

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS E ESTUDO DE ESTABILIDADE  
DE LINEZOLIDA EM COMPRIMIDOS

CRISTIANI LOPES CAPISTRANO G. DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

*DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE LINEZOLIDA  
EM COMPRIMIDOS*

CRISTIANI LOPES CAPISTRANO G. DE OLIVEIRA

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

**Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**

ARARAQUARA – SP

2009

## **Ficha Catalográfica**

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

**Oliveira, Cristiani Lopes Capistrano Gonçalves de**

O49d      Desenvolvimento de métodos analíticos e estudo de estabilidade de linezolidina em comprimidos. / Cristiani Lopes Capistrano Gonçalves de Oliveira. – Araraquara, 2009.

196 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.Linezolidina. 2.Oxazolidinonas. 3.Validação de métodos analíticos.  
4.Análise e Controle de medicamentos. 5.Estudo de estabilidade. I.Salgado, Hérica Regina Nunes, orient.. II.Título.

**CAPES: 40300005**

Cristiani Lopes Capistrano Gonçalves de Oliveira

*Desenvolvimento de métodos analíticos e estudo de estabilidade de linezolidina em comprimidos*

Comissão examinadora da tese para obtenção do grau de  
Doutor

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado  
Presidente/orientadora

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo

Profa. Dra. Magali Conceição Monteiro da Silva

ARARAQUARA – SP  
2009

*A DEUS, por iluminar minha vida, olhar por minha família e guiar meus passos sempre, dando-me forças, coragem, paciência, esperança e perseverança, em todos os momentos da minha vida.*

*"Orar não é pedir. Orar é a respiração da alma. Como o corpo que se lava não fica sujo, sem oração, se torna impuro."*

**Ghandi**

*Ao meu marido, Angelo, por estar sempre ao meu lado, me apoiando,  
amando e aguentando meu humor nada convencional.  
Aos meus grandes amores, meus filhos, Nathan e Sarah.*

*“As mais lindas palavras de amor são ditas no silêncio de um  
olhar”*

*Leonardo da Vinci*

# *Agradecimentos*

À minha orientadora, professora Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, que esteve comigo durante o mestrado e doutorado, e que durante este período, foi a grande responsável pelo meu crescimento e amadurecimento profissional. Ao meu lado, tinha mais que uma orientadora, tinha uma amiga.

*"Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade."*

*S. Tomás de Aquino*

À minha mãe, que desde o princípio esteve ao meu lado, me apoiando em todos os aspectos e principalmente, pelo amor dedicado a mim.

À minha irmã, pelo apoio e ajuda em muitos momentos difíceis que eu passei. Pelo amor incondicional por Nathan e Sarah.

Ao meu pai, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao meu sogro, Francisco das Chagas e Silva, e à minha sogra, Maria Creusa, pela ajuda emocional e apoio sempre constante, para que eu e Angelo realizássemos nosso sonho.

*"Diante de Deus, somos todos igualmente sábios e igualmente tolos"*

*Albert Einstein*

À minha tia Eunice, minha madrinha de crisma, pelo apoio incondicional, principalmente em orações em minha intenção.

A todos os meus familiares, que torceram por mim durante todo este tempo em que eu estive em São Paulo. Muito obrigada.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.  
Não na vitória propriamente dita”*

*Mahatma Gandhí*

A Arnóbio e Alianda, pela amizade, acolhimento e por compartilhar comigo e minha família momentos de alegria e convivência.

Aos meus amigos que torceram e me acompanharam durante este tempo aqui em São Paulo, em especial: Neiza, Alessandro, Flávio, Alessandra, Duda, Luana, Cynara, Venceslau, Alexandre, Camila e Rubiana. Em especial, minhas amigas de infância: Cynthia, Andréa, Cristina e Patrícia.

Aos meus amigos de laboratório, que dividiram comigo os anseios, tristezas e alegrias de trabalhar com pesquisa: Cristina Laignier, Flávia Fiorentino, Joceana, Karen, Marta, Adriana Takara, Adam, Marcelo, Daniela, Andrea Moreno, Hilris.

*"As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas,  
mas o seu eco é infundável."  
Madre Teresa de Calcutá*

Às estagiárias que trabalharam comigo neste período: Karen, Marta, Adriana, Eliane, Samária e Marília. Em especial, à Karen, Marta e Adriana pelo auxílio e amizade.

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

Aos Docentes do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, em especial aos professores: Prof. Dr. Luís Vitor Sacramento, Profa. Dra. Chung Man Chin, Prof. Dr. Raul César Evangelista, Profa. Dra. Virgínia Scarpa, Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Profa. Rose Miere Pietro e Profa. Raquel Moreira.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, por conceder o espectrofotômetro, para a realização de estudos em espectrofotometria.

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

Aos funcionários da biblioteca de Farmácia, sempre muito solícitos e dispostos a ajudar.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

*“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

A linezolida é o primeiro antimicrobiano da classe das oxazolidinonas comercializado mundialmente. O espectro de ação desta molécula envolve a ação contra bactérias gram-positivas, anaeróbias, bem como, *Mycobacterium tuberculosis*. Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos analíticos para linezolida, incluindo métodos físico-químicos e microbiológicos, realizar estudos de dissolução e de estabilidade, bem como dispor de técnicas de identificação para linezolida na forma farmacêutica comprimido e matéria-prima. A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta (UV), espectrofotometria no Infravermelho (IV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e análise térmica, possibilitando a identificação das amostras. Os métodos de análise quantitativos empregados e validados foram: (i) espectrofotometria no UV a 251 nm, na faixa de concentração de 6,0 -16,0µg/mL no qual foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e seletividade, com teor médio nos comprimidos de 98,7 %; (ii) CLAE, coluna de C<sub>18</sub> e fase móvel composta por, ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25, V/V/V), apresentando ampla linearidade, precisão, exatidão e especificidade, com um teor médio obtido nos comprimidos de 101,36 %; (iii) determinação da potência microbiológica, pelo método de difusão em ágar cilindros em placa, utilizando cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 9372, em que o teor médio nos comprimidos foi 101,96%. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para um nível de significância de 1 %. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando água como meio de dissolução e pás a 50 rpm. O perfil de dissolução obtido foi satisfatório, e a cinética de dissolução calculada. Estudo preliminar de estabilidade de linezolida frente à degradação ácida, alcalina, oxidativa, térmica, fotolítica e em câmara climática (40° C/75%) mostrou a oxidação, a alcalinidade, a luz e o estudo em câmara climática como fatores importantes de degradação. O decaimento do teor de princípio ativo foram determinados após o armazenamento das amostras em câmara climática e espelhada com luz-UVC.

**Palavras-chave:** linezolida, oxazolidinones, validação de métodos analíticos, teste de dissolução, estudos de fotoestabilidade, produtos de degradação

## ABSTRACT

The antimicrobial agent linezolid is the first class of oxazolidinones marketed worldwide. The spectrum of action of this molecule involves action against gram-positive bacteria, anaerobic, and *Mycobacterium tuberculosis*. This work aims to develop analytical methods to quantify linezolid, including physical, chemical and microbiological tests, studies of dissolution and stability, as well as providing technical quality of identification for tablet and raw material. Qualitative analysis performed by thin layer chromatography, UV-spectrophotometry, IR-spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and thermal analysis, enabling the identification of samples. The methods of quantitative analysis employed and validated were: (i) UV spectrophotometry at 251 nm, in the range of concentration of 6.0-16.0 µg/mL which presented linearity, precision, accuracy and selectivity, with the average content in tablets of 98.7%, (ii) HPLC, using as stationary phase column of C<sub>18</sub> reversed-phase and mobile phase with the following composition, 1% acetic acid: methanol: acetonitrile (50:25:25, V/V/V), a wide linearity, precision, accuracy and specificity, with an average content obtained in tablets of 101.36%. (iii) Agar diffusion bioassay, using strains of *Bacillus subtilis* ATCC 9372, with the average content in tablets of 101,96 %. The results of assays were treated statistically by analysis of variance (ANOVA) and were found to be linear ( $r^2 = 0.9998$ ) in the selected range of 20-80 µg/mL. The proposed methods showed no statistical difference for a significance level of 1%. The dissolution test was developed and validated using water as a means of dissolution and blades to 50 rpm. The dissolution profile obtained was satisfactory. Preliminary study of stability of linezolid in acidic, alkaline, oxidative, thermal, photolytic and climatic chamber (40°C/75%) conditions, showed that oxidation study in the light exposure and climate chamber as important factors of degradation. The decay of the content of active principle were determined after storage of samples in a climatic chamber and mirror with light-UVC.

**Keywords:** linezolid, oxazolidinones, analytical methods validate, dissolution test, photostability, degradation products, quality control

# SUMÁRIO

	Lista de Figuras.....	xiii
	Lista de Tabelas.....	xviii
	Lista de Abreviaturas.....	xxi
1	<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	1
2.	<b>CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	4
3.	<b>CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	14
3.1	Introdução.....	14
3.2	Parte experimental.....	18
3.2.2.	<b>Análise qualitativa.....</b>	20
3.2.2.1.	Determinação do peso médio dos comprimidos de linezolida.....	20
3.2.2.2.	Determinação da faixa de fusão.....	22
3.2.2.3	Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho.....	23
3.2.2.4.	Análise térmica de linezolida.....	27
3.2.2.5.	Cromatografia em camada delgada.....	30
3.2.3.	<b>Análise quantitativa .....</b>	37
3.2.3.1.	Espectrofotometria na região ultravioleta.....	37
3.2.3.2.	Doseamento microbiológico.....	54
3.2.3.3.	Método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência .....	65
3.2.4.	Análise comparativa dos métodos.....	82
3.3	Discussão geral.....	84
3.4	Conclusão .....	87
4.	<b>CAPÍTULO IV – TESTE DE DISSOLUÇÃO.....</b>	88
4.1.	Introdução.....	88
4.2.	Material.....	94
4.3.	Teste de dissolução.....	94
4.4	Validação do teste de dissolução.....	98

4.4.1.	Estabilidade e especificidade das soluções.....	99
4.4.2.	Precisão.....	102
4.5.	Estudo da cinética de dissolução .....	113
4.6	Conclusão.....	119
5.	<b>CAPÍTULO V – ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....</b>	120
5.1.	Introdução.....	120
5.2.	Parte experimental.....	126
5.2.1.	Estudo preliminar da estabilidade de linezolida.....	126
5.2.2.	Estudo de fotodegradação de linezolida .....	161
5.2.3.	Estudo da cinética de fotodegradação utilizando CLAE.....	172
5.2.4.	Estudo da estabilidade de linezolida em câmara climática.....	176
5.2.5.	Discussão geral.....	181
5.2.6.	Conclusão.....	183
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	184

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Estrutura química de linezolida.....	6
Figura 2.2.	Relação estrutura-atividade de linezolida.....	7
Figura 2.3	Estrutura química do metabólito PNU 142300.....	8
Figura 2.4	Estrutura química do metabólito PNU 142586.....	8
Figura 3.	Ilustração da variação dos vinte comprimidos de linezolida pesados.....	22
Figura 3.1	Espectro de absorção de infravermelho de LNZ-SR e LNZ-comp., com as bandas características de absorção.....	24
Figura 3.2	Curva de DSC de LNZ-SR e LNZ-comp., sob atmosfera de ar sintético, em razões de aquecimento de 5° C.....	27
Figura 3.3	Curva termogravimétrica de LNZ-SR e LNZ-comp. sob atmosfera de ar sintético, em razões de aquecimento de 5° C.....	28
Figura 3.4	Fotos dos cromatogramas de LNZ-SR (1), LNZ-comp. (2), LNZ-DEG (3) nos solventes dos sistemas 1, sistema 2, sistema 5 e sistema 6.....	33
Figura 3.5	Fotos dos cromatogramas de LNZ-SR(1), LNZ-comp. (2), LNZ-DEG(3) nos solventes dos sistemas 7, sistema 11, sistema 12 e sistema 15.....	34
Figura 3.6	Fotos dos cromatogramas de LNZ-SR (1), LNZ-comp. (2), LNZ-DEG (3), nos solventes do sistema 16 e sistema 17.....	35
Figura 3.7	Espectro de absorção de solução de LNZ-SR, na concentração de 20 µg/mL, por espectrofotometria na região do UV, utilizando água ultrapura, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.....	38
Figura 3.8	Espectro de absorção de solução de LNZ-SR, na concentração de 20 µg/mL, por espectrofotometria na região do UV, utilizando metanol e etanol, com comprimento de onda máximo de 256 nm.....	38
Figura 3.9	Espectro de absorção de solução de LNZ-SR, na concentração de 20 µg/mL, por espectrofotometria na região do UV, utilizando tampão fosfato pH 6,0, 7,4 e 8,0, com comprimento de onda máximo em 251 nm.....	39
Figura 3.10	Espectros sobrepostos de LNZ-SR e LNZ-comp., em água ultrapura na concentração de 12 µg/mL, com comprimento de onda máximo em 251 nm.....	39
Figura 3.11	Curva de Ringbom para LNZ-SR (concentração de 1,0 a 40,0 µg/mL).....	46
Figura 3.12	Representação gráfica da curva analítica das soluções de linezolida em concentrações de 6,0 a 16,0 µg/mL usando o método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 251 nm...	48
Figura 3.13	Espectro de absorção de LNZ-SR em concentração de 20 µg/mL e os excipientes obtidos por espectrofotometria na região UV a 251 nm.....	52
Figura 3.14	Delineamento 3 x 3 demonstrando a disposição das soluções padrão ( <b>P</b> ) e amostra ( <b>A</b> ) na placa de Petri, onde P <sub>1</sub> (20,0 µg/mL); P <sub>2</sub> (40,0 µg/mL); P <sub>3</sub> (80,0 µg/mL) e A <sub>1</sub> (20,0 µg/mL); A <sub>2</sub> (40,0 µg/mL); A <sub>3</sub> (80,0 µg/mL).....	56
Figura 3.15	Curva analítica de LNZ-SR obtida no doseamento microbiológico em difusão em ágar, cilindros em placa.....	61

Figura 3.16	Cromatograma obtido por CLAE para solução de LNZ-SR (12 µg/mL). Fase móvel: ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25 V:V:V); coluna Symmetry Waters C <sub>18</sub> , 5 µm, 250 x 4,6 mm; tempo de retenção ≅ 4,50 min.....	66
Figura 3.17	Cromatograma obtido por CLAE para solução de comprimido de linezolida (12 µg/mL). Fase móvel: ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25 V:V:V); coluna Symmetry Waters C <sub>18</sub> , 5 µm, 250 x 4,6 mm; tempo de retenção ≅ 4,50 min.....	67
Figura 3.18	Representação gráfica da curva analítica das soluções de linezolida em concentrações de 8,0 a 20,0 µg/mL por cromatografia líquida de alta eficiência.....	74
Figura 3.19	Cromatograma da degradação ácida forçada de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) em meio ácido (HCl 0,1 M) após uma hora.....	77
Figura 3.20	Cromatograma da degradação alcalina forçada de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) em meio alcalino (NaOH 0,1 M) após uma hora.....	77
Figura 3.21	Cromatograma da degradação de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) em meio oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%) após uma hora.....	78
Figura 3.22	Cromatograma da degradação de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) na luz ultravioleta por 72 horas utilizando metanol como solvente.....	78
Figura 3.23	Cromatograma da degradação de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) na luz ultravioleta por 48 horas utilizando metanol como solvente, em meio básico.....	79
Figura 4.1	Perfis de dissolução de comprimidos de linezolida utilizando pás a 50 rpm e HCl 0,1 M e água como meios de dissolução, analisados por CLAE.....	96
Figura 4.2	Perfis de dissolução de comprimidos de linezolida utilizando pás a 50 rpm e HCl 0,1 M e água como meios de dissolução, analisados por espectrofotometria no UV.....	96
Figura 4.3	Perfil de decaimento de linezolida nas primeiras 24 horas de avaliação de sua estabilidade nos meios de dissolução.....	100
Figura 4.4	Cromatograma da amostra placebo, em água.....	100
Figura 4.5	Espectro de absorção da amostra placebo, em água.....	101
Figura 4.6	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	103
Figura 4.7	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 1, usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	104
Figura 4.8	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 2, usando água como meio e velocidade..	105
Figura 4.9	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 1 e 2, usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	106
Figura 4.10	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).....	108
Figura 4.11	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 1, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).....	109

Figura 4.12	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).....	110
Figura 4.13	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelos analistas 1 e 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm, analisados.....	111
Figura 4.14	Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo método em CLAE e UV, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm.....	112
Figura 4.15	Modelos propostos (A) – reação de ordem zero; (B) reação de primeira ordem; (C) modelo de Higuchi, obtidos por CLAE.....	115
Figura 4.16	Modelos propostos: (A) – reação de ordem zero; (B) reação de primeira ordem; (C) modelo de Higuchi, obtidos através de espectrofotometria no UV.....	116
Figura 5.1	Cromatograma linezolida em comprimidos, na concentração de 12,0 µg/mL, representando a degradação em meio ácido por 1 hora.....	130
Figura 5.2	Cromatograma de linezolida-comprimido, na concentração de 12,0 µg/mL, representando a degradação em meio básico por 1 hora.....	131
Figura 5.3	Cromatograma de linezolida-comprimido, representando a degradação oxidativa em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 % por 1 hora.....	132
Figura 5.4	Cromatograma ampliado de linezolida-comprimido, representando a degradação térmica em à 65°C, por 30 dias... ..	135
Figura 5.5	Cromatograma ampliado de comprimidos triturados de linezolida, na concentração de 12,0 µg/mL expostos durante 90 dias, em câmara climática (40° C/75%).....	136
Figura 5.6	Cromatograma de solução de LNZ-SR, em concentração de 100,0 µg/mL, utilizando CLAE acoplado a detector espectrofotométrico com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	137
Figura 5.7	Isograma de LNZ-SR, na concentração de 100,0 µg/mL, analisado em cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> , 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	138
Figura 5.8	Espectros de absorção na região do UV da solução de LNZ-SR, na concentração de 100,0 µg/mL, representando o isograma da Figura 5.7.....	139
Figura 5.9	Isograma de LNZ-comp, na concentração de 100,0 µg/mL, analisado em cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> , 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	140
Figura 5.10	Espectros de absorção na região do UV da solução de LNZ-comp, na concentração de 100,0 µg/mL, representando o isograma da Figura 5.9.....	141

Figura 5.11	Cromatograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, representando a degradação térmica em câmara climática (40°C/75%), de comprimidos triturados por 90 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	142
Figura 5.12	Espectro de absorção dos picos (1) e (2) relacionados ao cromatograma da Figura 6.11, com comprimento de onda equivalente a 221 nm (pico 1) e 253 nm (pico 2).....	143
Figura 5.13	Isograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, representando a degradação térmica em câmara climática, de comprimidos triturados por 90 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	144
Figura 5.14	Cromatograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, mostrando a degradação térmica em câmara climática (40°C/75%), de comprimidos triturados por 180 dias, utilizando CLAE com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	145
Figura 5.15	Espectro de absorção dos picos (1) e (2) relacionados ao cromatograma da Figura 5.14, com comprimento de onda equivalente a 221 nm (pico 1) e 253 nm (pico 2).....	146
Figura 5.16	Isograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, representando a degradação térmica em câmara climática, de comprimidos triturados por 180 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	147
Figura 5.17	Cromatograma de linezolida-comprimidos, em concentração 12,0 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias	150
Figura 5.18	Cromatograma de linezolida, em concentração de 12,0 µg/mL, representando o comprimido íntegro, exposto fora da embalagem, na câmara UV, durante 30 dias (A) e 60 dias (B)..	151
Figura 5.19	Cromatograma do comprimido triturado de linezolida, normal (A) e ampliado (B), em concentração de 12,0 µg/mL, representando a degradação fotoquímica em 60 dias, utilizando coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT e cromatógrafo Waters.....	152
Figura 5.20	Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	153
Figura 5.21	Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	154
Figura 5.22	. Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	155

---

Figura 5.23	Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	156
Figura 5.24	Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C <sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.....	157
Figura 5.25	Proposta da estrutura química do produto de degradação formado (PD1).....	159
Figura 5.26	Teor de LNZ-comp, no período correspondente a 90 dias, exposta ao fator luz UVC (254 nm), determinado por CLAE.....	164
Figura 5.27	Cromatogramas ampliados de exposição de comprimidos de linezolida (LNZ) na luz UVC, nos dias, 1 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D) e 30 (E), mostrando os possíveis produtos de degradação (PD).....	165
Figura 5.28	Análise do teor de linezolida, no período correspondente de 90 dias, exposta ao fator luz UVC – 254 nm, analisadas por espectrofotometria na região UV.....	167
Figura 5.29	Análise da potência de linezolida, no período correspondente de 90 dias, exposta ao fator luz UVC – 254 nm, analisadas por doseamento microbiológico.....	168
Figura 5.30	Análise comparativa do teor de decaimento dos comprimidos de linezolida, expostos à luz-UVC, analisados por CLAE, por doseamento microbiológico e espectrofotometria no UV.....	169
Figura 5.31	Estrutura química de linezolida e os possíveis grupos orgânicos atingidos durante a exposição por 90 dias.....	171
Figura 5.32	Gráficos correspondentes as ordens de reação: (A) reação de ordem zero; (B) reação de primeira ordem; (C) reação de segunda ordem de linezolida residual em função do tempo. Os coeficientes de regressão encontram-se demonstrados.....	174
Figura 5.33	Análise do teor de linezolida, no período correspondente de 180 dias, exposta em câmara climática (40° C/75%), analisadas por CLAE.....	178
Figura 5.34	Cromatogramas ampliados dos comprimidos triturados de linezolida, em câmara climática (40° C/75%), nos períodos de 5 (A), 30 (B), 45 (C), 60 (D), 75 (E) e 90 (F) dias.....	179

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos encontrados na literatura para determinação de linezolida em fluidos biológicos e forma farmacêutica, utilizando CLAE.....	11
Tabela 3	Relação do peso individual dos comprimidos de linezolida, o peso médio e o respectivo desvio padrão relativo.....	19
Tabela 3.1	Valores do ponto de fusão obtidos para linezolida-SQR.....	20
Tabela 3.2	Bandas do espectro na região de infravermelho.....	29
Tabela 3.3	Sistemas de fases móveis testados para LNZ-SQR e LNZ-comp.....	38
Tabela 3.4	Concentração das soluções do teste de recuperação aplicado à amostra de linezolida usando método espectrofotométrico na região UV a 251 nm.....	43
Tabela 3.5	Composição da amostra dos excipientes.....	44
Tabela 3.6	Valores obtidos para construção da curva de Ringbom com LNZ-SR.....	45
Tabela 3.7	Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para linezolida.....	47
Tabela 3.8	Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva analítica de linezolida por espectrofotometria na região UV.....	49
Tabela 3.9	Parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de linezolida.....	50
Tabela 3.10	Valores obtidos no teste de recuperação de LNZ-SR utilizando espectrofotometria UV a 251 nm.....	50
Tabela 3.11	Valores experimentais de linezolida, obtidos por espectrofotometria na região UV e a precisão do método representado pelo desvio padrão relativo.....	51
Tabela 3.12	Parâmetros testados para otimização do ensaio microbiológico - método de difusão em ágar- cilindros em placas para linezolida.....	54
Tabela 3.13	Parâmetros usados no desenvolvimento e validação de linezolida no ensaio microbiológico.....	55
Tabela 3.14	Esquema de preparo das soluções para análise do teste de recuperação de linezolida no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa.....	59
Tabela 3.15	Valores médios obtidos no doseamento microbiológico de linezolida, em difusão em ágar cilindros em placa, para obtenção da curva analítica.....	60
Tabela 3.16	Análise de variância dos dados obtidos no doseamento de linezolida pelo ensaio microbiológico difusão em ágar - cilindros em placa.....	61
Tabela 3.17	Valores experimentais obtidos para o doseamento de linezolida através do ensaio microbiológico difusão em ágar cilindros em placa.....	62
Tabela 3.18	Valores experimentais obtidos no doseamento microbiológico de linezolida no teste de recuperação para o ensaio das três amostras (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> ).....	62
Tabela 3.19	Valores experimentais obtidos no teste de recuperação de linezolida no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa....	63
Tabela 3.20	Condições cromatográficas utilizadas no método por CLAE.....	66

Tabela 3.21	Esquema de preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de linezolida para método por CLAE.....	70
Tabela 3.22	Áreas absolutas obtidas para construção da curva analítica de LNZ-SR por CLAE.....	73
Tabela 3.23	Análise de variância das áreas obtidas na curva analítica de linezolida por CLAE.....	74
	Parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de linezolida.....	75
Tabela 3.25	Valores obtidos no teste de recuperação de LNZ-SR utilizando CLAE.....	75
Tabela 3.26	Valores experimentais obtidos para determinação de teor de linezolida em amostras comerciais através de CLAE.....	76
Tabela 3.27	Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando espectrofotometria na região UV, doseamento microbiológico e CLAE.....	83
Tabela 3.28	Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de linezolida em comprimidos, pelos métodos propostos.....	83
Tabela 4.1	Condições usadas no perfil de dissolução de comprimidos de linezolida.....	95
Tabela 4.2	Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6), usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).....	103
Tabela 4.3	Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n=6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 1, usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	104
Tabela 4.4	Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n=6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 2, usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	105
Tabela 4.5	Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n=6), usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	108
Tabela 4.6	Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n=6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 1, usando água como meio e velocidade de 50 rpm (pás).....	109
Tabela 4.7	Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).....	110
Tabela 4.8	Equações da meia-vida de dissolução (ks) de acordo com o modelo matemático correspondente.....	114
Tabela 4.9	Parâmetros calculados da cinética de dissolução de linezolida obtidos por CLAE .....	117
Tabela 5.1	Valores obtidos na quantificação de linezolida nos comprimidos triturados expostos à luz (254 nm), analisados por CLAE.....	163
Tabela 5.2	Resultados obtidos na quantificação de linezolida nos comprimidos triturados expostos à luz-UVC (254 nm), analisados por espectrofotometria na região ultravioleta, a 251 nm.....	166
Tabela 5.3	Resultados obtidos na quantificação de linezolida nos comprimidos triturados expostos à luz-UVC (254 nm), analisados por doseamento microbiológico.....	168
Tabela 5.4	Concentração residual de linezolida em comprimidos triturados após a fotodegradação em lâmpada UVC - 254 nm, utilizando o método CLAE.....	173
Tabela 5.5	Valores dos coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir de soluções dos comprimidos triturados de linezolida expostas à luz UVC-254 nm (20 W).....	173

---

Tabela 5.6	Constantes de velocidade de reação (k), equação da reta, coeficiente de correlação e tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) para linezolida após fotodegradação a 254 nm dos comprimidos triturados, por CLAE.....	175
------------	---	-----

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DSC: calorimetria exploratória diferencial

DPR: desvio padrão relativo

DP1: produto de degradação 1

DP2: produto de degradação 2

IV: infravermelho

LNZ-SR: linezolida substância de referência

LNZ-comp.: linezolida nos comprimidos

QM: quadrático

SQ: soma dos quadrados

SR: substância de referência

UV: ultravioleta

## 1. INTRODUÇÃO

As oxazolidinonas são uma nova classe de fármacos antimicrobianos, em que a linezolida é o primeiro fármaco deste grupo aprovado atualmente para ser comercializado em vários países, inclusive no Brasil, nas formas farmacêuticas comprimidos revestidos e solução injetável, com o nome de Zyvox®, pelo laboratório Pfizer Ltda. A comercialização foi liberada pela ANVISA em 06/04/2005. A linezolida possui farmacocinética com biodisponibilidade oral de aproximadamente 100%. Este antimicrobiano é específico para bactérias Gram-positivas, inclusive as bactérias meticilina-resistentes, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*. Um fator importante neste grupo de fármacos é o mecanismo de ação diferenciado das demais classes de antibióticos e antimicrobianos, demonstrando resultados satisfatórios na terapêutica.

Na literatura, são encontrados muitos relatos relacionados com sua atividade farmacológica, mas poucos métodos de análise para o fármaco em formas farmacêuticas. A maioria dos trabalhos envolve a determinação do fármaco em fluidos biológicos. Por ser um medicamento novo, há poucos estudos relacionados às características físico-químicas, estudo de estabilidade e métodos analíticos.

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para determinação do teor de princípio ativo, 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 ao paciente. Apesar da comprovada eficácia e segurança no seu tratamento, a linezolida, até então, não possui um método de análise padronizado em compêndios oficiais. Este fato justifica pesquisas nessa área para desenvolvimento e validação de métodos analíticos, bem como a análise químico-farmacêutica de comprimidos de linezolida e estudos de estabilidade.

Neste trabalho, foram realizadas análises qualitativas, utilizando espectrofotometria de IV e UV, análise térmica, cromatografia líquida de alta eficiência

e cromatografia em camada delgada, além de análises quantitativas, com o desenvolvimento e validação de três métodos analíticos para linezolida em comprimidos. Foram também realizados estudos do perfil de dissolução de linezolida, bem como estudos de estabilidade dos comprimidos de linezolida, utilizando câmara climática, com temperatura e umidade controlada, e câmara com luz ultravioleta, com objetivo de verificar o comportamento de degradação de linezolida frente a estes parâmetros.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.2. OBJETIVO GERAL**

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa de linezolida em comprimidos e a avaliação da estabilidade de comprimidos de linezolida.

#### **1.1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a faixa de fusão de linezolida substância de referência (SR).
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação de linezolida em comprimidos.
- Realizar análise térmica e termogravimétrica de linezolida-SQR e linezolida comprimidos.
- Desenvolver método por espectrofotometria na região ultravioleta (UV) e na região de infravermelho (IV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação de linezolida em comprimidos.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região UV para determinação quantitativa de linezolida em comprimidos.
- Desenvolver e validar método por CLAE para análise quantitativa de linezolida em comprimidos.
- Desenvolver e validar método microbiológico para linezolida em comprimidos.
- Realizar análise comparativa dos métodos quantitativos desenvolvidos e validados para análise de linezolida em comprimidos.
- Desenvolver e validar método de dissolução para comprimidos de linezolida.
- Avaliar a estabilidade preliminar de linezolida comprimidos frente à degradação ácida, básica, oxidativa, térmica e fotolítica.
- Realizar estudos de estabilidade em câmara climática e na luz UVC.

---

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Propriedades farmacológicas

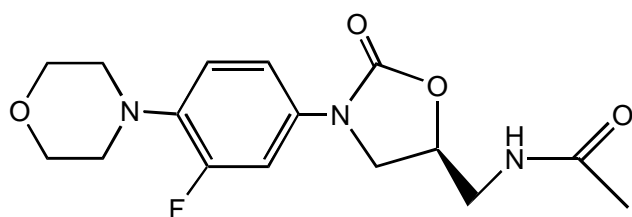
O aumento na incidência de infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, bem como *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, continua aumentando mundialmente (DOERN et al., 1998). Na década atual, na Inglaterra, aproximadamente 42% dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* são resistentes à meticilina, comparando com a década anterior, que era de aproximadamente 2% (REACHER et al., 2000). No Japão, 60% das cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas são meticilina resistentes (HIRAMATSU et al., 1997). Na América Latina, 26,5 % dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* são meticilina resistentes (MENDES et al., 2003). No Brasil, foram realizados estudos em hospitais com isolados clínicos de enterococos resistentes à vancomicina e de estafilococos. A linezolida foi o composto mais ativo pesquisado, mostrando 100 % de inibição contra cepas resistentes (REIS et al., 2001; SADER et al., 2001).

A linezolida possui um espectro de atividade que envolve bactérias Gram-positivas (YAGI e ZURENKO, 1997; BAUM et al., 2002; BEHRA-MIELLET et al., 2003; YAGI e ZURENKO, 2003; LIVERMORE, 2003; KRUEGER et al., 2004), enterococos multi-resistentes (BOSTIC et al., 1998; MUTNICK et al., 2002; JONES et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (WILCOX, 2003; JONES et al., 2007), *Streptococcus pneumoniae* (JONES et al., 2007), *Streptococcus pyogenes* (LLOYD et al., 2007). Desde o lançamento de Zyvox® (produto comercial que contém a linezolida como princípio ativo), o monitoramento da atividade de linezolida em alguns continentes (Europa, Ásia, Austrália, América Latina, América do Norte), vem sendo realizado. O objetivo deste monitoramento é verificar o espectro de linezolida, bem como o possível surgimento de cepas resistentes. Nas avaliações realizadas, os microrganismos mais comumente testados foram: *Staphylococcus aureus* (54,0%), *Staphylococcus coagulase negativo*, enterococos, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* do grupo

viridans, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Nestes levantamentos, foi verificado que linezolida possuía atividade contra todas as cepas testadas (BALLOW et al., 2002; ROSS et al., 2005; JONES et al., 2007; ROSS et al., 2007).

ALCALÁ e colaboradores (2003) estudaram a atividade de linezolida contra isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, susceptíveis ou resistentes a fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose. No estudo, linezolida apresentou atividade *in vitro* contra todas as cepas testadas, inclusive as resistentes aos medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose. Um trabalho científico que corrobora com esta atividade é o de PASCUAL e colaboradores (2002), que pesquisaram a atividade intracelular de linezolida em células fagocitárias e não fagocitárias humanas, verificando que este fármaco possui rápida penetração nestas células. Outros trabalhos na literatura ratificam a atividade de linezolida contra *Mycobacterium tuberculosis* resistente a vários fármacos (FORTÚN et al., 2005; ERTURAN e UZUN, 2005; LIPPE et al., 2006; TATO et al., 2006).

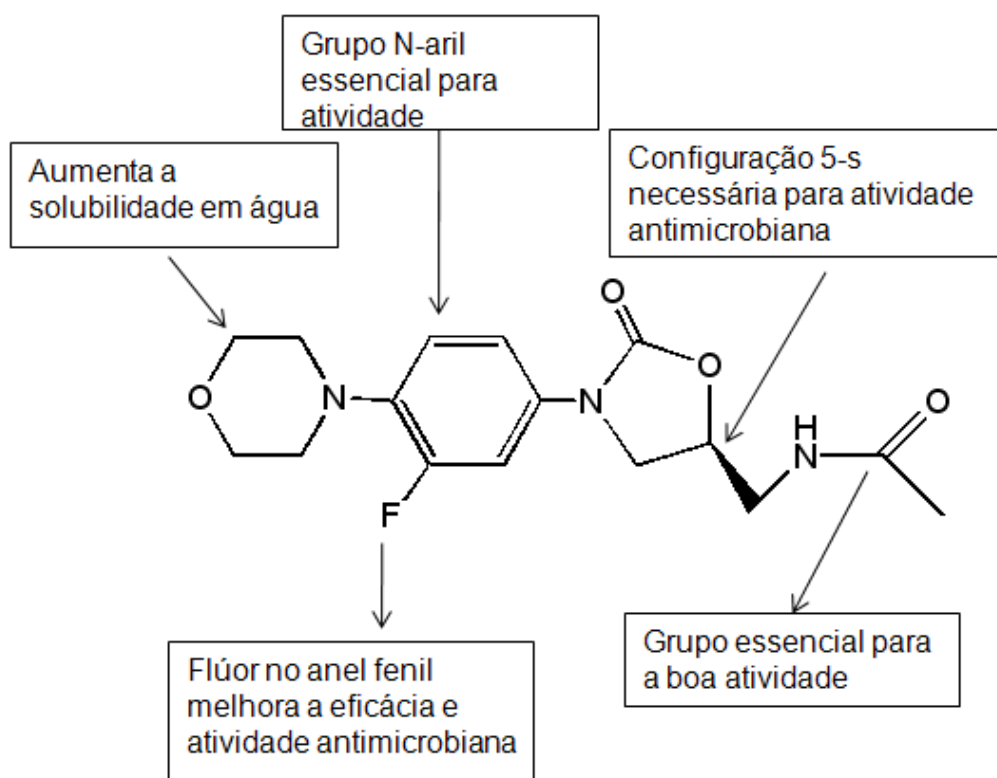
Devido a elevadas incidências de bactérias multiresistentes, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos ou antibióticos efetivos para tratar estas infecções têm sido alvo de intensas pesquisas na área farmacêutica. As oxazolidinonas correspondem a uma nova classe de agentes antimicrobianos, que possuem um mecanismo de ação único, exclusivo dos fármacos desta classe. A linezolida (Figura 2.1) é um inibidor da síntese de proteínas (SHINABARGER et al., 1997), atuando na interrupção que envolve a translação da banda *N*-formilmetionil-RNA<sub>t</sub> para o ribossomo 70S. Esta atuação é um contraste para os outros antimicrobianos no mercado, com mecanismo de ação atuando na síntese protéica, possuindo como alvo a fase de alongação na síntese de proteínas (ZURENKO et al., 2001).



**Figura 2.1.** Estrutura química de linezolida.

O benefício do novo mecanismo de ação da linezolida está no fato que microrganismos resistentes a outros antimicrobianos não apresentam resistência para esta molécula. Foi realizado um estudo que demonstrou claramente que a linezolida não possui resistência cruzada com outros fármacos que atuam inibindo a síntese protéica (incluindo macrolídeos, cloranfenicol, lincosamidas, aminoglicosídeos e tetraciclina). Neste estudo foram avaliadas cepas isoladas protegidas com os genes que conferem resistência a este antimicrobiano (FINES e LECLERCQ, 2000).

A Figura 2.2 apresenta a relação entre estrutura e atividade de linezolida (BARBACHYN e FORD, 2003):



**Figura 2.2.** Relação estrutura-atividade de linezolid.

O substituinte amino (doador de elétrons) no anel fenil, pode conferir melhor atividade antimicrobiana e ajuda a manter um bom perfil de segurança. O flúor confere uma boa absorção oral e aumenta a atividade antimicrobiana. O anel morfolínico aumenta a solubilidade em água. A administração oral de comprimidos de linezolid possui biodisponibilidade de quase 100%, e a concentração máxima (C<sub>max</sub>) no plasma, ocorre de 1 a 2 horas após a administração oral do comprimido. A linezolid possui uma baixa ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 31%) e é livremente distribuída nos tecidos (ELIOPOULOS, 2003). O volume de distribuição no estado de equilíbrio em adultos voluntários saudáveis é de 0,5-0,6 L/kg, aproximando-se do volume total de água no corpo, sendo também bem distribuído no tecido adiposo, ósseo e muscular (SLATTER et al., 2001).



linezolida 600 mg. Duas horas depois da administração do antimicrobiano, o humor aquoso foi aspirado e testado, obtendo-se níveis para concentração inibitória mínima de 90% das cepas de *Staphylococcus epidermidis* analisadas (VASQUEZ et al., 2004).

PELÁEZ e colaboradores (2002) pesquisaram a atividade *in vitro* de linezolida contra anaeróbios como o *Clostridium difficile*. Essa bactéria é a maior causa de infecções diarreicas e colites pseudomembranosas em pacientes hospitalizados (BARBUT et al., 1996). Neste estudo, os autores demonstraram que a linezolida é ativa contra isolados clínicos susceptíveis e não susceptíveis aos fármacos tradicionais. Em estudos realizados em pacientes com disfunção renal, verificou-se que não há necessidade de alteração na dose, destes pacientes, pois o fármaco é removido por hemodiálise (BRIER et al., 2003). GARAZZINO e colaboradores (2007) relataram o aparecimento de mielosupressão reversível, quando o tratamento de linezolida é prolongado. STANTON e colaboradores (2002) concluíram que a linezolida causa uma mielosupressão tempo-dependente leve e reversível. Segundo os autores os benefícios do tratamento suplementam o potencial risco, pois a eficácia em infecções sérias por bactérias Gram-positivas, principalmente por patógenos resistentes a vários antimicrobianos, assegura o tratamento, desde que ocorra monitoramento sanguíneo.

Um tratamento experimental utilizando linezolida e gentamicina em modelos animais para debelar endocardites ocasionadas por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente foi relatado. Os autores concluíram que linezolida juntamente com gentamicina são adequadas para utilização em tratamentos de endocardites (JACQUELINE et al., 2004). Na literatura, foram encontrados alguns relatos da utilização de linezolida em pacientes com endocardite. Em todos os casos relatados, a linezolida mostrou-se eficaz no tratamento desta enfermidade (RAVINDRAN et al., 2003; BASSETI et al., 2004; NATHANI et al., 2005; MUNOZ et al., 2006; WAREHAM et al., 2006; MYLONA et al., 2007).

## 2.2. Propriedades físico-químicas

### 2.2.1. Descrição:

Nome químico: (s)-N-[[3-[3-fluoro-4(4-morfolinil) fenil]-2-oxo-5-oxazolidinil] metil] acetamida

Sigla: PNU 100766

Fórmula molecular:  $C_{16}H_{20}FN_3O_4$

Massa molecular: 337,35

Ponto de fusão: 181,5° C – 182,5° C

Número no Chemical Abstracts: 165800-03-3

Denominação Comum Brasileira: 04150.01-5

## 2.3. Métodos analíticos para a determinação de linezolida

A Tabela 2 apresenta os métodos para determinação de linezolida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas.

**Tabela 1.** Métodos encontrados na literatura para determinação de linezolida em fluidos biológicos e forma farmacêutica, utilizando CLAE

<b>Matriz</b>	<b>Coluna</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Deteção (nm)</b>	<b>tr* (min)</b>	<b>Referência</b>
Plasma/ tecidos	Kromasil, 150 mm x 4,6 mm, C8 (5 µm)	Água-acetonitrila (80:20)	254	10,4	BA et al., 2007
Plasma/ líquido broncoalveolar	Zorbax Eclipse XDBC8 (3 mm x 100 mm, 3,5 µm)	Água com 0,4 % de trietilamina:acetonitril a pH 4,0-gradiente	254	15,0	TOUTAIN et al., 2004
Plasma	Spherimage-80 RP-18 ODS2 5 µm, 125 mm x 4 mm	Tampão acetato de sódio (25 mM, pH 5)/ACN 80:20	251	5,0	BUERGER et al., 2003
Soro humano	Hypersil 5ODS 10 mm x 4,6 mm	Ácido <i>orto</i> -fosfórico 1%:metanol 30%, 2g/L de ácido sulfônico heptano pH 5,0	254	6,5	TOBIN et al., 2001
Fluido de diálise peritoneal	Hypersil 5 ODS 10 mm x 4,6 mm	Ácido <i>orto</i> -fosfórico 1%:metanol 30%, 2g/L de ácido sulfônico heptano pH 4,5	254	6,0	TOBIN et al., 2003
Plasma/ e tecidos	Atlantis dC18 column (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Acetonitrila e ácido e ácido trifluoracético 0,1%- gradiente	254/ 292	16,0	CAVAZOS-ROCHA et al., 2007
Comprimidos	Phenomenex 5 µm, ODS	Metanol:água (65:35) pH 3,5 (ácido acético)	240	2,8	BEBAWY, 2003 <sup>a</sup>
Matéria-prima e forma farmacêutica	250x 4,6 mm Chiralpak AD (Daicel) 10 µm	Método A: hexano:2-propanol:TFA (80:20:0,1) Método B: hexano:etanol:TFA (65:35:0,1)	258	15 e 20	NARAYANA et al., 2003
Soro humano e urina	Nucleosil-100 5C18 (125 x 4 mm, 5 µm)	Acetonitrila:tampão acetato de sódio:água (180:100:720) ajustado a pH 3,7	250	6,7	BORNER et al., 2001
Plasma de animais	Zorbax RXC8, 4,6 x 150 mm, 5 µm,	Acetonitrila:água (20:80)	251	11,0	PENG et al., 1999
Soro e urina	Nucleosil C18 250 mm x 4,6 mm, 5µm	Metanol:água (50:50)	260	18,0	ERLICH et al., 2001

\*tr – tempo de retenção

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura, envolvendo este fármaco, está relacionada à quantificação em fluidos biológicos utilizando CLAE (Tabela 3.1) e eletroforese capilar (KITAHASHI e FURUTA, 2002; KITAHASHI e FURUTA, 2004). Poucos métodos utilizam a forma farmacêutica comprimidos para desenvolvimento e validação de linezolida.

NARAYANA e colaboradores (2003) validaram um método por CLAE utilizando coluna quiral para separação dos enantiômeros de linezolida. Em 2002, REDDY e colaboradores, isolaram e caracterizaram impurezas relacionadas ao processo, utilizando CLAE. BEBAWY (2003b) desenvolveu métodos para determinar a estabilidade de linezolida na presença de substâncias alcalinas que induziam produtos de degradação. MACCARONI e colaboradores (2008) estudaram técnicas para identificação e quantificação das formas polimórficas II e IV de acordo com as informações preliminares da patente na literatura. Em 2007, foi desenvolvido e validado um método em CLAE, utilizando coluna de fase reversa, e um método espectrofotométrico UV para análise de comprimidos e solução injetável de linezolida (PATEL et al., 2007).

Os métodos analíticos têm por objetivo fornecer informações confiáveis quanto à natureza e à composição dos materiais submetidos à análise. Sabe-se, entretanto que, um certo grau de variabilidade está atrelado a todas as avaliações. Portanto, um dos objetivos da garantia de qualidade é manter em patamar mínimo esta variabilidade. A validação é parte importante do programa de garantia de qualidade, 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, também ocorrer conforme as boas práticas de laboratório (BPL), do inglês, *Good Laboratory Practices* (GLP). Nesta década, a ANVISA, na Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003, divulgou aspectos relacionados à validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003).

A escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada, em determinada forma farmacêutica. Precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade (ERMER, 2001; USP 31, 2008) são características fundamentais de um método analítico, porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional também devem ser consideradas.

As Farmacopéias Americana (USP, 2008) e Britânica (BP, 2001) fazem referência à validação analítica de forma destacada, incluindo a definição dos termos e parâmetros analíticos envolvidos nos ensaios de validação. Os atributos do método analítico ou parâmetros de validação estão descritos em inúmeras publicações (VESSMAN, 1996; WOOD, 1999; ERMER, 2001; HEYDEN et al., 2001; PERSON e VESSMAN, 2001). A ICH (*The International Conference on the Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) estabelece requerimentos em duas diretrizes: no primeiro documento orienta definições de características sobre validação necessária para vários tipos de procedimentos e no segundo documento inclui dados experimentais requeridos e algumas interpretações estatísticas (ICH, 2005).

A introdução de métodos analíticos exige a adoção de procedimentos de validação que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação. O desenvolvimento de métodos que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade destes produtos, tanto no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional, como em farmácias magistrais públicas e privadas.

---

### 3.1. INTRODUÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004). Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de métodos analíticos e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (ICH, 1995; BRASIL, 2003; USP 31; 2008).

A descrição dos parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método, segundo USP 31 (2008), ICH (2005) e a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003), estão relacionados abaixo:

- **Especificidade/seletividade:** é a capacidade do método de determinar exatamente a substância em análise, na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e excipientes presentes na forma farmacêutica. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiver disponível, podem-se comparar os resultados dos testes das amostras

contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo métodos farmacopéicos ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

➤ **Precisão:** A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Este procedimento analítico é usualmente expresso como desvio padrão relativo. A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

- **Repetibilidade (intra-dia):** refere-se ao procedimento analítico realizado no mesmo laboratório, em curto período de tempo, com o mesmo analista e mesmo instrumento.

- **Precisão intermediária (inter-dia):** está relacionada com variações no mesmo laboratório, obtidos com diferentes analistas, diferentes dias, diferentes equipamentos, etc.

- **Reprodutibilidade:** procedimentos analíticos realizados em laboratórios diferentes (estudos colaborativos, geralmente aplicado para padronização de métodos analíticos).

➤ **Exatidão:** A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Pode ser determinada pela aplicação do teste de recuperação, em que se adiciona quantidade conhecida de substância química de referência na amostra e calcula-se o percentual recuperado pelo método; pela comparação dos resultados do método proposto com os obtidos por um método já caracterizado, cuja exatidão, tenha sido estabelecida, como por

---

exemplo, um método farmacopéico, ou ainda pode ser inferida, uma vez estabelecida a precisão, linearidade e especificidade do método.

- **Linearidade:** É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade deve ser realizada com no mínimo cinco níveis de concentrações diferentes.
- **Limite de detecção:** é a menor quantidade que uma substância presente em uma amostra, pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para determinação do limite de detecção, a seguinte fórmula é utilizada:

$$LD = 3,3 \sigma/S$$

Em que:

$\sigma$  = inclinação da curva analítica

S = desvio padrão do intercepto

- **Limite de quantificação:** representa a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais especificadas. Para determinação do limite de quantificação, a seguinte fórmula é utilizada:

$$LQ = 10 \sigma/S$$

Em que:

$\sigma$  = inclinação da curva analítica

S = desvio padrão do intercepto

- **Robustez:** é a capacidade que o método possui em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para desenvolvimento de métodos espectrofotométricos, pode-se realizar as seguintes variações: variação do pH da solução, temperatura e diferentes fabricantes de solventes. Em métodos cromatográficos as seguintes variações são utilizadas para verificar a robustez do método: variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel.

A escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada, em determinada forma farmacêutica. Precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade são características fundamentais de um método analítico (ERMER, 2001; USP 31, 2008), porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional podem também ser consideradas. A validação envolve não apenas os procedimentos do processo produtivo, mas todos os métodos empregados no controle de qualidade, incluindo a comparação do método estudado com o método oficial ou outro método anteriormente validado.

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram validados para a determinação quantitativa de linezolida, em comprimidos, sendo eles: a espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), doseamento microbiológico e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, foram realizados testes qualitativos para identificação de linezolida nos comprimidos e matéria prima.

---

## 3.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Material

#### 3.2.1.1. Substância de referência (SR)

Foi utilizada linezolida, substância de referência, com teor estimado em 99,3% e identificado pelo lote A-1131-178. Substância adquirida pela empresa canadense “Synfine research”. Os certificados de análise encontram-se anexados (anexos 1, 2, 3, 4 e 5). Nome químico: linezolida (s)-N-[[3-[3-flúor-4-(4-morfolinil)-fenil]-2-oxo-5-oxazolidinil]metil] – acetamida (PENG et al., 1999). CAS: 165800-03-3 e DCB: 04150.01-5.

#### 3.2.1.2. Produto farmacêutico

Foram analisados comprimidos revestidos contendo 600 mg de linezolida (teor rotulado), sob nome comercial de Zyvox® e identificado pelo lote de número 44PTJ, data de fabricação 03/2006 e validade 03/2008. Medicamento produzido pelos Laboratórios Pfizer Ltda (Porto Rico, EUA). Os comprimidos foram adquiridos no Hospital escola da UNESP de Botucatu.

Fórmula unitária: linezolida (600 mg), celulose microcristalina, amido de milho, amidoglicolato de sódio, hiprolose, estearato de magnésio, cera de carnaúba, vermelho opaco FGE-15040 corante vermelho (impressão), opadry® branco YS-1-18202-A, água purificada, álcool isopropílico e/ou álcool SD 3A (Bula de Zyvox).

#### 3.2.1.3. Equipamentos

- Agitador de Tubos, PHOENIX, modelo AP56
- Autoclave (PHOENIX)
- Aparelho de ponto de fusão Logen, modelo LS III Basic
- Balança analítica (METTLER, modelo H10).
- Cubetas de quartzo de 1 cm
- Coluna symmetry waters C18, 5µm, 250 x 4,6 mm

- 
- Coluna Phenomenex C18, 5µm, 250 x 4,6 mm
  - Cromatógrafo líquido da marca Waters, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detetor UV-Vis Waters 2487, coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 4,6 x 250 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 3,9 x 20 mm
  - Espectrofotômetro Hewlet Packard Mod. 8453, com software chemstation UV – visível
  - Espectrofotômetro infravermelho (IV) Bomem BM modelo 102
  - Estufa bacteriológica (ODONTOBRÁS, modelo ECB 1.2)
  - Estufa de esterilização (NOVA ÈTICA)
  - Equipamento SDT Q600 – TA para análise térmica
  - Membranas de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro
  - Micropipetas, BOECO
  - Módulo DSC 2910 (TA Instruments), com taxa de aquecimento programável de 0,01 a 200° C/min, sensibilidade máxima de 0,2 µW.
  - Paquímetro (STARRET, modelo digital eletrônico série 727).
  - Placas de sílica-gel F<sub>254</sub> (20 x 20 cm), com espessura de 0,25 mm (MERCK)
  - Seringa HAMILTON, 100µL

#### 3.2.1.4. Solventes, matérias-primas e reagentes

- Água ultrapura – água Milli-Q
- Acetonitrila (J.T.Baker)
- Ácido acético (MERCK)
- Ácido fórmico (Synth, Brasil)
- Ágar nº 11 (Merck, Alemanha)
- Butanol (Synth, Brasil)
- Clorofórmio (Merck, Alemanha)
- Cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> - (Merck, Alemanha)

- Diclorometano (Merck, Alemanha)
- Etanol (Synth, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico (Reagen, Brasil)
- Membrana de nylon 0,45 µm de diâmetro
- Metanol (MERCK)
- Metanol grau HPLC (J.T.Baker)

### **3.2.2. Análise qualitativa**

#### *3.2.2.1. Determinação do peso médio dos comprimidos de linezolid*

##### *3.2.2.1.1. Método*

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopéia Brasileira IV (1988). Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos. Para comprimidos contendo peso médio acima de 250 mg, a variação de peso permitida é  $\pm 5,0 \%$ .

## 3.2.2.1.2. Resultados e discussão

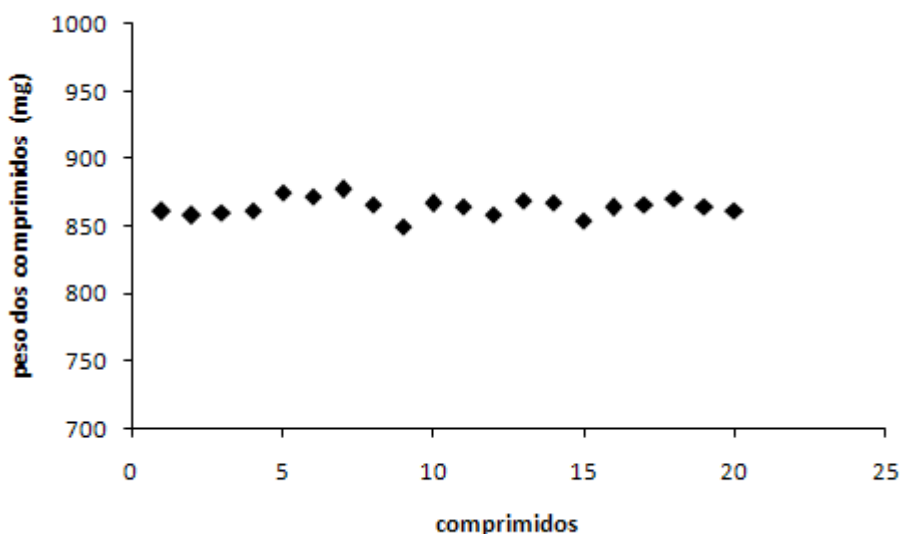
A Tabela 3 relaciona o peso individual de vinte comprimidos com o peso médio e o desvio padrão relativo.

**Tabela 3.** Relação do peso individual dos comprimidos de linezolida, o peso médio e o respectivo desvio padrão relativo

comprimido	peso individual (mg)	peso médio (mg)	desvio padrão	DPR* (%)
1	860,9			
2	858,0			
3	860,0			
4	861,7			
5	874,9			
6	871,6			
7	877,4			
8	865,7			
9	850,1			
10	867,0			
11	864,7	864,42	6,709349	0,78
12	858,5			
13	869,5			
14	867,4			
15	853,7			
16	864,0			
17	866,4			
18	870,4			
19	864,7			
20	861,8			

\*DPR – desvio padrão relativo

A Figura 3 ilustra a variação dos vinte comprimidos de linezolida (LNZ-comp.) pesados.



**Figura 3.** Ilustração da variação dos vinte comprimidos de linezolida pesados.

As variações de peso dos comprimidos de linezolida encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (1988). Neste caso, a variação permitida é  $\pm 5,0\%$ , peso máximo 881,80 mg e peso mínimo 847,04 mg. O desvio padrão relativo (DPR) apresentou um valor dentro das especificações. O peso médio foi realizado para verificar se os comprimidos encontravam-se dentro dos parâmetros farmacopéicos.

#### 3.2.2.2. Determinação da faixa de fusão

##### 3.2.2.2.1. Método

Uma pequena quantidade de linezolida-SR (LNZ-SR), previamente dessecada a 80°C durante 2 horas, foi introduzida em tubo capilar e, posteriormente, inserida na célula de aquecimento. Foram realizadas três determinações.

### 3.2.2.2.3. Resultados e discussão

A Tabela 3.1 mostra a faixa de fusão de LNZ-SR.

**Tabela 3.1.** Valores do ponto de fusão obtidos para LNZ-SR.

Ensaio	Faixa de fusão (°C)
1	185°C
2	183°C
3	185°C
<b>média ± e.p.m*</b>	<b>184,3°C ± 1,0</b>

e.p.m – erro padrão da média

O ponto de fusão é uma avaliação físico-química útil na identificação de fármacos, pois fornece informações do grau de pureza e é utilizada para pesquisar a presença de possíveis contaminantes na amostra. Entretanto, esta técnica não possibilita à conclusão definitiva da identidade dos compostos, sendo necessária a execução de testes de identificação complementar.

A literatura descreve o ponto de fusão de linezolida entre 181,5 – 182,5° C (NARINA e SUDALAI, 2006). Os dados obtidos nestas análises tiveram como ponto de fusão médio o valor de 184,3°C. O ponto de fusão pode ter ficado fora de faixa, pois o equipamento pode estar descalibrado.

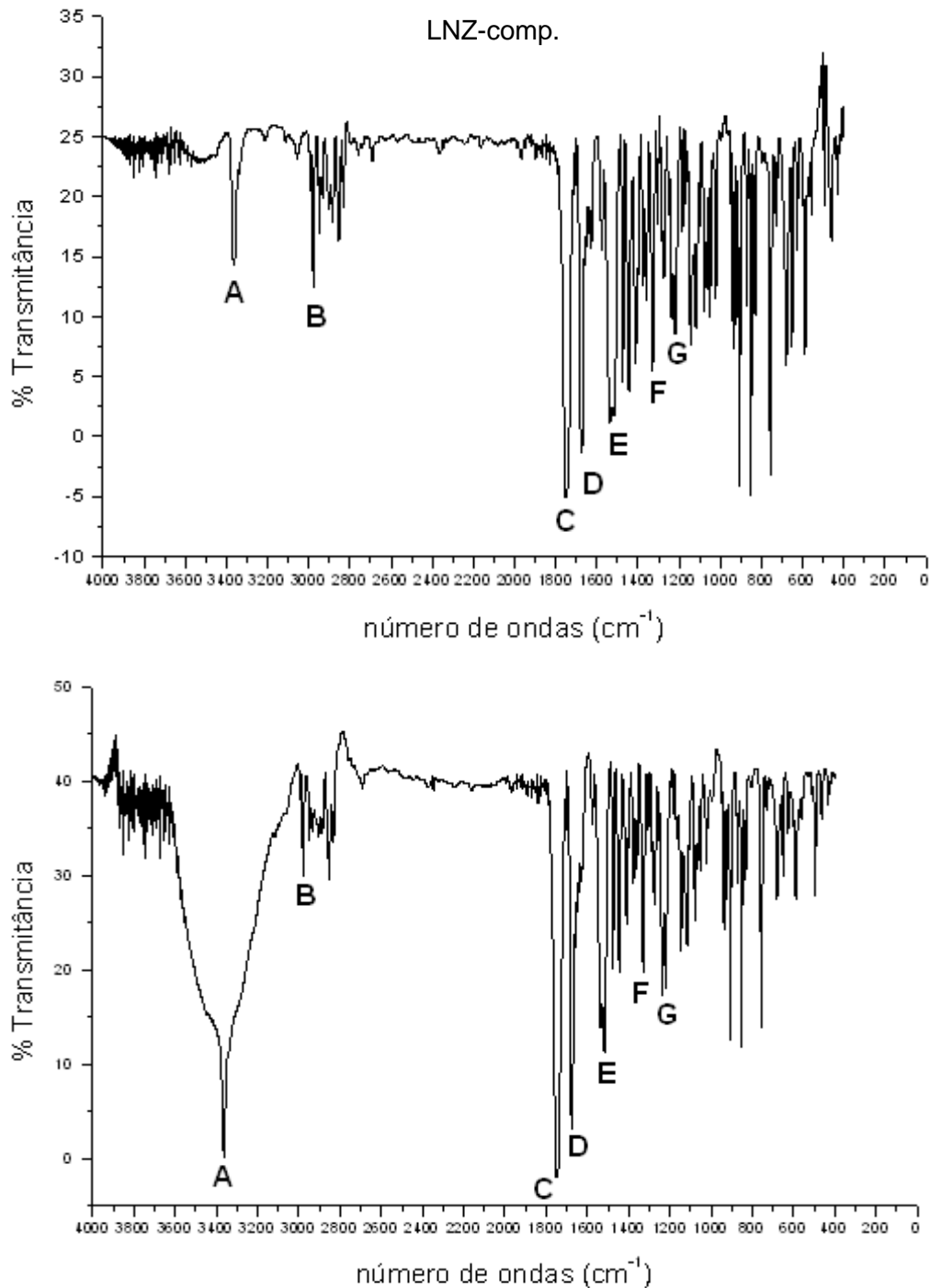
### 3.2.2.3. Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho

#### 3.2.2.3.1. Método

Os espectros foram obtidos com 2,0 mg de LNZ-SR e LNZ-comp., utilizando-se pastilhas de 150 mg de brometo de potássio dessecado a 105° C durante duas horas.

## 3.2.2.3.2. Resultados e discussão

A Figura 3.1 mostra o espectro de infravermelho de LNZ-SR e LNZ-comp., e a indicação das bandas de absorção características.



**Figura 3.1.** Espectro de absorção de infravermelho de LNZ-SR e LNZ-comp., com as bandas características de absorção. As deformações das bandas indicadas no espectro na região de IV, estão relacionadas na Tabela 3.2.

A Tabela 3.2 relaciona as deformações das bandas indicadas no espectro de absorção no infravermelho para LNZ-SR e LNZ-comp.

**Tabela 3.2.** Bandas do espectro na região de infravermelho com as respectivas deformações axiais

	Banda (cm <sup>-1</sup> ) 1)	Deformação axial	Região (cm <sup>-1</sup> )
A	3300	N - H	3500 – 3220
B	2960	C – H aromático	3100 – 2990
C	1760	C = O	1760
D	1695	C = O ligada N	1695 – 1650
E	1500	Deformação C=C de aromático	1650 – 1515
F	1320	C – N amina aromática terciária	1360 – 1310
G	1210	C – O - C	1200 - 1225

A espectrofotometria no IV é um método de identificação de excelência no controle de qualidade de medicamentos. Nos espectros obtidos para LNZ-SR e LNZ-comp. (Figura 3.1), pode-se observar a semelhança do espectro de LNZ-comp. com LNZ-SR, com bandas de absorção características.

A banda A (3300 cm<sup>-1</sup>), nos espectros de LNZ-SR e LNZ-comp., mostra uma deformação axial da ligação de N-H. A banda B (2960 cm<sup>-1</sup>) caracteriza-se pela deformação da ligação C-H relacionada ao grupo aril. A banda mais intensa no espectro é a banda C (1760 cm<sup>-1</sup>), que caracteriza o grupo carbonílico (C = O). A banda D (1695 cm<sup>-1</sup>) indica a ligação de nitrogênio ao grupo carbonila na estrutura química de linezolida (SILVERSTEIN et al., 1994).

Os dois espectros na região de IV para as duas substâncias foram praticamente idênticos, confirmando o propósito desta técnica, que é a identificação da molécula por comparação com um padrão de referência.

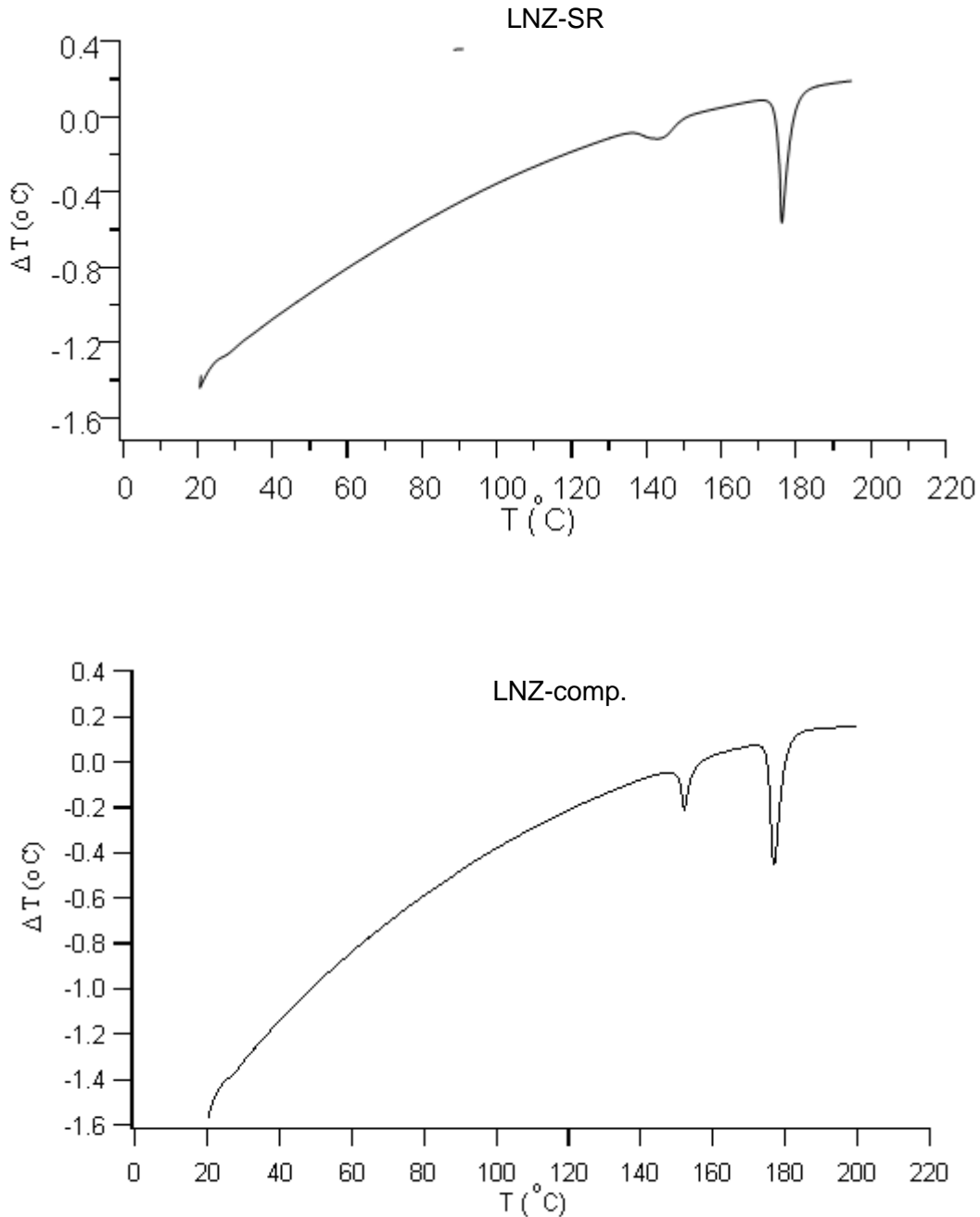
#### 3.2.2.4. Análise térmica de linezolid

##### 3.2.2.4.1. Método

As amostras, LNZ-SR e LNZ-comp., foram colocadas em frascos de vidro e secas em estufa a 95°C por oito horas. Foram pesados aproximadamente 20 mg de cada uma das amostras e colocadas em cadinhos de alumínio para realização das análises. Cada amostra foi analisada separadamente em aparelho de calorimetria exploratória diferencial, previamente calibrado de acordo com os seguintes parâmetros: razão de aquecimento de 5°C/minuto; variação de temperatura de 30-200°C e vazão de ar sintético a 50 mL/minuto. Utilizou-se cadinho de alumínio vazio no forno de referência.

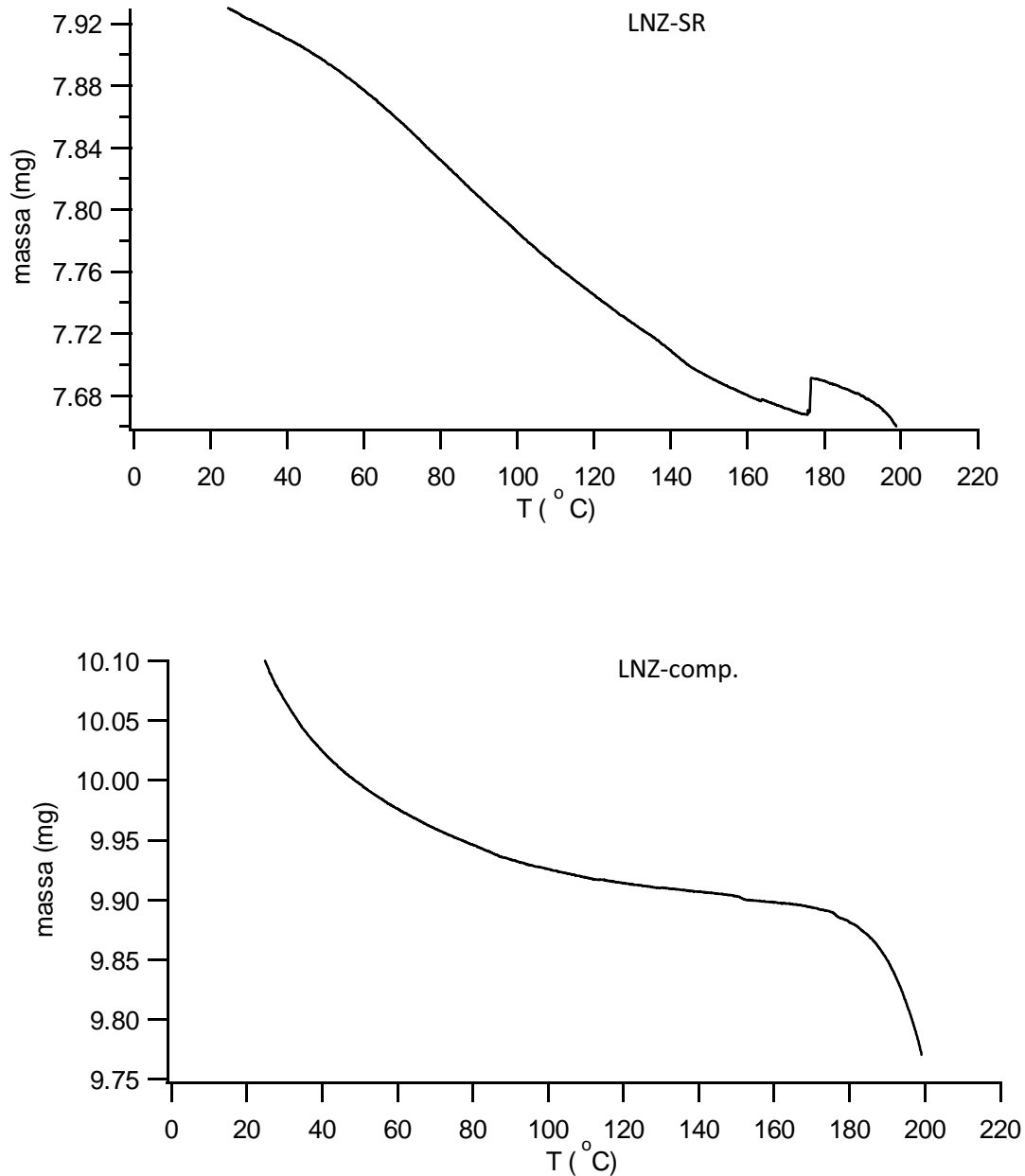
## 3.2.2.4.2. Resultados e discussão

A Figura 3.2 demonstra as curvas obtidas por análise térmica (DSC) de LNZ-SR e LNZ-comp.



**Figura 3.2.** Curva de DSC de LNZ-SR e LNZ-comp., sob atmosfera de ar sintético, em razões de aquecimento de 5°C.

A Figura 3.3 demonstra as curvas obtidas por termogravimetria (TG) de LNZ-SR e LNZ-comp.



**Figura 3.3.** Curva termogravimétrica de LNZ-SR e LNZ-comp. sob atmosfera de ar sintético, em razões de aquecimento de 5° C.

A análise térmica refere-se ao grupo de técnicas nas quais propriedades físico-químicas de uma substância são mensuradas em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura (GIRON et al., 2002). A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial a calorimetria exploratória diferencial e a termogravimetria, tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos (BUCKTON et al., 1991). As principais aplicações nessa área têm visado à caracterização de matérias-primas e produtos acabados (THOMPSON, 2000), caracterização de polimorfismo (IKEDA et al., 2005) determinação do grau de pureza (KSIQZCZAK et al., 2004) e a realização de ensaios de estabilidade e cinética de decomposição (HAN e SURYANARAYANAN, 1999; RODRIGUES et al., 2005).

Atualmente, o recurso da análise térmica no domínio farmacêutico é considerável, não só para o estudo do polimorfismo, mas também pela sua versatilidade em outras aplicações, tais como: (a) Estudos de compatibilidade fármaco-fármaco e fármaco-excipiente em pré-formulações; (b) Estudo de polimorfismo, compostos de inclusão e dispersões sólidas; (c) Determinação da pureza química; (d) Estudo de reações no estado sólido (estabilidade térmica e parâmetros cinéticos) e (d) Análise de formas farmacêuticas sólidas.

Em relação à curva de DSC para LNZ-SR, o pico endotérmico que caracteriza a linezolida encontra-se a 177-179° C. Não houve diferença, em relação ao pico endotérmico nos comprimidos, que obteve o mesmo ponto de fusão. Isto é um indicativo que não há interação fármaco excipiente. A DSC permitiu caracterizar e identificar linezolida nos comprimidos conforme é observado nas Figuras 3.2. Desta forma, a DSC pode ser utilizada nas monografias de fármacos em determinação da faixa de fusão de substâncias, permitindo a caracterização quanto a aspectos como pureza e polimorfismos (GIRON-FOREST et al., 1989). Foi realizada também a análise termogravimétrica de LNZ-SR e LNZ-comp. Observando-se a Figuras 3.3, pode-se concluir que a perda de massa de LNZ-SR e LNZ-comp. são praticamente

insignificantes, em torno de  $\pm 4,0\%$ , mostrando-se termoestável até a temperatura de  $180^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2.5. Cromatografia em camada delgada

#### 3.2.2.5.1. Método

As placas utilizadas para identificação do fármaco foram cromatofolhas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm), com espessura de 0,25 mm, adquiridas comercialmente e ativadas em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por uma hora.

Pesou-se 5,0 mg de LNZ-SR, previamente dessecados em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , por uma hora, transferindo para balão volumétrico de 50 mL, dissolvendo a solução com metanol, para obtenção de solução com concentração final de 100,  $\mu\text{g/mL}$ .

Pesou-se o equivalente a 50,0 mg de linezolida da amostra de comprimidos, transferindo-os para balão volumétrico de 50 mL, dissolvendo a solução em metanol, para obtenção de solução com concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Alíquota de 1,0 mL foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, para obtenção de solução com concentração de 100,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Pesou-se o equivalente a 50,0 mg de LNZ-comp. degradados na luz UVC por 30 dias, transferindo-os para balão volumétrico de 50 mL, dissolvendo a solução em metanol, para obtenção de solução com concentração final de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram testados os seguintes sistemas de fases móveis com solução-padrão, solução-amostra e solução de amostras degradadas em luz UVC por 30 dias de linezolida em placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Os sistemas testados foram os seguintes:

**Sistema 1:** clorofórmio : metanol : ácido fórmico (18:7:1) V:V:V

**Sistema 2:** diclorometano : metanol : ácido acético 5% : água (3:3:1:3) V:V:V:V

**Sistema 3:** diclorometano : metanol : acetonitrila : ácido acético 5% (6:4:4:2) V:V:V:V

**Sistema 4:** isopropanol : ácido acético : água (4:1:5) V:V:V

**Sistema 5:** ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25) V:V:V

---

**Sistema 6:** isobutanol : amônia:metanol (7:1:2) V:V:V.

**Sistema 7:** metanol : acetonitrila (70:30) V:V

**Sistema 8:** metanol : hexano (50:50) V:V

**Sistema 9:** clorofórmio : metanol (80:20) V:V

**Sistema 10:** isobutanol : amônia (9:1) V:V.

**Sistema 11:** metanol : isopropanol (80:20) V:V

**Sistema 12:** metanol : acetato de etila (85:15) V:V

**Sistema 13:** diclorometano : metanol : hidróxido de amônio (6:4:2) V:V:V:V

**Sistema 14:** n-Butanol : ácido acético : água (40:10:50) V:V:V

**Sistema 15:** isobutanol : amônia 25% (9:1) V:V.

**Sistema 16:** diclorometano : metanol : acetonitrila : ácido acético (6:4:2:2) V:V:V:V

**Sistema 17:** hexano : acetato de etila (50:50) V:V

Para o ensaio, procedeu-se, inicialmente, à saturação da placa com o sistema de fase móvel. Com auxílio de seringa de 25 µL foram transferidas as soluções de LNZ-SR, LNZ-comp. e LNZ-DEG. para as placas procedendo-se a cromatografia. Após migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, deixando o solvente evaporar. As placas foram reveladas na câmara UV, para a comparação das manchas quanto à forma, posição e tamanho. Foi determinado o R<sub>f</sub> do fármaco em cada análise.

#### 3.2.2.5.2. Resultados e discussão

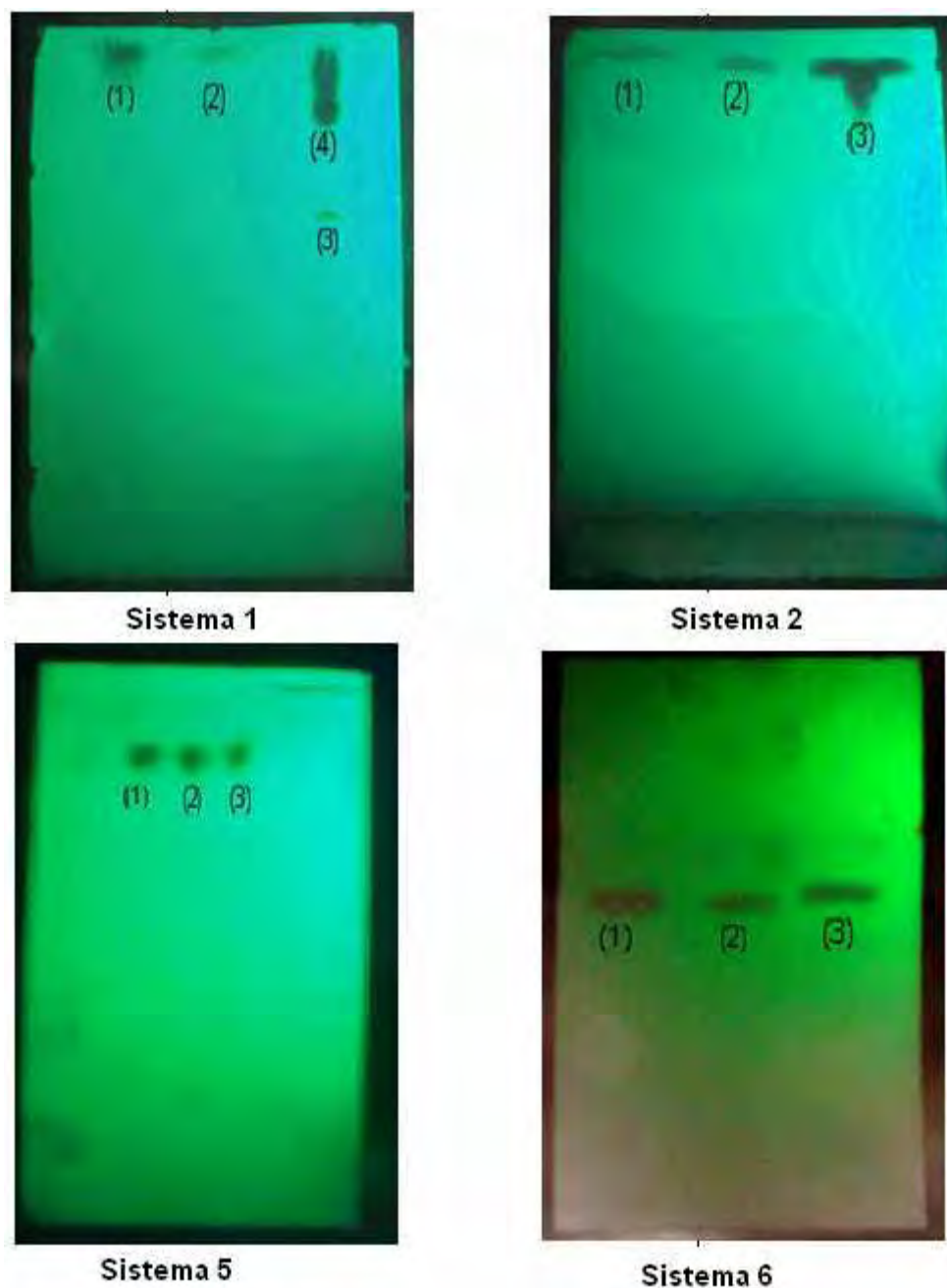
A Tabela 3.3 mostra os R<sub>f</sub> dos diversos sistemas solventes empregados na análise de LNZ-SR, LNZ-comp. e LNZ-DEG.

**Tabela 3.3.** Sistemas de fases móveis testados para LNz-SR, LNz-comp. e LNz-DEG.

	Sistema solvente	LNz-SR (Rf)	LNz-comp (Rf)	LNz- DEG.(Rf)
1	clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:7:1)	0,93	0,93	0,58/0,83
2	diclorometano: metanol: ácido acético 5 %: água (3:3:1:3)	0,92	0,92	*
3	diclorometano:metanol:acetonitrila:ácido acético (6:4:4:2)	0,90	0,90	*
4	isopropanol:ácido acético:água (4:1:5)	0,87	0,87	0,62*
5	ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25)	0,85	0,85	0,65
6	isobutanol:amônia:metanol (7:1:2)	0,79	0,79	*
7	metanol:acetonitrila (70:30)	0,77	0,77	0,59
8	metanol:hexano (50:50)	0,75	0,75	*
9	clorofórmio:metanol (80:20)	0,73	0,73	0,61
10	isobutanol:amônia 25% (9:1)	0,71	0,71	*
11	metanol:isopropanol (80:20) v:v.	0,71	0,71	0,58
12	metanol:acetato de etila (85:15)	0,71	0,71	*
13	diclorometano: metanol: hidróxido de amônio (6:4:2)	0,71	0,71	*
14	n-butanol: ácido acético: água (40:10:50)	0,57	0,57	0,46/0,33 *
15	isobutanol:amônia (9:1)	0,38	0,38	*
16	diclorometano: metanol: acetonitrila: ácido acético 5% (6:4:2:2)	0,36	0,36	*
17	hexano:acetato de etila (50:50)	0,10	0,10	*

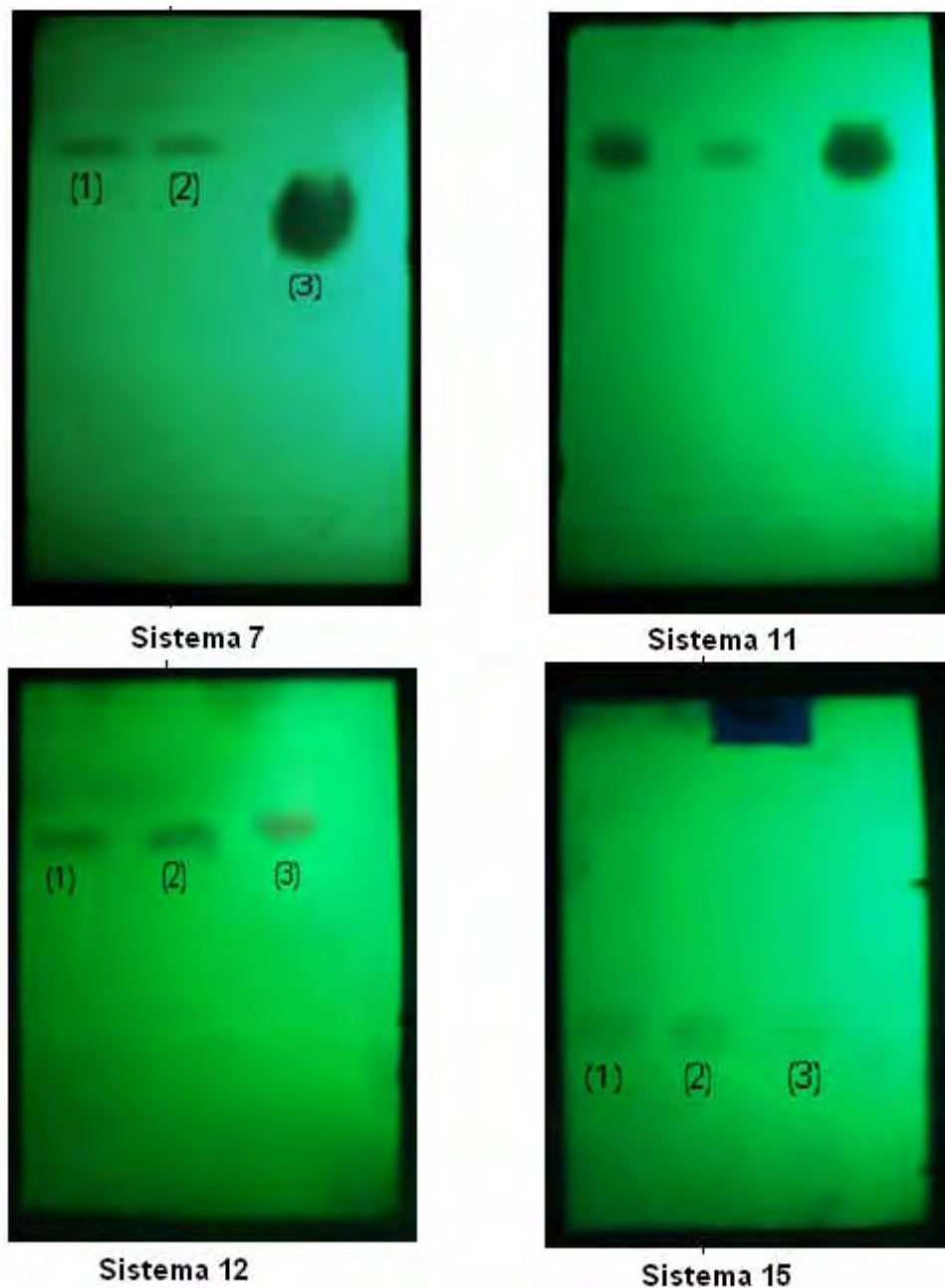
\*Não houve separação dos produtos de degradação

A Figura 3.4 mostra as fotos dos cromatogramas de LNZ-SR, LNZ-comp. e LNZ-DEG. nos solventes do sistema 1, sistema 2, sistema 5 e sistema 6.



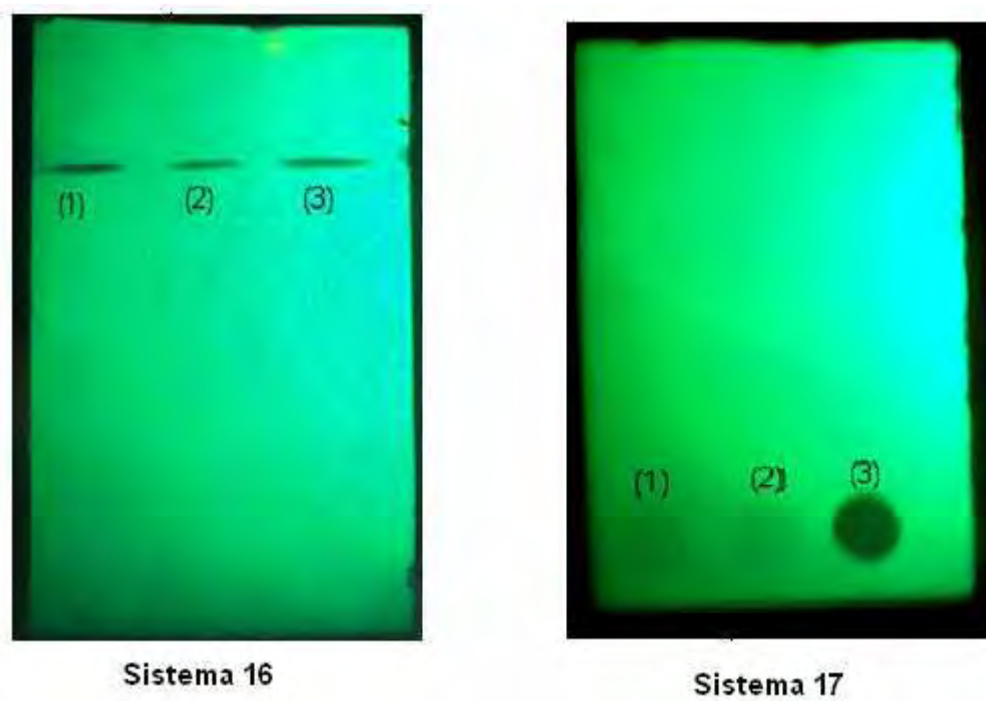
**Figura 3.4.** Fotos dos cromatogramas de LNZ-SR (1), LNZ-comp. (2), LNZ-DEG (3) nos solventes dos sistemas 1, sistema 2, sistema 5 e sistema 6.

A Figura 3.5 mostra as fotos dos cromatogramas de LNZ-SR, LNZ-comp. e LNZ-DEG. nos solventes do sistema 7, sistema 11, sistema 12 e sistema 15.



**Figura 3.5.** Fotos dos cromatogramas de LNZ-SR (1), LNZ-comp. (2), LNZ-DEG (3) nos solventes dos sistemas 7, sistema 11, sistema 12 e sistema 15.

A Figura 3.6 mostra as fotos dos cromatogramas de LNZ-SR, LNZ-comp. e LNZ-DEG. nos solventes do sistema 16 e sistema 17.



**Figura 3.6.** Fotos dos cromatogramas de LNZ-SR (1), LNZ-comp. (2), LNZ-DEG (3), nos solventes do sistema 16 e sistema 17.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica flexível, pois permite a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores, os quais são determinados de acordo com as características da amostra em teste.

Foi empregada com o objetivo de identificar a linezolida, nos comprimidos, e também para distinguir linezolida de possíveis produtos de degradação do fármaco, utilizando para isso vários sistemas solventes. A linezolida indica, no UV-longo, uma mancha bem característica, de intensidade de cor roxa, facilmente identificável. Através da análise da estrutura química da linezolida, podemos concluir que é uma molécula polar, com grupos funcionais orgânicos bem característicos.

A maioria dos sistemas solventes testados são adequados para identificar a linezolidina em comprimidos, com exceção do sistema 17, com  $R_f = 0,10$ , sistema notadamente mais apolar e os sistemas 2 ( $R_f = 0,92$ ), sistema 3 ( $R_f = 0,90$ ) e sistema 4 ( $R_f = 0,87$ ), sistemas muito polares, com valores de  $R_f$  muito elevados.

O sistema 17, hexano : acetato de etila ( $R_f = 0,10$ ) foi testada para identificar um possível produto de degradação de linezolidina mais apolar. Os outros sistemas solventes possuíam características mais polares, devido a isto, os  $R_f$ s foram satisfatórios para estas fases móveis.

Os sistemas testados, com algumas exceções, apresentaram a capacidade adequada de identificar linezolidina nos comprimidos, mas não foram capazes de identificar produtos de degradação nas amostras de comprimidos degradadas frente a luz UVC. Provavelmente, os produtos de degradação formados possuíam estruturas químicas muito semelhantes, dificultando a separação por CCD. O sistema solvente clorofórmio : metanol : ácido fórmico (sistema 1) foi capaz de identificar dois produtos de degradação nas amostras expostas à luz UVC por 30 dias. Neste sistema LNZ-SR possui  $R_f = 0,93$  e para os produtos de degradação  $R_f = 0,58$  e  $R_f = 0,83$ . A Figura 3.4 mostra a fotografia deste sistema. O produto de degradação com  $R_f = 0,83$  não se separou totalmente de LNZ-comp. nesta análise.

O sistema ácido acético : metanol : acetonitrila (sistema 5) mostra  $R_f$  para LNZ-SR equivalente a 0,85 e para o produto de degradação  $R_f = 0,65$ . A Figura 3.4 mostra o cromatograma do sistema solvente metanol : acetonitrila (sistema 7) com  $R_f = 0,77$  para LNZ-SR e  $R_f = 0,59$  para o produto de degradação. O sistema solvente clorofórmio : metanol (sistema 9) obteve para LNZ-SR  $R_f = 0,73$  e para LNZ-DEG.  $R_f = 0,61$ . O último sistema solvente com capacidade de diferenciar os produtos de degradação formado foi metanol : isopropanol (sistema 11) com  $R_f = 0,71$  para LNZ-SR e  $R_f = 0,58$  para LNZ-DEG (Figura 3.5).

Na literatura foram encontrados dois trabalhos com CCD, como objetivo de isolar o produto de degradação alcalina desta molécula. BEBAWY (2003a) desenvolveu e

---

validou dois métodos, um cromatográfico e outro espectrofotométrico, na presença de um produto de degradação alcalina, sendo isolado por CCD, utilizando como fase móvel isobutanol : amônia 25% (9:1). Tentou-se reproduzir esta fase móvel para separação dos produtos de degradação formados pela luz UVC, mas não se obteve sucesso.

A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta, com a qual é possível identificar a maioria das moléculas farmacêuticas. Além disso, é de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. O método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação de linezolida na forma farmacêutica, e o melhor sistema desenvolvido e adequado para identificação de produtos de degradação foi o sistema 1.

### **3.2.3. Análise quantitativa**

#### *3.2.3.1. Espectrofotometria na região ultravioleta*

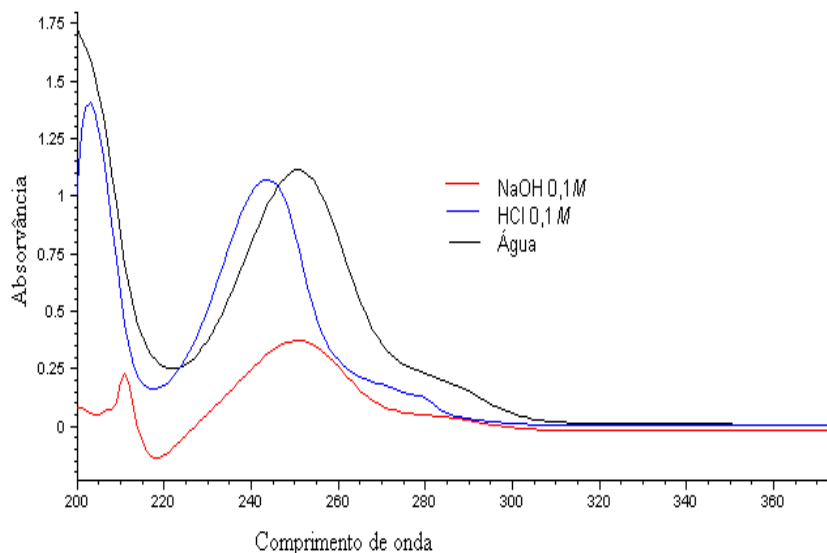
##### *3.2.3.1.1. Espectro de absorção de LNZ-SR*

O espectro de absorção de LNZ-SR foi obtido em água ultrapura, em concentração de 20 µg/mL na região UV. As leituras foram realizadas entre 200–400 nm em espectrofotômetro Hewlet Packard Mod. 8453, com software chemstation UV – visível, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. O espectro de absorção no ultravioleta de LNZ-SR foi obtido em vários solventes: água ultrapura, metanol, etanol, tampão fosfato pH 6,0, 7,4 e 8,0, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M, em concentração de 20 µg/mL.

A identificação de linezolida nos comprimidos foi realizada por sobreposição dos espectros obtidos (LNZ-SR e LNZ-comp.) e comparação quanto ao seu perfil característico e comprimentos de onda.

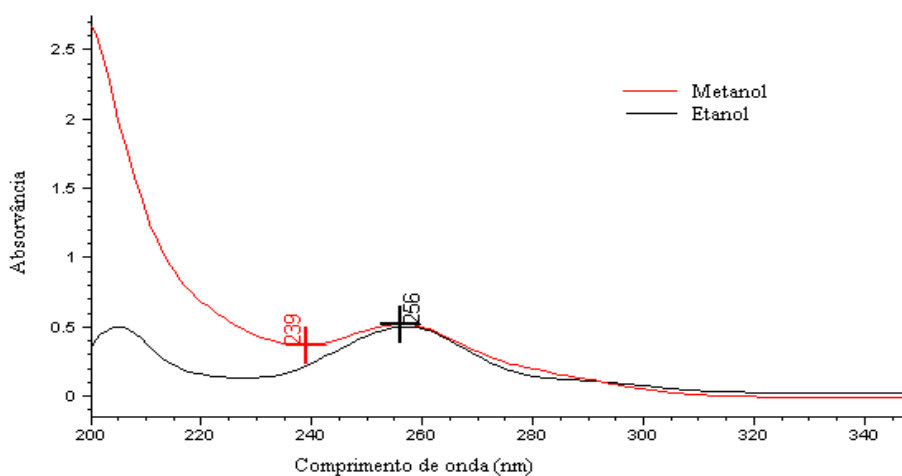
## 3.2.3.1.1.2. Resultados e discussão

A Figura 3.7 ilustra o espectro de absorção na região UV de LNZ-SR com concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  em água ultrapura, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.

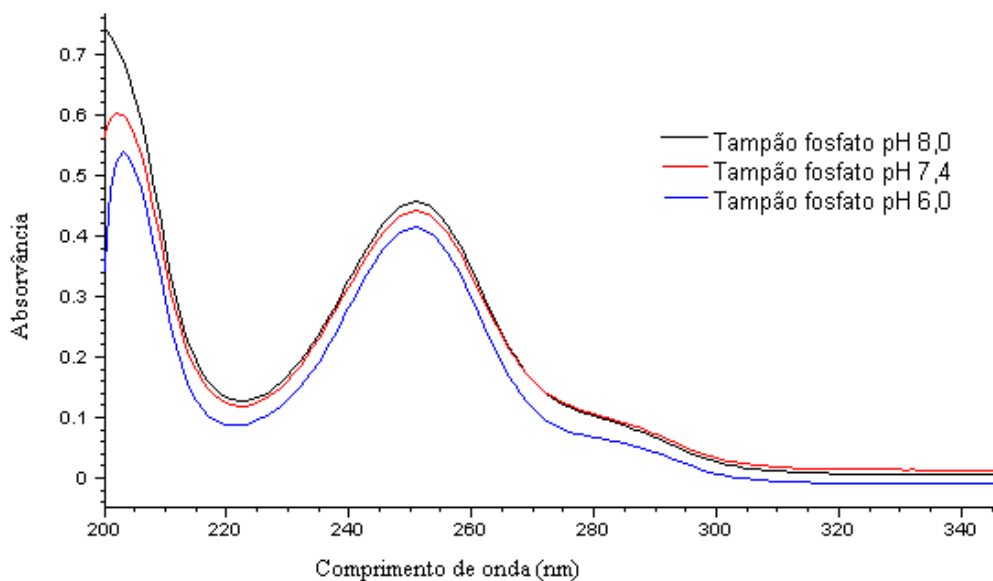


**Figura 3.7.** Espectro de absorção de solução de LNZ-SR, na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , por espectrofotometria na região do UV, utilizando água ultrapura, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.

O espectro de absorção na região UV de LNZ-SR em metanol e etanol com concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , está representado na Figura 3.8 e em tampão fosfato pH 6,0, 7,4 e 8,0 na Figura 3.9.

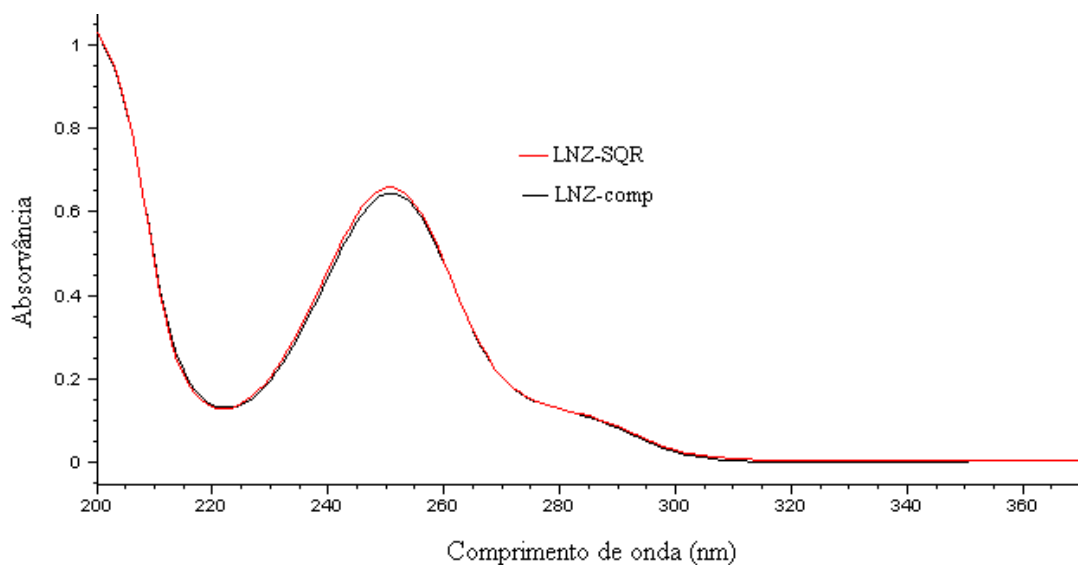


**Figura 3.8.** Espectro de absorção de solução de LNZ-SR, na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , por espectrofotometria na região do UV, utilizando metanol e etanol, com comprimento de onda máximo de 256 nm.



**Figura 3.9.** Espectro de absorção de solução de LNZ-SR, na concentração de 20 µg/mL, por espectrofotometria na região do UV, utilizando tampão fosfato pH 6,0, 7,4 e 8,0, com comprimento de onda máximo em 251 nm.

A Figura 3.10 mostra os espectros sobrepostos de LNZ-SR e LNZ-comp. em água em concentração de 12 µg/mL.



**Figura 3.10.** Espectros sobrepostos de LNZ-SR e LNZ-comp., em água ultrapura na concentração de 12 µg/mL, com comprimento de onda máximo em 251 nm.

A espectrofotometria na região do ultravioleta engloba uma série de aplicações na análise farmacêutica, destacando-se a identificação e quantificação de fármacos, a determinação do pKa, a determinação dos coeficientes de partição e solubilidade, e a determinação da liberação da substância ativa de uma formulação, como, por exemplo, no teste de dissolução (WATSON, 1999). O fármaco mostrou-se solúvel em água, metanol, etanol, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. Em NaOH 0,1 M, LNZ-SR apresentou um espectro de absorção sugestivo de degradação alcalina (Figura 3.7), pois, observa-se uma menor absorção e a formação de um pico em comprimento de onda de aproximadamente 214 nm. O pico de absorção máxima em HCl 0,1 M (244 nm) apresentou um deslocamento hipsocrômico, em relação à absorção em água (251 nm). Isto ocorre, provavelmente, devido ao efeito auxocrômico do solvente (HCl 0,1 M) sobre o cromóforo.

O metanol e o etanol apresentaram o mesmo comprimento de onda e um deslocamento batocrômico, em relação à absorção máxima em água (Figura 3.8). A absorção em soluções tampão fosfato pH 6,8, 7,2 e 8,0, demonstraram mesmo pico de absorção máxima de LNZ-SR em água (Figura 3.9). Neste caso, observa-se, que, em tampão fosfato pH 8,0, há uma maior absorção de linezolida. Os espectros de absorção obtidos na análise de LNZ-SR e de LNZ-comp., em água, demonstraram perfis similares, sugerindo a mesma identidade das amostras (Figura 3.10). Os espectros obtidos nos diferentes solventes foram todos satisfatórios, mas em água observa-se um espectro bem característico, em comprimento de onda adequado, em que não se verifica a interferência de solventes nas análises. Neste caso, preconizar a água como solvente de escolha para identificação de linezolida em comprimidos seria a opção mais adequada.

---

### 3.2.3.1.2. Método

Para validação do método por espectrofotometria na região UV foram determinadas as seguintes características:

- Linearidade: seis níveis de concentração foram avaliados. As curvas foram obtidas em três diferentes dias.

- Precisão: foram realizadas seis análises de linezolida nas amostras com concentração teórica de 12 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo de linezolida.

- Precisão intermediária: foi avaliada pela realização de análises das amostras por diferentes analistas e em três diferentes dias.

- Exatidão: foi determinada pelo teste de recuperação.

- Especificidade: foi avaliada pela possível interferência dos excipientes na determinação quantitativa de linezolida e foram comparados os espectros de absorção obtidos do fármaco e dos excipientes presentes nos produtos farmacêuticos.

- Limite de detecção e limite de quantificação: foram determinados pelas equações indicadas pelo ICH (1996).

#### 3.2.3.1.2.1. Obtenção da curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi obtida com o objetivo de estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região UV apresentava linearidade. Foram pesados, 10,0 mg de LNZ-SR, previamente dessecados em estufa a 105°C durante uma hora e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em água e mantida em ultrassom por 10 minutos. O volume do balão foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 100,0 µg/mL. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas para balões volumétricos, obtendo-se a curva com 19 pontos, com concentrações variando de 1,0 a 40,0 µg/mL de LNZ-SR. A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de transmitância e de concentração em escala logarítmica.

#### 3.2.3.1.2.2. Obtenção da curva analítica para linezolida utilizando água

Para a obtenção da curva analítica, foram pesados 10,0 mg de LNZ-SR, previamente dessecados em estufa a 105°C durante uma hora, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos em água ultrapura e mantidos em aparelho de ultrassom por 10 minutos, para melhor solubilização. Com a utilização de micro-bureta foram obtidas soluções com concentrações de 6,0 a 16,0 µg/mL de linezolida-SR. As leituras das soluções foram efetuadas a 251 nm, utilizando água ultrapura como branco. A curva analítica foi construída em três diferentes dias e em triplicata, utilizando o programa Origin 5.0. A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As absorvâncias utilizadas na determinação da curva analítica foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

#### 3.2.3.1.2.3. Determinação dos limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de linezolida foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média (ICH, 2005):

#### 3.2.3.1.2.4. Determinação de linezolida nos comprimidos

Foram pesados 20 comprimidos para a determinação do peso médio, o qual foi equivalente a 864,42 mg. foi pesado o equivalente ao peso médio dos comprimidos, triturado e transferido para balão volumétrico de 1000 mL. Foram adicionados 500 mL de água ultrapura e a solução foi mantida em aparelho de ultrassom por 20 minutos. O volume foi completado para a obtenção de solução com concentração de 600,0 µg/mL. Foram transferidas alíquotas de 10,0 mL para balões volumétricos de 100 mL e o volume completado com água (concentração teórica de 60,0 µg/mL). Desta solução, foram retiradas alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 25 mL e os volumes

foram completados com água para a obtenção de soluções com concentrações teóricas de 12,0 µg/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata.

As leituras das soluções foram realizadas em espectrofotômetro a 251 nm, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico empregando água como branco.

#### 3.2.3.1.2.5. Exatidão do método proposto

Foi preparada solução de LNZ-SR com concentração de 10,0 µg/mL. As soluções da amostra foram preparadas com concentração de 60,0 µg/mL, a partir da solução de linezolida em comprimidos com concentração de 600,0 µg/mL. As soluções foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água ultrapura. A Tabela 3.4 relaciona as concentrações das soluções obtidas para o teste de recuperação de LNZ-SR usando método espectrofotométrico na região UV.

**Tabela 3.4.** Concentração das soluções do teste de recuperação aplicado à amostra de linezolida usando método espectrofotométrico na região UV a 251 nm

	Solução amostra 60 µg/mL (mL)	Solução LNZ-SR 10 µg/mL (mL)	Concentração (µg/mL)
A	5,0	-	12,0
R <sub>1</sub>	5,0	1,0	12,4
R <sub>2</sub>	5,0	2,0	12,8
R <sub>3</sub>	5,0	3,0	13,2
P	-	6,0	12,0

#### 3.2.3.1.2.6. Avaliação da especificidade

Foi preparada solução de LNZ-SR na concentração de 12,0 µg/mL em água. Paralelamente, uma solução contendo os excipientes presentes nos comprimidos, foi preparada em água utilizando diluição equivalente à solução de LNZ-SR, em

conformidade com o peso médio dos comprimidos. A composição dos excipientes encontra-se na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Composição da amostra dos excipientes

Excipiente	Percentual (%)*
amido de milho	10
celulose microcristalina	80
estearato de magnésio	1
amidoglicolato de sódio	4
hipromelose	2

\*Determinadas de acordo com as especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000)

As soluções preparadas para o teste foram colocadas em banho de ultrassom por 20 minutos. Os espectros de absorção foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de linezolida.

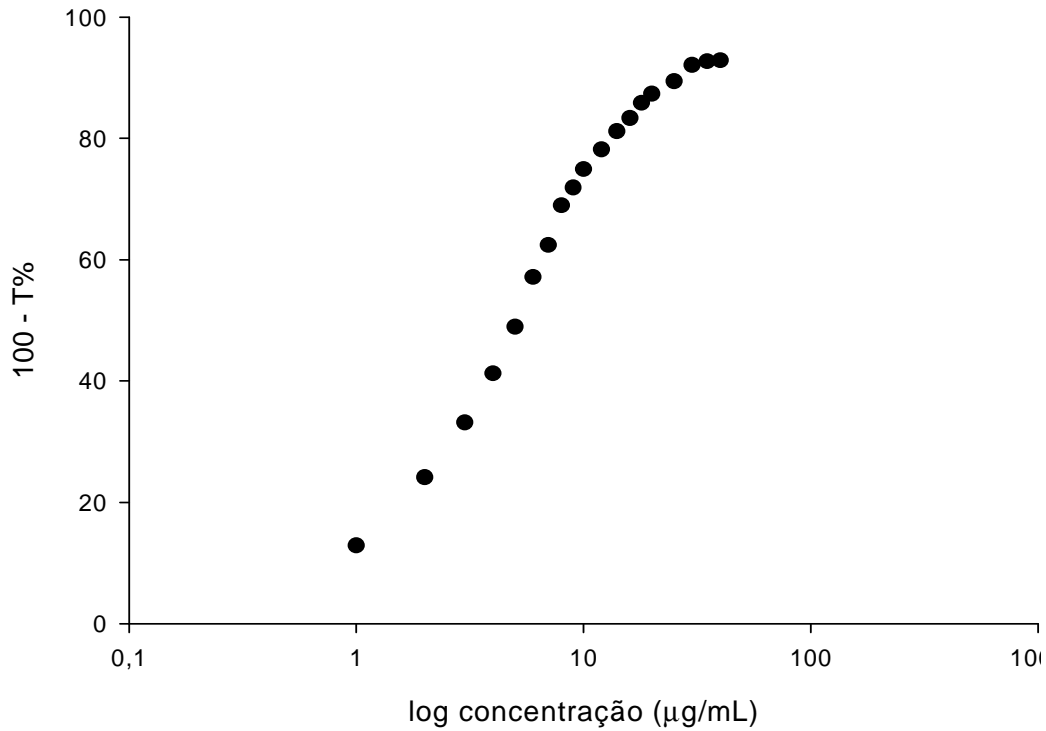
### 3.2.3.1.3. Resultados

#### 3.2.3.1.3.1. Curva de Ringbom de linezolida

A Tabela 3.6 relaciona os valores utilizados na construção da curva de Ringbom para LNZ-SR utilizando água ultrapura como solvente e a Figura 3.11, a curva de Ringbom correspondente.

**Tabela 3.6.** Valores obtidos para construção da curva de Ringbom para LNZ-SR

<b>Volume da solução de LNZ-SR</b>	<b>Concentração</b>	<b>100-T%</b>
<b>100<math>\mu</math>g/mL (mL)</b>	<b>(<math>\mu</math>g/mL)</b>	
0,1	1,0	12,89
0,2	2,0	24,13
0,3	3,0	33,15
0,4	4,0	41,24
0,5	5,0	48,92
0,6	6,0	57,13
0,7	7,0	62,41
0,8	8,0	68,95
0,9	9,0	71,88
1,0	10,0	74,93
1,2	12,0	78,16
1,4	14,0	81,16
1,6	16,0	83,33
1,8	18,0	85,85
2,0	20,0	87,34
2,5	25,0	89,40
3,0	30,0	92,08
3,5	35,0	92,70
4,0	40,0	92,85



**Figura 3.11.** Curva de Ringbom para LNZ-SR (concentração de 1,0 a 40,0 µg/mL).

#### 3.2.3.1.3.2. Construção da curva analítica de linezolida

A Tabela 3.7 mostra os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de LNZ-SR, utilizando água ultrapura como solvente, e a Figura 3.12 a curva analítica correspondente.

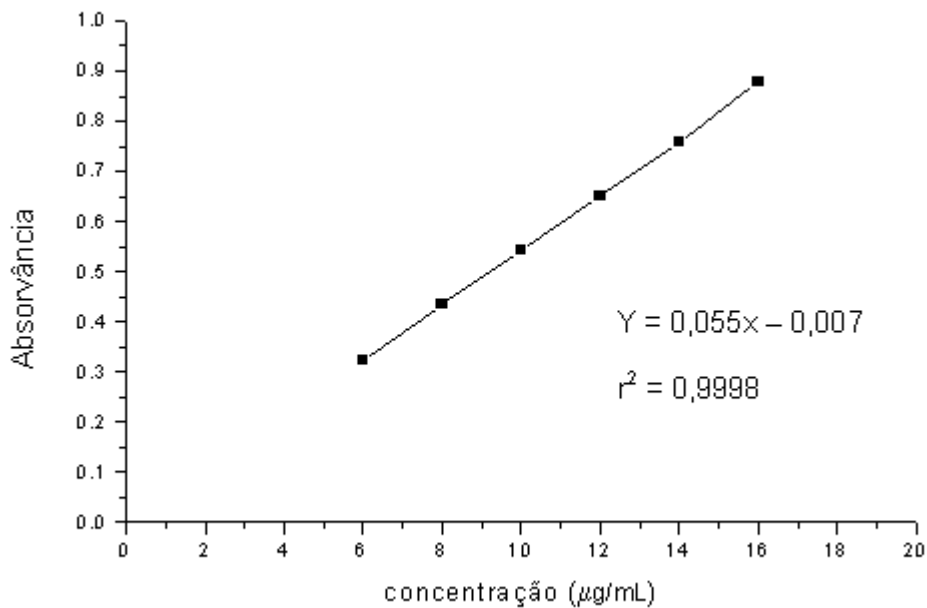
**Tabela 3.7.** Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para linezolida

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância*	Absorvância média $\pm$ e.p.m.	Desvio padrão	DPR%
6,0	0,320	0,323 $\pm$ 0,0033	0,0057	1,78
	0,330			
	0,320			
8,0	0,437	0,434 $\pm$ 0,0026	0,0046	1,06
	0,437			
	0,429			
10,0	0,543	0,544 $\pm$ 0,0026	0,0056	1,04
	0,551			
	0,540			
12,0	0,643	0,650 $\pm$ 0,0035	0,9358	0,01
	0,654			
	0,653			
14,0	0,763	0,759 $\pm$ 0,0041	0,0072	0,95
	0,764			
	0,751			
16,0	0,858	0,877 $\pm$ 0,0100	0,0173	1,97
	0,892			
	0,881			

\*Média de três leituras

e.p.m. - erro padrão da média

DPR% - desvio padrão relativo



**Figura 3.12.** Representação gráfica da curva analítica das soluções de linezolida em concentrações de 6,0 a 16,0 µg/mL usando o método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 251 nm.

#### 3.2.3.1.3.3. Análise estatística

A Tabela 3.8 representa a validade da regressão linear da curva analítica calculada utilizando análise de variância (ANOVA) dos valores de absorvância obtidos na curva analítica de linezolida usando o método espectrofotométrico na região UV.

**Tabela 3.8.** Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva analítica de linezolida por espectrofotometria na região UV

Fontes de variação	gL	Soma dos quadrados	Variância	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Entre	5	0,634939	0,126988	1596,216*	3,11
Regressão linear	1	0,63481	0,63481	7979,456*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,000129	3,23x 10 <sup>-5</sup>	0,405622	3,26
Resíduo	12	0,000955	7,96x10 <sup>-5</sup>		
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>0,635894</b>			

\*Significativo p< 0,05

#### 3.2.3.1.3.4. Parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de linezolida

A Tabela 3.9 relaciona os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de linezolida.

**Tabela 3.9.** Parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de linezolida

Parâmetros	Resultados
$\lambda$ (nm)	251
Faixa linear ( $\mu\text{g/mL}$ )	6,0-16,0
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,055x - 0,007$
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	$0,007 \pm 0,3168$
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	$0,055 \pm 0,0275$
Limite de detecção ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,57
Limite de quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ )	1,73
r (coeficiente de correlação)	0,9998
n	6

### 3.2.3.1.3.5.. Exatidão utilizando o teste de recuperação para linezolida

A Tabela 3.10 demonstra os valores obtidos no teste de recuperação de LNZ-SR utilizando espectrofotometria UV a 251 nm.

**Tabela 3.10.** Valores obtidos no teste de recuperação de LNZ-SR utilizando espectrofotometria UV a 251 nm

	Concentração inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração teórica adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ DPR
R <sub>1</sub>	12,0	0,4	12,4	0,39	$99,16 \pm 0,33$
R <sub>2</sub>	12,0	0,8	12,8	0,81	$102,2 \pm 0,69$
R <sub>3</sub>	12,0	1,2	13,2	1,19	$99,98 \pm 0,69$

\* Média de três determinações

3.2.3.1.3.6. *Precisão do método e valores experimentais obtidos na determinação do teor de linezolida nos comprimidos por espectrofotometria na região UV*

A Tabela 3.11 relaciona os valores experimentais de linezolida obtidos pelo método espectrofotométrico na região UV para comprimidos, bem como a precisão do método.

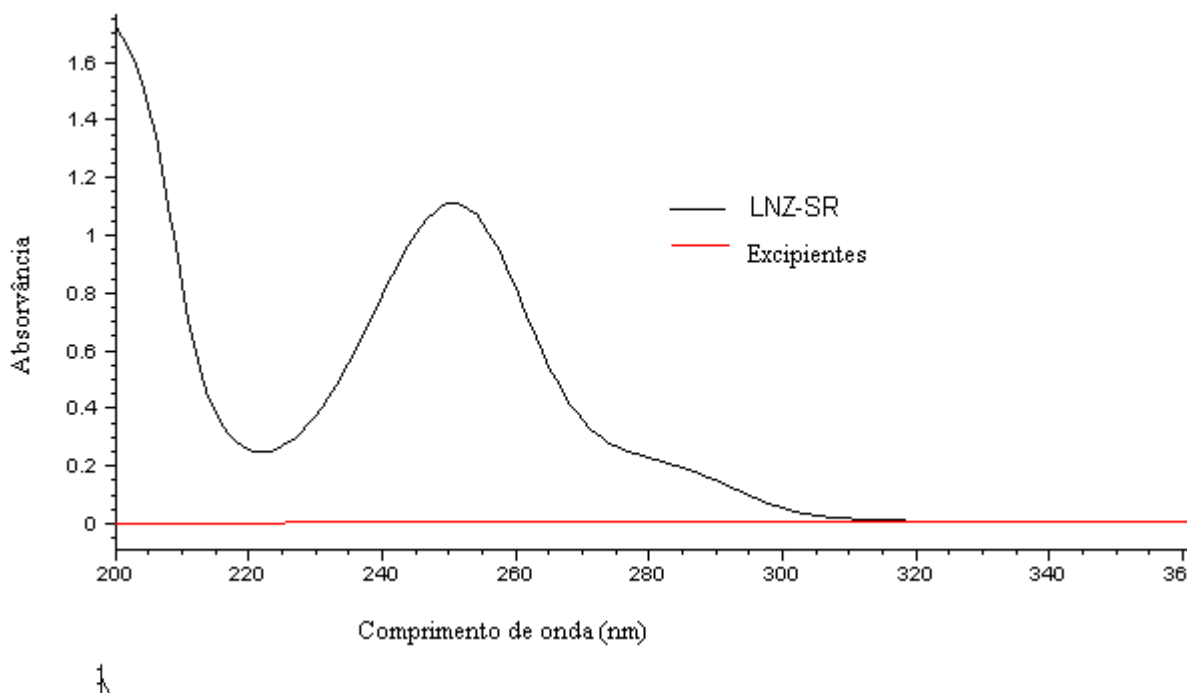
**Tabela 3.11.** Valores experimentais de linezolida, obtidos por espectrofotometria na região UV e a precisão do método representado pelo desvio padrão relativo

	<b>quantidade de linezolida nos comprimidos (mg)</b>	<b>teor (%)</b>	<b>teor médio (%)</b>	<b>desvio padrão</b>	<b>DPR%*</b>
1	599,8	99,9			
2	587,0	97,8			
3	592,2	98,7			
4	584,4	97,4	98,7	1,31	1,32
5	603,0	100,5			
6	585,0	97,5			

DPR- desvio padrão relativo

3.2.3.1.3.7. *Avaliação da especificidade*

A Figura 3.13 mostra os espectros de absorção das soluções de LNZ-SR e da amostra dos excipientes obtidos por espectrofotometria na região UV a 251 nm.



**Figura 3.13.** Espectro de absorção de LNZ-SR em concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  e a solução placebo obtidos por espectrofotometria na região UV a 251 nm

#### 3.2.3.1.5. Discussão

A espectrofotometria é um método largamente utilizado para determinação de vários compostos orgânicos (HARRIS, 2001). Com o conhecimento da estrutura química de linezolida (Figura 2.1) e verificando que esta molécula possuía ligações que absorvem luz, foi desenvolvido e validado um método analítico na região UV para determinação deste fármaco. Para desenvolver o método na região UV, avaliou-se o espectro de absorção de LNZ-SR em diferentes solventes, bem como a influência de excipientes do comprimido. O fármaco mostrou-se solúvel em água, metanol, etanol, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. Em NaOH 0,1 M, LNZ-SR apresentou um espectro de absorção sugestivo de degradação alcalina, apresentado na Figura 3.7. Procurando um método simples, de baixo custo e a utilização de solventes de baixa toxicidade, optou-se pela água, por ser um solvente atóxico e de fácil acesso. O espectro de absorção para linezolida mostrou pico de absorção máxima a 251 nm, utilizando solução aquosa de LNZ-SR em concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ . O espectro da amostra

(comprimidos) mostrou o mesmo máximo de absorção que de LNZ-SR. Não houve nenhuma evidência de interferências dos excipientes nas amostras analisadas. Com o objetivo de verificar a faixa de concentração que a solução de LNZ-SR apresentava-se linear, foi realizada a construção da curva de Ringbom. De acordo com a lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 6,0 - 16,0 µg/mL, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9998, entre as concentrações estabelecidas e as absorções lidas. A equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi  $y = 0,055x - 0,0073$ ; onde  $x$  é a concentração em µg/mL e  $y$  é a absorção no UV.

A análise estatística dos resultados das absorvâncias obtidas foi matematicamente verificada pela análise de variância. Os resultados obtidos, com  $F$  significativo para regressão (1596,216) e não significativo para o desvio de linearidade (0,405622), valida o método por espectrofotometria na região do UV para determinação de linezolida. O teor de linezolida nos comprimidos foi 98,7%, demonstrando a sensibilidade do método para quantificar a substância ativa nos comprimidos, não ocorrendo interferência dos excipientes na absorção de linezolida. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo das amostras, equivalente a 1,32 %. A exatidão do método foi verificada pelo teste de recuperação (AOAC, 1997), em que se obteve uma recuperação média de LNZ-SR de 100,44%. Com este resultado, comprova-se a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos analíticos. O método apresentado mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade na faixa de 6,0-16,0, precisão e exatidão, podendo ser usado tanto para fins de quantificação como identificação de linezolida em comprimidos.

### 3.2.3.2. Doseamento microbiológico

#### 3.2.3.2.1. Método

##### 3.2.3.2.1.1. Desenvolvimento do ensaio microbiológico

Foram realizados ensaios preliminares para o desenvolvimento do método de análise de linezolida na forma farmacêutica comprimidos, alternando-se alguns parâmetros (Tabela 3.12).

**Tabela 3.12.** Parâmetros testados para otimização do ensaio microbiológico - método de difusão em ágar- cilindros em placas para linezolida

Parâmetros	Descrição
Microrganismos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
Meio de cultura	Meio nº 11 de Grove-Randall (MERCK)
	Meio antibiótico nº 1 (DIFCO)
Soluções diluentes	Solução tampão fosfato pH 6,0
	Solução tampão fosfato pH 8,0
Concentrações das soluções padrão (µg/mL)	5,0; 10,0; 20,0
	20,0; 40,0; 80,0

Após a avaliação dos diversos parâmetros pré-estabelecidos (Tabela 3.13), o doseamento microbiológico foi desenvolvido e validado com os parâmetros apresentados na Tabela 3.13.

**Tabela 3.13.** Parâmetros usados no desenvolvimento e validação de linezolida no ensaio microbiológico

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372
Meio de cultura	Meio antibiótico nº 1
Solução diluente	Tampão fosfato pH 6,0
Concentração do inóculo	2%
Concentrações da solução padrão (µg/mL)	20,0; 40,0; 80,0
Temperatura de incubação (°C)	35 ± 1
Tempo de incubação (horas)	18

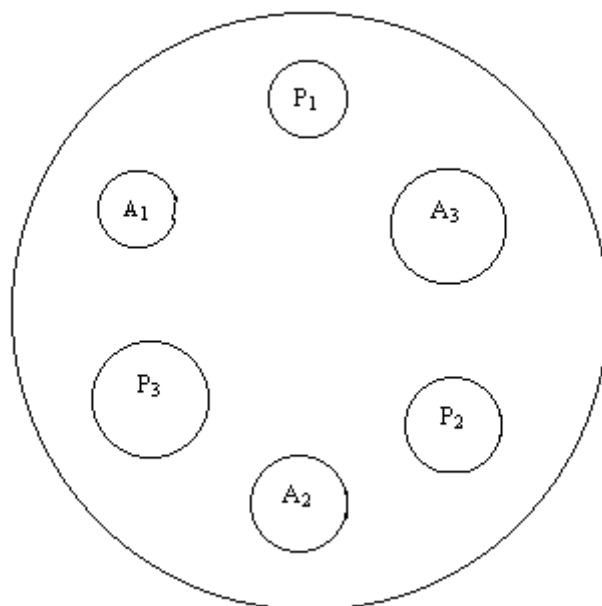
#### 3.2.3.2.1.2. Preparo do inóculo

O microrganismo-teste *Bacillus subtilis* ATCC 9372 foi mantido em meio TSB à  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. A padronização foi realizada utilizando espectrofotômetro a 580 nm com transmitância de  $25\% \pm 2\%$  (Farmacopéia Brasileira, 1988). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 2 % em meio antibiótico nº 1 mantido em banho de vapor à  $47^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.3.2.1.3. Ensaio

Foram utilizadas 18 placas de Petri para o doseamento de linezolida em comprimidos. Em cada ensaio foram utilizadas 6 placas de Petri, e os resultados foram analisados estatisticamente. Em capela de fluxo laminar, foram transferidos para cada placa, com auxílio de pipetador automático, 20,0 mL de meio antibiótico nº 1 para a camada base. Após a solidificação desta camada, foram adicionados por meio de pipetador automático, 5,0 mL de meio nº 1 contendo 2 % de inóculo. Após a solidificação da camada semeada, foram distribuídos, equidistantemente, 6 cilindros de aço inoxidável por placa. Cada cilindro recebeu 200,0 µL das soluções do padrão ou da amostra (comprimido), em delineamento 3 x 3 (Figura 3.14).

As placas foram colocadas em estufa incubadora à 35°C ± 1°C. Após 18 horas, foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de paquímetro. Em cada ensaio os resultados foram analisados estatisticamente e a potência de cada doseamento calculada. A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (1977).



**Figura 3.14.** Delineamento 3 x 3 demonstrando a disposição das soluções padrão (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P<sub>1</sub> (20,0 µg/mL); P<sub>2</sub> (40,0 µg/mL); P<sub>3</sub> (80,0 µg/mL) e A<sub>1</sub> (20,0 µg/mL); A<sub>2</sub> (40,0 µg/mL); A<sub>3</sub> (80,0 µg/mL).

#### 3.2.3.2.1.4. Cálculo da potência do medicamento

A potência do fármaco foi determinada pela equação (Equação 3.3) de HEWITT (1977). Os ensaios foram realizados em dias diferentes, e cada amostra corresponde à média de seis determinações.

Equação 3.3:

Na qual:

$$T/R (\%) = \text{Antilog } M \times 100$$

$$M = F/b \quad b = E/I$$

$$F = 1/3[(A_1 + A_2 + A_3) - (P_1 + P_2 + P_3)]$$

I = logaritmo da razão das doses

#### 3.2.3.2.1.5. Validação do método microbiológico

Para validação do método microbiológico foram determinadas as seguintes características:

- Linearidade: três níveis de concentração foram avaliados. As curvas foram obtidas em três diferentes dias.

- Precisão: foram realizadas seis análises de linezolida nas amostras com concentração teórica de 20,0, 40,0 e 80,0 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo de linezolida.

- Exatidão: foi determinada pelo percentual de recuperação de LNZ-SR adicionada à amostra.

#### 3.2.3.2.1.6. Construção da curva analítica

A curva analítica foi construída em gráfico logaritmo da concentração *versus* o diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da substância de referência. A curva foi construída utilizando o programa Origin 5.0. A equação da reta para representação gráfica da curva analítica foi determinada pela regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva analítica foram utilizados três pontos, cada um representando a média de três determinações. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988) para ensaio 3 x 3.

#### 3.2.3.2.1.7. Preparo das soluções-padrão

Foram transferidos 10,0 mg de LNZ-SR, para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água para obtenção de solução com 100,0 µg/mL. A solução foi levada ao ultrassom por 10 minutos, para melhor solubilização. A partir desta solução foram transferidos, 2,0, 4,0 e 8,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o

---

volume com solução de tampão fosfato pH 6,0 para obtenção de soluções com concentrações de 20,0; 40,0 e 80,0 µg/mL.

#### 3.2.3.2.1.8. *Preparo das soluções de linezolidina na forma farmacêutica*

Foram pesados 20 comprimidos para a determinação do peso médio, o qual foi equivalente a 864,42 mg. Depois de triturados manualmente em gral, uma quantidade de pó equivalente a um peso médio foi exatamente pesado e transferido para balão volumétrico de 1000 mL. Foram adicionados 500 mL de água ultrapura e a solução foi mantida em aparelho de ultrassom por 20 minutos. O volume foi completado com água para a obtenção de solução com concentração de 600,0 µg/mL. Alíquota de 25,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 150 mL e o volume completado com solução tampão pH 6,0, perfazendo uma solução com concentração de 100,0 µg/mL. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 2,0 4,0 e 8,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações finais de 20,0, 40,0 e 80,0 µg/mL.

#### 3.2.3.2.1.9. *Exatidão do método*

O teste de recuperação para o método microbiológico foi realizado para avaliar a exatidão do método proposto.

##### 3.2.3.2.1.9.1. *Preparo das soluções*

Neste ensaio, preparou-se uma solução de substância de referência com concentração de 100,0 µg/mL. Para preparo da solução amostra pesou-se o equivalente a 100,0 mg, que foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL. A solução amostra adicionada da substância de referência foi preparada retirando-se uma alíquota de 10,0 mL da solução amostra, anteriormente preparada, transferindo para balão volumétrico de 100 mL. Em cada balão foram adicionados 50,0 mL de água

levando ao ultrassom para melhor solubilização. Adicionou-se alíquota de 5,0 mL da solução-padrão no balão 1 (recuperação 1), 10,0 mL de solução-padrão no balão 2 (recuperação 2) e 15,0 mL no balão 3 (recuperação 3). A Tabela 3.14 representa o esquema de preparo das amostras no teste de recuperação.

**Tabela 3.14.** Esquema de preparo das soluções para análise do teste de recuperação de linezolida no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa

	<b>Quantidade da amostra adicionada (µg)</b>	<b>Quantidade da solução padrão adicionada 100 µg/mL (mL)</b>	<b>Concentração teórica de amostra + padrão µg/ 100 mL</b>
<b>1</b>	10000,0	5,0	105,0
<b>2</b>	10000,0	10,0	110,0
<b>3</b>	10000,0	15,0	115,0

A partir destas soluções foram transferidas alíquotas de 2,0, 4,0 e 8,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, completando os volumes dos balões com tampão fosfato pH 6,0, para obtenção das seguintes concentrações teóricas:

- **Para o teste de recuperação 1:** 21,0, 42,0 e 84,0 µg/mL
- **Para o teste de recuperação 2:** 22,0, 44,0 e 88,0 µg/mL
- **Para o teste de recuperação 3:** 23,0, 46,0 e 92,0 µg/mL

Após a execução do ensaio, as placas foram colocadas em estufa incubadora à 35°C ± 1°C. Após 18 horas, foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de paquímetro. A potência do antimicrobiano foi calculada pela equação de Hewitt (1977), e a partir do valor encontrado, foi calculada a concentração experimental da solução amostra adicionada de padrão.

3.2.3.2.2.10. *Precisão do método*

A precisão do método proposto foi avaliada pelo desvio padrão relativo da concentração de linezolida nos comprimidos.

3.2.3.2.2. *Resultados*3.2.3.2.2.1. *Curva analítica de linezolida no doseamento microbiológico*

A Tabela 3.15 mostra os valores obtidos na construção da curva analítica no ensaio microbiológico de linezolida.

**Tabela 3.15.** Valores médios obtidos no doseamento microbiológico de linezolida, em difusão em ágar cilindros em placa, para obtenção da curva analítica

	Concentração de LNZ-SR (µg/mL)	Diâmetro dos halos de inibição*(mm)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão	DPR (%)
P <sub>1</sub>	20,0	16,42	16,37	0,1044	0,63
		16,25			
		16,44			
P <sub>2</sub>	40,0	19,69	19,57	0,1001	0,51
		19,54			
		19,50			
P <sub>3</sub>	80,0	22,68	22,60	0,0693	0,30
		22,56			
		22,56			

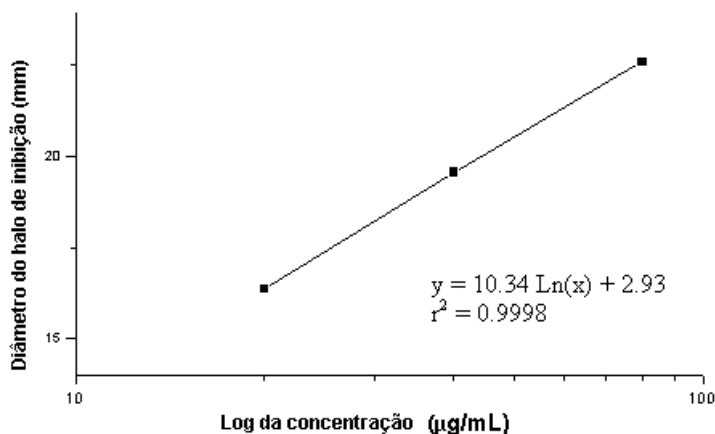
\* Cada valor corresponde a média de 6 halos de inibição

DPR%- desvio padrão relativo

3.2.3.2.2.2. *Construção da curva analítica de LNZ-SR no doseamento microbiológico*

*pele método de difusão em ágar, cilindros em placa*

A curva analítica do doseamento microbiológico pelo método de difusão em ágar, cilindros em placa de LNZ-SR está representada na Figura 3.15.



**Figura 3.15.** Curva analítica de LNZ-SR obtida no doseamento microbiológico em difusão em ágar, cilindros em placa.

3.2.3.2.2.3. *Análise estatística*

A Tabela 3.16 mostra os resultados da análise de variância dos dados obtidos no doseamento de linezolida pelo ensaio microbiológico difusão em ágar-cilindros em placa

**Tabela 3.16.** Análise de variância dos dados obtidos no doseamento de linezolida pelo ensaio microbiológico difusão em ágar - cilindros em placa

Fontes de variação	gL	SQ	QM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Preparação	1	0,127211	0,1272	1,50	4,24
Regressão	1	271,421	271,421	3200,451*	4,24
Desvio de paralelismo	1	0,246038	0,246038	2,9011	4,24
Quadrático	1	0,488401	0,488401	5,758967	4,24
Diferença de quadrático	1	0,050668	0,050668	0,597451	4,24
Entre doses	5	272,3333	54,46666	642,2417*	2,6
Entre placas	5	0,734522	0,146904	1,7322	2,6
Dentro (erro)	25	2,120178	0,084807	-	-
Total	35	275,188		-	-

\* significativo para  $P < 0,05$

gL – graus de liberdade

SQ – soma dos quadrados

QM- variância

3.2.3.2.2.4. *Determinação da potência do medicamento*

Os resultados obtidos na determinação de linezolida comprimido no ensaio microbiológico, calculados pela fórmula de HEWITT (1977), estão demonstrados na Tabela 3.17.

**Tabela 3.17.** Valores experimentais obtidos para o doseamento de linezolida pelo ensaio microbiológico difusão em ágar cilindros em placa

Valor rotulado (mg/comprimido)	Valor encontrado (mg/comprimido)	Teor (%)	DPR (%)	
			Intra-dias	Inter-dias
	612,84	102,14		
600,0	614,88	102,48	0,39	0,61
	607,62	101,27		

DPR: desvio padrão relativo

3.2.3.2.2.5. *Teste de recuperação de linezolida no ensaio microbiológico*

A Tabela 3.18 relaciona os valores experimentais obtidos no teste de recuperação do ensaio microbiológico das três concentrações elaborada para análise de linezolida.

**Tabela 3.18.** Valores experimentais obtidos no doseamento microbiológico de linezolida no teste de recuperação para o ensaio das três amostras (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>)

	Concentração teórica da amostra + padrão (µg)	Potência em cada ensaio (%)	Concentração encontrada (mg)*
R <sub>1</sub>	105,0	107,59	0,51
R <sub>2</sub>	110,0	111,04	1,00
R <sub>3</sub>	115,0	117,18	1,47

\*O cálculo é realizado levando em consideração o valor de amostra adicionada.

A Tabela 3.19 mostra os valores experimentais obtidos no teste de recuperação de linezolida no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa.

**Tabela 3.19.** Valores experimentais obtidos no teste de recuperação de linezolida no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa

	<b>Concentração de substância de referência adicionada (mg)</b>	<b>Atividade de padrão recuperada (mg)</b>	<b>Recuperado (%)</b>
<b>1</b>	0,5	0,51	102,0
<b>2</b>	1,0	1,00	100,0
<b>3</b>	1,5	1,47	98,0

#### 3.2.3.2.3. Discussão

O doseamento microbiológico por difusão em ágar, cilindros em placa, é um método específico para antibióticos, antimicrobianos e antifúngicos. O ensaio microbiológico vem sendo utilizado em laboratórios clínicos desde a introdução de antibióticos e outros agentes antimicrobianos. Na terapêutica, muitos métodos de ensaio foram elaborados pela própria indústria farmacêutica para controle das preparações comerciais (ANDREWS, 1999). Embora os métodos microbiológicos demonstrem um desempenho relativamente simples, muitos aspectos devem ser considerados no seu desenvolvimento, para assegurar que eles sejam suficientemente seguros e exatos. Tais métodos necessitam de mão-de-obra especializada e técnica apurada. Vários aspectos devem ser observados durante o desenvolvimento do método, como temperatura de incubação, espessura do ágar, microrganismo utilizado, pH da solução diluente, entre outras características para garantir que o método desenvolvido apresente uma resposta eficiente. A literatura, apresenta alguns artigos que relatam o doseamento de difusão em ágar cilindros em placa, utilizando diferentes classes de antibióticos e antimicrobianos como gentamicina (RATCLIFF et al., 1981; DELANEY et al., 1982), gatifloxacino (SALGADO et al., 2006), cefoxitina (TOZO e

---

SALGADO, 2007) cefalosporinas (BIEDENBACH et al., 1993; MORENO e SALGADO, 2008; SOUZA et al., 2006; SCHMIDT et al., 2008), esparfloxacino (MARONA e SCHAPOVAL, 1998), azitromicina (BREIER et al., 2002; SALGADO e RONCARI, 2006), telitromicina (VAUCHER et al., 2006) e ofloxacino (EV e SCHAPOVAL, 2002).

Para desenvolver e validar o método, foram realizados alguns testes no doseamento microbiológico, utilizando vários parâmetros, como, por exemplo, diferentes cepas bacterianas. As bactérias selecionadas para padronização do método foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus subtilis* ATCC 9372. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, respondeu adequadamente com crescimento uniforme e formação de halos de inibição nítidos. No entanto, por ser uma cepa de alta virulência para o ser humano, esta opção só seria utilizada caso as outras cepas não respondessem adequadamente, quando os outros parâmetros fossem analisados.

A espécie bacteriana *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foi analisada, mas a resposta do crescimento microbiano foi irregular. Posteriormente, foi utilizado o *Bacillus subtilis* ATCC 9372, que obteve um crescimento satisfatório e uniforme. As concentrações utilizadas no desenvolvimento e validação do método foram estipuladas, de acordo com a facilidade de diluição das soluções.

A solução tampão escolhida apresentava pH 6,0, pois nas soluções com tampão pH 8,0, os halos de inibição do antimicrobiano interpolaram-se e, com isso invalidaram o método microbiológico. Isso ocorreu, provavelmente devido ao caráter básico de linezolida e em pH 8,0, potencializava seu efeito. O doseamento em difusão em ágar cilindros em placa desenvolvido e validado para linezolida demonstrou ser um método preciso, exato, linear e sensível. Para assegurar a validade do ensaio microbiológico na determinação da potência de linezolida, foram utilizadas três concentrações diferentes para amostra, idênticas às da substância de referência, em delineamento 3 x 3. Estas doses estão em progressão geométrica (razão 2,0), já que o sistema utilizado possui relação linear entre o logaritmo da concentração da substância

analisada e o diâmetro dos halos de inibição. Em cada ensaio foram utilizadas seis placas, efetuando-se a leitura dos halos de inibição. Com os resultados obtidos foi construída a curva analítica para LNZ-SR, obtendo-se um coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,9998$ .

A potência dos comprimidos foi calculada pela equação de Hewitt (HEWITT, 1977), obtendo-se teor médio de 101,96 %, com desvio padrão relativo de 0,61 %, mostrando que o método é preciso. O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência foram adicionadas nas soluções de linezolida comprimidos, para quantificação da substância. Os resultados obtidos demonstraram que o método desenvolvido possui exatidão, precisão e linearidade. O ensaio foi validado, através de análise estatística, utilizando análise de variância, descrita na Farmacopéia Brasileira (1988).

### 3.2.3.3. Método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

#### 3.2.3.3.1. Análise qualitativa

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de ácido acético 1%: acetonitrila: metanol na proporção 50 : 25 : 25, V:V:V. A fase móvel foi filtrada através de membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, desgaseificada no ultrassom, durante 15 minutos. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters e coluna symmetry Waters  $\text{C}_{18}$ , 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 250 x 4,6 mm.

As amostras foram preparadas utilizando fase móvel como solvente na concentração de 12,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As soluções iniciais de LNZ-SR e LNZ-comp., foram levadas para o ultrassom por 10 e 20 minutos, respectivamente. Após a estabilização do sistema, foram injetados 20  $\mu\text{L}$ , previamente filtrados em membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 13 mm de diâmetro. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 3.20. A identificação de linezolida nos comprimidos foi realizada

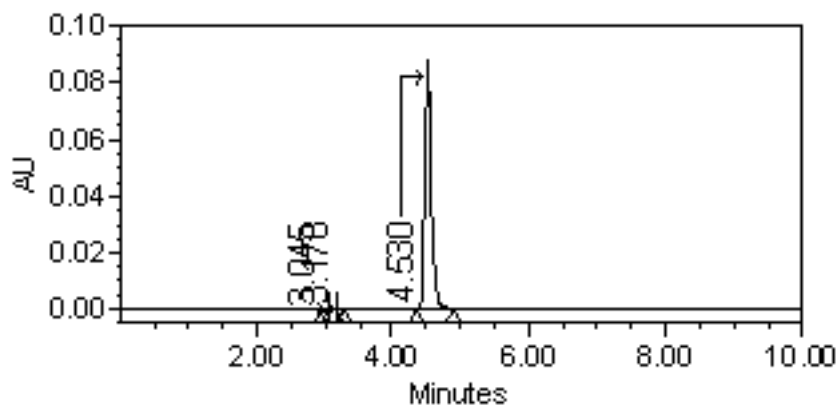
pela comparação dos tempos de retenção e perfil de cromatográfico obtido na análise desta solução com aquela preparada com LNZ-SR.

**Tabela 3.20.** Condições cromatográficas utilizadas no método por CLAE

Fase móvel	ácido acético 1%: acetonitrila: metanol (50:25:25, V:V:V)
Coluna	Symmetry Waters C <sub>18</sub> , 5 µm, 250 x 4,6 mm
Comprimento de onda	251 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25° C ± 1° C

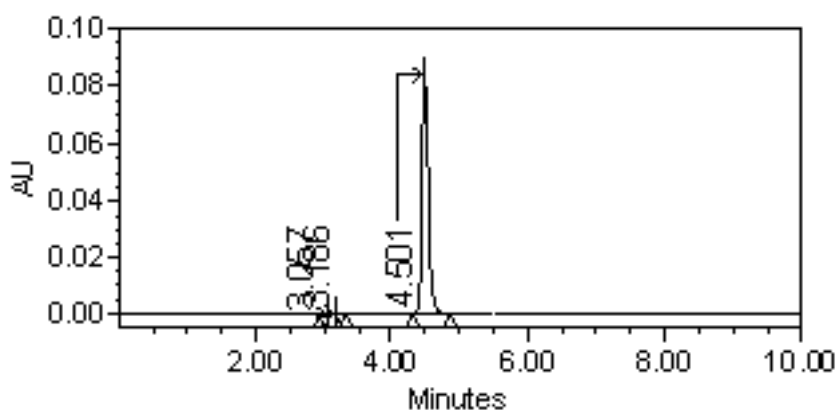
### 3.2.3.3.2. Resultados e discussão

As Figuras 3.16 e 3.17 ilustram os cromatogramas de LNZ-SR e LNZ-comp.



**Figura 3.16.** Cromatograma obtido por CLAE para solução de LNZ-SR (12 µg/mL).

Fase móvel: ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25 V:V:V); coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 x 4,6 mm; tempo de retenção  $\cong$  4,50 min.



**Figura 3.17.** Cromatograma obtido por CLAE para solução de comprimido de linezolidina (12 µg/mL). Fase móvel: ácido acético 1%: metanol: acetonitrila (50:25:25 V:V:V); coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 x 4,6 mm; tempo de retenção ≅ 4,50 min.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método analítico, que nos últimos anos domina as técnicas analíticas em determinação de medicamentos, alimentos, ensaios biológicos, entre outros. A Farmacopéia Americana (USP 31, 2008) dedica a esta técnica, a análise da maior parte de fármacos em produtos com monografias neste compêndio. Atualmente, prioriza-se a análise de produtos farmacêuticos por CLAE, devido à especificidade e seletividade relacionadas à utilização desta técnica.

Uma das limitações da utilização de CLAE é o alto custo da análise de um medicamento por este método, que emprega solventes orgânicos de alta pureza admitidos para uso e padrões de referências. Entretanto, este método analítico é altamente específico, pois possui coluna de separação que determina o composto analisado, originando uma identificação mais específica. Com o objetivo de desenvolver e validar o método por CLAE, diversos sistemas eluentes foram testados, compostos por água, acetonitrila, ácido acético, e metanol, em proporções variadas. O sistema que demonstrou um pico de retenção adequado, bem como o tempo de

eluição menor, foi o sistema escolhido para identificação e posterior validação do método analítico (ácido acético 1% : metanol : acetonitrila 50: 25: 25, V/V/V).

A solução de LNZ-SR com esta fase móvel possui comprimento de onda máximo de 254 nm. A linezolida foi avaliada no comprimento de onda de 251 e 254 nm, com o objetivo de verificar qual o comprimento de onda favorecia a melhor visualização de possíveis produtos de degradação. Para isto, foi utilizada uma solução de LNZ-comp. degradada em luz-UVC durante 24 horas. No comprimento de onda de 251 nm o cromatograma da solução degradada mostrou com mais nitidez os produtos de degradação.

Com estes parâmetros estabelecidos pode-se afirmar que a comparação dos tempos de retenção da solução de LNZ-SR e LNZ-comp. indica que as amostras possuem a mesma identidade, sendo adequado para identificação de linezolida em comprimidos.

#### 3.2.3.3.2. Método

As condições analíticas e os procedimentos para a análise cromatográfica estão descritos na Tabela 3.20. No ensaio de robustez, foi utilizada coluna Phenomenex Luna, C18, 5 µm, (250 x 4,6 mm).

##### 3.2.3.3.2.1. Parâmetros analíticos

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados visando a validação do método de análise da linezolida por CLAE:

- Linearidade: foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em diferentes dias e contendo seis níveis de concentração em cada uma delas.

- Precisão: foram realizadas seis análises de linezolida nas amostras com concentração teórica de 12,0 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições

experimentais. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo de linezolida.

- Precisão intermediária: foi avaliada pela realização de análises das amostras em três diferentes dias.

- Exatidão: foi determinada através do percentual de recuperação de LNZ-SR adicionada à amostra.

- Especificidade: determinada através da degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica e da solução placebo de linezolida em comprimidos.

- Limite de detecção e limite de quantificação: foram determinados pelas equações indicadas pelo ICH (1996).

- Robustez: foi verificada através de variações nas condições cromatográficas sobre a determinação quantitativa das amostras.

#### 3.2.3.3.3. Construção da curva analítica

Para construção da curva analítica, foram pesados, 10,0 mg de linezolida substância de referência, previamente dessecados em estufa a 105° C durante duas horas, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água ultrapura. Desta solução, foram retiradas alíquotas para preparar soluções com concentrações entre 8,0 e 20,0 µg/mL, completando-se o volume com a fase móvel. A curva analítica foi construída em três diferentes dias e em triplicata, utilizando o programa Origin 5.0. A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As áreas utilizadas na determinação da curva analítica foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

#### 3.2.3.3.4. Determinação dos limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizada com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (I), obtidos a partir das três curvas analíticas.

#### 3.2.3.3.5. Exatidão do método proposto

Foi preparada solução de LNZ-SR com concentração de 100,0 µg/mL. As soluções da amostra foram preparadas com concentração de 80,0 µg/mL. A Tabela 3.21 mostra o esquema de preparações das soluções usadas no teste de recuperação de LNZ-SR em CLAE.

**Tabela 3.21.** Esquema de preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de linezolida para método por CLAE

	Solução-amostra 80,0 µg/mL (mL)	Solução LNZ-SR 100,0 µg/mL (mL)	Concentração (µg/mL)
A	5,0	-	8,0
R <sub>1</sub>	5,0	1,0	10,0
R <sub>2</sub>	5,0	2,0	12,0
R <sub>3</sub>	5,0	3,0	14,0
P	-	5,0	8,0

#### 3.2.3.3.6. Determinação de linezolida nos comprimidos

Foram pesados 20 comprimidos para a determinação do peso médio, o qual foi equivalente a 864,42 mg. Depois de triturados manualmente em gral, uma quantidade de pó equivalente a um peso médio do comprimido foi pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. Foram adicionados 500 mL de água ultrapura e a solução foi levada ao aparelho de ultrassom por 20 minutos. O volume foi completado com água ultrapura para a obtenção de solução com concentração de 600,0 µg/mL. Foram transferidas alíquotas de 10,0 mL para balões volumétricos de 100 mL completando-se

os volumes com água. A solução preparada tinha concentração teórica de 60,0 µg/mL de linezolida. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com água ultrapura para a obtenção de soluções com concentrações teóricas de 12,0 µg/mL. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo de linezolida nas amostras de comprimidos em três diferentes dias.

#### 3.2.3.3.7. Avaliação da especificidade

Para realização dos ensaios de especificidade, foram utilizados dois parâmetros: a preparação de amostras placebo e a degradação forçada de linezolida, através de testes de estresse nos comprimidos de linezolida.

- **Degradação ácida, alcalina e oxidativa:** Foi preparada solução de LNZ-comp. em água ultrapura na concentração de 100,0 µg/mL. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 10,0 mL para balões volumétricos de 50 mL e os volumes foram completados com NaOH 0,1 M; HCl 0,1 M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %, respectivamente, obtendo-se soluções com concentrações teóricas finais de 20 µg/mL. Os balões volumétricos contendo as amostras em meios oxidativos, ácidos e básicos foram envoltos em papel alumínio e mantidos à temperatura ambiente. Após uma hora, alíquotas de 5,0 mL foram retiradas no final do processo e transferidas para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração final de 10,0 µg/mL. A análise foi realizada imediatamente após a retirada da alíquota.

- **Degradação fotolítica:** Soluções-amostras, com concentração de 500,0 µg/mL, dissolvidas em diferentes solventes, metanol e água, foram expostas à luz ultravioleta, acoplada em câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 mm) para realização de degradação fotolítica. A amostra ficou exposta por 18 e 36 horas.

Foram preparadas soluções placebo. Os cromatogramas obtidos das amostras degradadas e amostra placebo foram analisados e comparados observando-se os picos e os tempos de retenção. Na avaliação deste parâmetro analítico verificou-se a possível interferência dos excipientes e dos produtos de degradação na determinação do fármaco.

#### 3.2.3.3.8. Avaliação da robustez

A robustez do método foi avaliada através de variações nas condições cromatográficas. As alterações incluíram variações na proporção da fase móvel, comprimento de onda, volume de injeção e coluna cromatográfica. Na preparação da fase móvel, a proporção de acetonitrila e metanol foram modificados em  $\pm 5\%$ . Para avaliação da influência do comprimento de onda de detecção, a análise foi realizada utilizando detecção de 260 nm. Em ambos os casos, todos os outros parâmetros mantiveram-se conforme descrito na Tabela 3.20.

Para realização deste ensaio foram preparadas soluções de LNZ-SR e LNZ-comp., em fase móvel, em concentração equivalente a 12,0  $\mu\text{g/mL}$ . Para este ensaio, foram feitas três amostras, sendo realizadas três determinações para cada solução de análise.

#### 3.2.3.3.9. Resultados

##### 3.2.3.3.9.1. Curva analítica

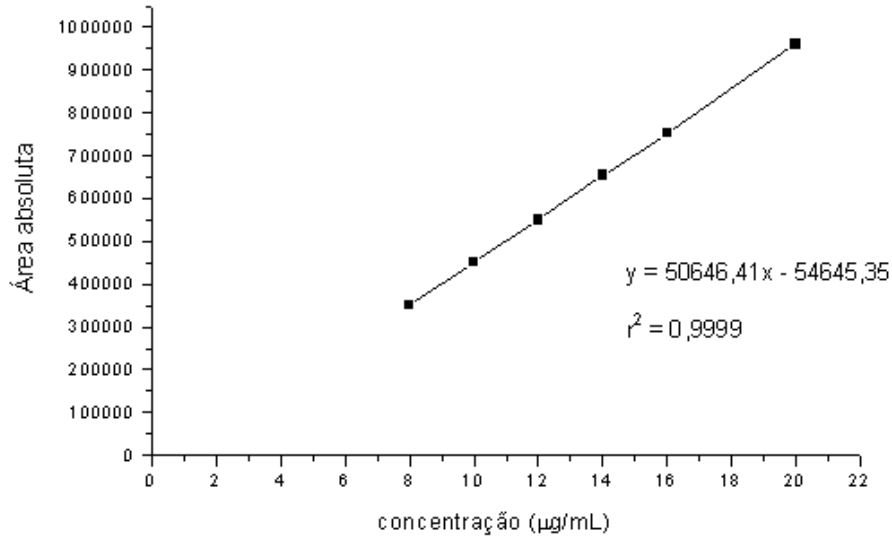
A Tabela 3.22 mostra os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para LNZ-SR por CLAE e a Figura 3.18, a curva analítica correspondente.

**Tabela 3.22.** Áreas absolutas obtidas para construção da curva analítica de LNZ-SR por CLAE

Concentração (µg/mL)	Áreas absolutas	Áreas absolutas média ± e.p.m.	DPR %
8,0	350135	351974 ± 2627,124	1,29
	357156		
	348631		
10,0	450000	452656 ± 1480,409	0,56
	455117		
	452853		
12,0	557137	550523 ± 4140,717	1,30
	542900		
	551532		
14,0	655510	655218 ± 1980,480	0,52
	651652		
	658494		
16,0	754246	753217 ± 2098,907	0,48
	749178		
	756227		
20,0	958793	960253 ± 4247,831	0,76
	968231		
	953735		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo



**Figura 3.18.** Representação gráfica da curva analítica das soluções de linezolida em concentrações de 8,0 a 20,0 µg/mL por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 3.2.3.3.9.2. Análise estatística

A validade da regressão linear da curva analítica média obtida foi calculada através de análise de variância (ANOVA) dos valores das áreas determinadas na obtenção da curva analítica de linezolida por CLAE relacionadas na Tabela 3.23.

**Tabela 3.23.** Análise de variância das áreas obtidas na curva analítica de linezolida por CLAE

Fontes de variação	gL	Soma dos quadrados	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Entre	5	7,18 x 10 <sup>11</sup>	1,44 x 10 <sup>11</sup>	5461,068*	3,11
Regressão linear	1	7,18 x 10 <sup>11</sup>	7,18 x 10 <sup>11</sup>	27302,99*	4,75
Desvio de linearidade	4	61848981	15462245	0,587798	3,26
Resíduo	12	316000000	26305352		
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>7,19 x 10<sup>11</sup></b>			

\*Significativo  $P < 0,05$

### 3.2.3.3.9.3. Parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais da curva analítica

A Tabela 3.24 relaciona os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica.

**Tabela 3.24.** Parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de linezolida

Parâmetros	Resultados
$\lambda$ (nm)	251
Faixa de concentração utilizada ( $\mu\text{g/mL}$ )	8-20 $\mu\text{g/mL}$
Equação: $y = bx + a$	$y = 50646,41x - 54645,35$
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	$-54645,35 \pm 3233,78$
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	$50646,41 \pm 232,57$
Limite de detecção (LD)	0,21
Limite de quantificação (LQ)	0,63
r (coeficiente de correlação)	0,9999
n	6

3.2.3.3.9.4. *Exatidão do método por CLAE*

A Tabela 3.25 mostra os valores obtidos no teste de recuperação para LNZ-SR utilizando CLAE.

**Tabela 3.25.** Valores obtidos no teste de recuperação de LNZ-SR utilizando CLAE

	Concentração teórica adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ ) *	Recuperação (%)	Média (%) $\pm$ DPR
R <sub>1</sub>	2,0	2,01	100,50	
R <sub>2</sub>	4,0	4,03	100,83	100,27 $\pm$ 0,69
R <sub>3</sub>	6,0	5,97	99,50	

\* Média de três determinações

DPR – desvio padrão relativo

3.2.3.3.9.5. *Precisão do método e valores experimentais obtidos na determinação do teor de linezolida nos comprimidos por CLAE*

A Tabela 3.26 relaciona os valores experimentais de linezolida nos comprimidos obtidos por CLAE.

**Tabela 3.26.** Valores experimentais obtidos para determinação de teor de linezolida em amostras comerciais através de CLAE

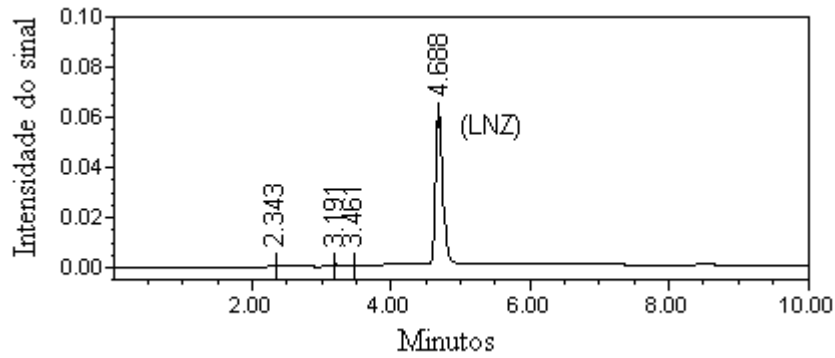
Amostra	Teor (%)*			Interdias	DPR
	1º dia	2º dia	3º dia		
1	103,5	98,08	102,06		
2	100,32	99,33	105,01		
3	100,81	98,30	104,43		
4	105,00	99,70	101,25	101,36	1,65
5	101,31	98,85	102,70		
6	101,31	102,46	100,20		
Média	102,04	99,45	102,60		
DPR	1,77	1,60	1,79		

\*cada valor é média de três determinações

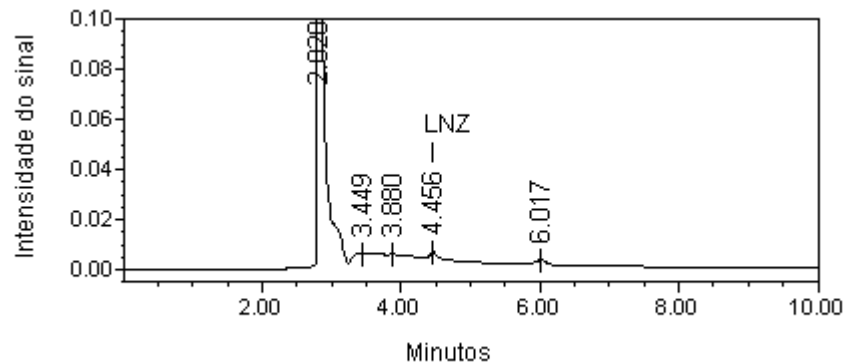
DPR – desvio padrão relativo

#### 3.2.3.3.9.6. Avaliação da especificidade

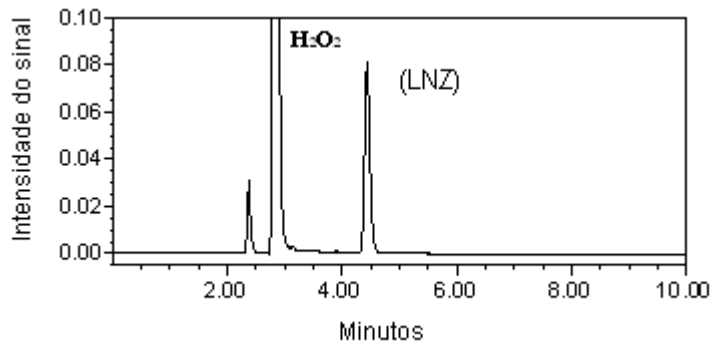
As Figuras 3.19, 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23 mostram, respectivamente, os cromatogramas obtidos na degradação ácida, alcalina, oxidativa, fotolítica por 72 horas e 48 horas em meio básico de LNZ-comp. na concentração de 10,0 µg/mL.



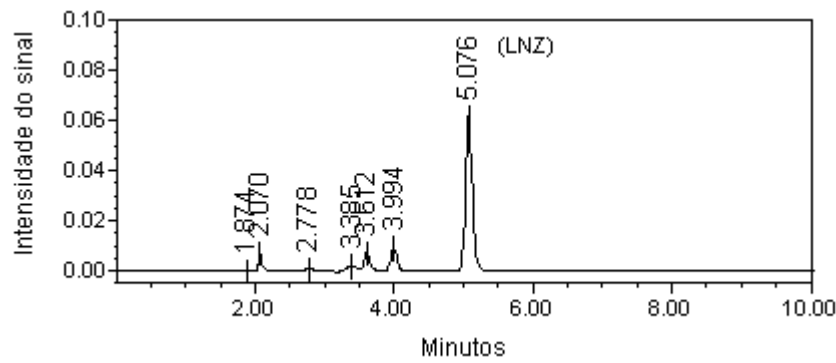
**Figura 3.19.** Cromatograma da degradação ácida de LNZ-comp.(10,0 µg/mL) em meio ácido (HCl 0,1 M) após uma hora.



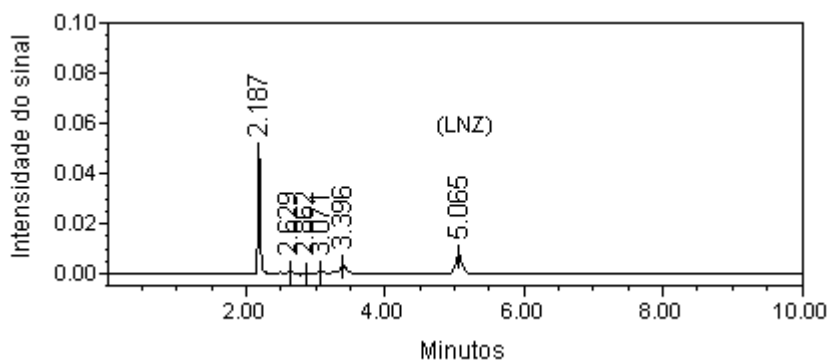
**Figura 3.20.** Cromatograma da degradação alcalina de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) em meio alcalino (NaOH 0,1 M) após uma hora.



**Figura 3.21.** Cromatograma da degradação de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) em meio oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) após uma hora.



**Figura 3.22.** Cromatograma da degradação de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) na luz ultravioleta por 72 horas utilizando metanol como solvente.



**Figura 3.23.** Cromatograma da degradação de LNZ-comp. (10,0 µg/mL) na luz ultravioleta por 48 horas utilizando metanol como solvente, em meio básico.

#### 3.2.3.3.4. Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método analítico, que nos últimos anos domina as técnicas de análise e determinação de medicamentos, alimentos, ensaios biológicos, entre outros. A Farmacopéia Americana (USP 31, 2008) dedica a esta técnica, a análise da maior parte de produtos com monografias neste compêndio. Atualmente, prioriza-se a análise de produtos farmacêuticos por CLAE, devido à especificidade e seletividade relacionadas à utilização desta técnica.

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

O desenvolvimento de métodos utilizando CLAE requer a cuidadosa combinação entre a polaridade do soluto, da fase móvel e da fase estacionária de modo a garantir separações satisfatórias em tempos razoáveis. O método de CLAE desenvolvido para determinação de linezolida em comprimidos foi avaliado em relação aos seguintes

parâmetros de validação: especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade de um método analítico representa sua capacidade de sofrer a influência única e exclusiva da substância que se quer analisar. A especificidade do método pode ser determinada com a adição de impurezas e produtos de degradação, obtidos experimentalmente ou induzindo a sua formação (ERMER, 2001). Os comprimidos de linezolida foram submetidos à degradação em meio alcalino, ácido, oxidativo e fotolítico. Os cromatogramas das soluções degradadas estão ilustrados nas Figuras 3.19 a 3.23.

Na degradação alcalina (Figura 3.30) observou-se a formação de pico adicional em 2,0 minutos e 6,0 minutos. Ocorreu o decréscimo da área absoluta do pico de linezolida em 4,5 minutos. Na degradação ácida observou-se o início de formação de produtos de degradação como observado no cromatograma (Figura 3.19) em tempos de retenção inferiores ao da linezolida.

A estabilidade de LNZ-comp. em meio oxidativo foi avaliada em  $H_2O_2$  a 3% (Figura 3.21). Nestas condições, houve a formação de pico adicional em 2,4 minutos. Nos estudos de degradação fotolítica, foram colocadas soluções de linezolida comprimidos por 72 horas na luz ultravioleta, observando-se a presença de vários produtos minoritários de degradação, com a conseqüente diminuição da área de linezolida. Para acelerar a formação de produtos de degradação pela luz ultravioleta, foram preparadas soluções em meio básico (20% de NaOH 0,1 M), em que observou-se a formação de um produto majoritário em 2,1 minutos. Estes estudos de degradação forçada mostram a susceptibilidade do fármaco perante a degradação básica, ácida, oxidativa e fotolítica. Sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser indicativo de estabilidade.

Os resultados obtidos na validação do método demonstraram que as soluções de LNZ-SR apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, no intervalo utilizado. Gráficos de concentração *versus* área absoluta

foram plotados e demonstraram linearidade na faixa de 8,0 a 20,0 µg/mL (Figura 3.18). A equação da reta para a linezolida foi  $y = 50646,41x - 54645,35$ , com coeficiente de correlação de 0,9999. A Tabela 3.22 mostra as áreas absolutas correspondentes a cada uma das diluições de LNZ-SR para as três curvas analíticas construídas. Os dados de linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA) que demonstrou regressão linear significativa e nenhum desvio de linearidade significativo ( $P < 0,05$ ). Os dados referentes ao tratamento estatístico dos dados de linearidade do método por CLAE estão demonstrados nas Tabelas 3.23 e 3.24.

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (interdias) relacionada na Tabela 3.26. Os valores experimentais obtidos para a determinação de linezolida nas amostras analisadas possuíam desvio padrão relativo (DPR) de 1,65 (interdias), descritos na Tabela 3.26. Os valores de DPR confirmam a adequada precisão do método. Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 3.25, apresentando média de recuperação de 100,27 % para comprimidos de linezolida.

A sensibilidade do método em CLAE foi avaliada pela determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de linezolida no sistema cromatográfico empregado. De acordo com o ICH (1996) e USP (2008) não há necessidade de avaliar estes parâmetros se o método for utilizado para fins de quantificação. Verificou-se que os LQ e LD foram 0,63 µg/mL e 0,21 µg/mL, respectivamente. Os baixos valores indicam a sensibilidade do método.

O método cromatográfico desenvolvido sofreu algumas modificações nos parâmetros da fase móvel e no comprimento de onda, a fim de verificar a sua capacidade na suscetibilidade a variações para determinação quantitativa de linezolida. A partir da modificação realizada na proporção da fase móvel foi observado teor médio de linezolida de 101,93% (DPR = 1,53%) para comprimidos de linezolida.

Não houve mudança significativa no tempo de retenção em relação às condições otimizadas. Não houve variação no tempo de retenção de linezolida quando se

realizou análises em 260 nm. Ocorreu uma redução proporcional das áreas absolutas dos picos de linezolida em decorrência da menor absorvidade do fármaco neste comprimento de onda. O valor experimental obtido foi de 100,83% (DPR% = 1,29) para comprimidos de linezolida. A robustez do método, também foi verificada, utilizando outra coluna cromatográfica (Phenomenex C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 x 4,6 mm). Nesta coluna o tempo de retenção foi de aproximadamente 5,0 minutos, com áreas absolutas semelhantes às obtidas com coluna Symmetry Waters (C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 x 4,6 mm). De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o método proposto indica robustez adequada, pois permitiu a quantificação de linezolida apesar das variações aplicadas ao método analítico. O método mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

#### *3.2.4. Análise comparativa dos métodos*

##### *3.2.4.1. Método*

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para determinação de linezolida em comprimidos, foi realizada análise estatística dos teores médios de linezolida obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA).

##### *3.2.4.2. Resultados*

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de linezolida em comprimidos, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 3.27.

**Tabela 3.27.** Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando espectrofotometria na região UV, doseamento microbiológico e CLAE

	Doseamento		
	UV	microbiológico	CLAE
<b>Média (%)</b>	98,70	101,96	101,36
<b>DPR</b>	1,32	0,61	1,65

A Tabela 3.28 mostra o resultado de ANOVA calculado, utilizando os valores experimentais obtidos do teor de linezolida em comprimidos, a partir dos métodos validados.

**Tabela 3.28.** Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de linezolida em comprimidos, pelos métodos propostos

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F (5%)
<b>Tratamentos</b>	<b>2</b>	35513,61	17756,8	0,075777*
<b>Resíduo</b>	<b>6</b>	1405971	234328,5	F crítico = 4,07
<b>Total</b>	<b>8</b>			

\* significativo para  $p < 0,01$

#### 3.2.4.3. Discussão

Os resultados obtidos através de ANOVA demonstraram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para o nível de significância de 5 %. Desta forma, os métodos validados são equivalentes, ou seja, o resultado comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa do fármaco em comprimidos. Todos os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamentos oficiais, e apesar de demonstrarem

intercambialidade cada método possui características próprias. Mas alguns métodos são mais específicos e adequados para análise de rotina em laboratórios. A análise espectrofotométrica na região UV é um método simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas não é específico para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação na amostra.

O ensaio microbiológico é um método específico, mas não é capaz de indicar e quantificar a formação de produtos de degradação. Este método seria melhor preconizado para análise eventual em laboratórios, com o objetivo de determinar a potência do antimicrobiano nos comprimidos, sendo utilizado como um teste alternativo de análise. O método mais adequado para ser incluído num compêndio oficial, seria por CLAE, pois é um método específico e apropriado para determinação de produtos de degradação e impurezas.

### **3.3. Discussão geral**

A validação de métodos analíticos é uma ferramenta essencial para a análise de qualidade de fármacos e medicamentos. Métodos analíticos precisam demonstrar características de análise adequadas para identificação de fármacos em formas farmacêuticas e matéria-prima. A linezolida é o primeiro fármaco da classe das oxazolidinonas, e até o momento, não há métodos analíticos padronizados em compêndios oficiais, e também poucos artigos científicos abordando o desenvolvimento de métodos analíticos para linezolida na forma farmacêutica comprimidos.

Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos usualmente utilizados para determinação do teor descritos em códigos oficiais e na literatura, relacionados ao controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Além disso, a simplicidade de execução, tempo de análise, custo e a capacidade de aplicação em estudos de estabilidade foram, também, considerados, tendo em vista buscar métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina.

A análise qualitativa deve ser realizada para identificar a substância ativa em matérias-primas e em formas farmacêuticas. Neste trabalho foram realizadas as seguintes análises: ponto de fusão, análise térmica (DSC/TG), CCD, espectrofotometria no UV, espectrofotometria no IV e CLAE. A partir dos resultados obtidos, foi possível confirmar, a identidade de LNZ-SR, bem como identificá-la nos comprimidos de linezolida. Todos os métodos desenvolvidos para quantificação de linezolida mostraram-se adequados, proporcionando resultados satisfatórios. As diferentes técnicas utilizadas propiciam alternativas versáteis na escolha do método de análise.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados três métodos analíticos: espectrofotometria na região UV, CLAE e doseamento microbiológico. A validação foi realizada com base nos guias ICH (1996a), AOAC (1997) e resolução nº899 (BRASIL, 2003), as quais contêm diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos, indicando os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método.

Os métodos mostraram-se específicos, uma vez que não houve interferência dos excipientes presente na formulação dos comprimidos de linezolida. O método CLAE, mostrou ser indicativo de estabilidade, pois os comprimidos foram colocados em condições extremas de degradação ácida, alcalina, oxidativa e fotolítica, nas quais o método foi capaz de diferenciar a linezolida dos demais produtos de degradação. O doseamento microbiológico mostrou-se específico em relação à degradação de linezolida pela luz.

A faixa de linearidade foi estabelecida para todos os métodos, construindo a curva analítica, analisada por ANOVA. Todas as análises realizadas forneceram regressão linear significativa, não apresentando desvio significativo de linearidade. Todos os métodos apresentaram coeficiente de correlação próximo da unidade (acima de 0,999) indicando haver correlação linear entre as concentrações utilizadas e as respectivas respostas obtidas. A precisão e o desvio padrão relativo foram avaliados

---

para todos os métodos desenvolvidos e não excedeu o valor de 2%, demonstrando que os mesmos apresentam elevada precisão sob as condições estudadas. A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, e as percentagens recuperadas de LNZ-SR foram próximas a 100 %, indicando que os métodos possuem exatidão adequada.

Não existem especificações oficiais para o teor de linezolida nos comprimidos. Os limites preconizados pelas farmacopéias para a determinação do teor de fármacos em formas farmacêuticas encontram-se na faixa de 90,0 a 110,0 % (F. Bras., 1988; USP 31, 2008).

Através dos métodos validados, os teores encontrados para as amostras encontram-se entre 98,7 a 101,96 % do valor declarado, dentro dos limites usuais.

### 3.4. Conclusões

- Avaliação da faixa de fusão permitiu caracterizar LNZ-SR.
- Os métodos por CCD, espectrofotometria no UV, espectrofotometria no IV, CLAE e análise térmica, mostraram-se adequados para a identificação do fármaco nas formas farmacêuticas.
- A determinação de linezolida em comprimidos por espectrofotometria na região de ultravioleta a 251 nm, utilizando água como solvente demonstrou ser seletiva, linear, sensível, precisa e exata.
- A análise quantitativa por CLAE demonstrou especificidade, linearidade, sensibilidade, robustez, precisão e exatidão para determinação de linezolida em comprimidos.
- O doseamento microbiológico foi desenvolvido e validado, utilizando método por difusão em ágar cilindros em placa e *Bacillus subtilis* ATCC 9372 como microrganismo padrão para linezolida em comprimidos, em que o método mostrou-se linear, preciso, exato e específico.
- A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa de linezolida em comprimidos por CLAE, UV e doseamento microbiológico atendeu aos requisitos de validação, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

#### 4.1. Introdução

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida incorpora-se no solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação do fármaco de uma forma farmacêutica para uma determinada área, numa determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição é mais consentânea com a aplicação dos ensaios de dissolução aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico a libera (COSTA e LOBO, 1999; COSTA e LOBO, 2001a). No entanto, podem ser incorporadas no seio da forma farmacêutica substâncias, que permitem alterar a solubilidade do fármaco no meio (PREECHAGOON et al., 2000).

O teste de dissolução é uma ferramenta muito importante para a indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos, como nos testes de controle de qualidade de rotina. Apesar de ter sido inicialmente desenvolvido para formas farmacêuticas sólidas, nos últimos anos o teste de dissolução vem sendo aplicado também às formas não sólidas, como suspensões, adesivos transdérmicos, supositórios e outras. Recentemente, com o advento dos medicamentos genéricos, outros empregos do ensaio de dissolução tornaram-se importantes. A comparação de perfis de dissolução, por exemplo, é fundamental para evitar que todas as dosagens de um mesmo produto sejam submetidas a estudos de bioequivalência. Outro aspecto importante relacionado à dissolução é a classificação biofarmacêutica. Ela divide os fármacos em quatro categorias segundo sua solubilidade e permeabilidade (DRESSMAN et al., 1998; MARCOLONGO, 2003).

De acordo com esta classificação, os fármacos são divididos em quatro categorias (AMIDON et al., 1995; FDA, 1997; FDA, 2000; BRASIL, 2002):

- Classe 1: Alta solubilidade (AS) – Alta permeabilidade (AP)
- Classe 2: Baixa solubilidade (BS) – Alta permeabilidade (AP)
- Classe 3: Alta solubilidade (AS) – Baixa permeabilidade (BP)
- Classe 4: Baixa solubilidade (BS) – Baixa permeabilidade (BP)

A utilização da classificação biofarmacêutica permite determinar a possibilidade de correlação *in vitro* – *in vivo* (FDA, 2000; BROWN et al., 2004). Nos casos em que há possibilidade de correlação, o teste de dissolução deve ser realizado de forma a prever o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas (MANADAS et al., 2002). Embora as formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata sejam rotineiramente analisadas quanto ao peso médio, uniformidade de conteúdo, dureza, friabilidade e desintegração, pode-se afirmar que, o teste mais frequentemente associado às características do comportamento *in vivo* é o teste de dissolução (DRESSMAN et al., 1998).

Desde a introdução do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995), a validade e aplicabilidade desta teoria têm sido objeto de ampla discussão e investigação. Estes esforços têm resultado numa melhor orientação do SUPAC-IR (FDA, 1995), diretrizes para dissolução (FDA, 1997) e orientação da FDA (*Food and Drug Administration*) para isenção dos estudos de bioequivalência, dos fármacos inseridos na Classe I (formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata), que apresentam dissolução rápida e liberação imediata (FDA, 2000). Os aspectos destas diretrizes abordam, também, os seguintes aspectos em relação à isenção dos estudos de bioequivalência: o fármaco deve ser estável no trato gastrointestinal, os excipientes não devem interferir na absorção do fármaco, o fármaco

não deve ter um índice terapêutico estreito e o produto não pode ser absorvido na cavidade oral (FDA, 2000).

O SCB geralmente é considerado conservador nos critérios de dissolução, em relação à solubilidade e permeabilidade, levando em consideração o limite das classes. Com isso, a possibilidade de modificar os limites e critérios, para permitir a isenção de estudos de bioequivalência *in vivo* nos estudos de novos produtos, tem recebido atenção crescente (BLUME e SCHUG, 1999).

A solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dosagem mais alta de um medicamento em 250 mL de uma solução tampão de pH entre 1,0 e 8,0. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando o resultado, em volume, da relação dose/solubilidade é menor ou igual a 250 mL. Um fármaco de alta permeabilidade é, geralmente, aquele cuja biodisponibilidade absoluta é maior que 90% na ausência de instabilidade no trato gastrointestinal ou quando este parâmetro é determinado experimentalmente. O SCB sugere que, para fármaco de AS e AP (classe I) e para alguns fármacos de AS e BP (classe III), a obtenção de 85% de dissolução em HCl 0,1 M, em até 15 minutos, pode garantir que a biodisponibilidade do fármaco não é limitada pela dissolução. Em outras palavras, o medicamento, com este perfil de dissolução, tem na permeabilidade a etapa determinante da biodisponibilidade e, portanto, da equivalência terapêutica.

Outro aspecto a ressaltar, trata da grande variabilidade existente na cinética de dissolução dos medicamentos contendo fármacos altamente solúveis, enquadrados no perfil de dissolução mínima de 85% em até 15 minutos. Em virtude da concentração na solução aumentar verticalmente com o tempo, qualquer desvio por menor que seja no tempo de coleta da amostra nas diferentes cubas, na formulação do produto ou nas condições da dissolução poderá conduzir a erros que inviabilizam a comparação dos perfis de dissolução dos medicamentos contendo fármacos altamente solúveis e que atendam as condições de dissolução propostas nesta emenda. O fato da dissolução

não ser a etapa determinante da biodisponibilidade nestes produtos e a dificuldade de evitar os erros metodológicos em função dos diferentes fatores mencionados, neste caso, ocorre a isenção da comparação matemática, porém mantém-se a exigência da apresentação do perfil de dissolução (BRASIL, 2002).

Para fármacos de BS e AP (caso II), a dissolução pode ser o passo limitante da velocidade de absorção e uma correlação *in vitro* - *in vivo* pode ser esperada. Perfis de dissolução obtidos em meios de dissolução diferentes são recomendados para medicamentos que contêm fármacos desta categoria. Para fármacos de AS e BP (caso III), a permeabilidade é o passo limitante da velocidade de absorção, podendo-se esperar, no máximo, uma correlação *in vitro-in vivo* limitada, dependente das velocidades relativas de dissolução e do trânsito intestinal. Os fármacos que se enquadram no caso IV (BS e BP), geralmente, apresentam problemas significativos para liberação a partir de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI) (BRASIL, 2002).

A *Food and Drug Administration* (FDA, 2000) regulamenta diretrizes para os testes de dissolução das formas farmacêuticas sólidas, abordando os seguintes aspectos:

- Recomendações gerais para os testes de dissolução
- Acesso às especificações de dissolução estabelecidas em relação às características biofarmacêuticas dos fármacos
- Métodos estatísticos para comparação dos perfis de dissolução
- Processos para determinar quando o teste de dissolução é suficiente para garantir a isenção dos estudos de bioequivalência.

O teste de dissolução é considerado um teste de desempenho (USP 31; 2008; BRASIL, 2002), sendo importante para sua validação, a avaliação dos parâmetros precisão, exatidão, especificidade e linearidade, respeitando as características de cada caso. Os resultados obtidos auxiliam no desenvolvimento e avaliação de novas

---

formulações, possibilitando possível correlação *in vivo-in vitro* e fazem parte da documentação para registro de novos produtos às autoridades regulatórias (MARQUES e BROWN, 2002).

Para desenvolver um teste de dissolução, vários fatores devem ser avaliados como a solubilidade, a permeabilidade e as características farmacocinéticas do fármaco, bem como as peculiaridades da formulação em estudo. O aparato (usualmente cestas ou pás), o meio de dissolução e a velocidade de agitação devem ser cuidadosamente determinados. O pH do meio e o volume utilizado também devem ser observados (FDA, 1997). Além disso, é necessário que o método de quantificação a ser aplicado no teste esteja validado. A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade propostos (MARCOLONGO, 2003).

Os estudos de dissolução são uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento galênico, identificação de variáveis críticas, na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares. Existe necessidade real de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever de forma mais eficaz o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas, devendo levar não só à redução dos custos e trabalho necessários ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica, mas também ao número e tamanho dos estudos clínicos requeridos e o controle de qualidade mais confiável. Os ensaios de dissolução *in vitro* constituem importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, possibilitando o controle de qualidade farmacêutico e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*. O conhecimento e controle das variáveis que podem influenciar a liberação da substância ativa bem como a padronização e conseqüente calibração e validação de equipamentos e procedimentos fortalecem a importância destes ensaios, tornando-os mais confiáveis, robustos e exeqüíveis. A seleção criteriosa das

condições do ensaio deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos (MANADAS et al., 2002; MARCOLONGO, 2003).

Além de demonstrar a equivalência lote-a-lote, o teste é uma exigência para o registro de novos produtos e um parâmetro essencial a ser avaliado em um processo de controle de qualidade (MARQUES e BROWN, 2002). Diversos parâmetros devem ser avaliados para o desenvolvimento do teste de dissolução, quais sejam: meio de dissolução, velocidade de agitação, aparelho de dissolução, tempo para amostragem, entre outros (MARQUES e BROWN, 2002; USP 31, 2008). Além disso, o conhecimento das propriedades do fármaco, relacionadas à solubilidade e permeabilidade deve ser buscado na literatura, com o objetivo de verificar em qual classe da classificação biofarmacêutica se encontra, e se há possibilidade de correlação *in vitro-in vivo*.

No âmbito mundial, a dissolução adquire importância cada vez maior em relação às alterações pós-registro relacionada a mudanças de formulação, equipamento, processo produtivo e local de produção, de forma a fornecer justificativas técnicas que embasem a não realização de ensaios desnecessários envolvendo seres humanos, evitando assim o problema ético e também de custo, que estes estudos acarretam (MARCOLONGO, 2003). Há, atualmente, inúmeras pesquisas em andamento para ampliar o uso dos ensaios de dissolução nos casos de isenção de testes de bioequivalência previstos pelo SCB. Embora não existam no mundo muitos casos em que esta isenção foi efetivamente concedida, a perspectiva é que, com o advento de novas técnicas para determinação da permeabilidade intestinal e a definição real de quais fármacos seriam objeto de tal isenção, especificamente aqueles da classe I, a aplicação do SCB seja difundida, podendo inclusive ser ampliada para fármacos da classe III (MARCOLONGO, 2003).

## **4.2. Material**

Foram utilizados comprimidos revestidos de linezolida (Zyvox), descritos no capítulo III, empregados para o desenvolvimento e validação dos métodos qualitativos e quantitativos.

### *4.2.1. Equipamento*

Os testes de dissolução foram realizados em equipamento HANSON – SR 8 plus, contendo seis cubas de dissolução, de acordo com as normas estabelecidas pela USP 31 (2008). A quantificação de linezolida nas amostras foi realizada utilizando os métodos anteriormente validados em CLAE e espectrofotometria UV.

## **4.3. Teste de dissolução**

### *4.3.1.1. Determinação das condições sink*

As condições *sink* para linezolida foram determinadas em água e HCl 0,1 M (pH 1,2), utilizando quantidades de fármaco equivalentes a 3 vezes a dose presente na forma farmacêutica em 900 mL de meio de dissolução.

### *4.3.1.2. Determinação do perfil de dissolução*

O perfil de dissolução foi avaliado depois de obtidas as condições mais adequadas para o perfil de dissolução. Após cada tempo de coleta selecionado, conforme Tabela 4.1, uma alíquota de 15,0 mL (equivalente a aproximadamente 10.000 µg) foi retirada de cada cuba e o mesmo volume de meio de dissolução foi repostado, para manter o volume total constante. A alíquota retirada foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se solução com concentração teórica de 100,0 µg/mL. Uma alíquota de 3,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se solução com concentração teórica de 12,0 µg/mL. Para análise em CLAE,

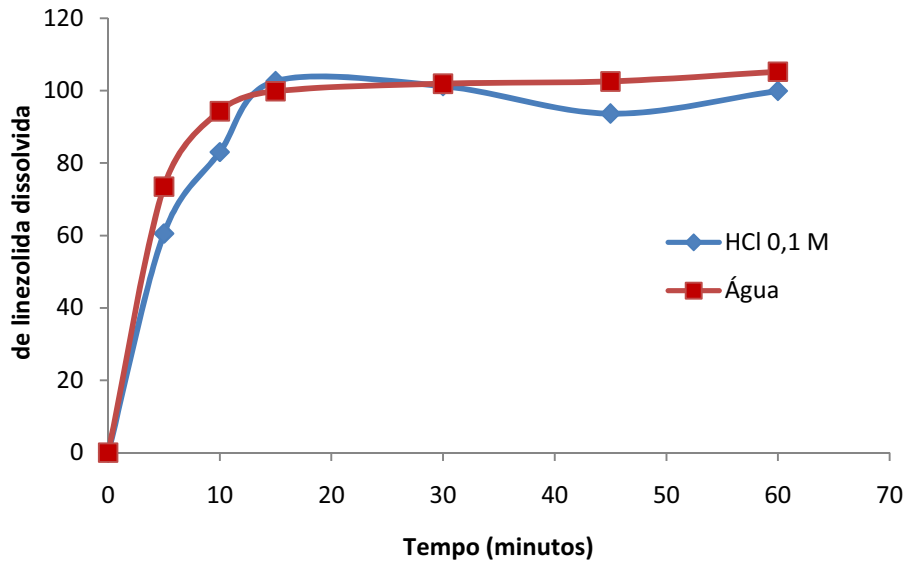
esta solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm e diluída com a fase móvel. Para análise por espectrofotometria no UV foi preparada uma solução com concentração final de 12,0 µg/mL, utilizando o procedimento descrito anteriormente.

**Tabela 4.1.** Condições usadas no perfil de dissolução de comprimidos de linezolida

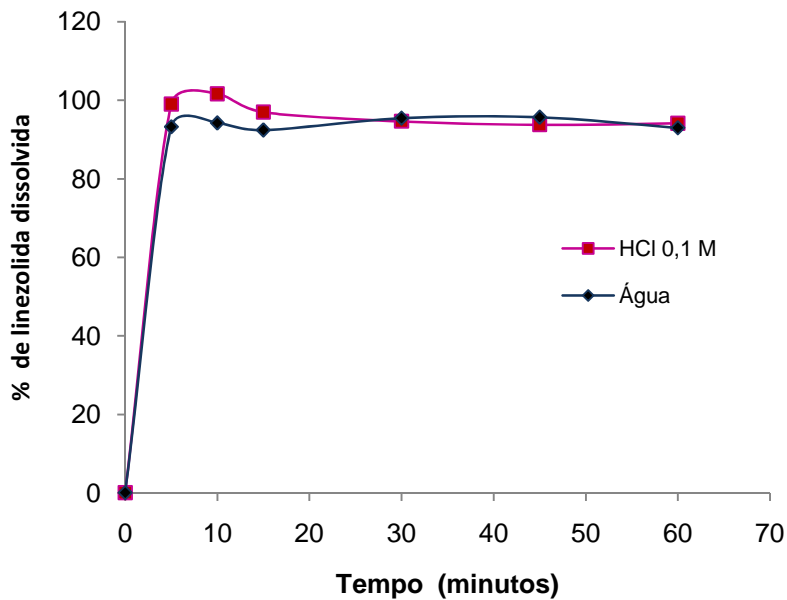
<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
Velocidade de agitação	50 rpm
Meio de dissolução	Água/HCl 0,1 M
Volume do meio	900 mL
Modo de desaeração	Banho de ultrassom 15 minutos
Tempos de coleta	5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos
Temperatura	37 ± 0,5° C
Aparato	pá

#### 4.3.1.3. Resultados e discussão

Os testes preliminares foram realizados para verificar se linezolida era solúvel em HCl 0,1 M e água. As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam os resultados obtidos a partir de testes de dissolução com comprimidos de linezolida utilizando pás e velocidade de rotação de 50 rpm e dois meios de dissolução: água e HCl 0,1 M, utilizando CLAE e espectrofotometria no UV, respectivamente, para análise.



**Figura 4.1.** Perfis de dissolução de comprimidos de linezolida utilizando pás a 50 rpm e HCl 0,1 M e água como meios de dissolução, analisados por CLAE.



**Figura 4.2.** Perfis de dissolução de comprimidos de linezolida utilizando pás a 50 rpm e HCl 0,1 M e água como meios de dissolução, analisados por espectrofotometria no UV.

O perfil de dissolução foi desenvolvido para verificar o comportamento de dissolução de linezolida. Na literatura, não foi encontrada a classificação de linezolida no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, mas pode-se inferir que o fármaco seja Classe I, visto que apresenta uma alta solubilidade e biodisponibilidade de quase 100 %. Neste caso, a análise poderia ter sido realizada em apenas um ponto (FDA, 1997). Entretanto, como não há dados sobre os testes de dissolução para os comprimidos contendo linezolida publicados na literatura, optou-se por realizar o perfil de dissolução, a fim de conhecer as informações geradas a partir do teste desenvolvido.

Inicialmente, para os estudos de dissolução, foram escolhidos dois métodos analíticos validados anteriormente (capítulo III) para análise dos comprimidos de linezolida: método espectrofotométrico e CLAE. Para o desenvolvimento do teste de dissolução para comprimidos contendo linezolida, foram testadas as condições *sink*. Os resultados mostraram que o fármaco apresenta solubilidade em HCl 0,1 M e água. Desta forma, o teste de dissolução foi realizado nestes dois meios, para avaliar o percentual de liberação do fármaco ao final do teste de dissolução. Nos estudos em meio ácido (Figura 4.1 e 4.2), os comprimidos se desintegraram levemente mais rápido do que em água, melhorando desta forma a taxa de dissolução, aumentando a área efetiva de superfície. Contudo, por causa da ação corrosiva de vapores ácidos sobre o equipamento de dissolução, atualmente é prática geral usar água destilada, a não ser que estudos de investigação apontem para a necessidade específica de dissolução ácida para gerar dados significativos (REMINGTON, 2004). Outra observação verificada nos estudos preliminares está relacionada ao perfil de dissolução em ácido e em água (Figura 4.1 e 4.2), que são praticamente semelhantes, excetuando-se os primeiros 15 minutos de dissolução, que em ácido é mais rápido. Devido aos fatores explanados o meio de dissolução selecionado para a realização dos perfis de dissolução foi a água.

A velocidade de agitação foi selecionada de acordo com faixa recomendada para pás (50-75 rpm) (FDA, 1997; USP 31, 2008). Considerando que os testes preliminares com 50 rpm foram satisfatórios, não foram testadas outras velocidades. O perfil de dissolução obtido para os comprimidos contendo linezolida foi satisfatório. Após 10 minutos, na análise por espectrofotometria no UV e CLAE mais de 85 % do fármaco estava dissolvido no meio. Como especificação do teste, pode ser sugerida a análise de um ponto, por exemplo, em 30 minutos, no qual mais de 85 % do fármaco deverá estar dissolvido. Com a determinação do perfil de dissolução de linezolida, foram estabelecidos os parâmetros para a realização do teste de dissolução, bem como sua validação.

#### 4.3.3. Métodos

Para definição dos parâmetros utilizados no teste de dissolução, foram testados dois meios: água e HCl 0,1 M (pH 1,2). Os testes de dissolução foram realizados utilizando 900 mL de cada um dos dois meios de dissolução, os quais foram previamente desaerados em ultrassom por 15 minutos e mantidos a temperatura de  $37 \pm 0,5^{\circ}$  C. Foi utilizado o aparato pá e o tempo de teste foi de 60 minutos.

#### 4.4. Validação do teste de dissolução

A validação do teste de dissolução foi realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão intermediária e estabilidade das soluções (MARQUES e BROWN, 2002; USP 31, 2008).

- **Especificidade:** avaliada usando placebo dos comprimidos. As amostras placebo foram preparadas utilizando-se quantidades equivalentes a um comprimido revestido, as quais foram transferidas para cubas de dissolução contendo 900 mL de meio por 1

h a 150 rpm, utilizando o respectivo aparato de dissolução. A interferência dos excipientes presentes foi analisada por UV e CLAE.

- **Linearidade:** avaliada pela curva analítica construída para o método de CLAE e UV, a qual empregou seis concentrações de linezólida-SQR (8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 e 20,0 µg/mL para CLAE e 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 µg/mL para UV).

- **Precisão:** a avaliação da precisão intermediária do teste de dissolução foi realizada utilizando um lote caracterizado em termos de uniformidade de conteúdo e comparando os resultados com aqueles obtidos do teste de dissolução. De acordo com a USP 31 (2008), a uniformidade de conteúdo é avaliada dosando dez comprimidos, individualmente, e calculando o conteúdo de linezólida de cada um. Além disso, foram comparados os resultados obtidos com analistas diferentes, utilizando um lote com uniformidade de conteúdo avaliada.

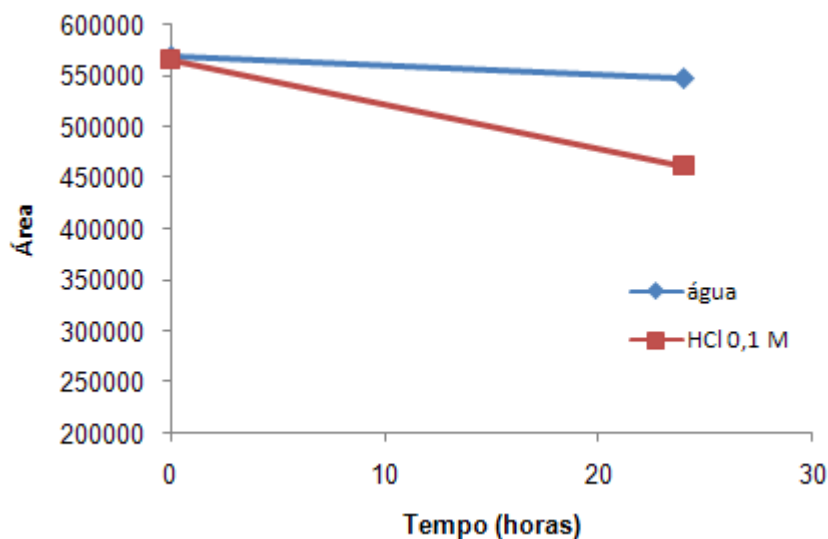
- **Exatidão:** Conforme os guias do ICH (1996), a exatidão foi inferida a partir dos dados de linearidade, especificidade e precisão.

- **Estabilidade das soluções:** a estabilidade foi avaliada verificando-se a resposta de solução amostra armazenada a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por um período de tempo especificado. As soluções amostras com os meios de dissolução testados (água e HCl 0,1 M) foram monitoradas por 24 h utilizando CLAE.

#### 4.4.1. Estabilidade e especificidade das soluções

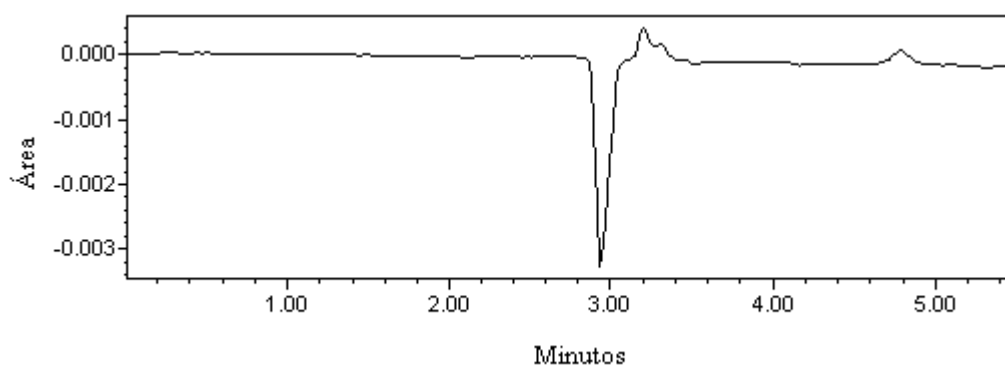
##### 4.4.1.1. Resultados e discussão

A Figura 4.3 apresenta o gráfico do decaimento de linezólida nas primeiras 24 horas de avaliação de sua estabilidade nos meios de dissolução água e HCl 0,1 M.



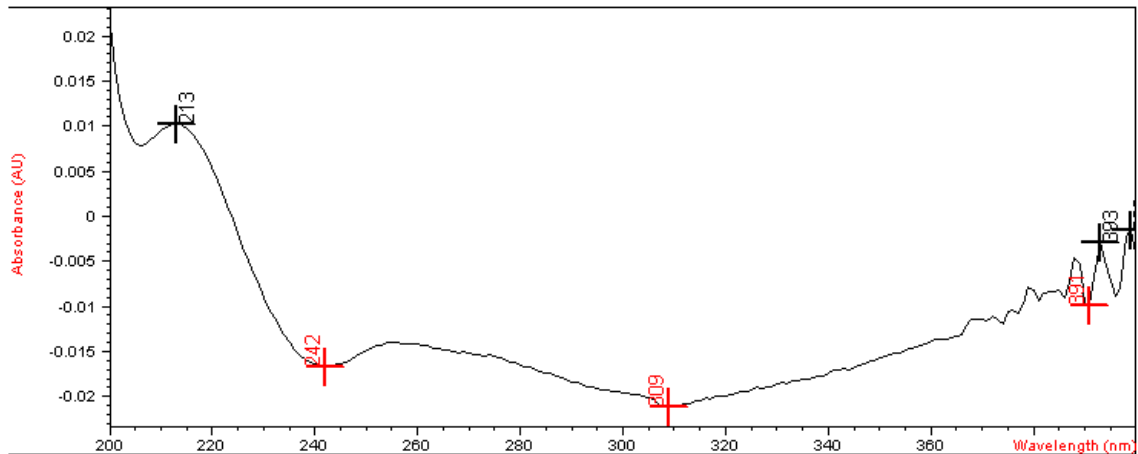
**Figura 4.3.** Perfil de decaimento de linezolida nas primeiras 24 horas de avaliação de sua estabilidade nos meios de dissolução.

A Figura 4.4 mostra o cromatograma referente à avaliação da especificidade dos excipientes contidos no comprimido, avaliados por CLAE.



**Figura 4.4.** Cromatograma do placebo, em água.

A Figura 4.5 mostra o espectro de absorção referente à avaliação da especificidade dos excipientes contidos no comprimido, avaliados por espectrofotometria no UV.



**Figura 4.5.** Espectro de absorção do placebo, em água.

A estabilidade das soluções foi avaliada nos dois meios analisados. De acordo com a Figura 4.4, as soluções foram avaliadas por 24 horas, em que, verificou-se que a solução em água é mais estável, que em meio ácido. Logo nas primeiras horas, verifica-se o decaimento de linezolidina em meio ácido. Este dado vem corroborar com a escolha de água como meio de dissolução para este fármaco. A análise da especificidade demonstrou que os métodos por CLAE e espectrofotometria no UV não sofrem interferência dos excipientes da formulação (Figura 4.4 e 4.5).

#### 4.4.2. Precisão

##### 4.4.2.1. Método

A precisão intermediária foi avaliada pela comparação dos resultados de uniformidade de conteúdo e o percentual de liberação do fármaco. A precisão intermediária também foi avaliada com a utilização de dois analistas diferentes durante os testes.

##### 4.4.2.2. Resultados e discussão

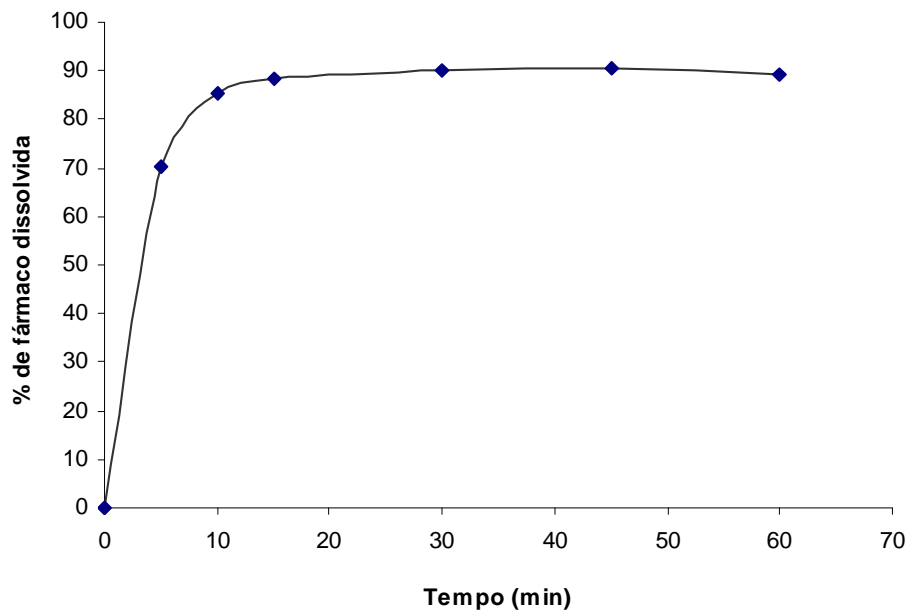
###### 4.4.2.2.1. Análise por espectrofotometria UV

As quantidades de linezolida, dissolvidas em cada tempo de coleta, e os valores de desvio padrão relativos estão listados na Tabela 4.2 e o perfil de dissolução apresentado na Figura 4.6.

**Tabela 4.2.** Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6), usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás)

Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR*
0	0	0
5	70,45	8,87
10	85,29	4,32
15	88,25	2,58
30	90,10	2,82
45	90,48	2,62
60	89,21	2,38

\*DPR- desvio padrão relativo



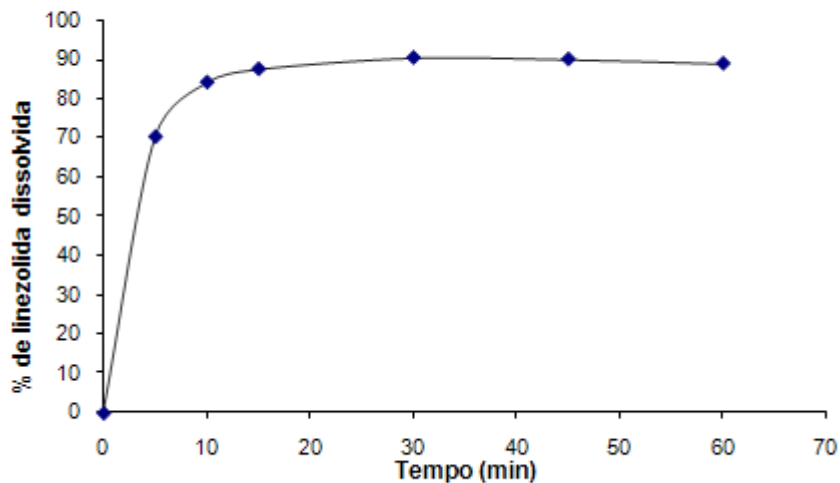
**Figura 4.6.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).

A precisão intermediária no teste de dissolução utilizando espectrofotometria no UV foi avaliada utilizando dois analistas diferentes. A Tabela 4.3 e a Figura 4.7, apresentam os resultados obtidos pelo Analista 1, utilizando espectrofotometria no UV para análise.

**Tabela 4.3.** Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 1, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás)

Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR*
0	0	0
5	70,35	12,50
10	84,18	7,15
15	87,58	4,54
30	90,46	2,83
45	90,07	2,14
60	88,98	2,16

\*DPR- desvio padrão relativo



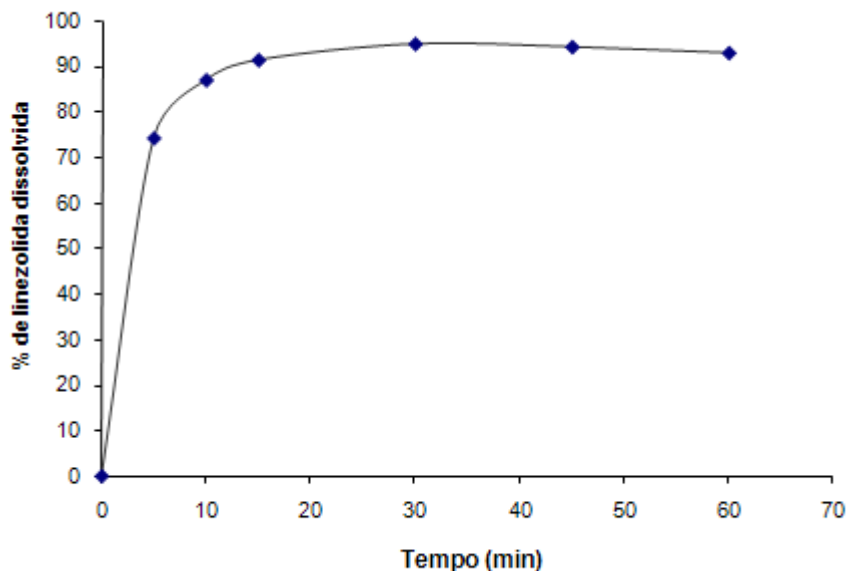
**Figura 4.7.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 1, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).

A Tabela 4.4 e a Figura 4.8 demonstram a quantidade de linezolida dissolvida em cada tempo, pelo analista 2.

**Tabela 4.4.** Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás)

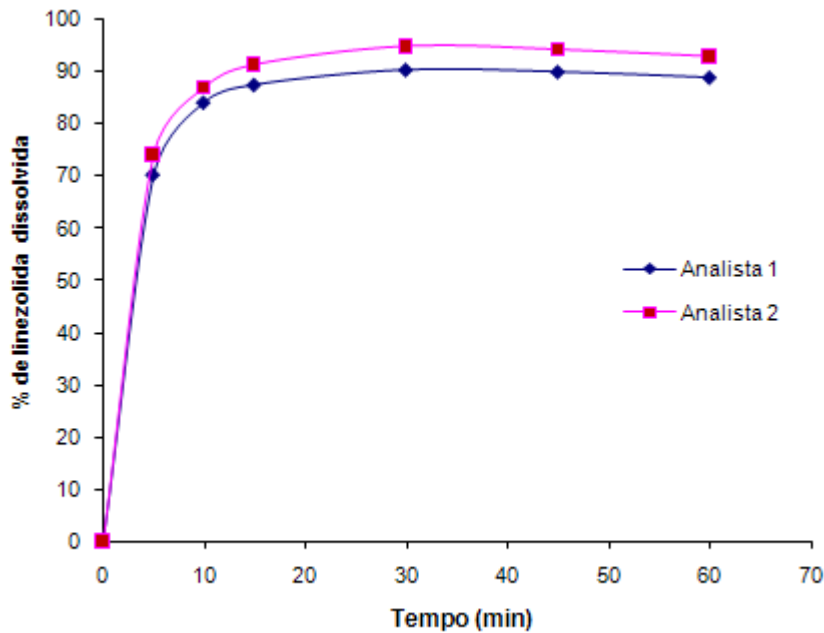
Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR
0	0	0
5	74,29	9,57
10	87,06	6,49
15	91,46	7,34
30	95,01	5,35
45	94,35	5,84
60	93,03	4,63

\*DPR- desvio padrão relativo



**Figura 4.8.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás)

A Figura 4.9 ilustra os perfis de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, determinados pelo método espectrofotométrico, por dois analistas.



**Figura 4.9.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 1 e 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm

A avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de linezolida foi determinado pelo método espectrofotométrico no UV, previamente validado. O valor médio de uniformidade de conteúdo para comprimidos de linezolida foi de 98,73 % utilizando espectrofotometria na região ultravioleta. A Tabela 4.2 mostra os valores de linezolida dissolvidos no meio de dissolução em tempos pré-determinados. Observa-se que em 10 minutos, a linezolida possui dissolução maior que 85 %.

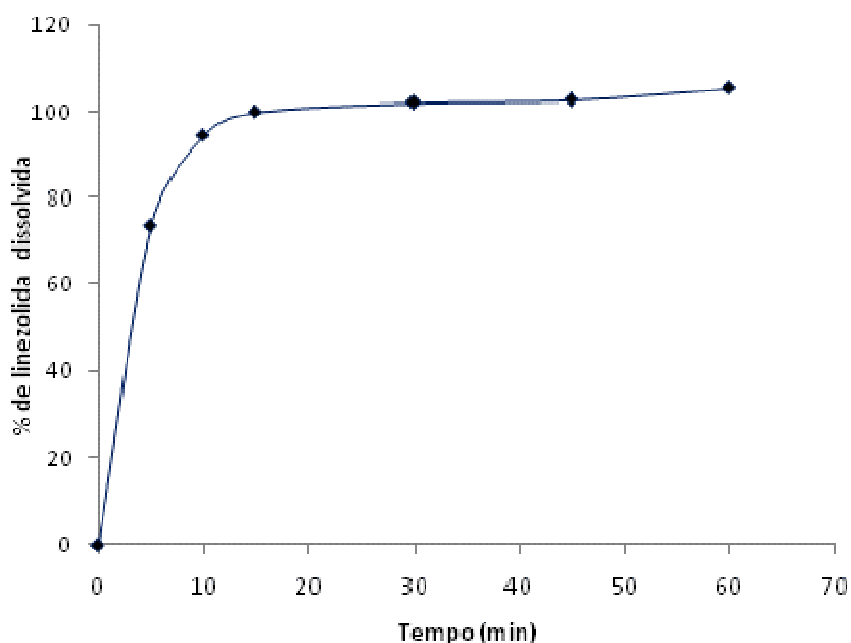
A precisão intermediária do método por espectrofotometria no UV foi avaliada por dois analistas diferentes. Os valores de DPR para percentagens de dissolução, utilizando o método espectrofotométrico no UV, com analistas diferentes, encontram-se abaixo de 6 % para valores acima de 85 % de dissolução. A Figura 4.9 apresenta os perfis de dissolução obtidos pelos dois analistas, em que observa-se, que não houve diferença significativa nos perfis de dissolução nas duas análises.

## 4.4.2.2.2. Análise utilizando CLAE

As quantidades de linezolida, dissolvidas em cada tempo de coleta, e os valores de DPR estão listados na Tabela 4.5 e o perfil de dissolução mostrado na Figura 4.10.

**Tabela 4.5.** Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6), usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás)

Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR
0	0	0
5	73,48	9,26
10	94,32	6,74
15	99,83	3,23
30	101,93	2,62
45	102,53	2,91
60	105,22	2,92

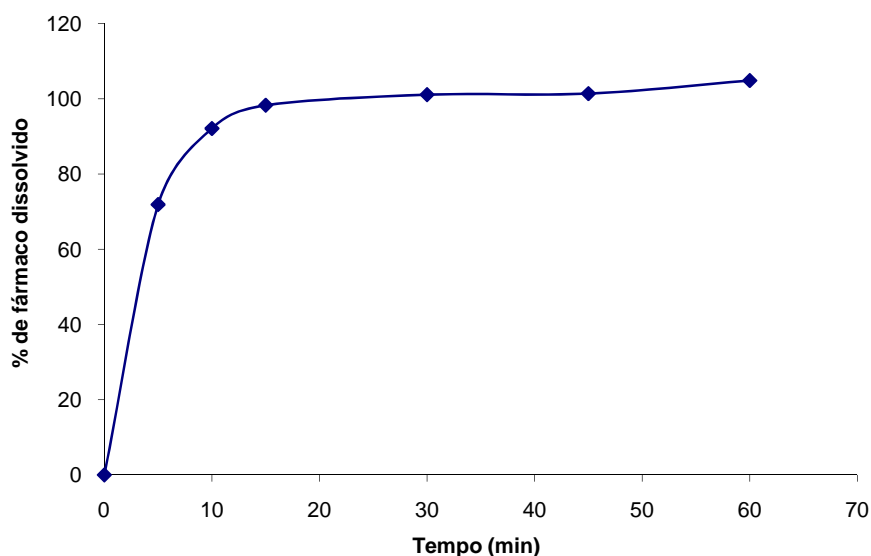


**Figura 4.10.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, usando água

A precisão intermediária no teste de dissolução utilizando CLAE foi avaliada utilizando dois analistas diferentes. A Tabela 4.6 e a Figura 4.11, apresentam os resultados obtidos pelo Analista 1, utilizando CLAE para análise.

**Tabela 4.6.** Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 1, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás)

Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR
0	0	0
5	71,87	11,21
10	92,11	8,12
15	98,27	5,11
30	101,09	3,40
45	101,38	4,32
60	104,85	4,74

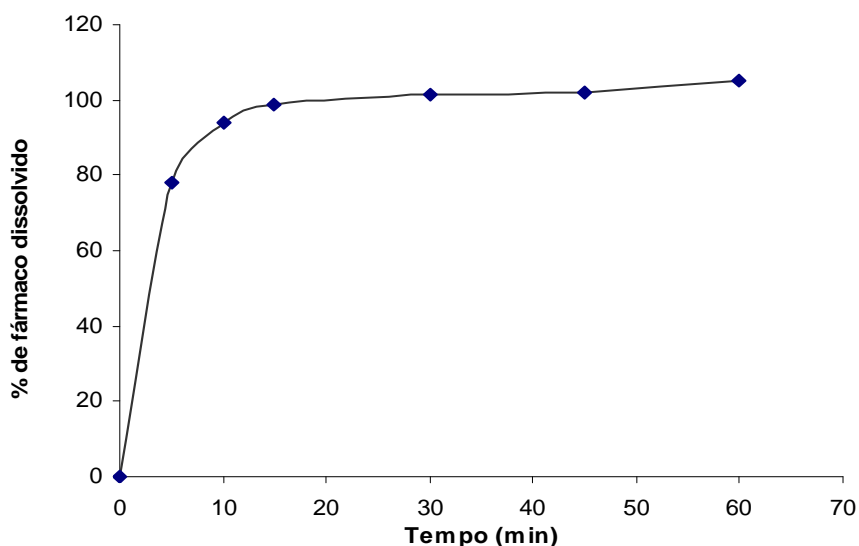


**Figura 4.11.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 1, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).

A Tabela 4.7 e a Figura 4.12 demonstram a quantidade de linezolida dissolvida em cada tempo, pelo analista 2.

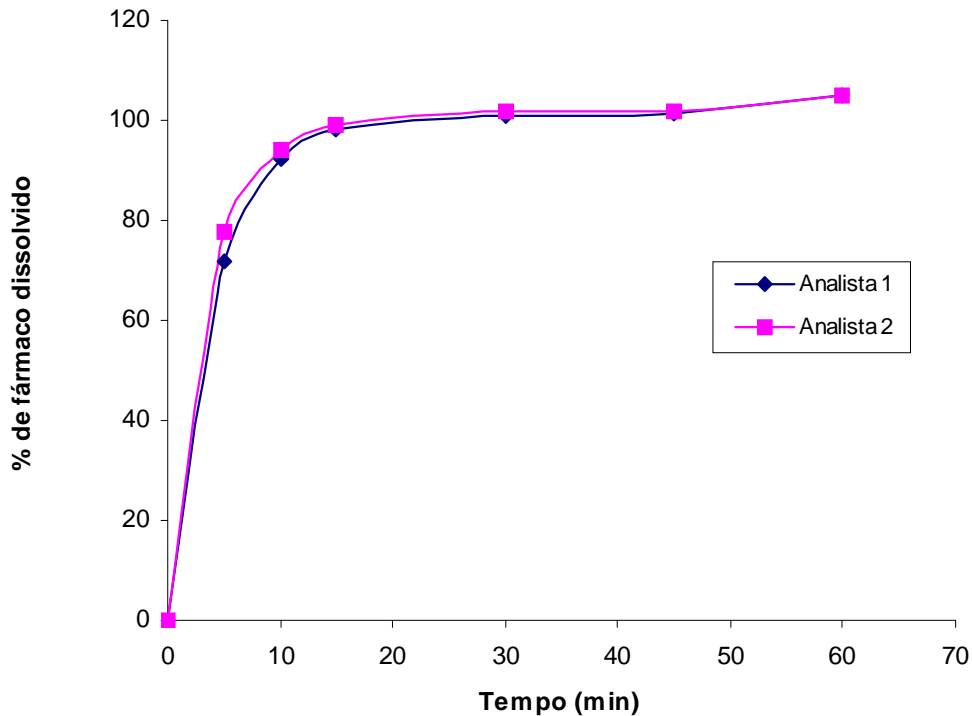
**Tabela 4.7.** Quantidade de linezolida dissolvida no teste de dissolução (n = 6) e o respectivo DPR, determinados pelo analista 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).

Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR
0	0	0
5	77,79	11,92
10	94,02	6,46
15	98,87	3,54
30	101,68	4,02
45	101,97	4,49
60	105,06	3,36



**Figura 4.12.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo analista 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm (pás).

A Figura 4.13 apresenta os perfis de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, determinados pelo método cromatográfico por dois analistas.



**Figura 4.13.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelos analistas 1 e 2, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm, analisados.

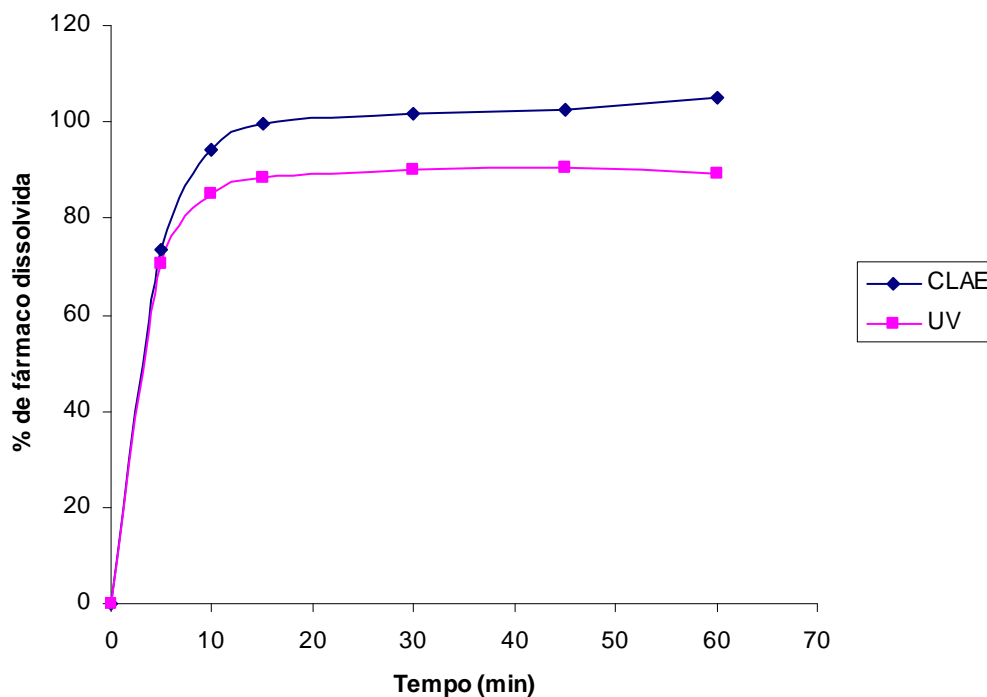
O perfil de dissolução de linezolida foi analisado utilizando CLAE, previamente validado. Os valores médios de uniformidade de conteúdo para comprimidos de linezolida foram 101,39 % utilizando CLAE.

A Tabela 4.5 apresenta os valores de linezolida dissolvida nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, em que, verificou-se a dissolução de 94 % de linezolida em 10 minutos de análise. No tempo de 30 minutos, linezolida apresentou dissolução de 100% e o DPR foi de aproximadamente 2,5 %. Este ponto, 30 minutos, pode ser sugerido para o tempo de análise no teste de dissolução, utilizando CLAE.

Com o intuito de analisar a precisão intermediária do teste de dissolução, o perfil de dissolução foi realizado por dois analistas. Os valores de DPR para percentagens de dissolução, utilizando CLAE, com analistas diferentes, estavam abaixo de 6 % para valores acima de 95 % de dissolução. A Figura 5.13 apresenta os perfis de dissolução pelos dois analistas em CLAE.

#### 4.4.2.2.3. Comparação dos perfis de dissolução analisados por CLAE e espectrofotometria na região ultravioleta

A Figura 4.14 apresenta a comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de linezolida obtidos por CLAE e espectrofotometria no UV.



**Figura 4.14.** Perfil de dissolução de comprimidos de linezolida 600 mg, obtido pelo método em CLAE e UV, usando água como meio de dissolução e velocidade de 50 rpm.

A comparação dos perfis de dissolução obtidos pelos dois métodos foi demonstrada na Figura 4.14. Pode-se observar que o método em CLAE é mais sensível para detecção do fármaco dissolvido no meio, apresentando um perfil de dissolução máximo (100 %), após 15 minutos de análise. Pela análise no UV, observa-se que, em 30 minutos de análise o fármaco se encontra 90 % dissolvido no meio. Este dado não invalida o teste pela espectrofotometria no UV, já que este valor está dentro da especificação de dissolução para comprimidos, mas o método utilizando CLAE é mais sensível para detecção de linezolida dissolvida no meio de dissolução.

#### 4.5. Estudo da cinética de dissolução

##### 4.5.1. Condições de estudo

Para o estudo da cinética de dissolução, foram utilizadas as concentrações relatadas nas Tabelas 5.2 e 5.5, analisadas por espectrofotometria no UV e CLAE, respectivamente. Os modelos aplicados foram de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi em que os gráficos foram traçados de acordo com o modelo matemático proposto. Para avaliar os perfis de dissolução pelos dos modelos propostos, estabeleceram-se as seguintes relações (FERRAZ, 1997; COSTA e LOBO, 2001b):

- a) Zero ordem: foram traçados gráficos de tempo *versus* quantidade total menos quantidade de fármaco não dissolvido ( $Q = Q_0 - k_0t$ ).
- b) Primeira ordem: foram traçados gráficos de tempo *versus* logaritmo neperiano da porcentagem de fármaco não dissolvido ( $\ln Q = \ln Q_0 - k_1t$ ).
- c) Modelo de Higuchi: foram traçados gráficos da raiz quadrada do tempo *versus* porcentagem de fármaco dissolvido ( $Q = kt^{1/2}$ ).

Estudos de regressão linear foram realizados para cada modelo, determinando-se as equações e parâmetros estatísticos da regressão. O modelo mais adequado foi

selecionado após análise de regressão, considerando-se o parâmetro  $r$  (coeficiente de correlação), das curvas de dissolução por CLAE e espectrofotometria no UV, utilizando apenas os pontos que correspondiam à fase ascendente das mesmas. Outros parâmetros relativos à cinética de dissolução como constante de velocidade de dissolução ( $k_s$ ) e meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ) também foram determinados. Após a seleção do modelo mais adequado, foi calculado o valor de  $k_s$ , que corresponde ao coeficiente angular de inclinação da reta. Cada modelo matemático possui uma equação de  $k_s$  correspondente (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8.** Equações da meia-vida de dissolução ( $k_s$ ) de acordo com o modelo matemático correspondente

Modelo Matemático	Equação
Zero ordem	$t_{50\%} = Q_{\infty}/2 \times k_s$
Primeira ordem	$t_{50\%} = 0,693/k_s$
Modelo de Higuchi	$t_{50\%} = \%D \times \sqrt{t}$

#### 4.5.2. Resultados e discussão

##### 4.5.2.1. Cinética de dissolução de comprimidos de linezolida por CLAE e espectrofotometria no UV

A Figura 4.15 mostra a cinética de dissolução, utilizando os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi, obtidas pela análise por CLAE.

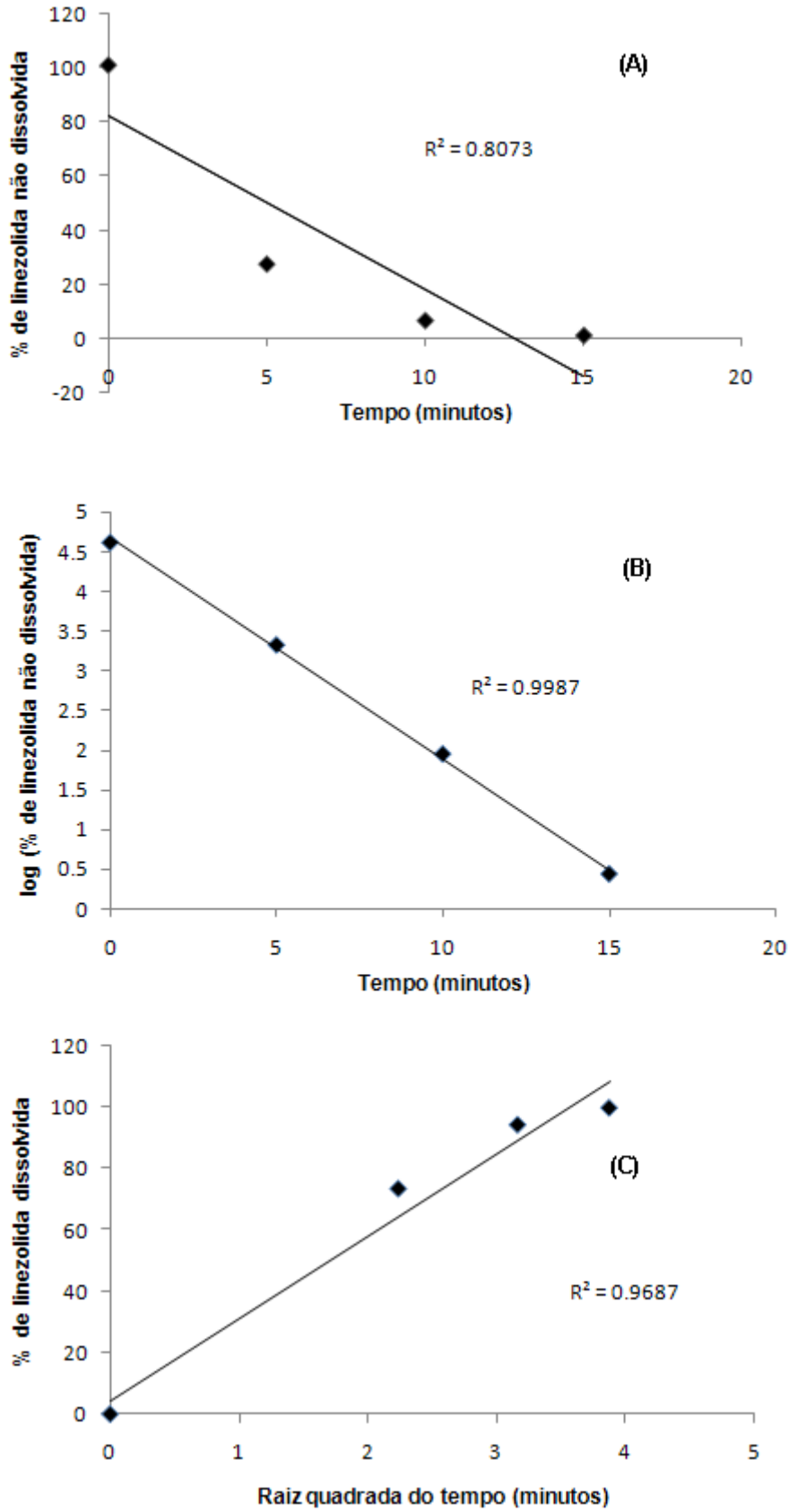
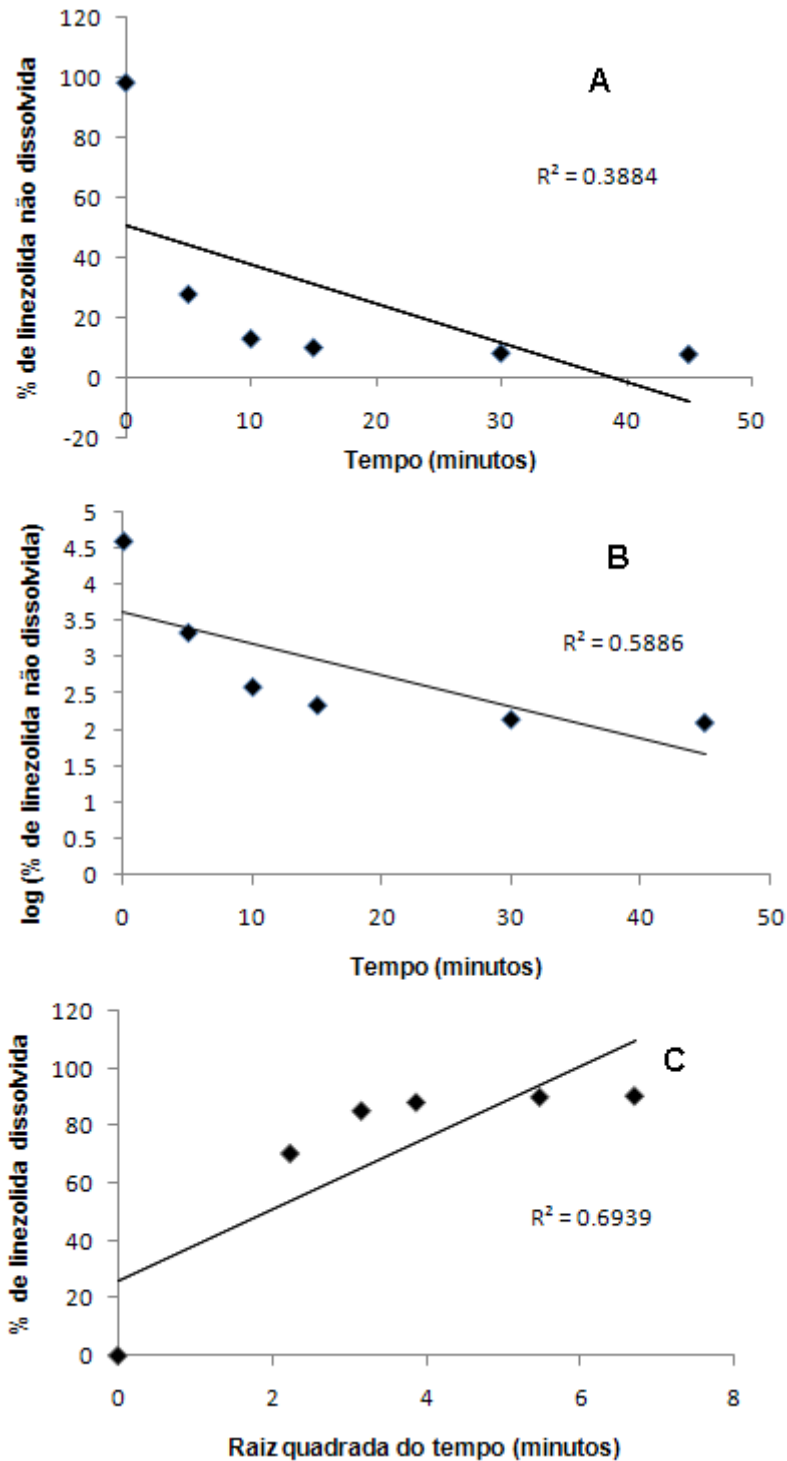


Figura 4.15. Modelos propostos (A) – reação de ordem zero; (B) reação de primeira ordem; (C) modelo de Higuchi, obtidos por CLAE.

A Figura 4.16 mostra a cinética de dissolução, utilizando os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi, obtidas pela análise por espectrofotometria no UV.



**Figura 4.16.** Modelos propostos: (A) – reação de ordem zero; (B) reação de primeira ordem; (C) modelo de Higuchi, obtidos por espectrofotometria no UV.

A Tabela 4.9 mostra os resultados obtidos da velocidade de dissolução (k) e a meia-vida útil ( $t_{50\%}$ ) de comprimidos de linezolida, obtidos segundo cinética de primeira ordem, obtidos pelo método em CLAE.

**Tabela 4.9.** Parâmetros calculados para cinética de dissolução de linezolida obtidos por CLAE

	CLAE
Modelo matemático	Primeira ordem
Coefficiente de correlação ( $r^2$ )	0,9987
Equação	$y = -0,2779x + 4,6715$
Coefficiente linear	4,6715
Coefficiente angular	-0,2779
Constante da velocidade de dissolução ( $\text{min}^{-1}$ )	0,2779
$t_{50\%}$ (minutos)	2,5

O estudo da cinética do processo de dissolução, empregando-se os modelos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi, foi efetuado para os comprimidos de linezolida. Os dados obtidos pelo método espectrofotométrico no UV e CLAE foram tratados com os modelos propostos. Na Figura 5.15 são mostrados os três modelos matemáticos obtidos por CLAE até 15 minutos. Observa-se que em 15 minutos de análise, praticamente 100 % de linezolida está totalmente dissolvida. Na linearização dos dados, utiliza-se os pontos ascendentes na curva. Quando utilizamos modelos matemáticos para caracterizar a cinética de dissolução, os dados plotados no eixo y é de fármaco não dissolvido no meio, em cada tempo de análise. Com isto, observa-se

que o modelo proposto mais adequado para definir a cinética de dissolução é de primeira ordem, que apresentou coeficiente de correlação ( $r^2$ ) equivalente a 0,9987.

A constante de velocidade de dissolução ( $k_s$ ) corresponde ao coeficiente angular da equação de primeira ordem, neste caso, equivalente a 0,2779. A meia-vida é extremamente importante, na medida em que se estabelece o tempo necessário para que 50 % do fármaco esteja dissolvido. Assim para produtos nos quais a liberação do fármaco é mais rápida, os valores de  $t_{50\%}$  serão mais baixos. Em relação a este parâmetro, os comprimidos de linezolida, indicaramram valores baixos,  $t_{50\%} = 2,5$  minutos. Está observação sugere que em um curto espaço de tempo, a forma farmacêutica libera metade da quantidade do fármaco contido, fato este, realmente adequado para uma forma farmacêutica de liberação imediata.

Os dados obtidos pelo método espectrofotométrico no UV (Tabela 4.2) foram tratados para obtenção dos dados de cinética de dissolução. Este método mostra-se pouco sensível para quantificação de linezolida no meio de dissolução. A Figura 5.16 mostra a aplicação dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e modelo de Higuchi. Pôde-se observar que não foi possível determinar um modelo matemático ideal, pois os coeficientes de correlação mostraram-se muito baixos.

O método em CLAE mostra-se mais sensível e adequado para delinear e estudar a cinética de dissolução de comprimidos de linezolida. Não foi possível realizar a comparação de perfis de dissolução entre formulações, pois, até o momento, existe apenas uma especialidade farmacêutica contendo linezolida disponível no mercado brasileiro.

#### **4.6. Conclusão**

O desenvolvimento do teste de dissolução é uma etapa muito importante, considerando que este ensaio é uma ferramenta de avaliação de produtos farmacêuticos. Os dados de especificidade e estabilidade são necessários a fim de considerar qual será o método de doseamento do fármaco, no meio de dissolução. As condições estabelecidas foram adequadas e o perfil obtido considerado satisfatório.

### 5.1. Introdução

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de armazenamento e uso, as mesmas condições características que possuía quando da época de sua fabricação (VADAS, 2000; ANSEL et al., 2000).

A estabilidade dos medicamentos também pode ser definida como o período a partir da data de fabricação e empacotamento da formulação até que a sua atividade química e biológica não seja menor que um nível pré-determinado de potência rotulada e suas propriedades físicas não tenham mudado apreciavelmente e de forma deletéria. Embora existam exceções, 90% das potências descritas em rótulos, geralmente são reconhecidas como o nível mínimo de potência aceitável. O prazo de validade é então definido como o período de tempo no qual a preparação permanecerá estável, dentro dos limites aceitáveis para efeito terapêutico, quando armazenada sob as condições recomendadas (VADAS, 2000).

Muitos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, entre eles, a estabilidade das substâncias ativas, a interação excipiente-fármaco, os processos de produção, a forma farmacêutica, a embalagem e o sistema de lacre, as condições durante o transporte, armazenamento e o período entre a fabricação e a utilização do produto. Fatores ambientais que podem alterar um produto com o tempo incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, pH, interações, contaminação microbiana, entre outros (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

O estudo da cinética das reações químicas tem por objetivo a correlação matemática de dados experimentais, visando estabelecer hipóteses sobre os fatores determinantes da velocidade de uma reação e elucidar os mecanismos de reação envolvidos (NETZ e ORTEGA, 2002).

No âmbito farmacêutico, a cinética química tem aplicação relevante nos estudos de estabilidade de medicamentos, assim como a caracterização dos mecanismos envolvidos na degradação dos mesmos. O conhecimento de tais aspectos permite estabelecer prazos de validade fidedignos, além de assegurar e otimizar a estabilidade dos medicamentos, detectando incompatibilidades decorrentes da mistura dos produtos ou evitando o efeito tóxico associado a produtos de degradação (NETZ e ORTEGA, 2002).

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de várias condições, tais como, concentração dos reagentes, temperatura, pH, solvente utilizado, presença de tensoativos na formulação, umidade, excipientes, luz e oxigênio (LACHMAN et al., 2001; FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Consequentemente, para que o estudo seja efetivo deve-se aplicar princípios de cinética química. O estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo de estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975).

A cinética química classifica as reações em ordem de reações, que são designadas de: ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, terceira ordem ou mesmo ordens cinéticas mais complexas (NETZ e ORTEGA, 2002). Nas reações de ordem zero, a decomposição procede a uma velocidade constante, sendo independente da concentração de quaisquer reagentes. Nesse caso, um gráfico de concentração (c) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k) de degradação do fármaco (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

As reações de primeira ordem indicam que, as velocidades de reação dependem da concentração do reagente, obtendo-se uma reta, com a representação

do logaritmo da concentração (log C) em função do tempo (t). Neste tipo de reação, uma substância decompõe-se em um, ou mais produtos. A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração (1/C) em função do tempo (t) fornece uma reta (LACHMAN et al., 2001). O modelo cinético pode ser representado pelas Equações 6.1, 6.2 e 6.3:

$$C = C_0 - kt \quad t_{90\%} = (0,1 \times C_0)/k \quad (\text{reação de ordem zero}) \quad \text{Equação 6.1}$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0,106/k \quad (\text{reação de primeira ordem}) \quad \text{Equação 6.2}$$

$$1/C = 1/C_0 + kt \quad t_{90\%} = 1/(9k \times C_0) \quad (\text{reação de segunda ordem}) \quad \text{Equação 6.3}$$

Quando a ordem de reação é desconhecida, é possível deduzi-la pela análise dos gráficos plotados para cada ordem. A representação gráfica que resultar em uma linha reta indica qual a ordem de reação. Este método possui algumas limitações, principalmente em relação ao tempo de exposição da amostra ao fator de degradação. Quando os graus de decomposição são muito baixos, é difícil diferenciar as ordens de reação, uma vez que todas parecem ser lineares (NETZ e ORTEGA, 2002).

Na reação de ordem zero, o fator limitante é outro, que não a concentração, por exemplo, a solubilidade ou a absorção da luz em certas moléculas fotossensíveis. Em formas farmacêuticas no estado sólido, que são expostos à degradação pela água (umidade), os fármacos decompõem-se de acordo com velocidades de pseudo-primeira ordem, à medida que as reações ocorrem entre o fármaco e a água. O sistema comporta-se como uma suspensão, e como existe um excesso de fármaco no estado sólido, a velocidade de reação de primeira ordem torna-se, na realidade, uma velocidade de pseudo ordem zero e a velocidade de diminuição da quantidade de fármaco ao longo do tempo é linear. Velocidades de reação de pseudo ordem zero ocorrem frequentemente com fármacos formulados na forma de suspensão (LACHMAN et al., 2001). Muitas decomposições em estado sólido ou em suspensão seguem cinética de ordem zero. O ácido ascórbico, por exemplo, degrada-se a uma

mesma velocidade em condições anaeróbicas, independente da concentração ser 1,3 ou 5 M (NETZ e ORTEGA, 2002).

Apesar da importância das formulações sólidas, têm existido, relativamente, poucas tentativas para avaliar detalhadamente a cinética de decomposição deste tipo de formulação. Muitos dos trabalhos iniciais foram desenvolvidos com o único objetivo de prever a estabilidade, mas os dados foram tratados utilizando-se equações de velocidade derivadas de reações em solução (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). O estudo das formas farmacêuticas no estado sólido é um dos grandes problemas das ciências farmacêuticas, principalmente quando temos fármacos sensíveis à umidade, e não temos a possibilidade de prever as mudanças rápidas de umidade no ambiente. Uma vez que a estabilidade em relação à umidade depende da sensibilidade dos fármacos direta e indiretamente sobre o teor de umidade no ambiente, as reações hidrolíticas podem envolver uma combinação de eventos complexos (WATERMAN e ADAMI, 2005).

UWAI e colaboradores (2005) realizaram estudo de fotoestabilidade com comprimidos de propranolol no estado sólido, em que foram isolados três produtos de degradação. Após a identificação dos produtos de degradação, estes foram testados em relação a sua toxicidade aguda, sendo observado a ausência de toxicidade. Recentemente, um estudo de estabilidade fotoquímica em comprimidos de dihidropiridinas (nifedipino, amilodipino e nivaldipino) foi realizado. Neste trabalho, os autores demonstraram a sensibilidade de cada produto frente à luz, sua cinética de degradação, os produtos de degradação formados e a confirmação que nifedipino é o fármaco mais sensível desta classe (KAWABE et al., 2008). BREIER e colaboradores (2008) isolaram dois produtos de degradação de fexofenadina em soluções metanólicas, estes produtos também foram observados em fexofenadina no estado sólido. Comprimidos de alprazolam foram analisados em câmara climática por 6 meses em diferentes temperaturas e umidade. Pode-se observar a formação de um produto de degradação majoritário (HUIDOBRO et al., 2007).

No estado sólido, os processos fotoquímicos ocorrem na superfície do produto. Na maioria dos casos, o interior do produto sólido será inalterado, independente do tempo de exposição (TONNESEN, 2001). As reações fotoquímicas são processos complexos, que usualmente ocorre em duas etapas. A primeira etapa envolve uma reação primária, que corresponde, diretamente, à absorção de um fóton, fazendo com que o estado da molécula fique excitado. Esta reação não depende da temperatura para a reação das moléculas. A reação fotoquímica primária, frequentemente, é seguida de reações secundárias (térmicas), devido à presença de produtos intermediários originados dos processos fotoquímicos iniciais. Diferentes tipos de reações podem ser iniciados fotoquimicamente, por exemplo, redução, desalquilação, hidrólise, oxidação, isomerização, rearranjo de anéis, polimerização ou remoção de diversos substituintes como halogenados ou grupos carboxílicos (TONNESEN, 2001). Estas reações podem ocorrer por exposição à luz para determinados comprimentos de onda. Quanto menor o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação, mais energia é absorvida por concentração de reagente. Com isso, as radiações absorvidas no ultravioleta, contribuem mais facilmente para o início de reações químicas, do que aquelas absorvidas em comprimentos de onda maiores (LACHMAN et al., 2001).

O teste de fotoestabilidade dos fármacos e das suas respectivas formas farmacêuticas finais, é importante para garantir a qualidade durante toda a vigência do produto. Os protocolos básicos para novos fármacos e respectivos produtos são descritos nas diretrizes do ICH para testes de fotoestabilidade, divulgados desde janeiro de 1998 (ICH, 1997a). Estas diretrizes determinam que os testes de fotoestabilidade, sejam parte integral dos testes de estresse, os quais são subdivididos em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios.

Os testes de degradação forçada, ou teste de estresse, são definidos como os testes de estabilidade da substância de referência e de medicamentos que excedem as condições utilizadas para os testes acelerados. Os testes de estresse são de extrema importância para a indústria farmacêutica e também para pesquisa. Estes

testes são aplicados aos estudos de pré-formulação, no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e também para selecionar a melhor formulação (KLICK et al., 2005). De acordo com vários documentos regulatórios, toda vez que a empresa for registrar um novo produto, é obrigatório realizar os testes de estresse, que devem ser incluídos na documentação (FDA, 2004; BRASIL, 2005).

O teste de estresse é a principal ferramenta utilizada para prever problemas relacionados à estabilidade, desenvolvimento de métodos analíticos e identificação de produtos e comportamentos de degradação.

Embora o desenvolvimento de uma ampla escala de produtos farmacêuticos requeira flexibilidade de como o teste de estresse é conduzido, muitas indústrias, aplicam extremas condições de estresse rotineiramente, e a explicação destes procedimentos, não é fornecida. Um exemplo típico é a utilização de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M em refluxo, por 8 horas, que geralmente geram produtos de degradação irrelevantes (KLICK et al., 2005).

## **5.2. Parte experimental**

### *5.2.1. Estudo preliminar da estabilidade de linezolida*

#### *5.2.1.1. Condições de estudo*

O estudo preliminar da estabilidade de linezolida foi realizado em meio ácido e básico, peróxido de hidrogênio 3%, temperatura e luz UVC, empregando-se comprimidos de linezolida. As amostras foram avaliadas quanto às características organolépticas de cor, odor e aspecto, por análise visual. Além disso, as amostras foram avaliadas quanto ao teor residual de linezolida e a possível formação de produtos de degradação. O monitoramento da degradação foi efetuado pelo método cromatográfico validado previamente. Na degradação em câmara climática, as amostras também foram analisadas por doseamento microbiológico.

Para os estudos de degradação térmica foi utilizada estufa (FABBE Ltda, BRASIL) e uma câmara climática (MARCONI, MA 835/UR). Para degradação

fotoquímica foi utilizada câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

Todas as amostras provenientes das degradações preliminares, foram analisadas utilizando coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 250 x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm, 20 x 3,9 mm, acopladas a um cromatógrafo a líquido Waters composto de bomba binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters 2487, e utilizando como fase móvel ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V).

Nas amostras expostas à degradação térmica e degradação fotoquímica, além das análises utilizando coluna Symmetry C<sub>18</sub>, foi utilizada uma coluna semipreparativa (Zorbax Rx-C<sub>18</sub> - 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT) acoplada ao cromatógrafo a líquido Waters. Esta coluna foi escolhida a fim de obter um perfil mais claro e otimizar processos de isolamento posteriores. O tempo de retenção de LNZ-SR e LNZ-comp. na coluna semipreparativa, nas condições utilizadas, encontra-se em 15 minutos.

As amostras degradadas pela luz-UVC (254 nm) e câmara climática foram analisadas também em cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star, utilizando-se coluna semi-preparativa Zorbax (Rx-C<sub>18</sub> - 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT), eluída com ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V) em fluxo de 1,0 mL/min e detecção em diodos em série (200-400 nm), com o objetivo de confirmar a formação de produtos de degradação nas amostras degradadas.

As condições empregadas, nos estudos preliminares de estabilidade, encontram-se descritas a seguir:

→ **Degradação em meio ácido:** a solução foi preparada transferindo-se o equivalente a um peso médio dos comprimidos de linezolida para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com água e levando-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, e o volume completado com HCl 0,1 M, obtendo-se uma solução com concentração de

60,0 µg/mL. A solução foi protegida com papel alumínio e exposta durante uma hora à temperatura ambiente. Após este período, alíquota de 2,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume do balão com fase móvel, para obter solução com concentração final de 12,0 µg/mL.

→ **Degradação meio alcalino:** a solução foi preparada transferindo-se o equivalente a um peso médio dos comprimidos de linezolida para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com água e levando-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, e o volume completado com NaOH 0,1 M, obtendo-se uma solução com concentração de 60,0 µg/mL. A solução foi protegida com papel alumínio e exposta durante uma hora à temperatura ambiente. Após este período, alíquota de 2,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume do balão com fase móvel, para obter solução com concentração final de 12,0 µg/mL.

→ **Degradação meio oxidativo:** a solução foi preparada transferindo-se o equivalente a um peso médio dos comprimidos de linezolida para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com água e levando ao banho de ultrassom por 20 minutos. Foi transferida alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, e o volume completado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, obtendo-se uma solução com concentração de 60,0 µg/mL. A solução foi protegida com papel alumínio e exposta durante uma hora à temperatura ambiente. Após este período, alíquota de 2,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com fase móvel, para obter solução com concentração final de 12,0 µg/mL.

→ **Degradação térmica:** os estudos de degradação térmica envolveram dois parâmetros distintos. Foi utilizada câmara climática (40° C e 75% de umidade relativa) e estufa (65° C).

- **Em câmara climática:** três comprimidos íntegros e o equivalente a três pesos médios dos comprimidos triturados foram colocados na câmara. Os comprimidos

triturados e íntegros (fora da embalagem) foram colocados em placa de Petri. Os tempos de exposição para os comprimidos triturados foram: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90 dias. Para os comprimidos íntegros os tempos de exposição foram 30, 60 e 90 dias. Para os comprimidos triturados, em cada tempo de análise, retirou-se da câmara uma quantidade equivalente a 200 mg de linezolida, que foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, perfazendo uma solução de 2000 µg/mL. Foi retirada alíquota de 10,0 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando a solução com água. Desta solução foi retirada uma alíquota de 3,0 mL e transferida para balão de 50 mL, obtendo-se concentração final de 12,0 µg/mL, completando a solução com fase móvel. Esta solução foi levada para análise por CLAE. Para os comprimidos íntegros, em cada tempo de análise, o comprimido foi retirado da câmara, triturado, e o equivalente a 200 mg de linezolida transferido para balão volumétrico de 100 mL. O procedimento adotado a partir desta solução foi o mesmo que para os comprimidos triturados.

- **Em estufa:** o equivalente a um peso médio do comprimido de linezolida foi colocado em estufa a 65 °C e analisado nos seguintes tempos: 5, 10, 15, 25 e 30 dias. Retirou-se da estufa uma quantidade equivalente a 50 mg de linezolida transferidas para balão volumétrico de 100 mL, perfazendo uma solução de 500 µg/mL. Foi retirada alíquota de 10,0 mL e transferida para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água. Desta solução foi retirada uma alíquota de 3,0 mL e transferida para balão de 25 mL, obtendo-se solução com concentração final de 12,0 µg/mL, completando a solução com fase móvel.

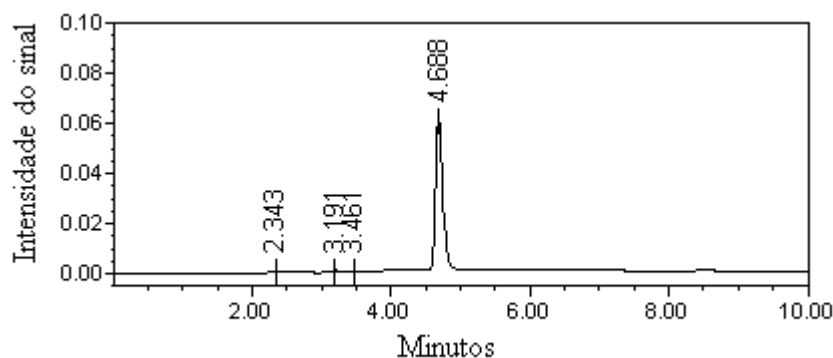
- **Degradação fotoquímica:** Este estudo preliminar de fotoestabilidade de linezolida foi desenvolvido em câmara espelhada contendo lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25° C. As amostras eram compostas por comprimidos intactos e comprimidos triturados e expostas à uma distância de 10 cm da lâmpada. As amostras foram preparadas conforme citado no item anterior para degradação térmica. Os tempos de análises foram os seguintes:

- Comprimidos intactos: 30 e 60 dias
- Comprimidos triturados: 1, 5, 10, 15, 20 e 30 dias

### 5.2.1.2. Resultados e discussão

#### 5.2.1.2.1. Degradação em meio ácido

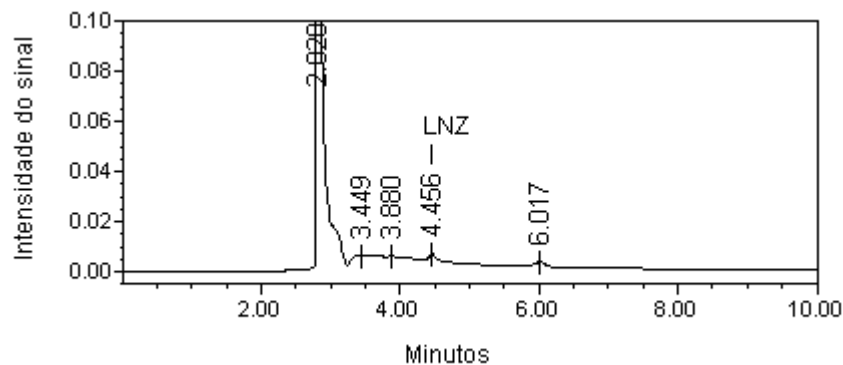
O cromatograma obtido usando CLAE para LNZ-comp., na concentração de 12,0 µg/mL, submetida à condição de degradação em meio ácido por 1 hora, utilizando coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5µm, 250 mm x 4,6 mm e cromatógrafo Waters, está mostrado na Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Cromatograma linezolidina em comprimidos, na concentração de 12,0 µg/mL, representando a degradação em meio ácido por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25,V/V/V). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub>,5 µm, 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub>, 5 µm 20 mm x 3,9 mm

### 5.2.1.2.2. Degradação em meio básico

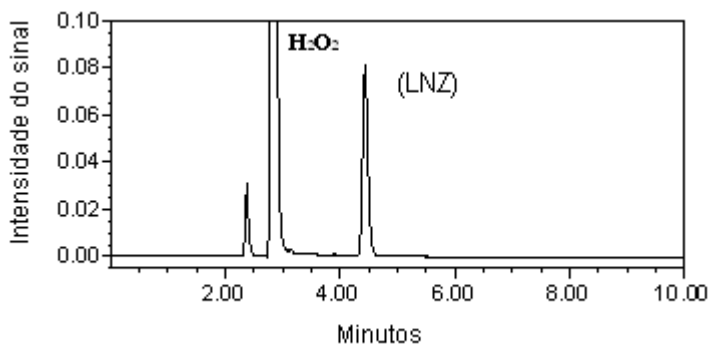
O cromatograma obtido por CLAE para amostra de LNZ-comp., na concentração de 12,0 µg/mL, submetida às condições de degradação em meio básico por 1 hora, utilizando coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm, 250 mm x 4,6 e cromatógrafo Waters, está mostrada na Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Cromatograma de linezolid-comprimido, na concentração de 12,0 µg/mL, representando a degradação em meio básico por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25,V/V/V). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 20 mm x 3,9 mm.

### 5.2.1.2.3. Degradação em meio oxidativo

O cromatograma obtido por CLAE para amostra de linezolida, na concentração de 12,0 µg/mL, submetida à condição de degradação em meio oxidativo por 1 hora, utilizando coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm e cromatógrafo Waters, está mostrado na Figura 5.3.

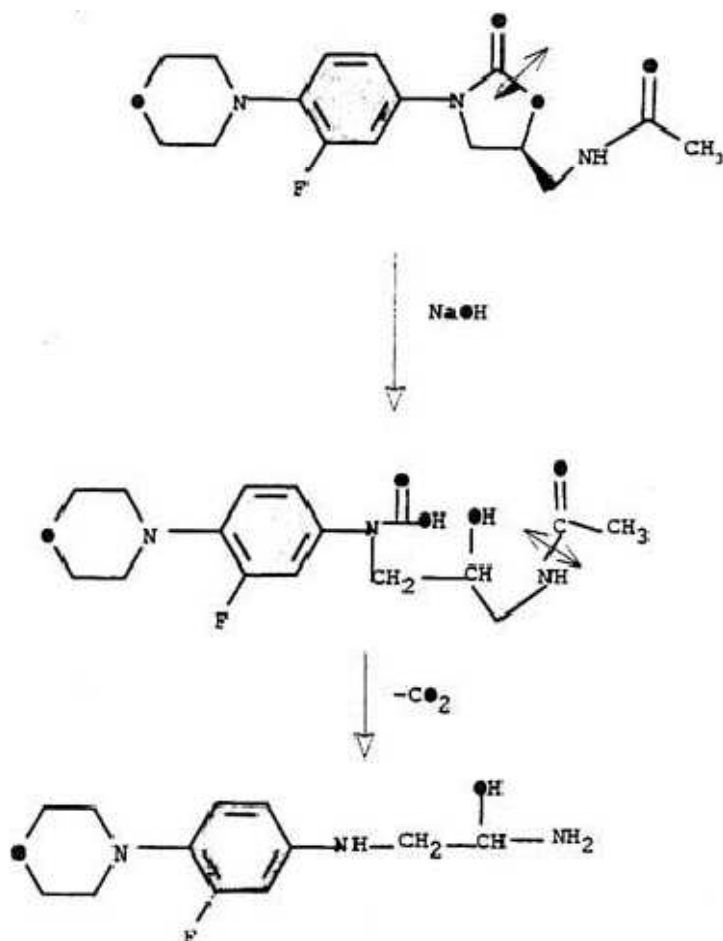


**Figura 5.3.** Cromatograma de linezolida-comprimido, representando a degradação oxidativa em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25,V/V/V). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5µm 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 20 mm x 3,9 mm.

Os estudos de estabilidade preliminar envolveram condições de estresse, com degradação ácida, básica e oxidativa. O objetivo desta exposição foi verificar a estabilidade preliminar de comprimidos de linezolida perante estas degradações. Nos estudos de degradação ácida observou-se o início de formação de produtos de degradação após a exposição de 1 hora, em meio ácido (HCl 0,1 M). Observando o cromatograma (Figura 5.1) pode-se visualizar o início da formação de produtos de degradação no tempo de retenção de 2,3 minutos.

Em relação à degradação básica, o fármaco é bem mais sensível nesta condição, sendo quase totalmente degradado, formando um produto de degradação majoritário no tempo de, aproximadamente, 2 minutos (Figura 5.2). Na literatura, há

um trabalho que cita a susceptibilidade do fármaco em meio básico. BEBAWY (2003a) desenvolveu três métodos analíticos para determinação de linezolida em comprimidos, dois métodos usando espectrofotometria no visível e um método usando CLAE na presença de produto de degradação alcalino. Segundo este autor, o produto de degradação básica formado, encontra-se apresentado no esquema 5.1.



**Esquema 5.1.** Esquema da reação de degradação de linezolida em meio básico e o produto de degradação majoritário produzido (Fonte: BEBAWY, 2003a).

A fase móvel utilizada foi metanol : água (65:35) com pH = 3,5, ajustado com ácido acético. O comprimento de onda utilizado foi 240 nm. O tempo de retenção do produto de degradação em meio básico equivale a 2,8 minutos. Nestas condições a LNZ-SR teve como tempo de retenção 3,9 minutos (BEBAWY, 2003a). Portanto, o

produto de degradação teve um tempo de retenção menor que LNZ-SR. A Figura 5.2 mostra a degradação em meio básico com o produto de degradação majoritário em 2,0 minutos. Pressupõe-se, que o produto de degradação neste trabalho, seja o mesmo que BEBAWY (2003a) sugeriu em trabalho publicado anteriormente.

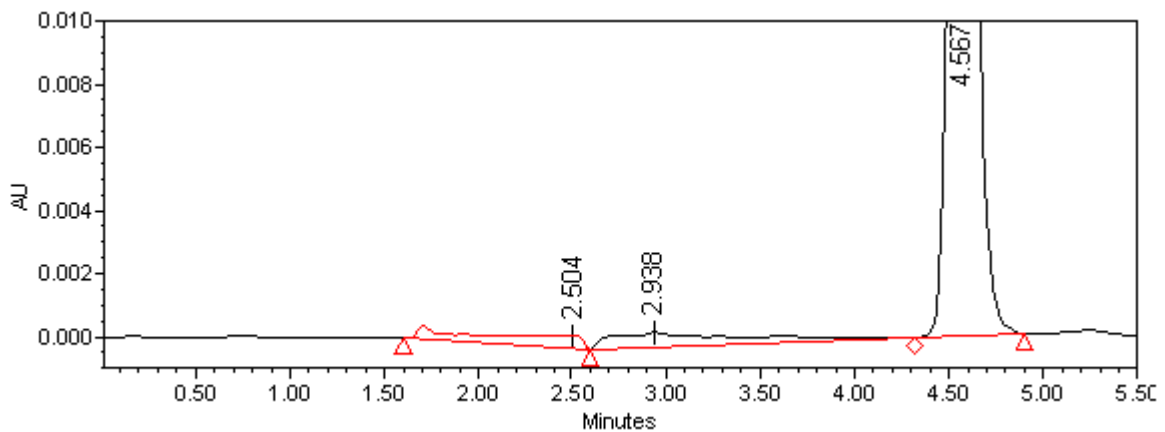
AGRAWAL e colaboradores (2003) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade para linezolida em matéria-prima e comprimidos, utilizando HPTLC. Neste método, os autores utilizaram como fase móvel tolueno e acetona, na proporção 5:5, V/V. Os autores realizaram estudos de degradação forçada nas amostras, verificando que o produto é susceptível à degradação ácida, básica, fotoquímica e oxidativa.

Na degradação oxidativa houve redução no teor de linezolida nos comprimidos e foi possível observar a presença de produto de degradação (Tr<sub>2,3</sub> minutos). Este estudo teve como objetivo avaliar se a linezolida é sensível a oxidação.

#### *5.2.1.2.4. Degradação térmica*

##### *5.2.1.2.4.1. Em estufa*

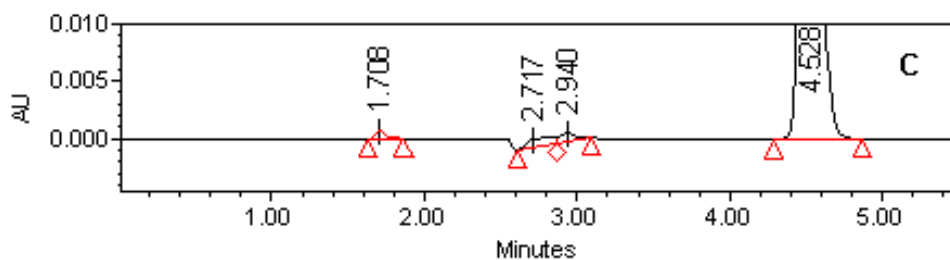
A Figura 5.4 mostra o cromatograma ampliado de linezolida-comprimidos, na concentração de 12,0 µg/mL, submetidos à degradação térmica, em estufa à 65° C, por 30 dias. Esta análise foi realizada em cromatógrafo líquido Waters e coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 250 mm x 4,6 mm.



**Figura 5.4.** Cromatograma ampliado de linezolida-comprimido, representando a degradação térmica em à 65°C, por 30 dias. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, v/v/v). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm, 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm, 20 mm x 3,9 mm.

## 5.2.1.2.4.2. Em câmara climática

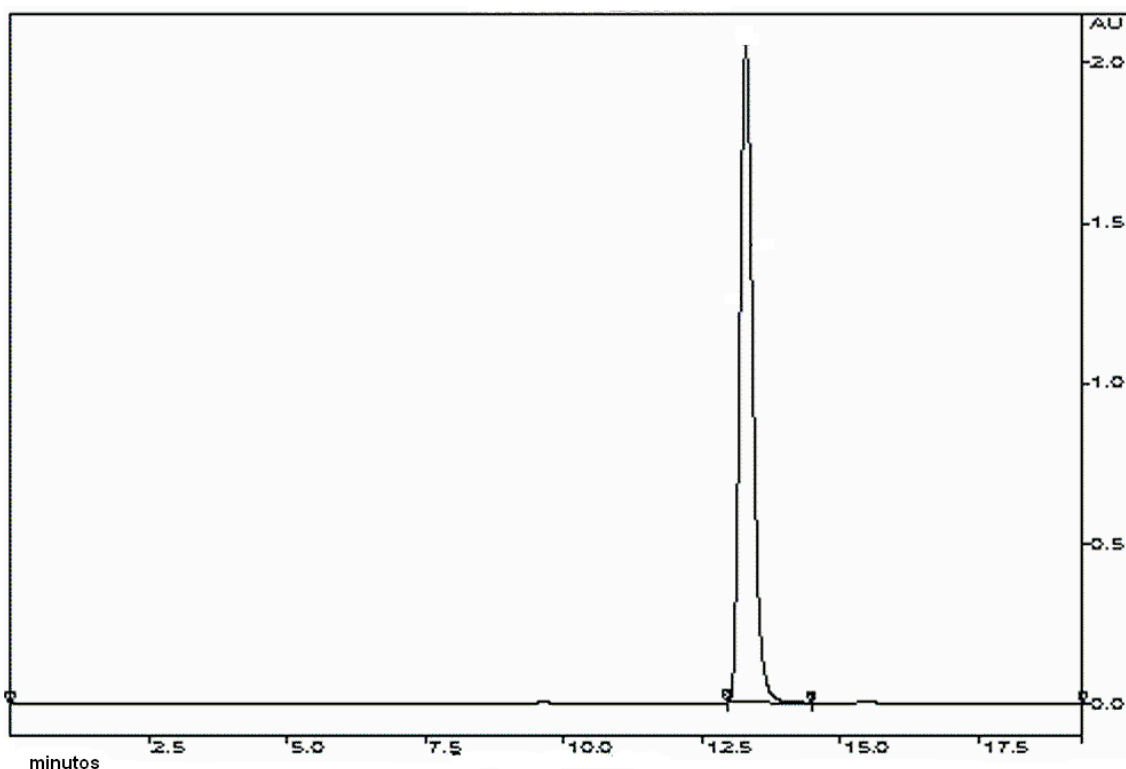
O cromatograma ampliado obtido por CLAE para solução de comprimidos triturados de linezolida, em concentração de 12,0 µg/mL, no período de 90 dias, submetidos às condições de degradação em câmara climática (40°C/75%), utilizando coluna Symmetry Waters, C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm em cromatógrafo Waters, está mostrado na Figura 5.5.



**Figura 5.5.** Cromatograma ampliado de comprimidos triturados de linezolida, na concentração de 12,0 µg/mL expostos durante 90 dias, em câmara climática (40°C/75%). Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Coluna Symmetry Waters, C<sub>18</sub>, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters, C<sub>18</sub>, 5 µm, 20 mm x 3,9 mm em cromatógrafo Waters.

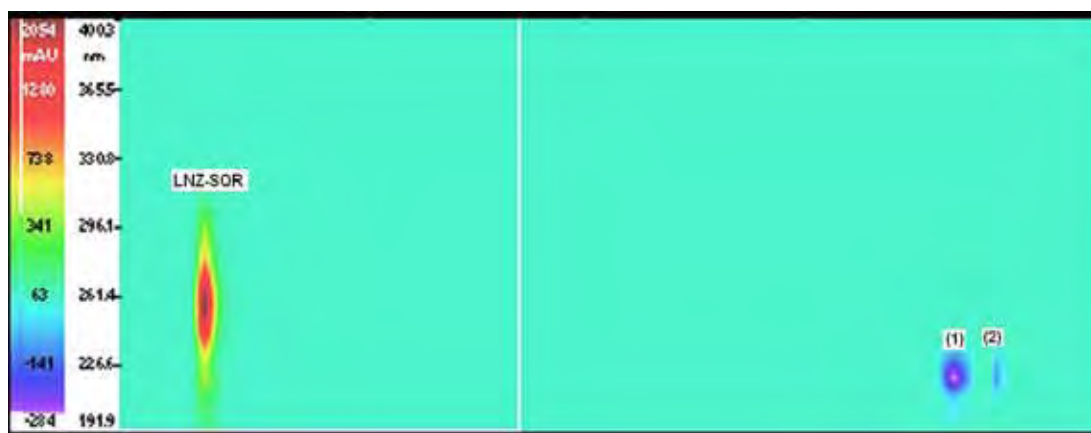
As Figuras 5.6 a 5.16 mostram as análises realizadas em LNZ-SR e LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, utilizando para análise cromatógrafo Varian-MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Para análise dos dados foi utilizado o software Polyview e Aurora 5.31.

A Figura 5.6 mostra o cromatograma de LNZ-SR, concentração de 100,0 µg/mL e o respectivo tempo de retenção (TR ≅ 13,0 minutos)



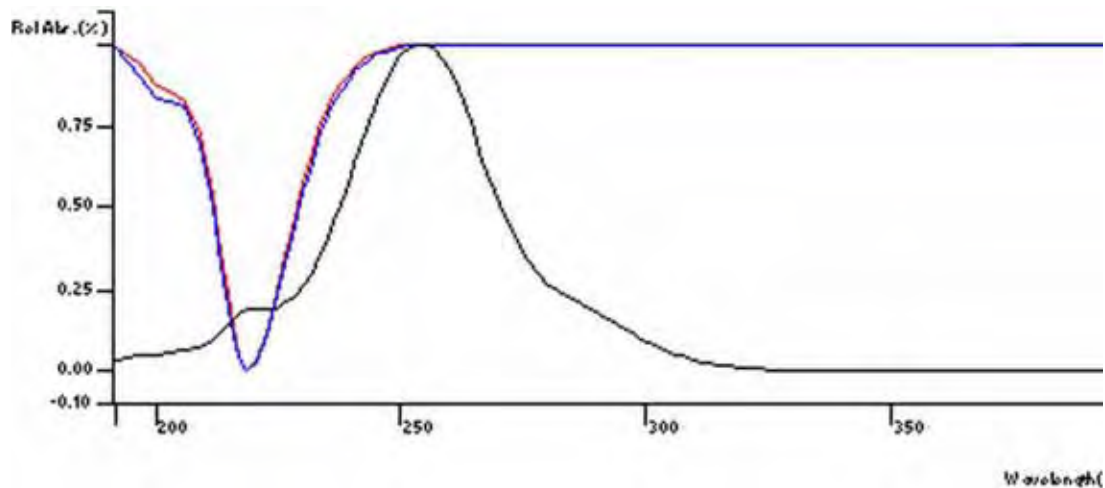
**Figura 5.6.** Cromatograma de solução de LNZ-SR, em concentração de 100,0 µg/mL, utilizando CLAE acoplado a detector espectrofotométrico com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V).

A Figura 5.7 mostra o isograma de LNZ-SR, na concentração de 100,0 µg/mL, utilizando o software Aurora versão 5.31.



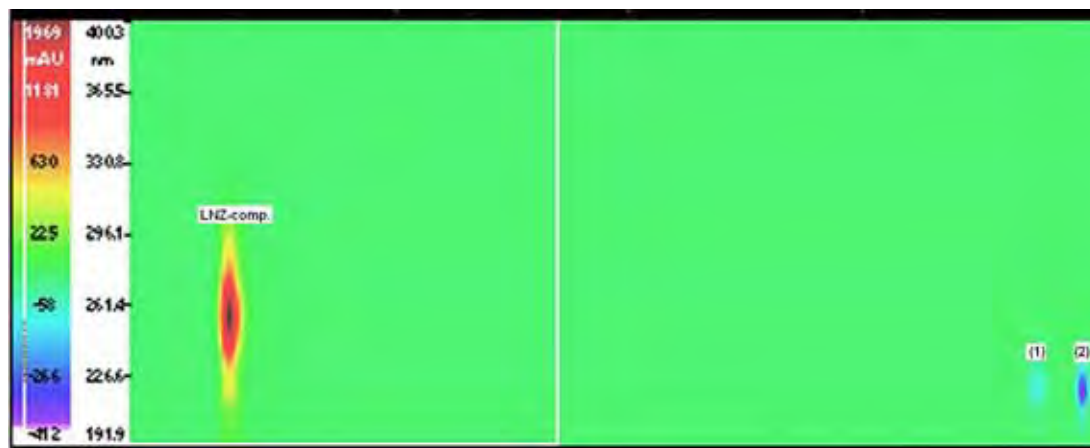
**Figura 5.7.** Isograma de LNZ-SR, na concentração de 100,0 µg/mL, analisado em cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). A coluna em branco indica o comprimento de onda (nm) dos picos no isograma. A coluna em cores indica a intensidade do sinal (mAU) de cada pico. (1) e (2) indicam absorções negativas, relacionadas à fase móvel.

A Figura 5.8 mostra os espectros da solução padrão de 100,0 µg/mL, utilizando o isograma da Figura 5.7. Os espectros de absorção relacionam-se aos picos visualizados no isograma.



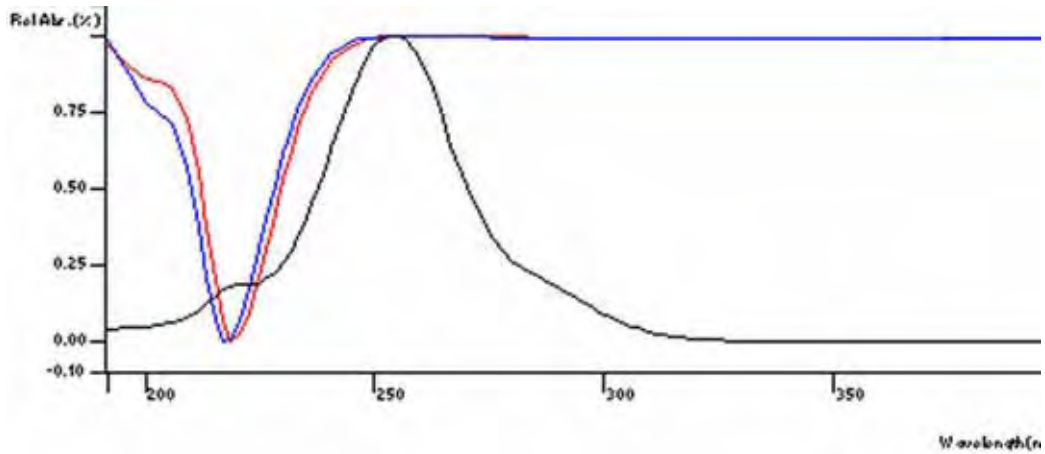
**Figura 5.8.** Espectros de absorção na região do UV da solução de LNZ-SR, na concentração de 100,0 µg/mL, representando o isograma da Figura 5.7.

A Figura 5.9 mostra o isograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, utilizando o software Aurora versão 5.31.



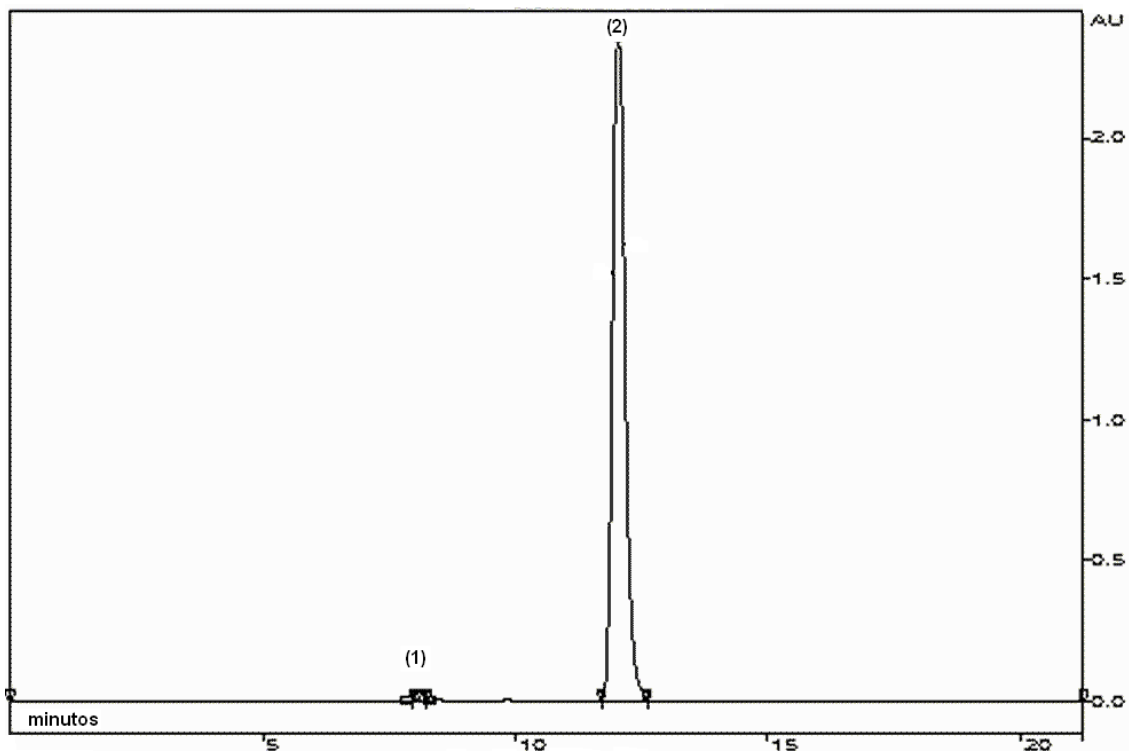
**Figura 5.9.** Isograma de LNZ-comp, na concentração de 100,0 µg/mL, analisado em cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). A coluna em branco indica o comprimento de onda (nm) dos picos no isograma. A coluna em cores indica a intensidade do sinal (mAU) de cada pico. (1) e (2) indicam absorções negativas, relacionadas à fase móvel.

A Figura 5.10 mostra os espectros da solução amostra de 100,0 µg/mL, utilizando o isograma da Figura 5.9. Mostra os espectros de absorção relacionados aos picos visualizados no isograma.



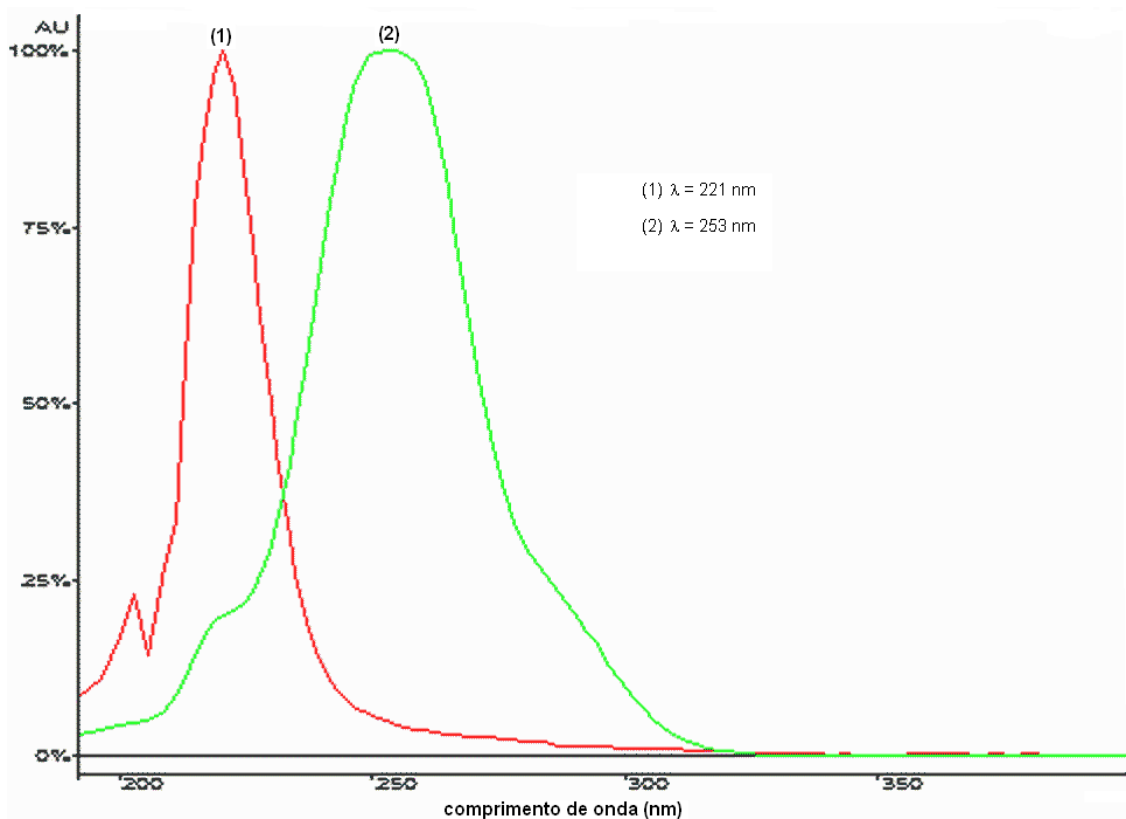
**Figura 5.10.** Espectros de absorção na região do UV da solução de LNZ-comp, na concentração de 100,0 µg/mL, representando o isograma da Figura 5.9.

A Figura 5.11 mostra o cromatograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, submetido às condições de degradação térmica em câmara climática (40°C/75%) por 90 dias, utilizando para análise cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.



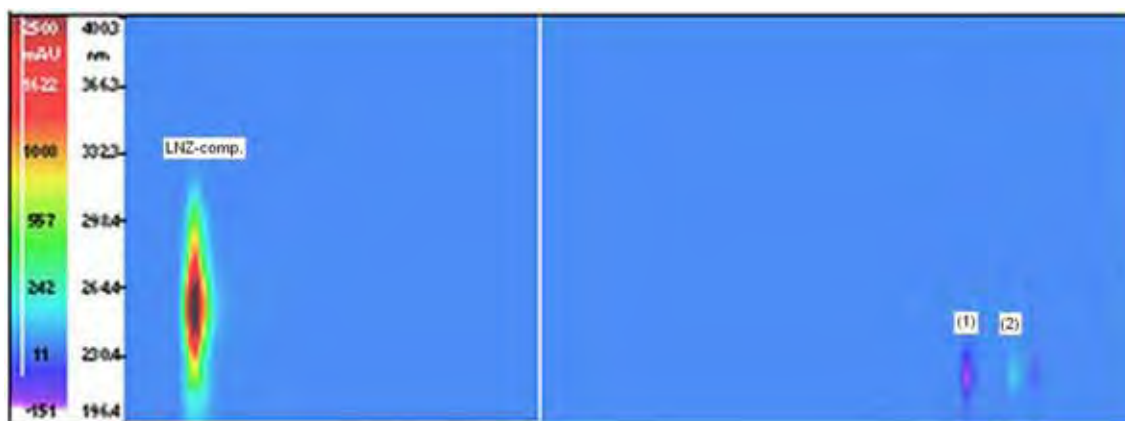
**Figura 5.11.** Cromatograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, representando a degradação térmica em câmara climática (40°C/75%), de comprimidos triturados por 90 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Pico (1): produto de degradação  $T_R \cong 8,0$  min. Pico (2): LNZ-comp.  $T_R \cong 13,0$  minutos;

A Figura 5.12 mostra o espectro de absorção do pico (1) e (2) de acordo com o cromatograma da Figura 5.11, com comprimento de onda equivalente a 221 nm (pico 1) e 253 nm (pico 2). Foi utilizada solução com concentração de 100,0 µg/mL, de comprimidos de linezolida triturados, expostos em câmara climática (40°C/75%) por 90 dias. Software utilizado polyview versão 5.31.



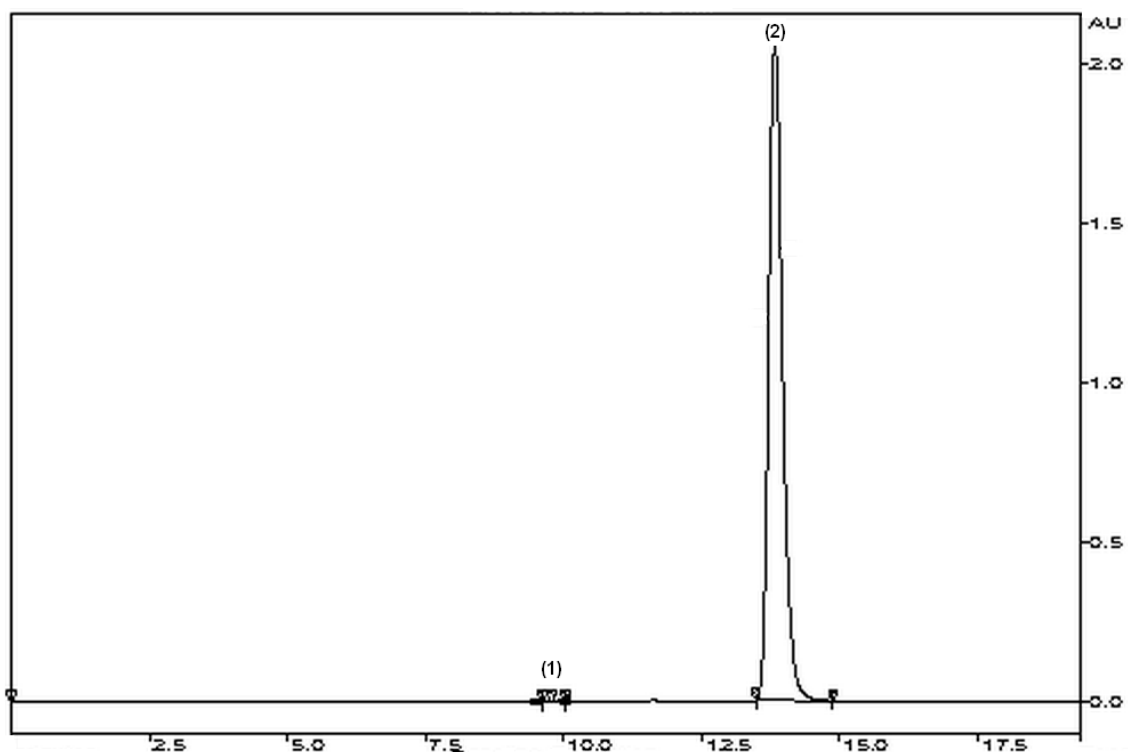
**Figura 5.12.** Espectro de absorção dos picos (1) e (2) relacionados ao cromatograma da Figura 6.11, com comprimento de onda equivalente a 221 nm (pico 1) e 253 nm (pico 2). Foi utilizada solução com concentração de 100,0 µg/mL, de comprimidos de linezolida triturados, expostos em câmara climática (40°C/75%) por 90 dias. Software utilizado Polyview versão 5.31. Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V).

A Figura 5.13 mostra a análise realizada em linezolida comprimido, na concentração de 100,0 µg/mL, submetida às condições de degradação térmica em câmara climática, por 90 dias, utilizando cromatógrafo Varian - MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. O software utilizado foi AURORA versão 5.31, ilustrado por isograma em cores.



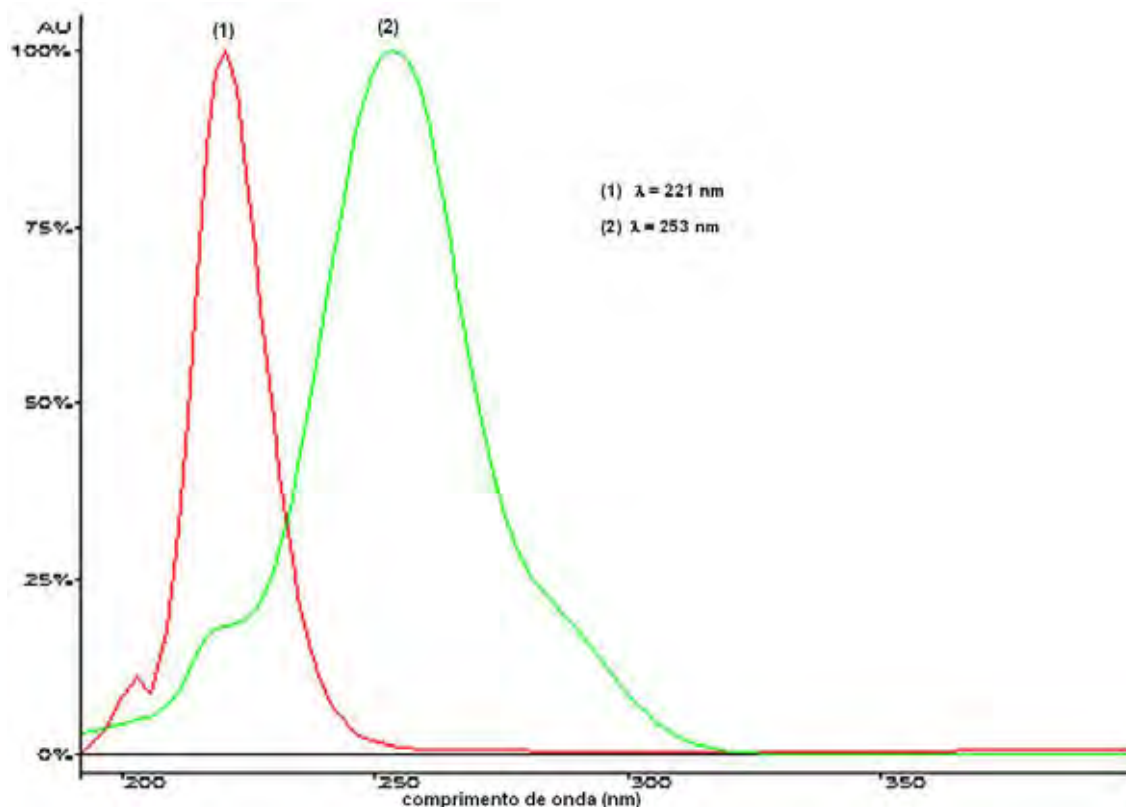
**Figura 5.13.** Isograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, representando a degradação térmica em câmara climática, de comprimidos triturados por 90 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). A coluna em branco indica o comprimento de onda (nm) das substâncias no isograma. A coluna em cores indica a intensidade do sinal (mAU) de cada pico. (1) solvente (2) produto de degradação.

A Figura 5.14 mostra o cromatograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, submetido às condições de degradação térmica em câmara climática (40°C/75%) por 180 dias, utilizando cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT.



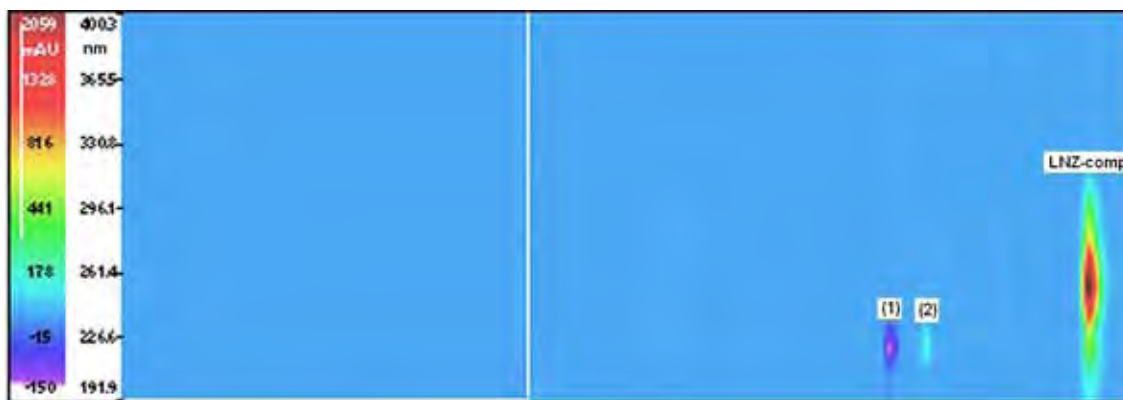
**Figura 5.14.** Cromatograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, mostrando a degradação térmica em câmara climática (40°C/75%), de comprimidos triturados por 180 dias, utilizando CLAE com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Pico (1): produto de degradação  $T_R \cong 8,0$  min. Pico (2): LNZ-comp.  $T_R \cong 13,0$  minutos;

A Figura 5.15 mostra o espectro de absorção do pico (1) e (2) de acordo com o cromatograma da Figura 5.14, com comprimento de onda equivalente a 221 nm (pico 1) e 253 nm (pico 2). Foi utilizada soluções com concentração de 100,0 µg/mL, de comprimidos de linezolida triturados, expostos em câmara climática (40°C/75%) por 180 dias. Software utilizado polyview versão 5.31.



**Figura 5.15.** Espectro de absorção dos picos (1) e (2) relacionados ao cromatograma da Figura 5.14, com comprimento de onda equivalente a 221 nm (pico 1) e 253 nm (pico 2). Esta análise foi obtida pela solução com concentração de 100,0 µg/mL, de comprimidos de linezolida triturados, expostos em câmara climática (40°C/75%) por 180 dias. Software utilizado Polyview versão 5.31. Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V).

A Figura 5.16 mostra a análise realizada em linezolida comprimido, na concentração de 100,0 µg/mL, submetido às condições de degradação térmica em câmara climática, por 180 dias, utilizando cromatógrafo Varian - MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. O software utilizado foi AURORA versão 5.31, ilustrado pelo isograma em cores.



**Figura 5.16.** Isograma de LNZ-comp., na concentração de 100,0 µg/mL, representando a degradação térmica em câmara climática, de comprimidos triturados por 180 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). A coluna em branco indica o comprimento de onda (nm) das substâncias no isograma. A coluna em cores indica a intensidade do sinal (mAU) de cada pico. (1) solvente (2) produto de degradação.

Os comprimidos de linezolida foram triturados e submetidos a exposição térmica em dois cromatógrafos diferentes, estufa e câmara climática. A estufa foi utilizada para verificar o comportamento de linezolida exposta somente ao fator temperatura. Os comprimidos triturados foram expostos por 30 dias na temperatura de 65°C e a Figura 5.4 mostra o cromatograma da solução de 12,0 µg/mL dos comprimidos expostos. Observando o cromatograma, não foi visualizada a degradação de linezolida nestas condições de ensaio.

Os comprimidos expostos em câmara climática por 90 dias foram analisados em dois cromatógrafos de marcas diferentes, Waters e Varian. Primeiramente, as análises foram realizadas no cromatógrafo Waters, utilizando coluna symmetry C<sub>18</sub>. A Figura 5.5 mostra o cromatograma da solução de 12,0 µg/mL dos comprimidos triturados expostos em câmara climática por 90 dias, em que, observa-se a formação de um produto de degradação nestas condições de exposição.

As amostras de linezolida também foram analisadas em cromatógrafo Varian - MOD. Pro Star, utilizando coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> e fase móvel ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Esta coluna semipreparativa foi utilizada com o objetivo de separar mais adequadamente os produtos de degradação. Primeiramente, foram injetadas soluções de LNZ-SR, na concentração de 100,0 µg/mL, mostrada pelo cromatograma na Figura 5.6, com tempo de retenção de, aproximadamente, 13 minutos.

Para melhor visualização e determinação da pureza de LNZ-SR (Figura 5.6), o cromatograma foi transformado num isograma, pelo software Aurora 5.31, mostrado na Figura 5.7. Neste isograma, pode-se observar a presença de LNZ-SR, com intensidade de sinal bastante elevada, demonstrado pelo diagrama de cor vermelho intenso com centro preto, indicando que a LNZ-SR é a única substância neste isograma. Os picos 1 e 2, de cor azul a roxo, indicam o pico de absorção dos solventes. Os espectros de absorção dos diagramas em cores visualizados no

isograma da Figura 5.7 são mostrados na Figura 5.8, em que LNZ-SR possui uma absorção máxima em 253 nm, e os picos (1) e (2) possuem absorção negativa. Amostras de comprimidos não degradados foram analisados em cromatógrafo Varian, com o objetivo de verificar a pureza de linezolida em comprimidos. As Figuras 5.9 e 5.10 mostram a análise de LNZ-comp, na concentração de 100,0 µg/mL e demonstra que não há nenhum produto de degradação antes de expor os comprimidos nas condições de degradação em câmara climática.

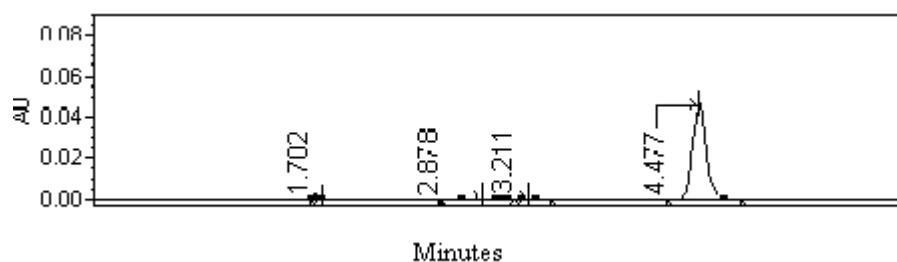
As análises das soluções dos comprimidos expostos em câmara climática (40°C/75%) por 90 dias também foram realizadas em cromatógrafo Varian - MOD. Pro Star, utilizando coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> e fase móvel ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). O tempo de retenção de LNZ-comp., nestas condições, equivale a, aproximadamente, 13 minutos (Figura 5.11). Neste cromatograma observa-se a presença de mais um produto, indicado pelo pico (1). Os espectros de absorção destes picos, são visualizados na Figura 5.12, em que o pico (1) absorve em 221 nm e o pico (2), LNZ-comp., em 253 nm. Nestas análises, observa-se a formação de um produto de degradação, com tempo de retenção de 8,0 minutos e espectros característicos com comprimento de onda máximo em 221 nm. O isograma da Figura 5.13 confirma presença deste produto de degradação formado, nestas condições de degradação. O produto de degradação formado indica um espectro de absorção com comprimento de onda menor que LNZ-SR. A molécula de LNZ-SR possui como banda principal (transição  $\pi \rightarrow \pi$ ) o grupamento aril, que se caracteriza pela absorção em comprimento de onda mínimo de 230 nm (SILVERSTEIN et al., 1994). Com isso, supõe-se que o produto de degradação formado, não possui o grupo aril na molécula.

Estas análises também foram realizadas em comprimidos triturados expostos em câmara climática por 180 dias. Observa-se o mesmo comportamento de degradação da exposição por 90 dias. As análises foram realizadas com linezolida no

estado sólido para verificar o comportamento de degradação durante o período de comercialização. As degradações neste estado ocorrem lentamente, em relação a linezolida em solução. Nestes estudos, seria possível preparar soluções de LNZ-comp, e expor às condições de degradação em câmara climática, mas, neste caso, não se saberia o real comportamento da formação de produtos de degradação em estado sólido. Com isto, optou-se, por realizar a degradação com comprimidos triturados, para acelerar a degradação.

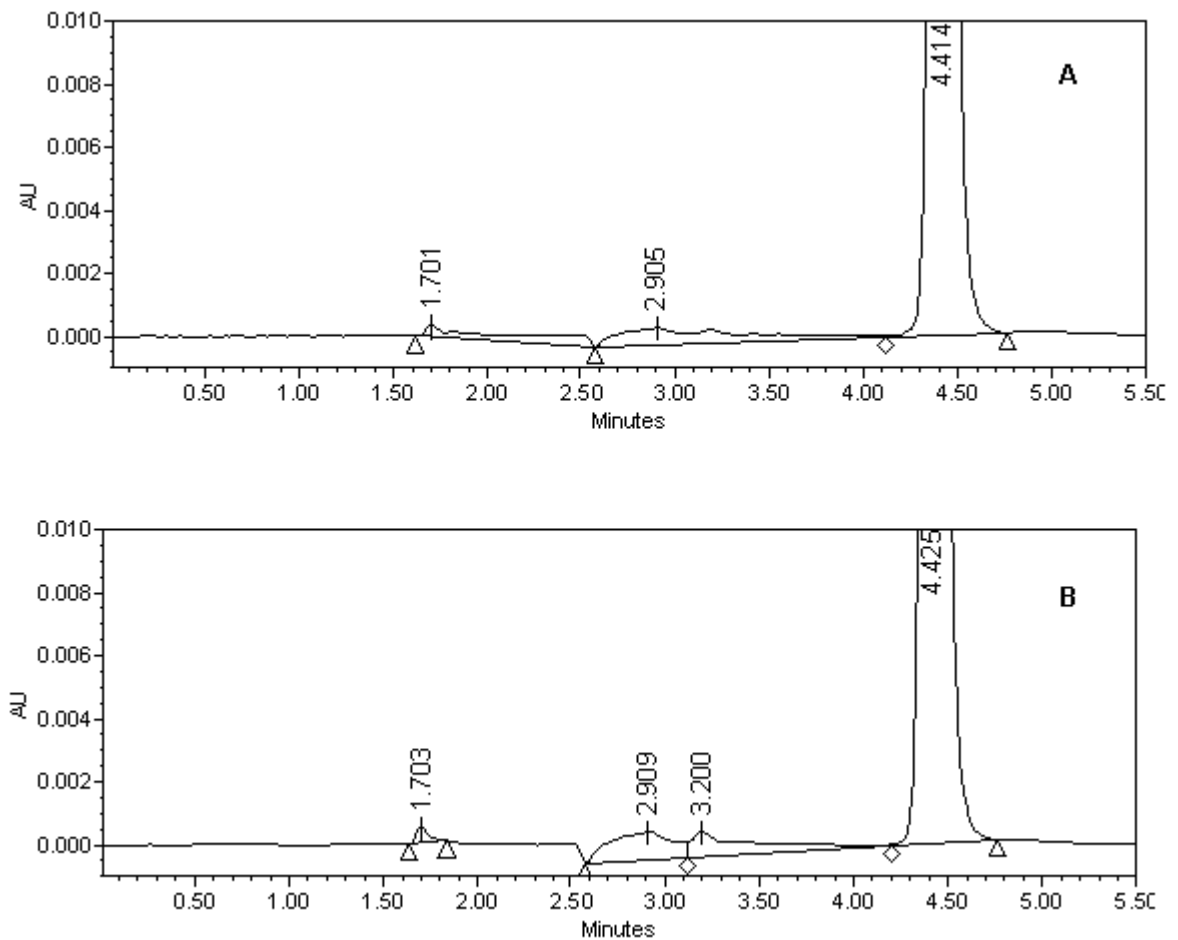
#### 5.2.1.2.5. Degradação fotoquímica

O cromatograma obtido por CLAE para solução de comprimidos triturados de linezolida, em concentração de 12,0 µg/mL, submetida à condição de degradação fotoquímica, por 30 dias, está mostrada na Figura 5.17, utilizando coluna Symmetry Waters, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm e cromatógrafo da Waters.



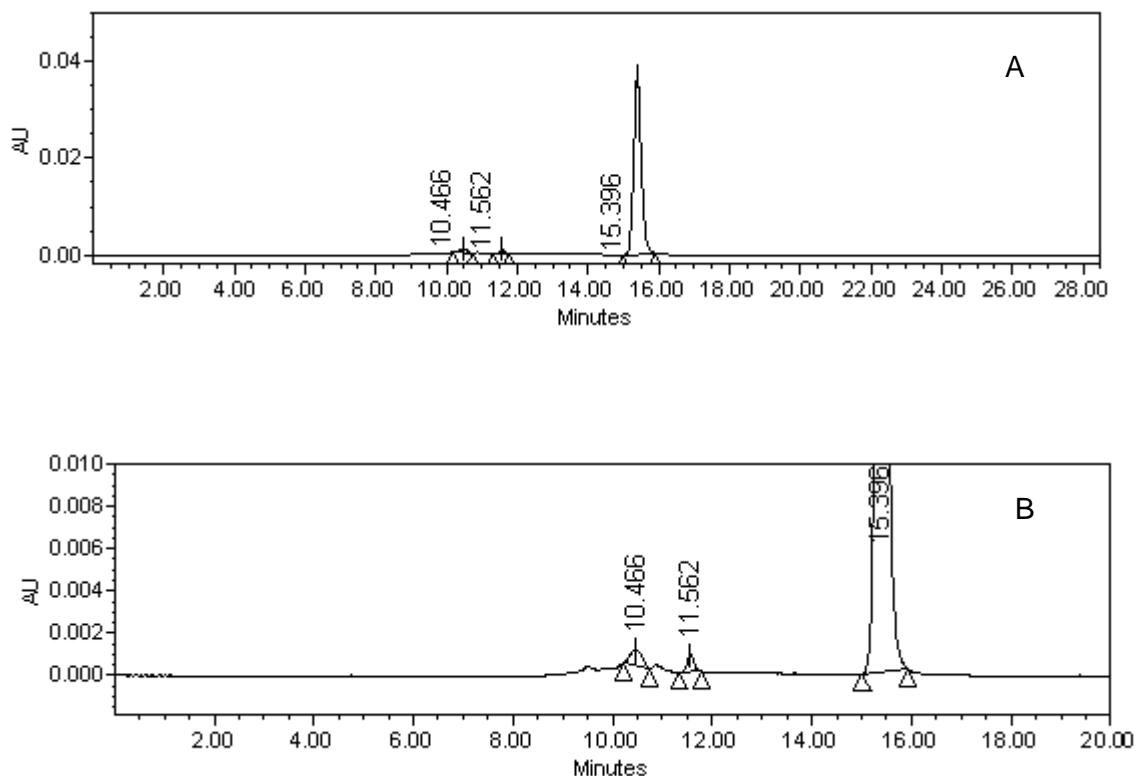
**Figura 5.17.** Cromatograma de linezolida-comprimidos, em concentração 12,0 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25,V/V/V). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 20 mm x 3,9 mm.

O cromatograma ampliado obtido por CLAE para a amostra de comprimido íntegro de linezolidina, exposto fora da embalagem, submetido às condições de degradação fotoquímica, por 30 e 60 dias, está mostrada na Figura 5.18, utilizando coluna Symmetry Waters, 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm e cromatógrafo Waters.



**Figura 5.18.** Cromatograma de linezolidina, em concentração de 12,0  $\mu\text{g/mL}$ , representando o comprimido íntegro, exposto fora da embalagem, na câmara UV, durante 30 dias (A) e 60 dias (B). Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Coluna Symmetry Waters,  $\text{C}_{18}$  5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm e pré-coluna Symmetry Waters,  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 20 mm x 3,9 mm.

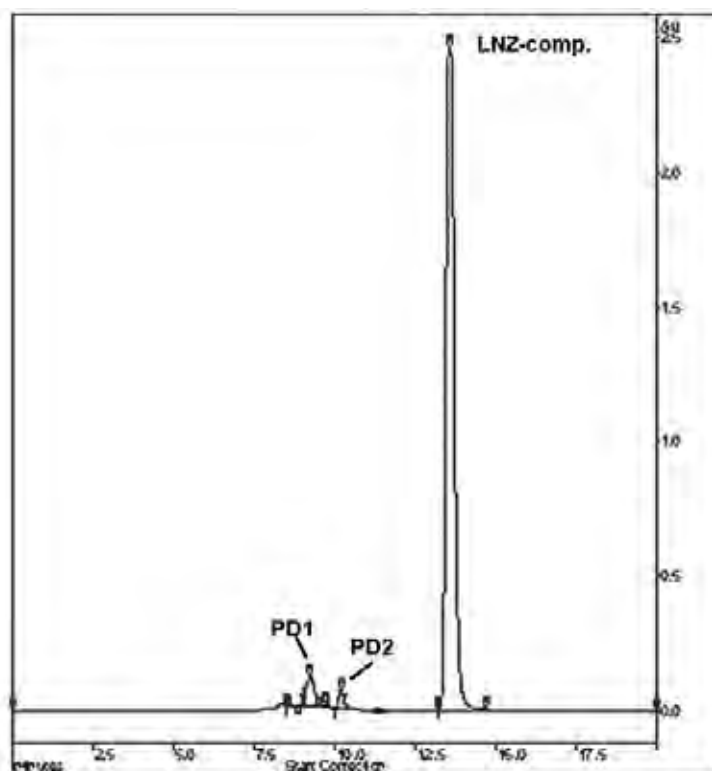
Cromatograma normal (A) e ampliado (B) obtidos por CLAE para comprimidos triturados de linezolida, submetidos às condições de degradação fotoquímica, por 60 dias, mostrado na Figura 5.19, utilizando coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> - 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT e cromatógrafo Waters. Nesta figura pode-se observar dois produtos de degradação majoritários (tr = 10,4 minutos e 11,5 minutos), nestas condições de análise.



**Figura 5.19.** Cromatograma do comprimido triturado de linezolida, normal (A) e ampliado (B), em concentração de 12,0 µg/mL, representando a degradação fotoquímica em 60 dias, utilizando coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT e cromatógrafo Waters. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V).

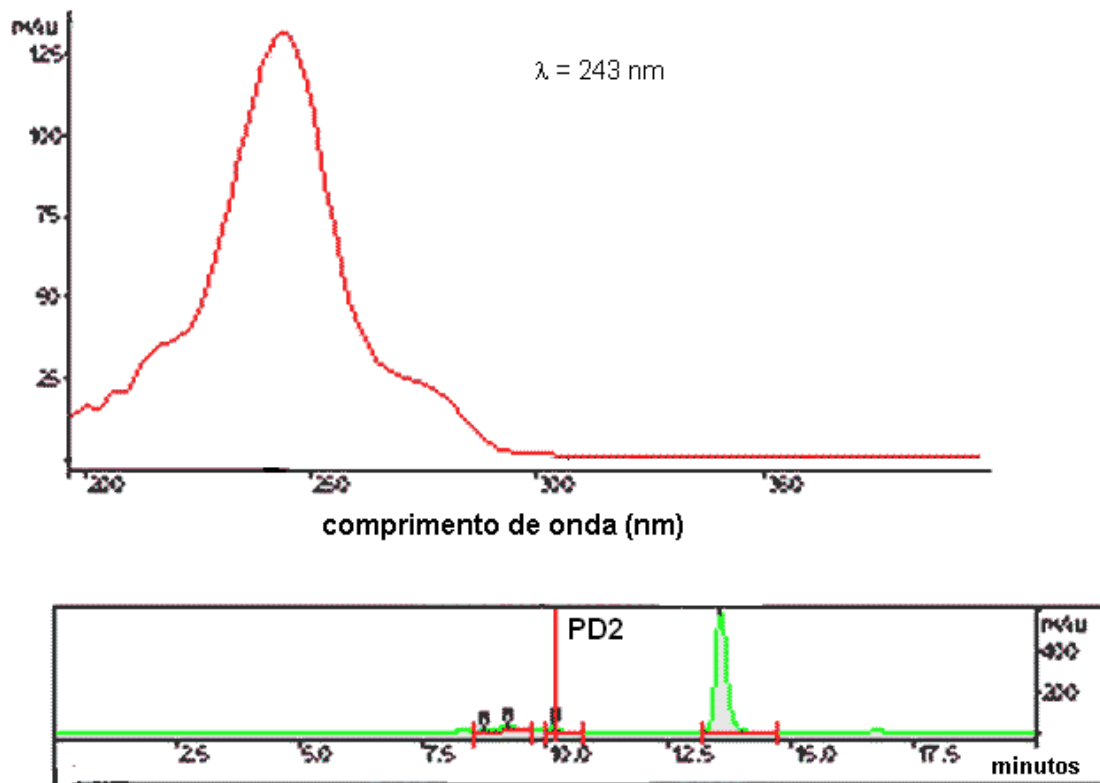
As Figuras 5.20 a 5.24 mostram as análises realizadas em linezolida comprimidos, na concentração de 200 µg/mL, submetidas às condições de degradação fotoquímica, por 30 dias, utilizando cromatógrafo Varian- MOD. Pro Star com detector espectrofotométrico com diodos em série e coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Para análise dos dados foi utilizado o software Polyview e Aurora 5.31.

A Figura 5.20 mostra o cromatograma de LNZ-comp. e os respectivos produtos de degradação majoritários formados, visualizados pelo software Polyview. LNZ-comp.  $t_R \cong 13,0$  minutos; PD1  $\cong 9,0$  minutos; PD2  $\cong 10,5$  minutos.



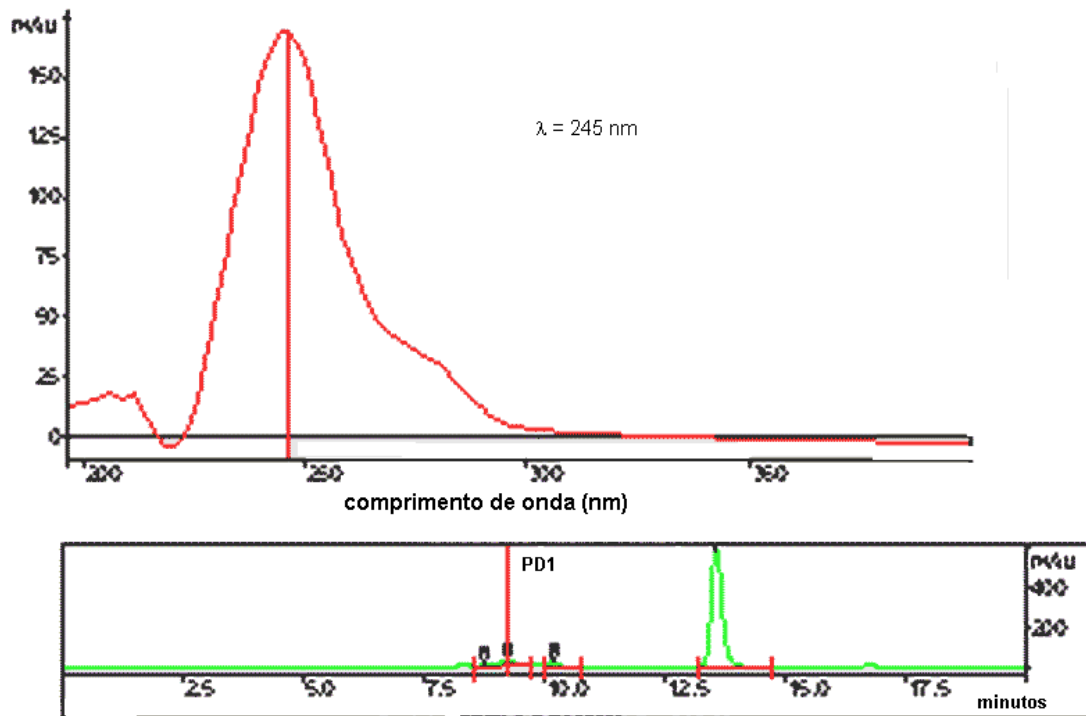
**Figura 5.20.** Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25,V/V/V). LNZ-comp.  $T_R \cong 13,0$  minutos; PD1  $\cong 9,0$  minutos; PD2  $\cong 10,5$  minutos.

A Figura 5.21 mostra o cromatograma de LNZ-comp. degradado por 30 dias em luz-UVC, e o produto de degradação 2 (PD2) identificado na figura, bem como o espectro de absorção correspondente. O software utilizado foi o Polyview.



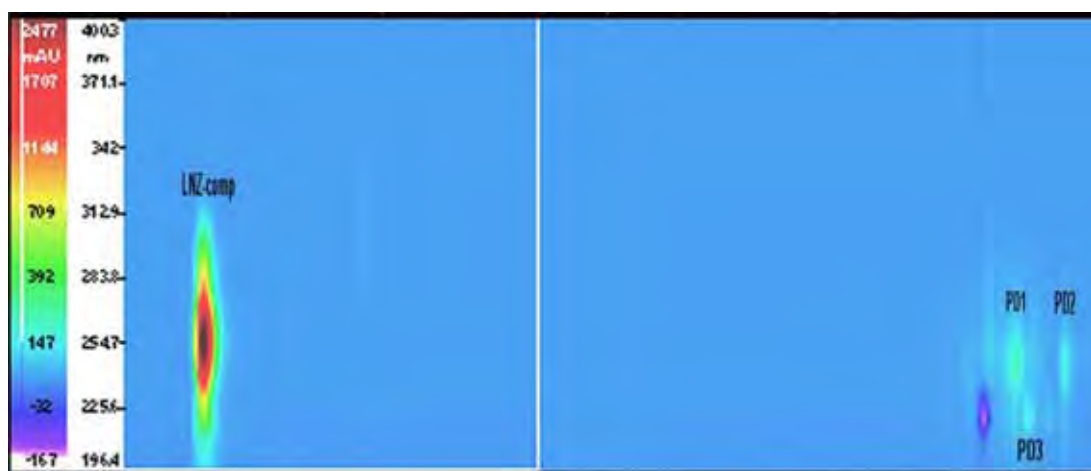
**Figura 5.21.** Cromatograma de solução de linezolidina-comprimido, em concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5  $\mu\text{m}$  – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Esta figura mostra o cromatograma com indicação do PD2 e o respectivo espectro de absorção. O software utilizado foi Polyview.

A Figura 5.22 mostra o cromatograma de LNZ-comp. degradado por 30 dias em luz-UVC, e o produto de degradação 1 (PD1) mostradado na figura, bem como o espectro de absorção correspondente. O software utilizado foi o Polyview.



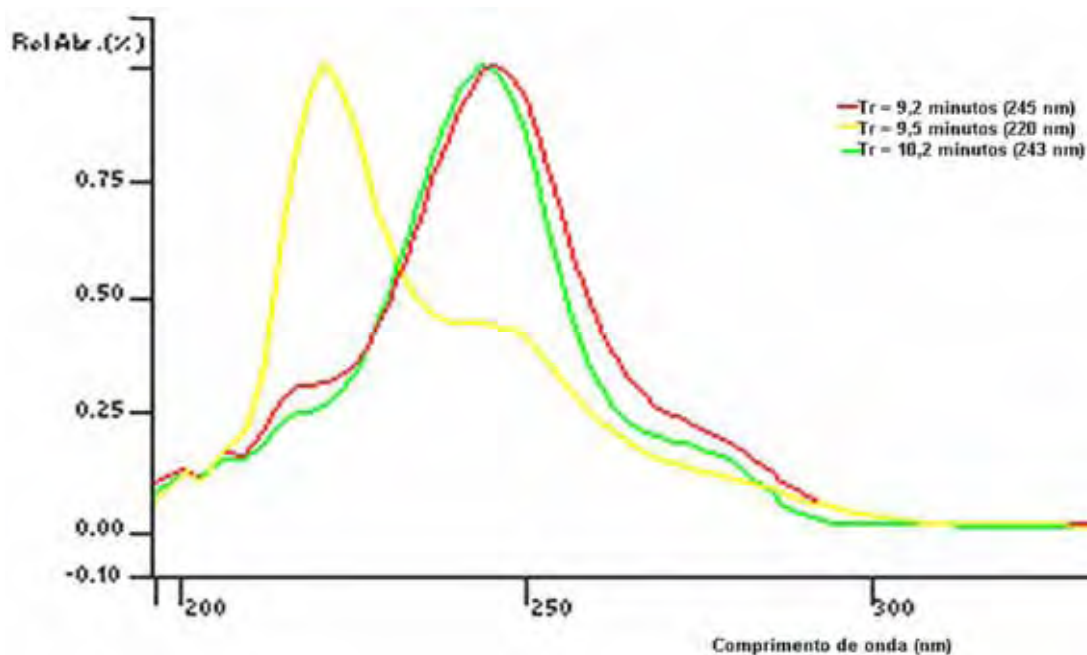
**Figura 5.22.** Cromatograma de solução de linezolidina-comprimido, em concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx- $\text{C}_{18}$  250 x 9,4 mm, 5  $\mu\text{m}$  – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Esta figura mostra o cromatograma com indicação do PD1 e o respectivo espectro de absorção. O software utilizado foi Polyview.

Na Figura 5.23, os resultados estão ilustrados pelo software AURORA, em que os picos de cada composto são mostrados por diagramas em cores. Nesta figura pode-se observar a intensidade do sinal em mAU, na primeira coluna e a absorvância, na segunda coluna. A Figura mostra LNZ-comp. e os produtos de degradação formados (PD1, PD2 e PD3).



**Figura 5.23.** Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 mm x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Neste isograma observa-se formação de três produtos de degradação.

A Figura 5.24 mostra os espectros correspondentes aos compostos PD1, PD2 e PD3. Os espectros foram extraídos do software AURORA através do isograma correspondente (Figura 5.19). O tempo de retenção de PD1 é 9,2 minutos e o comprimento de onda máximo equivale a 245 nm. O tempo de retenção de PD2 é 10,2 minutos e o comprimento de onda máximo equivale a 243 nm. O tempo de retenção do PD3 é 9,5 minutos e o comprimento de onda máximo equivale a 220 nm.



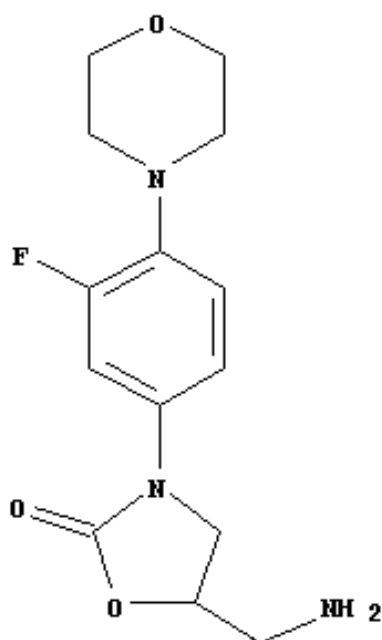
**Figura 5.24.** Cromatograma de solução de linezolida-comprimido, em concentração de 200 µg/mL, representando a degradação fotoquímica de comprimidos triturados em 30 dias, utilizando CLAE com diodos em série, coluna semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub> 250 x 9,4 mm, 5 µm – AGILENT. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). PD1 - t<sub>R</sub> = 9,2 min (245 nm); PD2 – tr = 10,2 min (243 nm); PD3. – TR = 9,5 min (220 nm).

Em relação à degradação fotoquímica, os pós dos comprimidos triturados demonstraram, a partir da análise visual, modificações significativas nas características organolépticas. A coloração amarelada se intensificou até o final do estudo (tempo de 30 dias). Observou-se também a formação de produtos de degradação, tanto para os pós dos comprimidos triturados, quanto para o comprimido íntegro, exposto na câmara com luz – UVC. Para analisar as amostras, foram utilizados dois cromatógrafos de fabricantes distintos (Waters e Varian), bem como colunas, cromatográficas de marcas diferentes.

As primeiras análises foram realizadas utilizando cromatógrafo Waters com coluna Symmetry C<sub>18</sub>. As Figuras 5.14 e 5.15 mostram os cromatogramas das soluções de LNZ-comp., na concentração de 12,0 µg/mL, em que, observa-se o início da formação de produtos de degradação. Para obter melhor visualização e distinção dos produtos de degradação, foi utilizada coluna cromatográfica semipreparativa Zorbax Rx-C<sub>18</sub>. A Figura 5.17 mostra o cromatograma da solução de LNZ-comp., na concentração de 12,0 µg/mL, em que dois produtos de degradação no tempo de retenção de 10,4 minutos e 11,5 minutos são mais bem visualizados. Nestas condições a linezolida possui tempo de retenção de 15 minutos. A Figura 5.21 mostra o cromatograma e o respectivo espectro de absorção do produto de degradação PD2, com comprimento de onda equivalente a 243 nm. A Figura 5.22 mostra o cromatograma e o respectivo espectro de absorção do produto de degradação PD1, com comprimento de onda equivalente a 245 nm. Esses dois produtos de degradação formados possuem espectro de absorção semelhante ( $\lambda = 243$  nm e  $\lambda = 245$  nm), com tempos de retenção próximos. Pode-se supor que estes produtos de degradação são os mesmos dos demonstrados nos picos visualizados na Figura 5.17 analisados em cromatógrafo Waters.

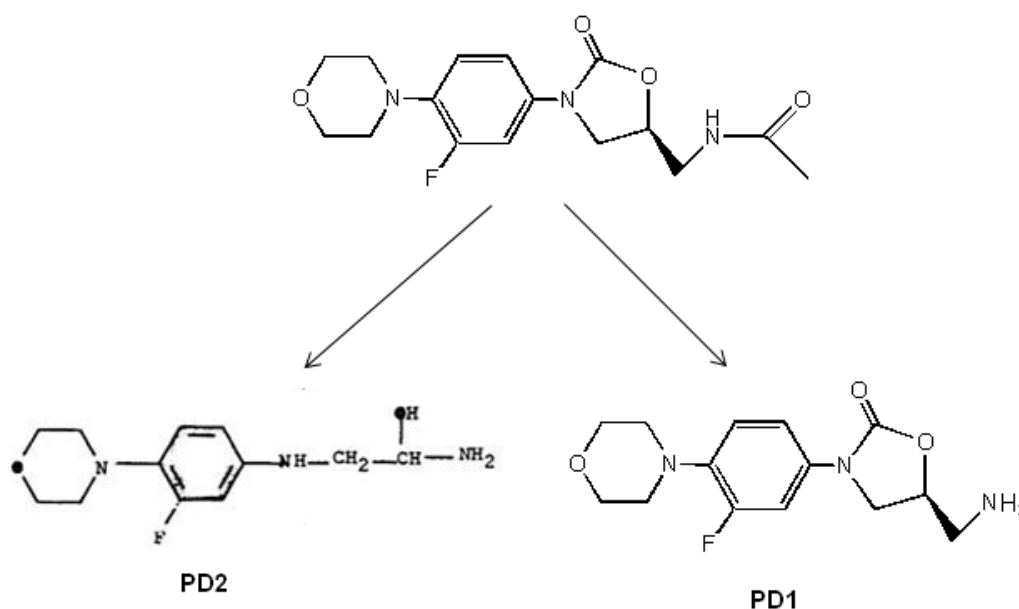
A LNZ-SR em água possui comprimento de onda máximo de 251 nm. Os produtos de degradação formados possuem espectro de absorção com comprimento de onda entre 243 nm e 245 nm. Provavelmente, a molécula de linezolida, deve ter

perdido um grupamento específico degradado pela luz-UVC. O comprimento de onda máximo teve um deslocamento muito pequeno e com isto, pode-se supor, que o produto de degradação formado, provavelmente, é resultante da degradação dos grupamentos envolvendo a ligação C = O (carbonila). Supõe-se que um dos produtos formados, seja o mesmo resultante da degradação alcalina, demonstrado no esquema 5.1, em que corresponderia ao produto de degradação (PD2) com espectro de absorção máximo de 243 nm (tr = 10,5 minutos). A Figura 5.25 mostra o outro possível produto de degradação formado (PD1).



**Figura 5.25.** Proposta da estrutura química do produto de degradação formado (PD1).

Para confirmar a pureza dos picos, comprimidos de linezolida expostos em luz UVC por 30 dias foram analisados no isograma mostrado na Figura 5.23, em que, observa-se a presença de um produto de degradação minoritário, com espectro de absorção característico na Figura 5.24, com comprimento de onda máximo de 220 nm e tempo de retenção equivalente a 9,5 minutos. Provavelmente, este produto de degradação é o mesmo produto formado na degradação em câmara climática, pois possuem espectros de absorção semelhantes. O esquema 5.2 mostra os dois possíveis produtos de degradação (PD1 e PD2) formados na degradação fotoquímica.



**Figura 5.2.** Esquema de degradação de linezolida mostrando os possíveis produtos de degradação (PD1 e PD2)

Com base nos resultados obtidos, os quais demonstram alteração das características organolépticas (em todas as amostras), na percentagem residual de linezolida nas amostras, principalmente do pó, e aparecimento de produtos de degradação nos cromatogramas, é possível afirmar que houve degradação do fármaco. Assim sendo, a linezolida demonstrou ser sensível ao fator luz-UVC nas condições estabelecidas. Com isso, verifica-se a importância de proteger este fármaco da luz, principalmente a matéria-prima, durante todo o processo de produção do medicamento.

### *5.2.2. Estudo de fotodegradação de linezolida*

#### *5.2.2.1. Condições de estudo*

##### *5.2.2.1.1. Para análise em CLAE e espectrofotometria no UV*

O equivalente a três pesos médios dos comprimidos de linezolida foi transferido para placa de vidro e colocados em câmara espelhada internamente e exposto à luz por 1, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 dias. Após o tempo de exposição, pesou-se o equivalente a 200,0 mg de linezolida de cada uma das amostras expostas à luz e transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com água. Desta solução a 2000,0 µg/mL, foi transferida alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água, obtendo-se concentração teórica de 200,0 µg/mL. Para análise em CLAE, foram transferidas alíquotas de 3,0 mL para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com fase móvel (ácido acético 1% : acetonitrila : metanol, 50:25:25, V/V/V). Em seguida, as soluções foram analisadas em CLAE. As amostras analisadas em CLAE foram filtradas em membrana de tamanho de poro 0,45 µm e volumes de 20 µL. Para análise em espectrofotometria, a partir da solução com concentração teórica de 200,0 µg/mL, foram transferidas alíquotas de 3,0 mL para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água ultrapura para obtenção de solução com concentração de 12,0 µg/mL.

#### *5.2.2.1.2. Para análise por ensaio microbiológico*

Três comprimidos foram triturados e transferidos em placa de vidro para câmara espelhada internamente e expostos à luz por 10, 30, 60 e 90 dias. Após o tempo de exposição, pesou-se o equivalente a 200 mg de linezolida de cada uma das amostras expostas à luz (10, 30, 60 e 90 dias) e transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com água. Desta solução a 2000,0 µg/mL, foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água, obtendo-se concentração de 200,0 µg/mL. Em seguida, alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 mL destas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e os volumes completados com tampão fosfato pH 6,0, obtendo-se concentrações de 20, 40 e 80,0 µg/mL.

#### *5.2.2.2. Resultados*

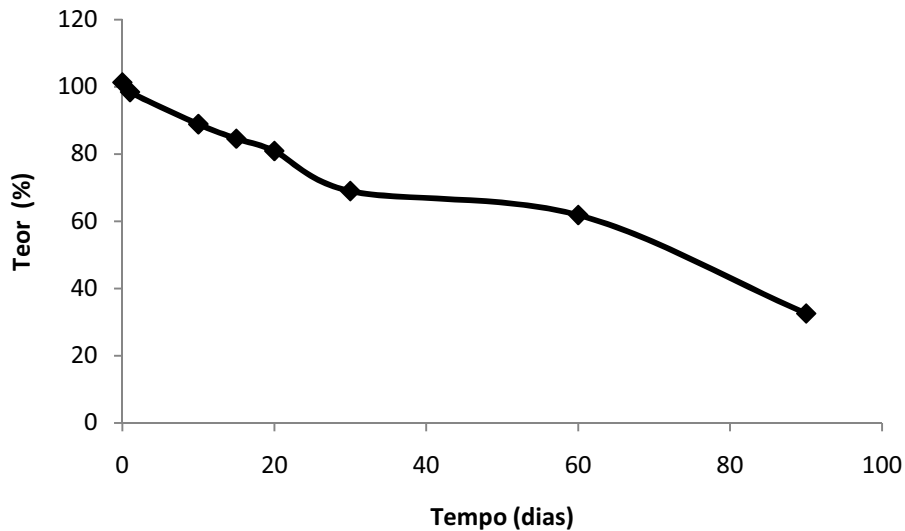
##### *5.2.2.2.1. Análise em CLAE*

A Tabela 5.1 mostra os resultados obtidos com os comprimidos triturados expostos ao fator luz (254 nm) durante o período de 90 dias.

**Tabela 5.1.** Valores obtidos na quantificação de linezolida nos comprimidos triturados expostos à luz (254 nm), analisados por CLAE

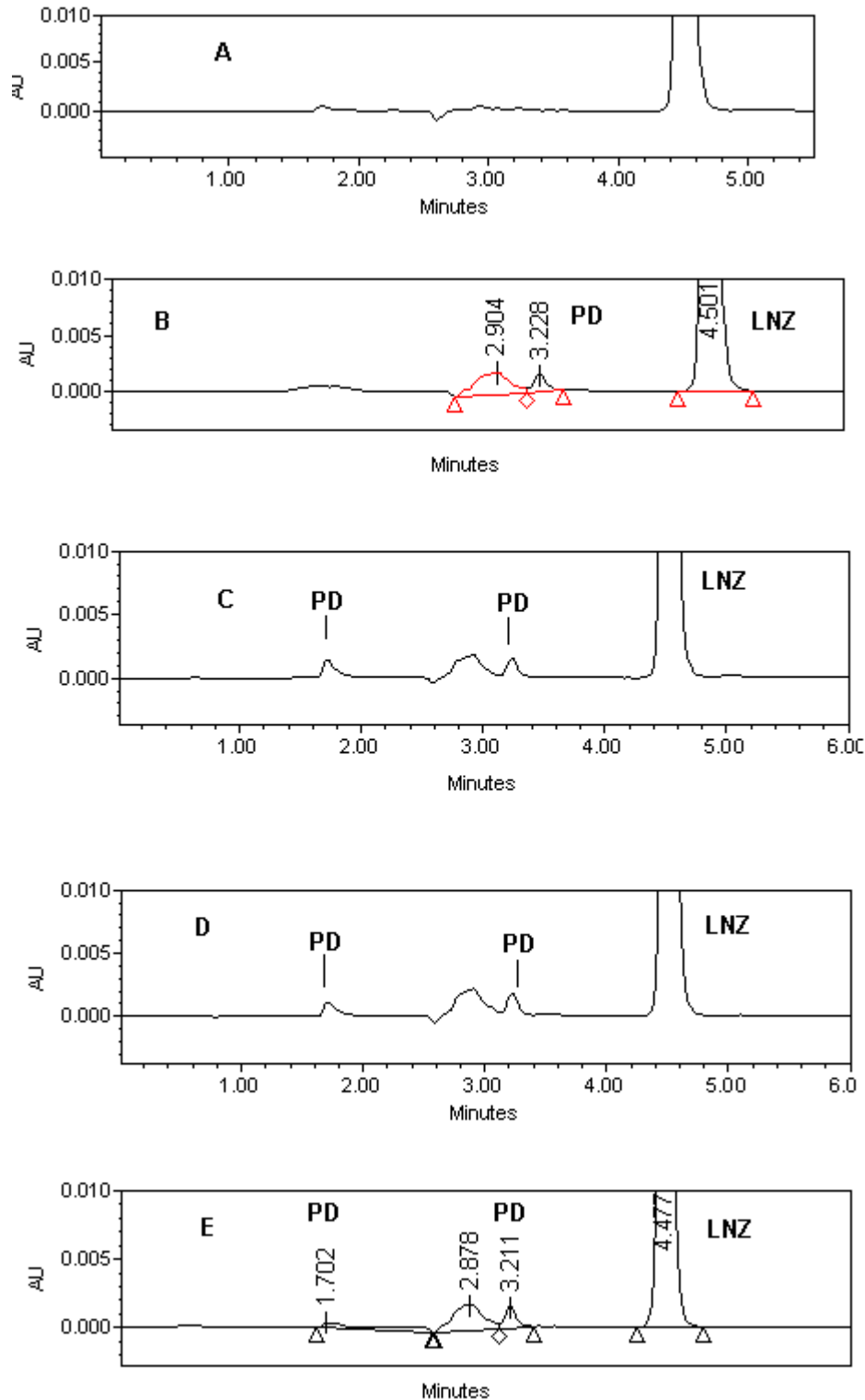
Tempo de exposição (dias)	Área	Teor (%)	Teor médio	
			(%)	DPR (%)
0	557734	101,31	101,32	1,57
	564065	102,46		
	551624	100,20		
1	547747	99,49	98,45	1,50
	536237	97,40		
	538863	97,88		
10	513444	93,26	91,56	1,99
	492326	89,42		
	506523	92,00		
15	470138	85,39	84,58	0,61
	461360	83,80		
	465423	84,54		
20	444214	80,68	80,91	3,68
	457641	83,12		
	434434	78,91		
30	365571	66,40	68,97	5,18
	400717	72,78		
	372895	67,73		
60	334522	60,76	61,85	0,70
	345224	62,70		
	341829	62,09		
90	176103	31,98	32,54	1,34
	179011	32,51		
	182408	33,13		

A Figura 5.26 mostra o gráfico correspondente à análise do teor de LNZ-comp. durante 90 dias, exposta ao fator luz-UVC 254 nm, analisadas por CLAE.



**Figura 5.26.** Teor de LNZ-comp, no período correspondente a 90 dias, exposta ao fator luz UVC (254 nm), determinado por CLAE.

A Figura 5.27 mostra os cromatogramas ampliados dos dias 1, 10, 15, 20 e 30 dias de exposição dos comprimidos triturados de linezolida na luz-UVC. Observa-se a formação e o aumento dos produtos de degradação com o aumento da exposição.



**Figura 5.27.** Cromatogramas ampliados de exposição de comprimidos de linezolid (LNZ) na luz UVC, nos dias, 1 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D) e 30 (E), mostrando os possíveis produtos de degradação (PD). Fase móvel: ácido acético 1%: metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 20 mm x 3,9 mm.

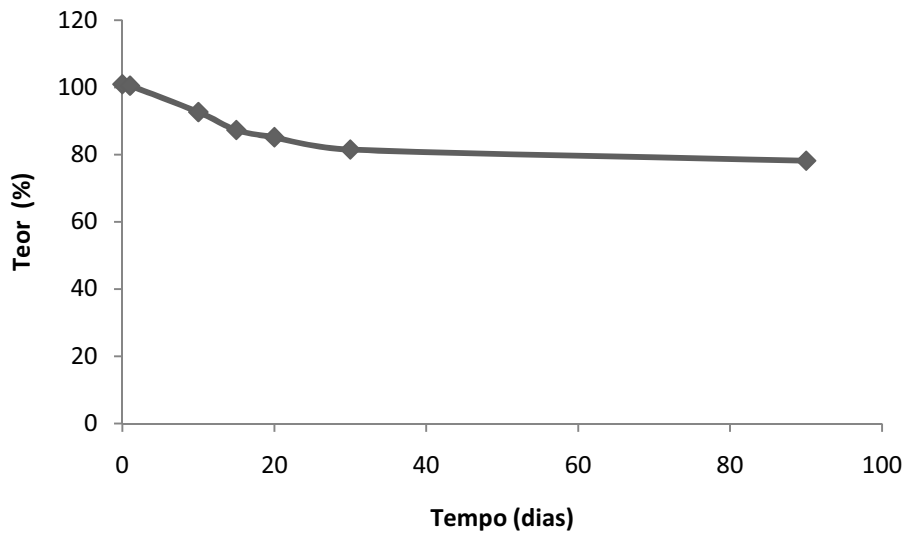
## 5.2.2.2.2. Análise por espectrofotometria na região de ultravioleta

A Tabela 5.2 mostra os resultados obtidos com os comprimidos triturados expostos ao fator luz-UVC (254 nm) durante o período de 90 dias.

**Tabela 5.2.** Resultados obtidos na quantificação de linezolida nos comprimidos triturados expostos à luz-UVC (254 nm), analisados por espectrofotometria na região ultravioleta, a 251 nm

Tempo de exposição (dias)	Absorvância	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR (%)
0	0,6639	101,5	100,87	0,90
	0,6534	99,91		
	0,6620	101,2		
1	0,6572	101,10	100,43	0,95
	0,6484	99,75		
	0,6529	100,44		
10	0,6066	93,32	92,61	1,09
	0,6043	92,56		
	0,5950	91,53		
15	0,5692	87,56	87,26	0,53
	0,5684	87,44		
	0,5641	86,78		
20	0,5521	84,93	85,11	0,10
	0,5534	85,13		
	0,5542	85,26		
30	0,5280	81,23	81,45	0,16
	0,5312	81,72		
	0,5300	81,53		
90	0,5089	78,29	78,14	0,26
	0,5070	78,00		
	0,5044	77,60		

A Figura 5.28 mostra o gráfico correspondente à análise do teor de linezolida durante 90 dias, exposta ao fator luz-UVC 254 nm, analisadas por espectrofotometria em 251 nm.



**Figura 5.28.** Análise do teor de linezolida, no período correspondente de 90 dias, exposta ao fator luz UVC – 254 nm, analisadas por espectrofotometria na região UV.

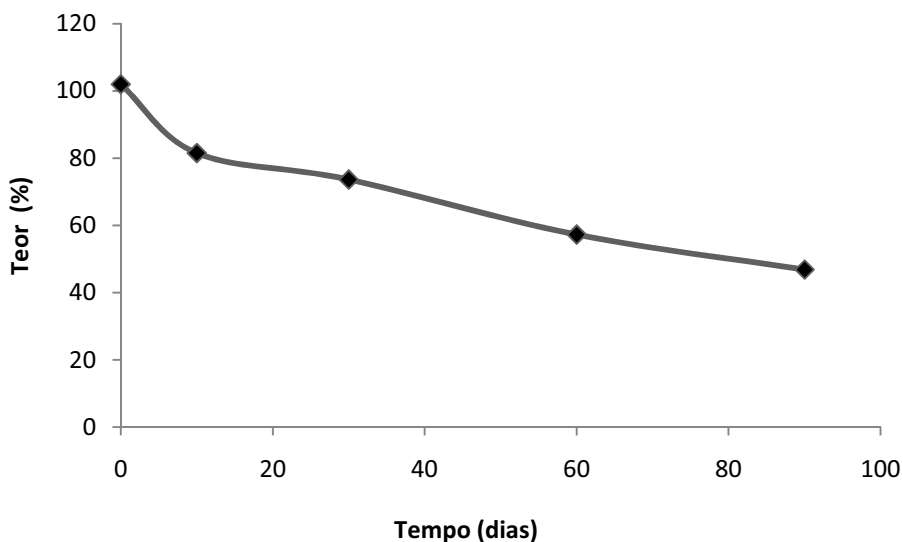
#### 5.2.2.2.3. Análise por doseamento microbiológico

A Tabela 5.3 mostra os resultados obtidos com os comprimidos triturados expostos ao fator luz-UVC (254 nm) durante o período de 90 dias.

**Tabela 5.3.** Resultados obtidos na quantificação de linezolida nos comprimidos triturados expostos à luz-UVC (254 nm), analisados por doseamento microbiológico

Tempo de exposição (dias)	Teor (%)
10	81,49
30	73,61
60	57,22
90	46,81

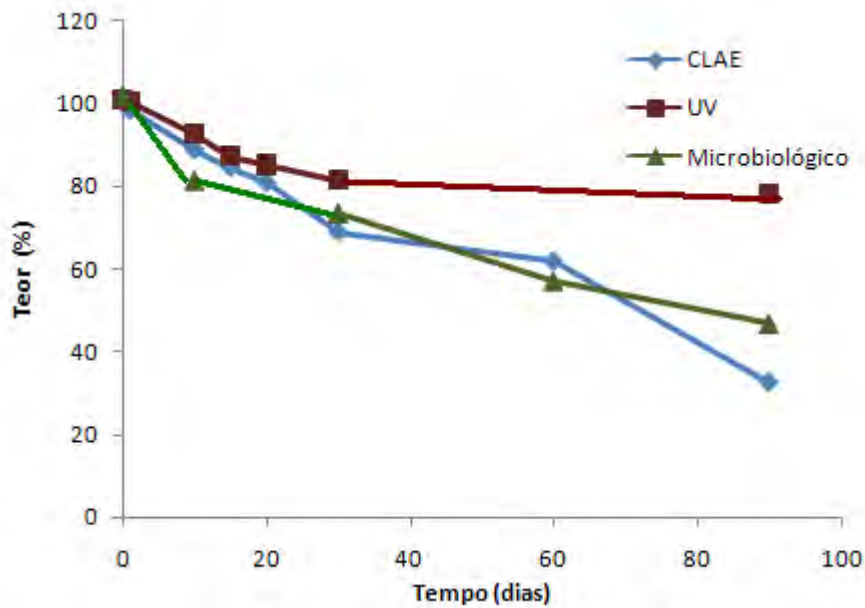
A Figura 5.29 mostra o gráfico correspondente à análise do teor de linezolida durante 90 dias, exposta ao fator luz-UVC 254 nm, analisadas por doseamento microbiológico.



**Figura 5.29.** Análise da potência de linezolida, no período correspondente de 90 dias, exposta ao fator luz UVC – 254 nm, analisadas por doseamento microbiológico.

5.2.2.2.3. *Análise comparativa do estudo de fotodegradação em CLAE, espectrofotometria no UV e doseamento microbiológico.*

A Figura 5.30 mostra o decaimento de teor, dos comprimidos de linezolida, expostos durante 90 dias na luz-UVC (254 nm), analisados por CLAE, por doseamento microbiológico e espectrofotometria no UV.



**Figura 5.30.** Análise comparativa do teor de decaimento dos comprimidos de linezolida, expostos à luz-UVC, analisados por CLAE, por doseamento microbiológico e espectrofotometria no UV.

#### 5.2.2.2.3. Discussão

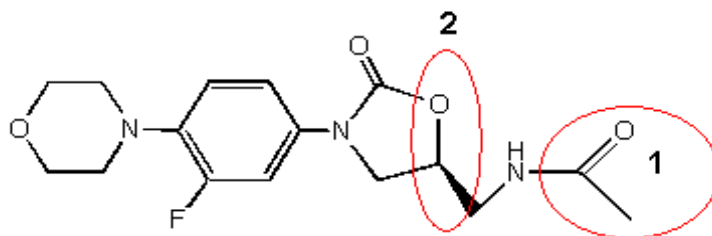
O estudo de fotodegradação demonstrou que linezolida é susceptível à luz UVC (254 nm) nas condições estudadas. As análises foram realizadas expondo o equivalente a três pesos médios dos comprimidos triturados, em câmara espelhada com luz-UVC (254 nm), forçando condições extremas de análise. Este estudo teve como objetivo verificar o decaimento do teor de linezolida nos comprimidos durante o período de 90 dias e também verificar, quais os possíveis produtos de degradação formados nesta condição de estresse. O método desenvolvido e validado em CLAE demonstrou a capacidade de diferenciar os produtos de degradação do fármaco não degradado e também quantificar a quantidade residual de linezolida após a degradação. Pode-se observar na Tabela 5.1 e Figura 5.26, o decaimento do teor de linezolida nos comprimidos, após os tempos de exposição pré-determinados. Após a exposição de 90 dias, os comprimidos triturados na luz UVC, apresentaram um teor residual de 32,54 % determinados por CLAE.

Com o estudo de fotodegradação, pode-se verificar que o método em CLAE, desenvolvido e validado, foi capaz de identificar e diferenciar linezolida dos seus produtos de degradação formados. As determinações dos possíveis produtos de degradação indicam as rotas de degradação de linezolida quando exposta à luz UVC-254 nm. Observando os cromatogramas dos períodos pré-determinados de exposição, verifica-se que a partir do décimo dia de exposição, ocorre a formação de um produto de degradação majoritário (Figura 5.27) e a partir do décimo quinto dia de exposição, observa-se a formação de outro produto de degradação. Pelos cromatogramas obtidos sugere-se a formação de dois produtos de degradação majoritários.

A espectrofotometria na região do ultravioleta foi outro método validado, e também escolhido para verificar a capacidade de quantificação de linezolida na presença de produtos de degradação, gerados pela degradação forçada de

comprimidos triturados de linezolida na luz-UVC. A espectrofotometria na região UV, a 251 nm, apresentou um decaimento no teor de linezolida em 60 dias, sendo que, neste caso, o método foi menos sensível, pois utilizando espectrofotometria no UV, observa-se que o teor residual de linezolida em 60 dias de exposição, foi de 78,14 % de linezolida. Este fato indica que o produto de degradação mantém parte da molécula responsável pela absorção na região UV. O anel fenil é o cromóforo responsável pelo espectro característico da molécula. Acredita-se que a estrutura do anel não foi degradada.

Amostras expostas por 90 dias em luz-UVC foram analisadas por doseamento microbiológico. Este método mostra-se sensível a degradação de linezolida na luz UVC, apresentando um decaimento característico do teor no período de 90 dias (Figura 5.29). Neste caso, supõe-se que os grupamentos orgânicos degradados, provavelmente, são importantes para a atividade antimicrobiana de linezolida. De acordo com a estrutura química de linezolida, é possível identificar cinco grupamentos que contribuem para a atividade antimicrobiana (Figura 3.2, capítulo II). Os resultados do ultravioleta sugerem que o grupamento principal pela absorção da molécula não foi quebrado, com estes dados, supõe-se que os grupos no círculo 1 e 2 (Figura 5.31) foram rompidos, diminuindo a atividade antimicrobiana de linezolida. A potência de comprimidos de linezolida após 90 dias de exposição foi de 46,81 %.



**Figura 5.31.** Estrutura química de linezolida e os possíveis grupos orgânicos atingidos durante a exposição por 90 dias.

---

### 5.2.3. Estudo da cinética de fotodegradação utilizando CLAE

#### 5.2.3.1. Condições de estudo

Considerando a fotossensibilidade de linezolida, verificada a partir dos resultados obtidos nos estudos de fotodegradação, realizou-se a cinética de fotodegradação. O estudo da cinética foi realizado com os comprimidos triturados expostos à radiação ultravioleta, colocados na câmara descrita no estudo preliminar de estabilidade durante o período de 60 dias. Após o término de análise, as soluções foram preparadas conforme o item 2.2.1.1 e analisadas em CLAE. A partir dos dados experimentais de concentração, determinou-se a ordem de reação seguida pela amostra, utilizando-se como base a correlação existente entre as duas variáveis (concentração e tempo). Os coeficientes de regressão linear ( $r$ ) foram obtidos, sendo que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem da reação (LACHMAN et al., 2001). Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação ( $k$ ), e período de vida útil  $t_{90\%}$  (tempo no qual 90% da concentração do fármaco encontra-se inalterada) foram obtidos. O valor de  $k$  médio foi obtido a partir da inclinação da reta.

#### 5.2.3.2. Resultados

A Tabela 5.4 relaciona os resultados do efeito da exposição à luz 254 nm na concentração residual de linezolida nos comprimidos triturados durante o período de 90 dias, analisados por CLAE.

**Tabela 5.4.** Concentração residual de linezolida em comprimidos triturados após a fotodegradação em lâmpada UVC - 254 nm, utilizando o método CLAE

Tempo (dias)	Área (média)	Teor (%)	Concentração obtida ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	558010,11	101,32	12,16
1	541992,5	98,45	11,81
10	500982,4	91,56	10,92
15	464141,4	84,58	10,11
20	445835,1	80,91	9,71
30	385890,7	68,97	8,41
60	342198,8	61,85	7,45
90	179174,0	32,54	3,90

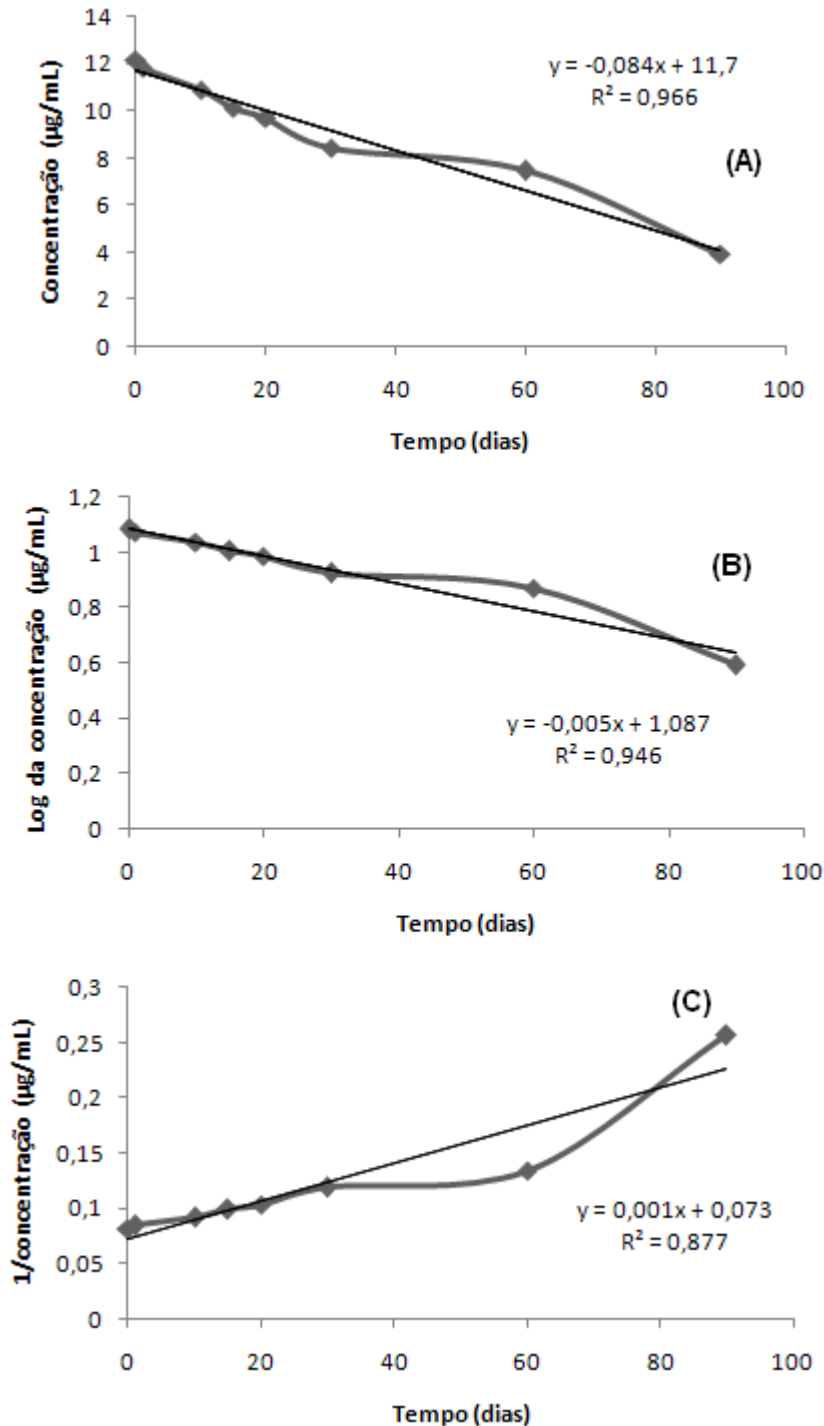
\*DPR – desvio padrão relativo

A Tabela 5.5 relaciona os valores das concentrações para cada ordem de reação, bem como o coeficiente de correlação, obtida a partir de soluções dos comprimidos triturados de linezolida expostos a luz UVC-254 nm (20 W).

**Tabela 5.5.** Valores dos coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir de soluções dos comprimidos triturados de linezolida expostas à luz UVC-254 nm (20 W)

Tempo (dias)	Reação de ordem zero concentração de linezolida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Reação de primeira ordem log da concentração	Reação de segunda ordem 1/concentração
0	12,16	1,084	0,082
1	11,81	1,072	0,084
10	10,92	1,038	0,0915
15	10,11	1,004	0,0989
20	9,71	0,987	0,1029
30	8,41	0,924	0,118
60	7,45	0,872	0,134
90	3,905	0,591	0,256
r	0,966	0,946	0,877

A Figura 5.32 mostra os gráficos de concentração de fármaco residual em função do tempo, log da concentração em função do tempo, e inverso da concentração em função do tempo.



**Figura 5.32.** Gráficos correspondentes as ordens de reação: (A) reação de ordem zero; (B) reação de primeira ordem; (C) reação de segunda ordem de linezolida residual em função do tempo. Os coeficientes de regressão encontram-se demonstrados.

A Tabela 5.6 mostra os resultados obtidos da velocidade de degradação (k) de linezolida, o tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) e o coeficiente de correlação para linezolida, obtidos segundo cinética de ordem zero.

**Tabela 5.6.** Constantes de velocidade de reação (k), equação da reta, coeficiente de correlação e tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) para linezolida após fotodegradação a 254 nm dos comprimidos triturados, por CLAE

Parâmetros	Valores
equação	$y = -0,084x + 11,7$
Coeficientes de correlação	$r^2 = 0,966$
Velocidade de degradação (k)	$k = 0,084$
$t_{90\%}$ (h)	$t_{90\%} = 14,47$

### 5.2.3.3. Discussão

O método por CLAE, validado para a determinação de linezolida na forma farmacêutica, demonstrou ser adequado para estudos de estabilidade, pois não há interferência dos picos referentes aos produtos de degradação na análise. Testes preliminares de estabilidade haviam demonstrado que a luz é um fator importante para a degradação de linezolida, mas não havia dados sobre a velocidade das reações. Com isso, foi realizado o estudo da cinética de fotodegradação do fármaco, na forma sólida (comprimidos triturados), visando verificar o comportamento de linezolida nos pós. Os resultados demonstraram que a linezolida apresenta importante fotodegradação nos comprimidos triturados expostos à luz UVC-254 nm. Foi possível observar que em 90 dias de exposição, os comprimidos triturados possuem teor

---

residual de linezolida de 32,54 %. Os pós apresentaram coloração amarelada, a qual aumentou com o tempo de exposição.

A partir dos gráficos obtidos, foi possível atribuir à reação de fotodegradação de linezolida em comprimidos triturados, uma cinética de ordem zero. Com isto, de acordo com o conceito de ordem zero, a degradação de linezolida sob efeito de radiação UVC-254 nm, independe da concentração dos reagentes. Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k) e tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) foram calculados com base nas equações matemáticas apresentadas para reação de ordem zero (Tabela 5.6).

#### **5.2.4. Estudo da estabilidade de linezolida em câmara climática**

##### *5.2.4.1. Condições de estudo*

Para este estudo foi utilizada uma câmara climática (Marconi MA 835/UR), a 40°C e 75% de umidade relativa, simulação dia/noite, durante 3 meses. O equivalente a três pesos médios foram triturados e colocados em placa de Petri. Após o tempo de exposição, pesou-se o equivalente a 200 mg de linezolida de cada uma das amostras expostas a 40°C e 75% de umidade relativa e transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com água. Desta solução a 2000,0 µg/mL, foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água, obtendo-se concentração de 200,0 µg/mL. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 3,0 mL para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com fase móvel (ácido acético 1% : acetonitrila: metanol, 50:25:25, V/V/V). As soluções foram filtradas em membrana de tamanho de poro 0,45 µm e volumes de 20 µL foram analisados por CLAE.

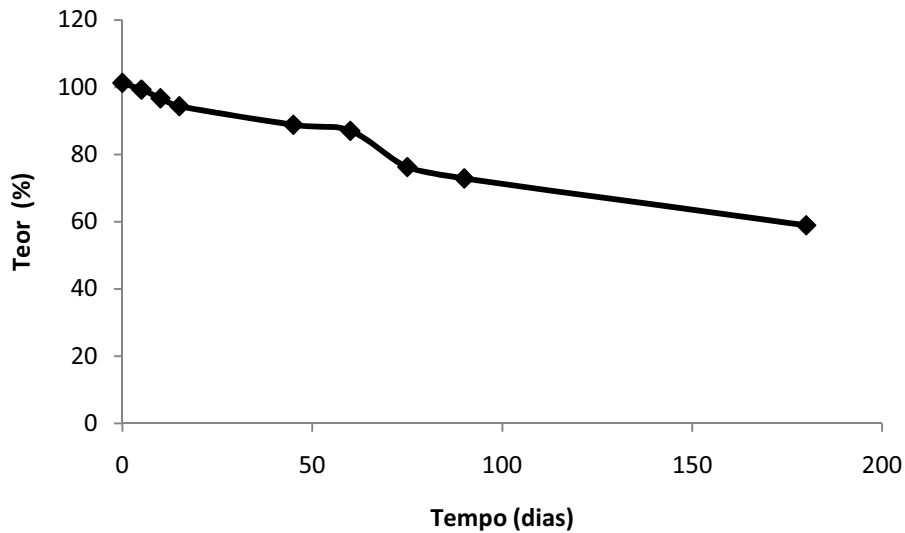
##### *5.2.4.2. Resultados*

A Tabela 5.7 mostra os resultados obtidos com os comprimidos triturados expostos à câmara climática (40° C/75%) durante o período de 180 dias.

**Tabela 5.7.** Valores obtidos na quantificação de linezolidina nos comprimidos triturados expostos à câmara climática (40° C/75%), analisados por CLAE.

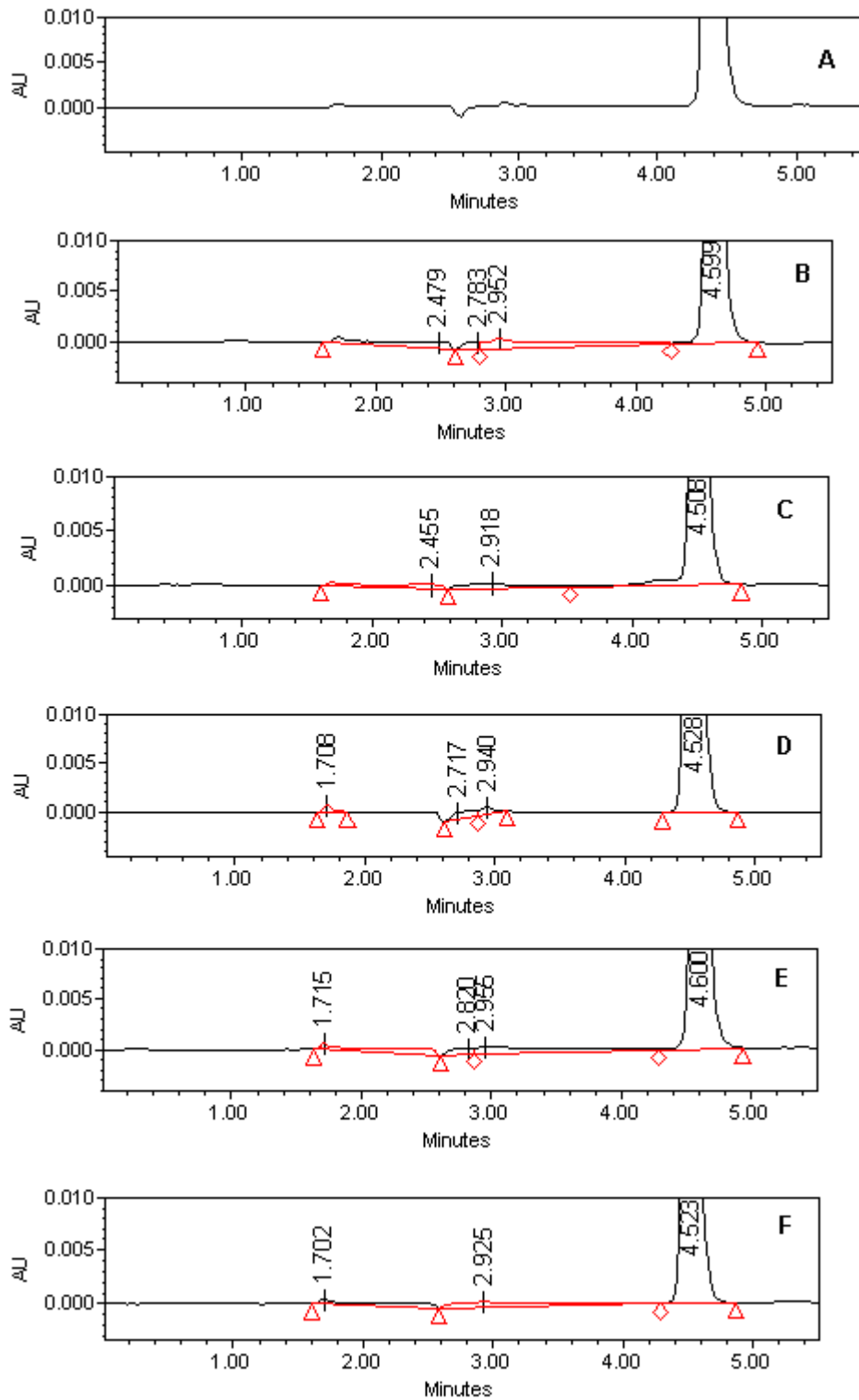
Tempo de exposição (dias)	Área	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR
0	557734	101,31	101,32	1,57
	564065	102,46		
	551624	100,20		
5	558761	101,49	99,33	3,15
	554763	100,77		
	527084	95,74		
10	525488	95,45	96,72	1,78
	543313	98,69		
	528741	96,04		
15	514350	93,42	94,35	3,48
	539508	97,99		
	504402	91,62		
30	496777	90,23	94,09	4,11
	517958	94,08		
	539365	97,97		
45	487631	88,57	88,44	0,81
	490470	89,09		
	482609	87,66		
60	484874	88,07	87,04	3,72
	493548	89,65		
	459237	83,41		
75	517608	94,02	90,58	2,29
	495320	89,97		
	502032	91,19		
90	460688	83,68	85,02	3,43
	483578	87,83		
	452594	82,21		
180	339781	58,08	58,88	1,65
	330160	59,97		
	322568	58,59		

A Figura 5.33 mostra o gráfico correspondente à análise do teor médio de linezolida durante 180 dias, exposta em câmara climática 40°C/75%, analisadas por CLAE.



**Figura 5.33.** Análise do teor de linezolida, no período correspondente de 180 dias, exposta em câmara climática (40° C/75%), analisadas por CLAE.

A Figura 5.34 mostra os cromatogramas dos comprimidos triturados de linezolida expostos à 40°C/75 % em câmara climática nos períodos pré-determinados (5, 30, 45, 60 e 90 dias)



**Figura 5.34.** Cromatogramas ampliados dos comprimidos triturados de linezolid, em câmara climática (40° C/75%), nos períodos de 5 (A), 30 (B), 45 (C), 60 (D), 75 (E) e 90 (F) dias. Fase móvel: ácido acético 1% : metanol : acetonitrila (50:25:25, V/V/V). Coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5µm 250 mm x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C<sub>18</sub> 5 µm 20 mm x 3,9 mm.

---

#### 5.2.4.3. Discussão

De acordo com o *International Conference on Harmonization* (ICH), 1994, e a Resolução GMC 53/96 do Mercosul (2000), para estudos de estabilidade, o Brasil encontra-se na região climática IV, com temperatura média de 30°C e 70% de UR. Estes roteiros para análise da estabilidade de medicamentos sugerem a execução de estudos de degradação acelerada de acordo com a área climática em que se encontram cada país. Para os países situados na região IV, os ensaios de degradação acelerada devem ser conduzidos a 40 °C e 75% de umidade relativa (UR), durante o período de seis meses e a 50°C e 90% de UR, durante o período de três meses. Nesses estudos o medicamento é mantido na sua embalagem primária. Segundo a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), nas formas farmacêuticas sólidas, que possuem embalagem impermeável, os estudos de estabilidade acelerada e longa duração devem ser conduzidos utilizando somente um parâmetro: temperatura. Se a embalagem for semi-permeável, deve-se utilizar a temperatura e a umidade relativa nas análises.

Neste estudo, os comprimidos foram analisados fora da embalagem, íntegros e triturados, durante 3 meses. Foi realizado estudo de degradação forçada para os comprimidos de linezolida e com isso acelerar os processos de degradação. Os parâmetros e tempos de exposição foram determinados segundo KLINK e colaboradores (2005).

É amplamente reconhecido no campo das ciências farmacêuticas que a exposição de fármacos no estado sólido a altas taxas de umidade relativa bem como a associação entre o vapor d'água com as partículas sólidas pode acelerar a velocidade de degradação química do produto. Em geral, para reações que ocorrem com sólidos na forma amorfa, a velocidade de reação aumenta com o aumento do conteúdo de água e este fato pode ser atribuído à capacidade do sólido amorfo de absorver o vapor d'água na sua estrutura, formando uma solução amorfa. A água absorvida é

responsável pela maioria dos tipos de reações de degradação de fármacos como, por exemplo, reações de hidrólise, oxidação e desaminação (SHALAEV e ZOGRAFI, 1996).

Durante o tempo de análise, os comprimidos apresentavam-se brancos, e levemente amarelados com 60 dias de exposição. Verificou-se que houve a degradação de linezolida lentamente, com teor residual de 85,02% do fármaco em 90 dias de exposição. Os comprimidos foram analisados por CLAE, cujo método foi validado e também mostrou ser apropriado para identificação e diferenciação de produtos de degradação, nos estudos de degradação forçada em câmara climática.

#### **5.2.6. Discussão geral**

O estudo de estabilidade de linezolida em comprimidos foi um dos objetivos deste trabalho, tendo em vista a pequena quantidade de informações na literatura. Os trabalhos encontrados citam a susceptibilidade de linezolida à degradação básica, em testes de estresse (BEBAWY, 2003a; BEBAWY, 2003b). Nestes trabalhos, os autores desenvolveram um método analítico na presença do produto de degradação formado em meio alcalino. Este tipo de degradação é irrelevante, pois não condiz com degradações verdadeiras, em que os comprimidos são expostos.

Neste capítulo, inicialmente, foram realizados os testes preliminares, a fim de conhecer quais os fatores são importantes para a degradação do fármaco. Observa-se que linezolida nos comprimidos é sensível à degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica e nas condições de temperatura e umidade (40°C/75%). Sabendo que, os fatores reais de influência na estabilidade dos comprimidos seriam a exposição à luz, temperatura e umidade, escolheu-se a degradação fotolítica e em câmara climática para realizar os estudos do decaimento do teor de linezolida nos comprimidos, e,

posteriormente, aplicar os dados obtidos no estudo de cinética de degradação dos comprimidos de linezolida.

Para realizar os estudos de degradação fotolítica, foi utilizada uma câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC-254 nm. O comprimido íntegro, fora da embalagem primária, foi exposto à luz-UVC por 60 dias, e os comprimidos triturados, equivalente a três pesos médios, foram expostos durante 90 dias. O comprimido íntegro, exposto durante 60 dias, apresentou os mesmos produtos de degradação dos comprimidos triturados. Pode-se observar a formação de dois produtos de degradação majoritários na degradação fotolítica. Estes dois produtos de degradação foram mais bem visualizados quando analisados em coluna semipreparativa, apresentando tempos de retenção de 10,4 min e 11,5 min. Os dois produtos de degradação foram confirmados na análise em CLAE com diodos em série.

Após o estudo preliminar de comprimidos de linezolida, foi estudado o decaimento do teor de linezolida comprimidos, quando expostos à luz-UVC, durante 90 dias. Para estas análises utilizou-se os métodos validados em CLAE, espectrofotometria no UV e doseamento microbiológico. Os comprimidos triturados de linezolida apresentaram um decaimento de 32,54 % em 90 dias, quando analisados por CLAE e de 78,14 % quando analisados por espectrofotometria no UV. Para o doseamento microbiológico, o teor em 90 dias foi de 46,18 %. O método em CLAE e o doseamento microbiológico são mais sensíveis e específicos à degradação de linezolida. Com os dados fornecidos com a fotodegradação dos comprimidos, analisados por CLAE, pode-se realizar o comportamento de degradação de linezolida quando exposta à luz-UVC. Verificou-se que linezolida apresenta uma cinética de ordem zero quando exposta ao fator luz.

O estudo de degradação de comprimidos de linezolida em câmara climática (40°C/75%) também foi realizado, utilizando-se CLAE. Os comprimidos triturados

foram expostos durante o período de 180 dias, no qual apresentaram um decaimento de 58,88%. Esta degradação ocorreu mais lentamente do que com os comprimidos expostos à luz-UVC.

### 5.2.7. Conclusão

- O estudo de estabilidade preliminar em meio básico (NaOH 0,1 M) demonstrou que o fármaco é muito sensível a este fator, degradando-se completamente em 1 hora de contato com o meio básico.
- O estudo de estabilidade preliminar em meio oxidativo indicou que o fármaco sofre degradação em contato com peróxido de hidrogênio 3%.
- O estudo da estabilidade térmica de comprimidos de linezolida mostrou que os comprimidos são estáveis por 30 dias à temperatura de 65° C.
- O estudo preliminar de estabilidade frente às lâmpadas UVC-254 nm indicou que linezolida é sensível à radiação nos comprimidos triturados e íntegros de linezolida em menos de 10 dias.
- O estudo em câmara climática (40° C/75%) demonstrou que os comprimidos de linezolida são sensíveis a este fator, apresentando uma degradação mais lenta.
- O resultado obtido na avaliação de cinética de fotodegradação indicou tratar-se de uma reação ordem zero.

---

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

AGRAWAL, H.; MAHADIK; K. R.; PARADKAR, A. R.; KAUL, N. Stability Indicating HPTLC Determination of Linezolid as Bulk Drug and in Pharmaceutical Dosage Form. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, V. 29, n. 10, p. 1119–1126, 2003.

ALCALÁ, L.; RUIZ-SERRANO, M.J.; TURÉGANO, C.P.F.; VIEDMA, D.G.; DIAZ-INFANTES, M.; MARÍN-ARRIAZA, M.; BOUZA, E. *In vitro* activities of linezolid against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* that are susceptible or resistant to first-line antituberculous drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 1, p. 416-417, 2003.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p.413–420, 1995.

ANDES, D.; VAN OGTROP, M. L.; PENG, J.; CRAIG, W. A. *In vivo* pharmacodynamic of a new oxazolidinone (linezolid). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 3484-3489, 2002.

ANDREWS, J.M. Microbiological assays. In: REEVES, D.S.; ISE, R.; ANDREWS, J. M.; HITE, L.O. (Ed). **Clinical Antimicrobial Assays**. New York, Oxford University Press, 1999. Cap. 4. p. 35-44.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L.V. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16. ed. Arlington, 1997. v.1, v. 2.

BA, B.B.; BI NSO, B.B.; QUENTIN. C.; SAUX, M.-C. Determination of linezolid in growth media by high-performance liquid chromatography with on-line extraction. **J. Chromatogr. B**, v. 854, n. 1-2, p. 104–108, 2007.

BARBACHYN, M.R.; FORD, C.W. Oxazolidinone structure–Activity relationships leading to linezolid. **Angew. Chem. Int.**, v. 42, n. 18, p. 2010-2023, 2003.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências: NBR 6023:2002. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

---

BALLOW, C.H.; JONES, R.N.; BIEDENBACH, D.J.; THE NORTH AMERICAN ZAPS RESEARCH GROUP. A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, n. 1, p. 75–83, 2002.

BARBUT, F.; CORTIER, G.; CHARPAK, Y.; CERF, M., MONTEIL, H., FOSSE, T., TREVOUX, A., DE BARBEYRAC, B., BOUSSOUGANT, Y., TIGAUD, S., TYTGAT, F., SEDALLIAN, A., DUBORGEL, S., COLLIGNON, A., LE GUERN, M. E., BERNASCONI, P., PETIT, J. C. Prevalence and pathogenicity of *Clostridium difficile* in hospitalized patients. **Arch. Intern. Med.**, v. 156, n.13, p.1449-1954, 1996.

BASSETTI, M.; DI BIAGIO, A.; DEL BONO, V.; CENDERELLO, G.; BASSETTI, D. Successful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis with linezolid. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 24, supl. 2, p. 83–84, 2004.

BAUM, S.E.; CRAWFORD, S.A.; McELMEEL, M.L.; WHITNEY, C.G.; JORGENSEN, J.H. Comparative activities of the oxazolidinone AZD2563 and linezolid against selected recent North American isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 9, p. 3094-3095, 2002.

BEBAWY, L.I. Spectrophotometric and HPLC determination of linezolid in presence of its alkaline-induced degradation products and in pharmaceutical tablets. **Anal. Lett.**, v.36, n.6, p. 1147-1161, 2003a.

BEBAWY, L.I. Stability-indicating methods for the determination of linezolid in the presence of its alkaline-induced degradation products. **Talanta**, v. 60, n. 5, p. 945-953, 2003b.

BEHRA-MIELLET, J.; CALVET, L.; DUBREUIL, L. Activity of linezolid against anaerobic bacteria. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, supl. 2, p. 28-34, 2003.

BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; ERWIN, M. E. Interpretive accuracy of the disk diffusion method for testing newer orally administered cephalosporins against *Morganella morganii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.10, p.2828-2830, 1993.

BLUME, H.H.; SCHUG, B.S. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs-better candidates for BA/BE waiver? **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 9, n. 2, p.117–121, 1999.

---

BORNER, K.; BORNER, E.; LODE, H. Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 18, n. 3, p. 253–258, 2001.

BOSTIC, G.D.; PENI, M.B.; THAL, L.A.; ZERVOS, M.J. Comparative in vitro and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, n. 2, p. 109-112, 1998.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). BRASIL PROPOSTA DE EMENDA À RESOLUÇÃO ESPECÍFICA Anvisa RE 483, de 19 de março de 2002.

BRASIL Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 1, de 29 de Julho, que aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. 2005. Acesso em 05 de janeiro de 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco-med.htm>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, que apresenta um guia sobre validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Acesso em 05 de janeiro de 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco-med.htm>.

BREIER, A.R.; GARCIA, C.V.; OPPE, T. P.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, n. 5, p. 957-961, 2002.

BREIER, A.R.; NUDELMAN, N.S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Isolation and structure elucidation of photodegradation products of fexofenadine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 46, n. 2, p. 250–257, 2008.

BRIER, M.E.; STALKER, D.J.; ARONOFF, G.R.; BATTIS, D.H.; RYAN, K.K.; O'GRADY, M.; HOPKINS, N.K.; JUNGBLUTH, G.L. Pharmacokinetics of linezolid in subjects with renal dysfunction. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 9, p. 2775–2780, 2003.

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

---

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B. R.; SHAH, P.A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, 2004.

BUCKTON, G.; RUSSEL, S.J.; BEEZER, A.E. Pharmaceutical calorimetry : a selective review. **Thermochimica Acta**, v. 193, p. 195-214, 1991.

BUERGER, C.; JOUKHADAR, C.; MULLER, M., KLOFT, C. Development of a liquid chromatography method for the determination of linezolid and its application to in vitro and human microdialysis samples. **J. Chromatogr. B**, v. 796, n.1, p. 155–164, 2003.

CAVAZOS-ROCHA, N.; VERA-CABRERA, L.; WELSH-LOZANO, O.; WAKSMAN-DE-TORRES, N.; SALAZAR-CAVAZOS, M. L. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, n. 5, p. 1775–1781, 2007.

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. Influence of dissolution medium agitation on release profiles of sustained-release tablets. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 27, n. 8, p. 811-817, 2001a.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001b.

DELANEY, C. J.; OPHEIM, K. E.; SMITH, A. L.; FLORDE, J. J. Performance characteristics of bioassay, radioenzymatic assay, homogeneous enzyme immunoassay, and high performance liquid chromatographic determination of serum gentamicin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.21,n.1, p.19-25, 1982.

DOERN, G.; PFALLER, M.; KUGLER, K.; FREEMAN, J.; JONES, R. N. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 4, p.764-770, 1998.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharm. Res.**, v.15, n. 1, p. 11-22, 1998.

---

ELIOPOULOS, G.M. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, n. 4, p. 473-481, 2003.

ERLICH, M.; TRITTLER, R.; DASCHNER, F.D.; KÜMMERER, K. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation. **J. Chromatogr. B**, v.755, n.1-2, p.373-377, 2001.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I. An integrated approach. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, n.5-6, p.755-767, 2001.

ERTURAN, Z.; UZUN, M. In vitro activity of linezolid against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, n.1, p. 78–80, 2005.

EV, L.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.27, n. 1-2, p. 91-96, 2002.

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

FDA. Guidance for industry, Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Post-Approval Changes. November 1995, CDER/FDA. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>. Acesso 03/09/2008.

FDA U.S. Food and Drug Administration. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (1997). Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>. Acesso em: 19/08/2008.

FDA U.S. Food and Drug Administration Guidance for industry, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. August 2000, CDER/FDA. Disponível em: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/3618fnl.pdf>. Acesso em: 03/09/2008.

FDA. **Food and Drug Administration**. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 2004.

---

FERRAZ, H.G. **Avaliação biofarmacêutica in vitro e in vivo (bioequivalência) de comprimidos de ampicilina 500 mg comercializados no Brasil.** 1997.142 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FINES, M.; LECLERCQ, R. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, n. 6, p.797-802, 2000.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p. 155-218.

FORTÚN, J.; MARTÍN-DÁVILA, P.; NAVAS, E.; PÉREZ-ELÍAS, M. J.; COBO, J.; TATO, M.; DE LA PEDROSA, E. G.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; MORENO, S. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, p. 180–185, 2005.

GARAZZINO, S.; DE ROSA, F.G.; BARGIACCHI, O.; AUDAGNOTTO, S.; MAIELLO, A.; DI PERRI, G. Haematological safety of long-term therapy with linezolid. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, p. 471–483, 2007.

GIRON, D.; GOLDBRONN, Ch; MUTZ, M.; PFEFFER, S.; PIECHON, P.; SCHWAB, P. Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 68, n.2, p. 335-57, 2002.

GIRON-FOREST, D.; GOLDBRONN, C. H.; PIECHON, P. Thermal analysis methods for pharmacoepial materials. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.7, n.12, p.1421-1433, 1989.

HAN, J.; SURYANARAYANAN, R. A method for the rapid evaluation of the physical stability of pharmaceutical hydrates. **Thermochimica Acta**, v.329, n.2, 163-170, 1999.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa.** 5. ed. Rio de Janeiro: LTC- livros técnicos e científicos, 2001. Cap. 19. 435-459 p.

HEWITT, W. **Microbiological assay.** New York: Academic Press, 1977.

HEYDEN, Y.V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.24, n.5-6, p.723-753, 2001.

---

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v.350, n.9092, p.1670-1673, 1997.

HUIDOBRO, A.L.; RUPEREZ, F.J.; BARBAS, C. Isolation, identification and determination of the major degradation product in alprazolam tablets during their stability assay. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, n. 2, p. 404–413, 2007.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE Q2A): Validation of Analytical Methods (Definitions and Terminology). October, 1994.

ICH. Guideline Q1B, 1997a. Photostability testing of new drug substances and products. Federal Register. 62 27115– 27122.

ICH: Q2B Analytical Validation-Methodology. November, 1996.

ICH (international conference on the harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use Q2R1: Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology, 2005.

IKEDA, Y.; HIRAYAMA, T.; TERADA, K. Application of thermally stimulated current measurement to the polymorphic characterization of drug substances. **Thermochemica Acta**, v. 431, n.1-2, p. 195–199, 2005.

JACQUELINE, C.; ASSERAY, N.; BATARD, E.; MABECQUE, V.; KERGUERIS, M-F.; DUBE, L.; BUGNON, D.; POTEL, G., CAILLON, J. In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 24, p. 393–396, 2004.

JONES, R.N.; FRITSCHER, T.R.; SADER, H.S.; ROSS, J.E. Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program Results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 59, n.2, p. 199–209, 2007.

---

KAWABE, Y.; NAKAMURA, H.; HINO, E.; SUZUKI, S. Photochemical stabilities of some dihydropyridine calcium-channel blockers in powdered pharmaceutical tablets. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 47, n. 3, p. 618–624, 2008.

KIBBE, A.H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, p. 665, 2000.

KITAHASHI, T.; FURUTA, I. Further method development for measurement of linezolid in human serum by MEKC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.35, n.3, p.615–620, 2004.

KITAHASHI, T.; FURUTA, I. Method development for determining the antibacterial linezolid in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.30, n.4, p.1411-1416, 2002.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; SANGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharm. Technol.**, February, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

KRUEGER, W.A.; KOTTLER, B.; WILL, B.E.; HEININGER, A.; GUGGENBERGER, H.; UNERTL, K.E. Treatment of meningitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* with linezolid. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p.929–932, 2004.

KSIQZCZAK, A.; KSIQZCZAK, T.; ZIELENKIEWICZ, T.. Influence of purity on the thermal stability of solid organic compounds. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 77, p. 233-242, 2004.

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.

LIPPE, B.V.D.; SANDVEN, P.; BRUBAKK, O. Efficacy and safety of linezolid in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB)—a report of ten cases. **J. Infect.**, v. 52, p. 92–96, 2006.

---

LIVERMORE, D.M. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 51, suppl. S2, p. 9-16, 2003.

LLOYD, C.A.C.; JACOB, S.E.; MENON, T. Antibiotic Resistant  $\beta$ -hemolytic Streptococci. **Indian J. Pediatr.**, v.74, n.12, p.1077-1080, 2007.

MACCARONI, E.; ALBERTI, E.; MALPEZZI, L.; MASCIOCCHI, N., VLADISKOVIC, C. Polymorphism of linezolid: a combined single-crystal, powder diffraction and NMR study. **Int. J. Pharm.**, v. 351, n.1-2, p.144-151, 2008.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Desarrollo de análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino em polvo y en comprimidos de 200 mg. **Inf. Tecnol.**, v. 9, n. 5, p: 251-254, 1998.

MARQUES, M.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, n.1, p. 48-51, 2002.

MENDES, C.; MARIN, M.E.; QUIÑONES, F.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; CUILTY SILLER, C.; CASTANHEIRA, M.; ZOCCOLI, C. M.; LÓPEZ, H.; SÚCARI, A.; ROSSI, F.; BARRIGA ANGULO, G.; SEGURA, A.J.A.; STARLING, C.; MIMICA, I.; FELMINGHAM, D. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999–2000). **Braz. J. Infect. Dis.**, v.7,n.1, 2003.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **J AOAC Int.**, v. 90, n. 5, p.1379-1382, 2008.

MUNOZ, P.; FERREIRA, L.; MARÍN, M.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E.; GARCÍA-FERNANDEZ, M.A. First report of *Listeria monocytogenes* endocarditis treated with linezolid. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v. 28, n. 5, p. 477–483, 2006.

---

MUTNICK, A.H.; BIEDENBACH, D.J.; TURNIDGE, J.D.; JONES, R.N. Spectrum and potency evaluation of a new oxazolidinone, linezolid: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998–2000. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, n.1, p. 65–73, 2002.

MYLONA, E.; PLATSOUKA, E.; CHATZIS, N. Linezolid-based therapy in *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, n.5, p. 597–611, 2007.

NARAYANA, C.L.; SURESH, T.; RAO, S.M., DUBEY, P.K.; BABU, J.M. A validated chiral HPLC method for the enantiomeric separation of Linezolid on amylose based stationary phase. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.32, n.1, p.21-28, 2003.

NATHANI, N.; ILES, P.; ELLIOTT, T.S.J. Successful treatment of MRSA native valve endocarditis with oral linezolid therapy: a case report. **J. Infect.**, v.51, n.4, p. 213–215, 2005.

NARINA, S.V.; SUDALAI, A. Short and practical enantioselective synthesis of linezolid and eperzolid via proline-catalyzed asymmetric  $\alpha$ -aminooxylation. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 38, p. 6799–6802, 2006.

NUDELMAN, N.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed,. 2002. p. 203-222.

PASCUAL, A.; BALLESTA, S.; GARCIA, I.; PEREA, E.J. Uptake and intracellular activity of linezolid in human phagocytes and nonphagocytic cells. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 4013-4015, 2002.

PATEL, S.A.; PATEL, P.U.; PATEL, N.J.; PATEL, M.M.; BANGORIVA, U.V. Determination of linezolid in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectroscopy. **J. AOAC Int.**, v. 90, n. 5, p. 1272-1277, 2007.

PELAEZ, T.; ALONSO, R.; PEREZ, C.; ALCALA, L.; CUEVAS, O.; BOUZA, E. In vitro activity of linezolid against *Clostridium difficile*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, n. 5, p. 1617-1618, 2002.

---

PENG, G.W.; STRYD, R.P.; MURATA, S.; IGARASHI, M.; OZAWA, N. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, n. 1-2, p. 65-73, 1999.

PERSSON, B-A.; VESSMAN, J. The use of selectivity in analytical chemistry-some considerations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n.10, p. 526-532, 2001.

PRATTI; A.; KARANIKA; M.; MANIATIS; A.N.; PETINAKI; E.; SPILIOPOULOU; I.; KOLONITSIOU; F. Activity of linezolid against Gram-positive cocci: a multicentre study in Greek hospitals. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, p. 604-605, 2007.

PREECHAGOON, D.; UDOMPRATEEP, A.; MANWIWATTANAGUL, G. Improved dissolution rate of poorly soluble drug by incorporation of buffers. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 26, n. 8, p. 891-894, 2000.

RATCLIFF, R. M.; MIRELLI, C.; MORAN, E.; O'LEARY, D.; WHITE, R. Comparison of five methods for the assay of serum gentamicin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.19, n.4, p. 508-512, 1981.

RAVINDRAN, V.; JOHN, J.; KAYE, G.C.; MEIGH, R.E. Successful use of oral linezolid as a single active agent in endocarditis unresponsive to conventional antibiotic therapy. **J. Infect.**, v. 47, n. 2, p. 164–166, 2003.

REACHER, M.H.; SHAH, A.; LIVERMORE, D.M.; WALE, M.C.; GRAHAM, C.; JOHNSON, A.P.; HEINE, H.; MONNICKENDAM, M.A.; BARKER, K.F.; JAMES, D.; GEORGE, R.C. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. **Brit. Med. J.**, v. 320, n. 7229, p. 213-216, 2000.

REDDY, K.V.S.R.K.; RAO, S.M.; REDDY, G.O.; SURESH, T.; BABU, J.M.; DUBEY, P. K.; VYAS, K. Isolation and characterization of process-related impurities in linezolid. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, n. 3, p. 635–642, 2002.

REIS, A.O.; CORDEIRO, J.O.C.R.; MACHADO, A.M.O.; SADER, H.S. *In vitro* antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 5, p. 243-251, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

---

Resolução GMC n.53/96: estabilidade de produtos farmacêuticos. SINDICATO DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO. In: **Mercosul**: legislação para a indústria farmacêutica. São Paulo: SINDUSFARMA, 2000. p.141-148.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A. S., MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

ROSS, J.E.; ANDEREGG, T.R.; SADER, H.S.; FRITSCHÉ, T.R.; JONES, R.N. Trends in linezolid susceptibility patterns in 2002: Report from the worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v. 52, n.1, p. 53–58, 2005.

ROSS, J.E.; FRITSCHÉ, T.R.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Oxazolidinone susceptibility patterns for 2005: International Report from the Zyvox® Annual Appraisal of potency and spectrum study. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, n.3, p. 295–301, 2007.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; JONES, R.N. Antimicrobial activity of linezolid against gram-positive cocci isolated in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 171-176, 2001.

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, n.2, p. 443-446, 2006.

SALGADO, H.R.N.; RONCARI, A.F.F. Microbiological assay for the determination of azithromycin in ophthalmic solutions. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 40, n. 6, 544-549, 2006.

SCHMIDT, C.A.; CARAZZO, M.; LAPORTA, L.V.; BITTENCOURT, C.F.; SANTOS, M.R.; FRIEDRICH, M. Development and validation of an agar diffusion assay for determination of ceftazidime in pharmaceutical preparations. **J. AOAC Int.**, v. 91, n. 1, p. 59 – 66, 2008.

SHALAEV, E.Y.; ZOGRAFI, G. How does residual water affect the solid state degradation of drugs in the amorphous state? **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 11, p. 1137-1141, 1996.

---

SHINABARGER, D.L.; MAROTTI, K.R.; MURRAY, R.W.; LIN, A.H.; MELCHIOR, E.P.; SWANEY, S.M.; DUNYAK, D.S.; DEMYAN, W.F.; BUYSSE, J.M. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 10, p. 2132-2161, 1997.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC – livros técnicos e científicos, 1994.

SLATTER, J.G.; STALKER, D.J.; FEENSTRA, K.L.; WELSHMAN, I.R.; BRUSS, J.B., SAMS, J.P.; JOHNSON, M.G.; SANDERS, P.E.; HAUER, M.J.; FAGERNESS, P.E.; STRYD, R.P.; PENG G.W.; SHOBE, E.M. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of [(14)C] linezolid to healthy human subjects. **Drug Metab. Dispos.**, v. 29, n. 8, p. 1136-1145, 2001.

SOUZA, M.J.; KULMANN, R.R.; SILVA, L.M.; NOGUEIRA, D.R.; ZIMMERMANN, E.S. Development and in-house validation of a microbiological assay for determination of cefepime in injectable preparations. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 5, p.1367-1372, 2006.

STANTON, G.L.; SHELDON, K. L.; JON, B.B.; VU LE; FELIX, M.A.; BARRY, H.; KUTER, D.J. Hematologic effects of linezolid: summary of clinical experience. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2723-2726, 2002.

TATO, M.; PEDROSA, E.G-G.; CANTÓN, R.; GÓMEZ-GARCÍA, I.; FORTÚN, J.; MARTÍN-DAVILA, P.; BAQUERO, F.; GOMEZ-MAMPASO, E. In vitro activity of linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* complex, including multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 28, n.1, p. 75–78, 2006.

THOMPSON, K.C. Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium. **Thermochimica Acta**, v. 355, n. 1-2, p. 83-87, 2000.

TOBIN, C.M.; SUNDERLAND, J.; LOVERING, A.M.; MACGOWAN, A.P. A simple, isocratic high performance liquid chromatography assay for linezolid in human serum. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, p. 605-608, 2001.

---

TOBIN, C.M.; SUNDERLAND, J.; LOVERING, A.M.; MACGOWAN, A. P. A high performance liquid chromatography (HPLC) assay for linezolid in continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid (CAPDF). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 1041–1042, 2003.

TONNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 225, p. 1-14, 2001.

TOUTAIN, J.; BOSELLI, E.; DJABAROUTI, S.; ALLAOUCHICHE, B.; XUEREB, F.; BERNADOU, J-M.; BA, B.; SAUX, M.-C.; BREILH, D. Determination of linezolid in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method. **J. Chromatogr. B**, v. 813, p. 145–150, 2004.

TOZO, G.C.G.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for cefoxitin sodium in dosage form. **J. AOAC Int.**, v. 90, n. 2, p. 452-455, 2007.

USP 31. The United States Pharmacopeia. Rockville, USP Convention, 2008. v. 1, v. 2, v. 3.

UWAI, K.; TANI, M.; OHTAKE, Y.; ABE, S.; MARUKO, A.; CHIBA, T.; HAMAYA, Y.; OHKUBO, Y.; TAKESHITA, M. Photodegradation products of propranolol: The structures and pharmacological studies. **Life sciences**, v. 78, n. 4, p. 357-365, 2005.

VADAS, E.B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENARO, A.R. (Ed.). Remington. **A Ciência e a prática em farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1022-1031.

VÁSQUEZ, E.G.; MENSA, J.; LÓPEZ, Y.; COUCHARD, P. D.; SOY, D.; FONTENLA, J. R.; SARASA, M.; CARNÉ, X.; MONTULL, E. Penetration of linezolid into the anterior chamber (Aqueous humor) of the human eye after intravenous administration. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 2, p. 670-672, 2004.

VAUCHER, L.C.; BREIER, A.R.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for the determination of telithromycin in tablets. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 5, p. 1398-1402, 2006.

VESSMAN, J. Selectivity or Specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 867-869, 1996.

WAREHAM, D.W.; ABBAS, H.; KARCHER, A.M.; DAS, S.S. Treatment of prosthetic valve infective endocarditis due to multi-resistant Gram-positive bacteria with linezolid. **J. Infect.** , v. 52 , n. 4, p. 300 – 304, 2006.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R. C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.**, v. 293, p. 101–125, 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis**: A textbook for pharmacy students and Pharmaceutical chemists. London: Churchill Livingstone, 1999. 337 p.

WILCOX, M.H. Efficacy of linezolid versus comparator therapies in Gram-positive infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, Suppl. S2, p. 27–35, 2003.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, n. 9+10, p. 624-632, 1999.

YAGI, B.H.; ZURENKO, G.E. In vitro activity of linezolid and eperezolid, two novel oxazolidinone antimicrobial agents, against anaerobic bacteria. **Anaerobe**, v. 3, n.5, p.301-306, 1997.

YAGI, B.H.; ZURENKO, G.E. An in vitro time-kill assessment of linezolid and anaerobic bacteria. **Anaerobe**, v. 9, n.1, p. 1–3, 2003.

ZURENKO, G.E.; GIBSON, J.K.; SHINABARGER, D.L.; ARISTOFF, P.A.; FORD, C. W.; TARPLEY, W.G. Oxazolidinones: a new class of antibacterials. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.1, n.4, p. 470-476, 2001.



May 23, 2007

Universidade de Sao Paulo  
Rod. Araraquara-Jau, km 01  
Fauldad de Ciencias Farmaceuticas  
Araraquara - SP 14801-02  
Brazil

**PO no. N/A**

Enclosed please find:

- i. 500 mg of Linezolid, lot no. A-1131-178 and its certificate of analysis; reference no. SF4328.

The certificate of analysis is issued based on the methods that we develop for purity and characterization. These methods are not validated unless method validation was part of the quotation.

SynFine Research, Inc.  
P.O. Box 433, Station A, Richmond Hill, Ontario, L4C 4Y8, Canada  
Tel: 905-737-2702 Fax 905-737-6299

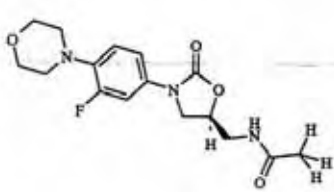


# CERTIFICATE OF ANALYSIS

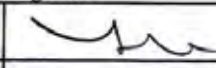
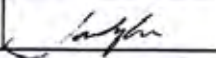
Certificate No.: 3842a

Date: JUN 27 2007

Retest date: Oct. 2007

<b>Compound Name:</b>	Linezolid	<b>Structure:</b> 
<b>Molecular Weight:</b>	337.35	
<b>Molecular Formula:</b>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Source:</b>	SynFine Research	
<b>Source Lot No.:</b>	A-1131-178	
<b>Storage conditions:</b>	Store at room temperature in a well closed container, protect from moisture and light	

Test Description	Specifications	Results
<b>Visual Description</b>	White to off white solid	Conforms
<b>Identification</b>		
MS	Conforms to structure	Conforms
<sup>1</sup> H NMR	Conforms to structure	Conforms
<b>Specific Rotation</b>	$[\alpha]_D^{20}$ Less than $-5.0^\circ$ (C=1.5, CHCl <sub>3</sub> )	$-7.5^\circ$
<b>Chromatographic Purity by HPLC</b>	Not less than 98.0%	99.3%
<b>Recommendation:</b>	Released	

Name	Department	Signature	Date
Reviewed and approved by	Analytical Services		June 27, 2007
Approved by	Quality Assurance		Jun 27, 2007

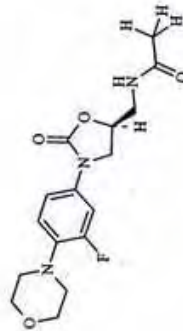
SynFine Research, Inc., P.O. Box 433, Station A, Richmond Hill, Ontario, Canada L4C 4Y8  
 Tel: (905) 737-2702, Fax: (905) 737-6299, e-mail: [research@synfine.com](mailto:research@synfine.com)  
[www.synfine.com](http://www.synfine.com)



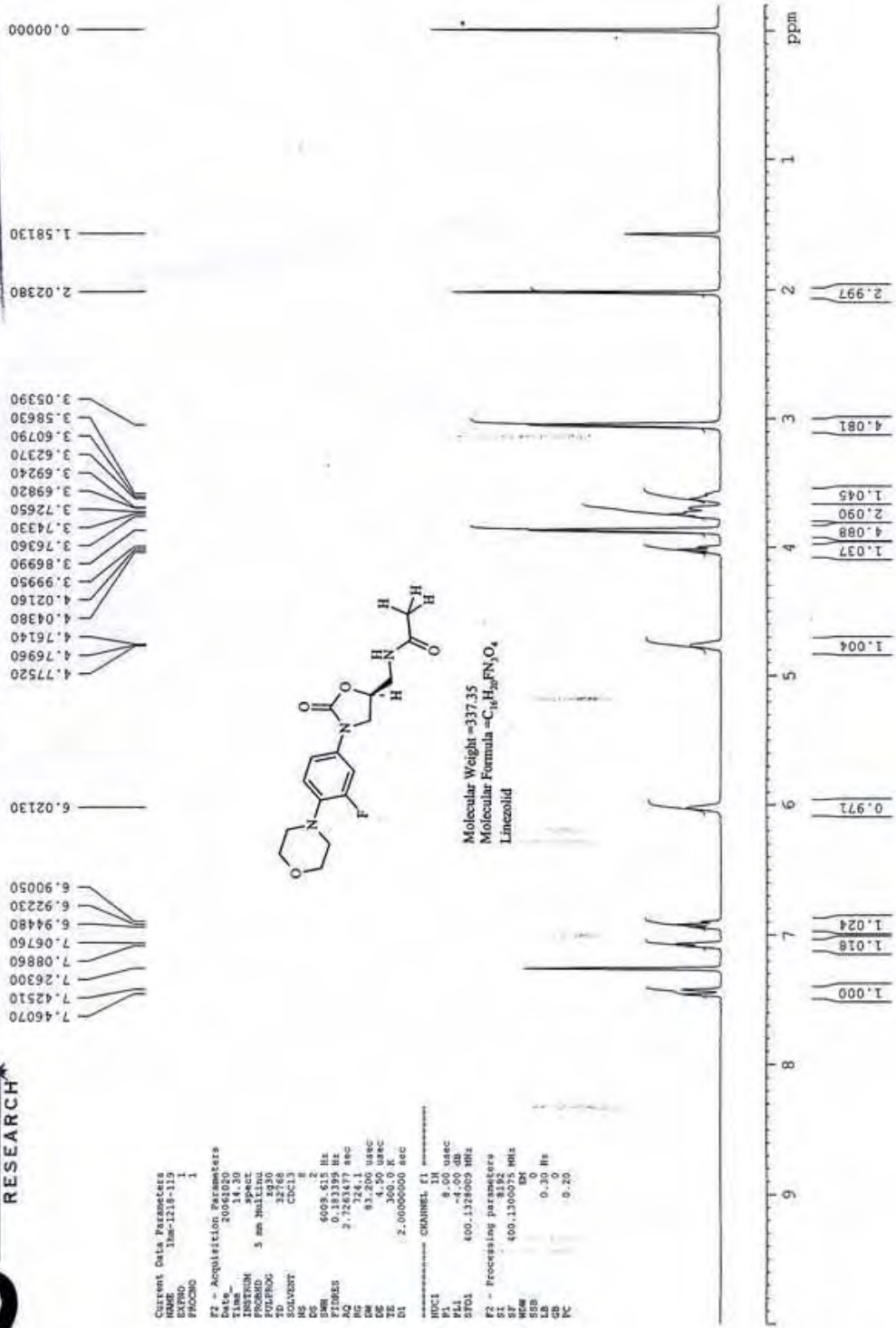
A-1131-178, 1H NMR in CDCl3

REVIEWED AND APPROVED  
 [Signature] Oct. 20, 2006

Current Data Parameters  
 Name\_ 118-118-11  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20061020  
 Time\_ 14:30  
 INSTRUM spect  
 PULPROG zgpg30  
 FWDPROG 5 mm Multifun  
 TD 32768  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 2  
 DS 2  
 SWH 6029.615 Hz  
 FIDRES 0.183398 Hz  
 AQ 2.725177 sec  
 RG 327.68  
 DM 72.500 usec  
 DE 9.200 usec  
 TE 300.2 K  
 D1 2.00000000 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 9.00 usec  
 PL 0.00 dB  
 SFO1 400.1328000 MHz  
 F2 - Processing parameters  
 SF 400.1300075 MHz  
 DS 2  
 WDW EM  
 GB 0  
 PC 0.20



Molecular Weight = 337.35  
 Molecular Formula = C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
 Linezolid

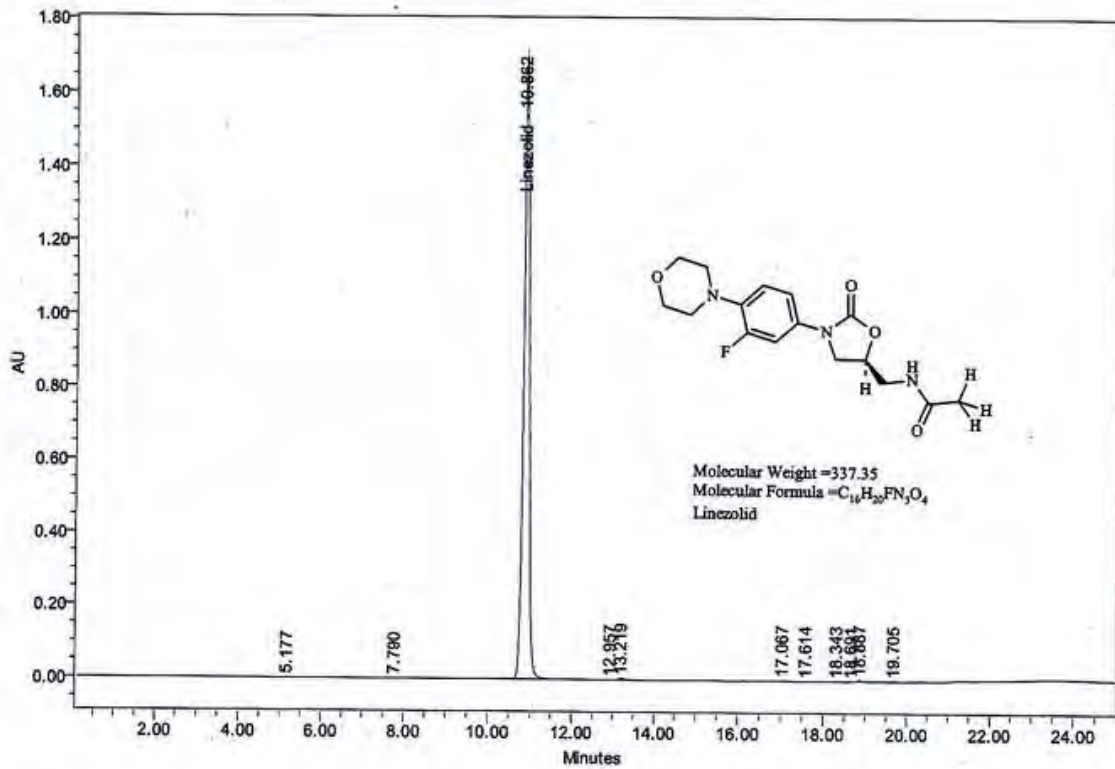




REVIEWED AND  
APPROVED  
*Ure* Oct-26, 2006

Sample Name Linezolid  
Lot No A-1131-178

Date Acquired 10/19/2006 7:42:19 PM  
Result Id 8616



Peak Name	RT	Area	% Area	Int Type
1	5.177	1344	0.01	bb
2	7.790	921	0.01	bb
3 Linezolid	10.862	15830154	99.32	bb
4	12.957	658	0.00	bv
5	13.219	48338	0.30	vb
6	17.067	21420	0.13	bb
7	17.614	1277	0.01	bb
8	18.343	3775	0.02	bb
9	18.691	390	0.00	bb
10	18.887	26357	0.17	bb

Peak Name	RT	Area	% Area	Int Type
11	19.705	3173	0.02	bb

REVIEWED AND APPROVED  
*[Signature]* Oct 26, 2006

page 1 of 1

MultiView 1.3  
10/19/6.4.51.17 PM (A-1131-178)  
Thursday, October 19, 2006 4:56 PM  
Period 1, Expt. 1; Mass range: 50.0 to 700.0 by 0.5 amu; Dwell: 1.0 ms; Pause: 5.0 ms  
Acq. Time: Thu, Oct 19, 2006 at 4:51:17 PM; Exp. Comment: Q1 Scan

