

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
ENROFLOXACINO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS**

**CAMILA TAVARES REBOUÇAS**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Hérica Regina Nunes Salgado

**ARARAQUARA**  
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
ENROFLOXACINO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS**

**CAMILA TAVARES REBOUÇAS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hérica Regina Nunes  
Salgado

ARARAQUARA

2014

**Ficha Catalográfica**

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

**R292v** Rebouças, Camila Tavares  
Validação de métodos analíticos para quantificação de enrofloxacino em comprimidos  
palatáveis / Camila Tavares Rebouças. — Araraquara, 2014  
140 f.

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

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Enrofloxacino. 2. Controle de qualidade. 3. CLAE. 4. Espectroscopia por IV. 5. Ensaio  
microbiológico. 6. Fluorquinolonas. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

Camila Tavares Rebouças

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
ENROFLOXACINO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS

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

Araraquara, 24 de fevereiro de 2014.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hérica Regina Nunes Salgado (FCFar-UNESP)  
Presidente/orientadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Taís Maria Bauab (FCFar-UNESP)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Masetto de Gaitani (FCFRP-USP)

ARARAQUARA-SP

2014

Dedico este trabalho à minha amada família, por  
sempre apoiar todas as minhas decisões e dar o  
incentivo necessário para que eu consiga alcançar  
os meus objetivos.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre me dando força, perseverança e saúde para que eu consiga alcançar os meus objetivos.

Agradeço aos meus queridos pais, Marcondes e Danielle, que sempre estão ao meu lado me incentivando a crescer e me mostrando os melhores caminhos na vida. Acreditando junto comigo nos meus sonhos e ajudando a realizá-los. Essa conquista é nossa!

Ao meu amado e único irmão, Marcondes Filho, que mesmo criança e sem entender a minha distância sempre me faz rir e me mostra o que é sentir o amor inocente e de verdade.

Aos meus avós, Severino e Fátima, que me apoiam e acreditam sempre que vencerei os obstáculos da minha vida mesmo antes de iniciá-los. Obrigada por serem a minha grande referência de vida e por entenderem a minha distância em busca de meus objetivos.

À minha avó, Nilva, que mesmo um pouco mais distante sempre está torcendo por mim e me dando força para não desistir nunca.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, por me proporcionar trabalhar ao seu lado, por sua incrível dedicação, confiança, incentivo e paciência. A senhora é um exemplo de ética, dedicação e profissionalismo. Cresci muito ao seu lado e sou eternamente grata por essa experiência.

À nossa incrível, Maria de Fátima Rodrigues, por toda a paciência e carinho em cuidar do nosso laboratório e nos ajudar tanto em tudo. Obrigada por sua grande amizade e ajuda nos momentos que mais precisei. Tenho a certeza que agora tenho uma segunda família em Araraquara e você tem uma em Fortaleza. Sou eternamente grata por tudo que fez por mim!

Aos meus amigos, Euler, Raquel e Cris, que mesmo com a distância, conseguiram entender a minha ausência e sempre me deram força para continuar e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos. Sem o amor, o carinho e a amizade de vocês não teria chegado até onde cheguei.

Aos meus grandes amigos de faculdade, Maira, Gabriela, Mariana, Aline, Viviane, Andrea, Marcus, Anderson, que me fazem rir sempre e deixam a minha vida leve e alegre. Obrigada pela força de sempre!

À minha amiga, Hannah Feijão, que, desde a ideia de pensar em fazer um mestrado longe de toda a minha família e amigos até a finalização dessa conquista, sempre me apoiou e me deu força para que eu não desistisse no momento mais difícil da pesquisa ou no momento mais sofrido por tanta saudade. Você sempre acreditou em mim e me fez acreditar também! Obrigada por muitas vezes facilitar a distância e entender as minhas escolhas.

À minha querida professora de Fortaleza, Profa. Dra. Cristiani Lopes, que me incentivou a amar a pesquisa e a fazer o mestrado em outra cidade. Obrigada pela confiança em meu trabalho e por ter oportunidade de trabalhar com a senhora!

Aos meus colegas de laboratório que levarei para a vida toda, Carol Kogawa, Flávia Fiorentino, Andressa Figueiredo, Kamila Rotolo, Ana Cláudia, Lucas, Eliane, Tahisa, Flávia Carnavali, Mirela, Josi, Lucélia e Cris Laignier com quem tive o enorme prazer de trabalhar e aprender muito! Vocês tornaram a minha estadia em Araraquara menos cansativa e mais divertida. Obrigada por todo apoio, risadas e aprendizado!

As minhas companheiras de casa, Bruna, Danila, Gabi e Evelise, que me receberam muito bem e com quem tive prazer de morar e aprender como me virar sozinha nestes 2 anos de mestrado.

A todos os professores da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela formação sólida e de qualidade.

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

À Ouro Fino Agronegócios pela gentil doação do enrofloxacino em matéria prima.

À Novo Aroma pela gentil doação de um dos excipientes contido nos comprimidos de enrofloxacino.

Ao CNPq, agradeço à bolsa concedida e ao PADC-FCF-UNESP agradeço pelo apoio financeiro concedido.

## RESUMO

O enrofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração derivada do ácido nalidíxico, desenvolvida na década de 1980, sendo a primeira fluorquinolona introduzida na medicina veterinária para o tratamento de várias infecções bacterianas. Existem vários trabalhos na literatura que descrevem métodos analíticos para análise de enrofloxacino em formas farmacêuticas, porém poucos para comprimidos. A maior parte deles envolve a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com fases móveis constituídas por soluções-tampão, as quais podem danificar o sistema cromatográfico, ou métodos que envolvem o gasto de grandes quantidades de solventes orgânicos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento, validação e otimização de métodos analíticos para análise de enrofloxacino na forma farmacêutica de comprimidos, que apresentem menor impacto sobre o meio ambiente e que sejam mais práticos, mais seguros para os operadores e mais econômicos do que as metodologias analíticas descritas para o enrofloxacino. O enrofloxacino foi analisado qualitativamente quanto à umidade, solubilidade e faixa de fusão. Também foi realizada análise por espectrofotometria no infravermelho e desenvolvido método por cromatografia em camada delgada (CCD) indicativo de estabilidade. Quanto à análise quantitativa, foi validado método por CLAE com detecção DAD a 278 nm, fase móvel composta por solução aquosa de ácido acético 5% e metanol (75:25, v/v) e faixa de concentração de 6,0 a 14,0 µg/mL, exatidão de 100,14%, teor de 100,94% e tempo de retenção médio de 5,1 minutos; ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, na faixa de concentração de 4,0 a 8,0 µg/mL, utilizando *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, com exatidão de 100,01% e potência de 97,84%; e espectroscopia na região do infravermelho, na faixa de concentração de 1,0 a 3,0 mg/150 mg, exatidão de 98,00% e teor de 99,74%. A validação dos métodos foi conduzida de acordo com os guias do ICH e com a legislação brasileira. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para nível de significância de 5%, demonstrando serem equivalentes para a quantificação do enrofloxacino em amostras de comprimidos.

**Palavras-chave:** enrofloxacino, controle de qualidade, CLAE, espectrofotometria, infravermelho, ensaio microbiológico, fluorquinolonas.

## ABSTRACT

Enrofloxacin, a second generation fluoroquinolone derivative of nalidixic acid, developed in the 80's, was the first fluoroquinolone introduced in veterinary medicine for the treatment of various bacterial infections. There are several published studies in literature that describe analytical methods for enrofloxacin in pharmaceutical dosage forms, but a few for tablets. Most of them are related to high performance liquid chromatography (HPLC) using mobile phases constituted by buffer solutions, which may damage the chromatographic columns over time, or methods that involve, mostly, the use of large amounts of organic solvents. In this way, this study aimed to develop new analytical methods for the analysis of enrofloxacin in tablets, which have the lowest impact on the environment as possible and that be more convenient, safer for operators and more economical than the analytical methodologies already described for enrofloxacin. Enrofloxacin was analyzed qualitatively in relation to moisture content, solubility and melting range. Furthermore, it was performed an analysis by infrared spectroscopy and was developed a stability indicative method by thin layer chromatography (TLC). Regarding the quantitative analysis, it was validated HPLC methodology with PDA detection at 278 nm, mobile phase composed by aqueous 5% acetic acid and methanol (75:25 v/v), the concentration range from 6.0 to 14.0 µg/mL, accuracy of 100.14%, content of 100.94% and average retention time of 5.1 minutes; microbiological assay by turbidimetric method, in the concentration range from 4.0 to 8.0 µg/mL, using *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, with average accuracy of 100.01% and 97.84% of content; and infrared spectroscopy, in the concentration range from 1.0 to 3.0 mg/150 mg, 98.00% of accuracy and content of 99.74%. Validation of the methods was conducted according to ICH guidelines and Brazilian legislation. The developed methods showed no statistical difference for a significance level of 5%, proving to be equivalent to the quantification of enrofloxacin in samples of tablets.

**Keywords:** enrofloxacin, quality control, HPLC, IR spectroscopy, microbiological assay, fluoroquinolone.

## SUMÁRIO

	<b>Dedicatória.....</b>	4
	<b>Agradecimentos.....</b>	5
	<b>Resumo.....</b>	7
	<b>Abstract.....</b>	8
	<b>Lista de Figuras.....</b>	13
	<b>Lista de Tabelas.....</b>	17
	<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	20
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	26
3.1	Fluorquinolonas.....	26
3.2	Enrofloxacino.....	33
3.3	Validação de métodos analíticos.....	39
<b>4</b>	<b>DESCRIÇÃO.....</b>	41
4.1	Descrição geral.....	41
4.2	Substância química de referência.....	41
4.3	Matéria prima de enrofloxacino.....	41
4.4	Amostra da forma farmacêutica comprimido.....	41
4.5	Adjuvantes presentes no comprimido.....	42
<b>5</b>	<b>ANÁLISES QUALITATIVAS.....</b>	43
<b>5.1</b>	<b>Determinação do peso médio dos comprimidos de enrofloxacino.....</b>	43
5.1.1	Material.....	43
5.1.2	Método.....	43
5.1.3	Resultados.....	43
5.1.4	Discussão.....	45
<b>5.2</b>	<b>Determinação da solubilidade.....</b>	45

5.2.1	Material.....	46
5.2.2	Método.....	46
5.2.3	Resultados.....	46
5.2.4	Discussão.....	47
<b>5.3</b>	<b>Determinação da umidade – método gravimétrico.....</b>	<b>47</b>
5.3.1	Material.....	48
5.3.2	Método.....	48
5.3.3	Resultados.....	48
5.3.4	Discussão.....	48
<b>5.4</b>	<b>Determinação da faixa de fusão.....</b>	<b>49</b>
5.4.1	Material.....	49
5.4.2	Método.....	49
5.4.3	Resultados.....	49
5.4.4	Discussão.....	49
<b>5.5</b>	<b>Espectrofotometria na região do infravermelho.....</b>	<b>50</b>
5.5.1	Material.....	50
5.5.2	Método.....	50
5.5.3	Resultados.....	51
5.5.4	Discussão.....	51
<b>5.6</b>	<b>Cromatografia em camada delgada.....</b>	<b>52</b>
5.6.1	Material.....	53
5.6.2	Método.....	53
5.6.3	Resultados.....	54
5.6.4	Discussão.....	57
<b>5.7</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência.....</b>	<b>58</b>
5.7.1	Material.....	59
5.7.2	Método.....	59

5.7.3	Resultados.....	60
5.7.4	Discussão.....	62
<b>5.8</b>	<b>Conclusão das análises qualitativas.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>ANÁLISES QUANTITATIVAS.....</b>	<b>64</b>
<b>6.1</b>	<b>Doseamento microbiológico – método turbidimétrico.....</b>	<b>64</b>
6.1.1	Introdução.....	64
6.1.2	Ensaio preliminares para o estabelecimento dos parâmetros analíticos.....	64
6.1.3	Execução do ensaio.....	65
6.1.4	Material.....	66
6.1.5	Ensaio.....	68
6.1.6	Validação do método analítico.....	69
6.1.7	Resultados.....	71
6.1.8	Cálculo da potência do enrofloxacino em comprimidos.....	75
6.1.9	Discussão.....	75
<b>6.2</b>	<b>Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho médio.....</b>	<b>77</b>
6.2.1	Introdução.....	77
6.2.2	Material.....	78
6.2.3	Método.....	80
6.2.4	Validação do método analítico.....	81
6.2.5	Resultados.....	83
6.2.6	Discussão.....	92
<b>6.3</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência.....</b>	<b>93</b>
6.3.1	Introdução.....	93
6.3.2	Ensaio preliminares.....	99
6.3.3	Material.....	99
6.3.4	Método.....	100
6.3.5	Desenvolvimento do método.....	101

6.3.6	Validação do método analítico.....	102
6.3.7	Cálculo do teor dos comprimidos de enrofloxacino.....	109
6.3.8	Resultados.....	109
6.3.9	Discussão.....	123
<b>7</b>	<b>ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS.....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>131</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>133</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Estrutura química do enrofloxacino (CAS: 93106-60-6).....	22
<b>Figura 2</b>	Estrutura da 4-quinolona, da qual derivam as diversas quinolonas.....	27
<b>Figura 3</b>	Variação de peso dos vinte comprimidos de enrofloxacino.....	45
<b>Figura 4</b>	Espectros na região do infravermelho médio sobrepostos de enrofloxacino comprimido, matéria prima, substância química de referência e placebo.....	51
<b>Figura 5</b>	Cromatogramas obtidos pela revelação em câmara escura de UVC 254 nm. Fase estacionária: TLC Silica gel 60 F <sub>250</sub> . Fases móveis: (A) metanol : água purificada (60:40, v/v); (B) clorofórmio : metanol (60:40, v/v); (C) metanol : água purificada (70:30, v/v); (D) clorofórmio : metanol (70:30, v/v); (E) metanol : água purificada (55:45, v/v) e (F) metanol : hidróxido de amônio (8:3, v/v). PD: Enrofloxacino padrão secundário; A: Enrofloxacino comprimido (amostra).....	55
<b>Figura 6</b>	Cromatograma de enrofloxacino obtido através de revelação câmara escura de UVC 254 nm. Fase estacionária: TLC Silica gel 60 F <sub>250</sub> . Fase móvel: metanol : hidróxido de amônio (8:3 v/v). MP: Enrofloxacino matéria prima; A: Enrofloxacino comprimido (amostra); SQR: Enrofloxacino substância química de referência e P: placebo (excipiente do comprimido).....	56
<b>Figura 7</b>	Cromatogramas obtidos na degradação acelerada de enrofloxacino matéria-prima. (A): hidrólise neutra (1), ácida (2), básica (3), oxidativa (4), amostra íntegra (5); (B), (C), (D), (E) e (F): amostra íntegra (1), hidrólise neutra (2), ácida (3), básica (4), oxidativa (5), térmica (6), fotolítica (7).....	57

<b>Figura 8</b>	Cromatograma obtido por CLAE pela sobreposição dos cromatogramas da solução de enrofloxacino-SQR (10 µg/mL), enrofloxacino comprimidos (10 µg/mL), placebo (10 µg/mL) e fase móvel. Fase móvel: ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax Agilent® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda de 278 nm. Tempo de retenção: 5,7 minutos. Temperatura: 25 °C ± 1.....	60
<b>Figura 9</b>	Espectro tridimensional do enrofloxacino-SQR (10 µg/mL) na varredura espectral de 200 a 400 nm, mostrando a máxima absorção em 278 nm; Fase móvel: ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax Agilent® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Tempo de retenção: 5,3 minutos. Temperatura: 25 °C ± 1.....	61
<b>Figura 10</b>	Espectro tridimensional do enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL) na varredura espectral de 200 a 400 nm, mostrando a máxima absorção em 278 nm; Fase móvel: ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax Agilent® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Tempo de retenção: 5,3 minutos. Temperatura: 25 °C ± 1.....	62
<b>Figura 11</b>	Representação gráfica da curva analítica de soluções de enrofloxacino padrão secundário e enrofloxacino comprimidos, em concentrações de 4,0; 8,0; 16,0 µg/mL, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	72
<b>Figura 12</b>	Espectro de absorção por infravermelho do enrofloxacino-SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa.....	79
<b>Figura 13</b>	Espectro de absorção na região do infravermelho médio de enrofloxacino padrão secundário na concentração de 2 mg/pastilha de KBr.....	84
<b>Figura 14</b>	Espectro de absorção na região do infravermelho médio de enrofloxacino em comprimidos na concentração de 2 mg/pastilha de KBr.....	85

<b>Figura 15</b>	Espectro de absorção na região do infravermelho médio do placebo na concentração de 2,0 mg/pastilha de KBr.....	86
<b>Figura 16</b>	Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho médio de enrofloxacino padrão secundário, comprimidos e placebo na concentração de 2,0 mg/pastilha de KBr.....	87
<b>Figura 17</b>	Representação gráfica da curva analítica de enrofloxacino pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	89
<b>Figura 18</b>	Cromatograma de enrofloxacino-SQR (10,0 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: solução aquosa de ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm).....	110
<b>Figura 19</b>	Cromatograma de enrofloxacino em comprimidos (10,0 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: solução aquosa de ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm).....	110
<b>Figura 20</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax <sup>®</sup> C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,6 minutos. Amostra submetida à degradação oxidativa (a); solução de peróxido de hidrogênio 3% (b) e amostra íntegra (c)....	111
<b>Figura 21</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em HCl 0,01 M, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax <sup>®</sup> C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,6 minutos. Amostra submetida à degradação ácida (a) e amostra íntegra (b).....	112

- Figura 22** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em NaOH 0,01 M, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax<sup>®</sup> C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,6 minutos. Amostra submetida à degradação (a) e amostra íntegra (b)..... 113
- Figura 23** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em água, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax<sup>®</sup> C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,8 minutos. Amostra submetida à degradação neutra (a); amostra íntegra (b)..... 114
- Figura 24** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em fase móvel, exposto em câmara UV por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax<sup>®</sup> C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,8 minutos. Amostra submetida à degradação fotolítica (a); amostra íntegra (b)..... 115
- Figura 25** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), enrofloxacino-SQR (10 µg/mL), placebo (10 µg/mL) e fase móvel. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax<sup>®</sup> C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm..... 116
- Figura 26** Curva analítica da enrofloxacino-SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel. Fase móvel: ácido acético 5%:metanol (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm..... 118

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Classificação das fluorquinolonas segundo espectro de ação.....	27
<b>Tabela 2</b>	Proporções propostas para o excipiente de comprimidos de enrofloxacino.....	42
<b>Tabela 3</b>	Peso individual dos comprimidos de enrofloxacino, peso médio e desvio padrão relativo.....	44
<b>Tabela 4</b>	Termos descritivos de solubilidade e seus significados.....	46
<b>Tabela 5</b>	Solubilidade de enrofloxacino matéria prima em diferentes solventes a 25 °C.....	47
<b>Tabela 6</b>	Umidade de enrofloxacino matéria prima determinada através de analisador de umidade por infravermelho.....	48
<b>Tabela 7</b>	Bandas características comuns encontradas nos espectros do produto acabado, matéria prima e SQR de enrofloxacino.....	52
<b>Tabela 8</b>	Valores de Rf obtidos com as fases móveis testadas no desenvolvimento do método por CCD.....	56
<b>Tabela 9</b>	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para quantificação de enrofloxacino.....	65
<b>Tabela 10</b>	Parâmetros estabelecidos para a determinação de enrofloxacino comprimidos pelo método turbidimétrico.....	66
<b>Tabela 11</b>	Valores das absorvâncias determinadas para obtenção da curva analítica de enrofloxacino, pelo método turbidimétrico.....	71
<b>Tabela 12</b>	Análise da variância dos valores das absorvâncias obtidas no ensaio microbiológico com a solução de enrofloxacino pelo método turbidimétrico.....	73
<b>Tabela 13</b>	Teste de recuperação do ensaio microbiológico, método turbidimétrico para análise de enrofloxacino.....	74
<b>Tabela 14</b>	Avaliação da robustez do ensaio microbiológico, método turbidimétrico para análise de enrofloxacino.....	74

<b>Tabela 15</b>	Potência de enrofloxacino em comprimidos pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico.....	75
<b>Tabela 16</b>	Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método de espectrometria por infravermelho para enrofloxacino.....	82
<b>Tabela 17</b>	Valores de absorvância referente a banda de estiramento da carbonila para obtenção da curva analítica do método de quantificação de enrofloxacino por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....	88
<b>Tabela 18</b>	Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados na obtenção da curva analítica de enrofloxacino padrão secundário, utilizando o método por IR.....	89
<b>Tabela 19</b>	Determinação da exatidão do método analítico para análise de enrofloxacino por IR.....	90
<b>Tabela 20</b>	Avaliação da robustez do método por espectrofotometria na região do infravermelho para análise de enrofloxacino.....	91
<b>Tabela 21</b>	Teor de enrofloxacino em comprimidos em percentagem pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....	91
<b>Tabela 22</b>	Teor de enrofloxacino em comprimidos em mg/pastilha pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....	92
<b>Tabela 23</b>	Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de enrofloxacino utilizando CLAE.....	95
<b>Tabela 24</b>	Condições testadas durante o desenvolvimento do método por CLAE específico - indicativo de estabilidade para a determinação de enrofloxacino em comprimidos.....	101
<b>Tabela 25</b>	Parâmetros estabelecidos para a determinação de enrofloxacino em comprimidos, pelo método por CLAE específico - indicativo de estabilidade.....	102
<b>Tabela 26</b>	Preparo das soluções de enrofloxacino para o teste de recuperação do método CLAE específico- indicativo de estabilidade.....	105

<b>Tabela 27</b>	Condições cromatográficas alteradas no ensaio de robustez no desenvolvimento de método cromatográfico para determinação de enrofloxacino em comprimidos.....	106
<b>Tabela 28</b>	Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden e Steiner.....	107
<b>Tabela 29</b>	Valores das áreas referentes ao pico de enrofloxacino-SQR para obtenção da curva analítica do método cromatográfico, utilizando como fase móvel ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v) a 278 nm.....	117
<b>Tabela 30</b>	Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de enrofloxacino-SQR utilizando o método de CLAE específico indicativo de estabilidade.....	119
<b>Tabela 31</b>	Valores determinados para a precisão interdias e entre-analistas do método para enrofloxacino em comprimidos por CLAE.....	120
<b>Tabela 32</b>	Preparo das soluções de enrofloxacino para o teste de recuperação do método CLAE específico- indicativo de estabilidade.....	120
<b>Tabela 33</b>	Resultados de cada variação obtidos nos Testes de Youden e Steiner.....	121
<b>Tabela 34</b>	Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para o enrofloxacino.....	122
<b>Tabela 35</b>	Parâmetro de pureza de pico avaliado na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para o enrofloxacino.....	122
<b>Tabela 36</b>	Valores obtidos na determinação do teor do enrofloxacino em comprimidos utilizando os métodos propostos.....	127
<b>Tabela 37</b>	Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento do enrofloxacino em comprimidos pelos métodos propostos.....	127

## Lista de Abreviaturas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA: análise de variância

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain-Heart Infusion*

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CAS: *Chemical Abstract Service*

CCD: cromatografia em camada delgada

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CVM: *FDA's Center for Veterinary Medicine*

DAD: *Diodo array detection*

DPR: desvio padrão relativo

ENRO: enrofloxacino

EPA: efeito pós-antibiótico

e.p.m.: erro padrão da média

EUA: Estados Unidos da América

Fcal: valor de F calculado

Ftab: valor de F tabelado

FB: Farmacopeia Brasileira

FDA: *Federation Drugs Administration*

FM: fase móvel

GL: graus de liberdade

ICH: *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

k: fator de capacidade

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

MAPA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA: Mastite-Metrite-Agalaxia

N: número de pratos

NADA: *New Animal Drug Application*

OMS: Organização Mundial da Saúde

QM: quadrados médios

r: coeficiente de correlação

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

Rf: fator de retenção

S: fator de simetria

SNC: sistema nervoso central

SQ: soma dos quadrados

SQR: substância química de referência

*t*<sub>cal</sub>: valor de t calculado

*t*<sub>tab</sub>: valor de t tabelado

TFA: ácido trifluoracético

*t*<sub>r</sub>: tempo de retenção da substância analisada

USP: *United States Pharmacopoeia*

UV-vis: ultravioleta e visível

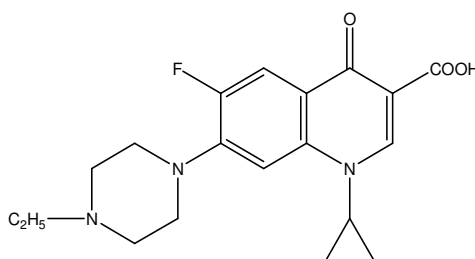
## 1 INTRODUÇÃO

As quinolonas e fluorquinolonas são grupos relacionados de antimicrobianos derivados do ácido nalidíxico. O ácido nalidíxico foi introduzido na clínica na década de sessenta do século passado, sendo a primeira quinolona a ser usada como antimicrobiano (ALÓS, 2009). As quinolonas, diferente dos outros antimicrobianos que foram isolados de organismos vivos, são compostos sintéticos. A primeira quinolona, ácido nalidíxico, foi derivada da substância antimalárica cloroquina. Com a introdução do átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazínico na posição 7 surgiram as fluorquinolonas (WILLIAM, 2005; SCHELLACK, 2006; ALÓS, 2009; BOLON, 2009).

As fluorquinolonas são bastante populares na veterinária e possuem atividade bactericida contra uma gama de patógenos importantes na veterinária, distribuição tecidual alta e poucos efeitos colaterais. As fluorquinolonas mais conhecidas e mais usadas na medicina veterinária são amifloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, marbofloxacino, norfloxacino, orbifloxacino e sarafloxacino. Outras ainda estão sendo avaliadas e adaptadas para uso veterinário como a premafloxacino, fleroxacino e difloxacino (IHRKE et al., 1999; ALBARELLOS, 2009; CAVALCANTE et al., 2009).

O enrofloxacino (Figura 1) é uma fluorquinolona de segunda geração, desenvolvida na década de 1980, sendo a primeira fluorquinolona introduzida na Medicina Veterinária para tratamento de bactérias de várias espécies (OTERO et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2009), podendo ser utilizado por via oral, intravenosa, intramuscular e subcutânea. Possui um amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas incluindo alguns patógenos anaeróbios, e é eficaz contra *Mycoplasma* spp (OTERO et al., 2001).

**Figura 1.** Estrutura química do enrofloxacino (CAS: 93106-60-6)



O enrofloxacino é encontrado em diversas formas farmacêuticas como a de uso oral em comprimidos palatáveis para cães e gatos, Baytril® Flavour® 15 mg, licenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 22/10/2004 sob o nº 8985.

Quanto ao mecanismo de ação, o enrofloxacino age inibindo a topoisomerase II bacteriana (DNA-girase) e topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação celular da bactéria. Estas enzimas são fundamentais no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano (WILLIAM, 2005; BABAAHMADY e KLLORAVI, 2011).

Pesquisando na base de dados *ScienceDirect*, pode-se verificar a presença de vários métodos de análise, sendo a maioria relativos a ensaios para determinação de enrofloxacino e seu metabólito primário em fluidos biológicos, fezes e tecidos de animais (TYCZKOWSKA et al., 1989; HORIE et al., 1994; TYCZKOWSKA et al., 1994; CINQUINA et al., 2003; SUNDERLAND et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2006; RUBIES et al., 2007; BIMAZUBUTE et al., 2008; GRANELLI et al., 2009) ou determinação de enrofloxacino na forma farmacêutica de solução oral ou solução injetável (MOSTAFA, EL-SADEK, ALLA, 2002a; MOSTAFA, EL-SADEK, ALLA, 2002b; SOUZA, BITTENCOURT, MORSCH, 2002; SOUZA, BITTENCOURT, SOUZA FILHO, 2004; ULU, 2009; AMIN, DESSOUKI, AGWA, 2011). Alguns artigos trazem metodologias de análise para enrofloxacino, porém a grande maioria é em fluidos biológicos. Não há metodologias descritas para nenhuma forma farmacêutica de enrofloxacino em compêndios oficiais, apenas para a matéria prima, que está na Farmacopeia Europeia de 2010. Não foram encontrados artigos com análise quantitativa por espectrofotometria na região do infravermelho com o enrofloxacino.

O controle de qualidade de medicamentos na indústria farmacêutica é uma etapa de grande importância para a identificação do teor da substância ativa, para o estudo das características físicas e químicas do fármaco bem como para o estudo de estabilidade, garantindo a qualidade do produto final que será comercializado. Produtos acabados com teor inadequado podem gerar doses subterapêuticas ou até mesmo sobreterapêuticas, levando ao desenvolvimento de cepas resistentes.

O aumento do número de antimicrobianos que podem ser utilizados em medicina veterinária nas últimas décadas levou ao uso intensivo de um maior número de substâncias e à diversificação das suas aplicações (para além da terapêutica), o que

causou um aumento inexoravelmente no “pool” de genes de resistência em bactérias patogênicas, zoonóticas e comensais (SILVA, HOLLEMBACH, 2010).

O enrofloxacino é usado em tratamentos de diversas enfermidades em vários animais (cavalos, bois, cães, gatos, peixes, etc.), sendo um dos antimicrobianos que têm gerado cepas resistentes em alguns animais, como já foi demonstrada significativa resistência de *Escherichia coli* (ISHII, FREITAS, ARIAS, 2009). Outro fato já comprovado é a relação entre o uso de antimicrobianos de forma inadequada em animais e o surgimento de considerável resistência das bactérias a antimicrobianos humanos. O estudo de CRUZ, PAES e SIQUEIRA (2012) mostrou que no caso da vancomicina, que não foi administrada aos cães do estudo, 13,33% dos *Staphylococcus* sp testados apresentaram resistência a este fármaco, podendo-se supor que ocorreu uma resistência mediada por plasmídeo de bactérias humanas resistentes para as bactérias dos animais.

Por tudo isso, justifica-se a necessidade de novas pesquisas para o desenvolvimento, validação e otimização de métodos analíticos bem como a análise químico-farmacêutica do produto acabado.

Assim sendo, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método cromatográfico alternativo que não utiliza soluções tampão, visando à maior vida útil da coluna e a facilidade do preparo da fase móvel. Também se propõe a validar um método microbiológico mais rápido do que a difusão em ágar, o método turbidimétrico, além de desenvolver e validar um método de quantificação por espectrofotometria na região do infravermelho, que não produz resíduos ao meio ambiente e não expõe os profissionais a solventes tóxicos. Estes métodos contribuem com a literatura científica internacional, com os órgãos governamentais (ANVISA e Farmacopeia Brasileira) bem como com a indústria farmacêutica nacional através da qualificação de processos de controle de qualidade de seus medicamentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver, validar e otimizar métodos analíticos que abordem aspectos inovadores nos laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos para o enrofloxacino na forma farmacêutica de comprimidos palatáveis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises qualitativas da amostra de enrofloxacino em comprimidos e da matéria prima através da análise das características físicas, teor de umidade, solubilidade, faixa de fusão, peso médio, identificação por espectrofotometria na região do infravermelho, CLAE e CCD.
- Desenvolver método que permita a identificação de enrofloxacino em comprimidos, por espectrofotometria na região do infravermelho.
- Desenvolver método que permita a identificação de enrofloxacino em comprimidos e que seja indicativo de estabilidade deste fármaco, mediante a utilização de cromatografia em camada delgada (CCD).
- Desenvolver, otimizar e validar método de análise indicativo de estabilidade de enrofloxacino em comprimidos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Desenvolver e validar método de análise de enrofloxacino em comprimidos por meio de ensaio microbiológico por turbidimetria.
- Desenvolver e validar método de análise de enrofloxacino em comprimidos por espectrofotometria na região do infravermelho médio.
- Comparar estatisticamente os métodos propostos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fluorquinolonas

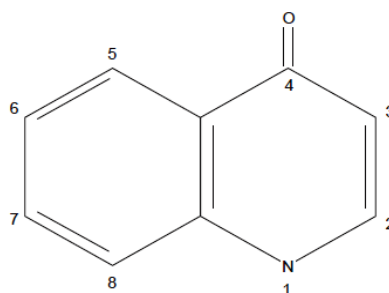
##### 3.1.2 Introdução

As quinolonas, diferente dos outros antimicrobianos que foram isolados de organismos vivos, são compostos sintéticos e a primeira quinolona foi o ácido nalidíxico, derivado da substância antimalárica cloroquina (WILLIAM, 2005; SCHELLACK, 2006; SOUSA, 2007; ALÓS, 2009; BOLON, 2009).

O ácido nalidíxico surgiu nos anos 1960 e a partir dele descobriu-se o grupamento 4-quinolona (composto por dois anéis, um nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3), observado na Figura 2. No final dos anos 1960, descobriu-se que modificações estruturais no grupamento 4-quinolona davam origem a compostos com diferentes características e melhor atividade terapêutica.

Assim, na década de 1980 foram desenvolvidas as fluorquinolonas, as quais possuíam um átomo de flúor na posição 6, associado ao aumento da potência e do espectro de ação, possivelmente por melhor penetração nos tecidos e devido à união das topoisomerasas bacterianas, e foi incluído o grupo piperazínico ou metil-piperazínico na posição 7, que aumentou a atividade contra bactérias Gram-negativas (WILLIAM, 2005; SCHELLACK, 2006; ALÓS, 2009; BOLON, 2009). No entanto, é importante destacar que, embora se denominem (fluor)quinolonas, quando na posição 8 do núcleo base se encontra um átomo de nitrogênio, as quinolonas são naitiridonas e só são, verdadeiramente, fluoroquinolonas (ou quinolonas) quando na posição 8 se encontra um átomo de carbono (SOUSA, 2007).

Devido às diferenças estruturais a partir de um mesmo núcleo, as quinolonas passaram a se diferenciar pelo maior espectro de ação, diferentes biodisponibilidade dentre outras características, sendo, portanto divididas em gerações. A Tabela 1 mostra as diferentes gerações de quinolonas de acordo com o espectro de ação (SCHOLAR, 2002; ALÓS, 2009). As diferenças entre as gerações não são claramente delineadas, especialmente para aqueles fármacos que podem ser classificados tanto em segunda quanto em terceira geração (MARTINEZ et al., 2006).

**Figura 2.** Estrutura da 4-quinolona, da qual derivam as diversas quinolonas.**Tabela 1.** Classificação das fluorquinolonas segundo espectro de ação

Geração	Fármacos	Características
Primeira	ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico e cinoxacino	Pobre biodisponibilidade oral; limitada distribuição tecidual; limitado espectro de ação, restringindo-se a <i>E. coli</i> e algumas bactérias Gram-negativas (MARTINEZ et al., 2006).
Segunda	ciprofloxacino, norfloxacino, enrofloxacino, danofloxacino, marbofloxacino e difloxacino	Atividade contra <i>Enterobacteriaceae</i> , maior atividade contra Gram-negativas (como <i>P. aeruginosa</i> ) e pouca atividade contra cocos Gram-positivos. Melhor biodisponibilidade oral e distribuição tecidual (MARTINEZ et al., 2006).
Terceira	orbifloxacino, esparfloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, entre outros	Mesmas características favoráveis da segunda geração, com maior atividade contra Gram-positivos, atividade contra anaeróbios e micobactérias; meia-vida prolongada; menor toxicidade sobre o SNC e menor interação com o citocromo P450 (MARTINEZ et al., 2006).

### 3.1.3 Atividade antimicrobiana

Na última década, as fluorquinolonas tornaram-se uma classe dominante de agentes antimicrobianos de forma que nenhuma outra classe de antimicrobianos tem crescido tão rapidamente devido às suas várias propriedades favoráveis, incluindo amplo espectro de atividade, excelente biodisponibilidade quando administrado por via oral, boa penetração tecidual e uma incidência relativamente baixa de efeitos adversos

(SCHOLAR, 2002). Por tudo isso, este grande grupo de agentes sintéticos tem despertado extensivo interesse e rápida aceitação na medicina humana e veterinária (IHRKE et al., 1999).

Em relação ao impacto na utilização clínica no campo de antimicrobianos, as fluorquinolonas são os únicos agentes antibacterianos que competem com os  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina, cefalosporinas) (SOUSA, 2007). Devido ao fato de atuarem especificamente sobre o DNA bacteriano, as fluorquinolonas são bactericidas, possuem atividade em baixas concentrações e apresentam efeito pós-antimicrobiano (OTERO et al., 2001).

As fluoroquinolonas, como já foram referidas, pertencem à classe de agentes antibacterianos com um amplo espectro de atividade contra micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus* spp.) e Gram-negativos, bem como contra organismos anaeróbios, porém são claramente mais ativas contra Gram-negativas (enterobactérias, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *Moraxella catarrhalis* e *P. aeruginosa*) (PINA, 2000; ALBARELLOS, LANDONI, 2009; ALÓS, 2009).

As fluorquinolonas de terceira geração têm atividade regular contra bactérias Gram-positivas. Assim não se recomenda monoterapia para as infecções causadas por estas bactérias devido à possibilidade de surgir resistência bacteriana. Levofloxacino e moxifloxacino possuem clara atividade contra Gram-positivos (estafilococos e estreptococos, dentre outros) (ALÓS, 2009).

Algumas fluorquinolonas possuem, ainda, atividade frente a algumas micobactérias entre elas *Mycobacterium tuberculosis*. Neste caso, o morfloxacino é mais ativo que o levofloxacino e o ciprofloxacino (ALÓS, 2009).

#### **3.1.4 Influência do pH na atividade antimicrobiana**

As fluorquinolonas possuem propriedade anfotérica com estrutura eletricamente neutra (*zwitteriônica*), devido à presença de um grupo ácido (grupo carboxílico,  $pK_{a1}$  mais baixo) e de um grupo básico (amina terciária,  $pK_{a2}$ ). Quando os valores de pH são mais baixos que o  $pK_{a1}$ , as quinolonas apresentam carga positiva. Estes valores de  $pK_a$  mais baixos determinam a faixa de pH dentro da qual o fármaco é solúvel nos fluidos aquosos. Isto é particularmente importante para a dissolução de suspensões e comprimidos. Em valores de pH entre  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$ , estes *zwitterions* apresentam a carga neutra. Conseqüentemente, eles podem se difundir livremente através das

membranas biológicas, mas exibem pobre solubilidade nos fluidos aquosos. Nos valores de pH acima de  $pK_{a2}$ , as quinolonas mostram carga negativa (MARTINEZ et al., 2006; SILVA, HOLLENBACH, 2010). Os valores de  $pK_a$  para o enrofloxacino encontrados na literatura são de 3,85, 6,19, 7,59 e 9,86 (QIANG e ADAMS, 2004; BABIC et al., 2007; POLIWODA, KRZYZAK, WIECZOREK, 2010). Deste modo, podem existir mais do que uma espécie em solução, dependendo do pH, devido à protonação/desprotonação destes grupos influenciando, assim, o comportamento farmacológico destes compostos, uma vez que a presença de grupos carregados é necessária para a atividade biológica, visto que atuam inibindo a DNA-girase (enzima alvo destes fármacos), sendo este processo dependente do pH e da concentração de ácido (SILVA, HOLLENBACH, 2010).

Avaliando as constantes de acidez para as diferentes quinolonas verifica-se que, embora as diferenças entre elas sejam pequenas e exista uma similaridade entre elas, essas pequenas diferenças são suficientes para influenciar as espécies que estarão presentes no pH fisiológico. No caso do enrofloxacino, é possível verificar que este, a pH 7,4, se encontra 92% na forma de íon dipolar, 4% na forma aniônica e 4% na forma catiônica. No entanto, o ciprofloxacino, que difere apenas do enrofloxacino pela presença de um átomo de hidrogênio na posição *para* no anel piperazínico, em vez de um grupo etilo, já se encontra 90% na forma de íon dipolar e 10% na forma aniônica (SOUSA, 2007).

### 3.1.5 Farmacocinética e Farmacodinâmica

No que se refere à farmacocinética das fluoroquinolonas, após a administração por via oral (principal via de administração), estes antimicrobianos são rapidamente absorvidos por animais monogástricos e pré-ruminantes. Por outro lado, o pico máximo de concentração sérica varia conforme a espécie animal; assim, por exemplo, após a administração oral de enrofloxacino, esta fluorquinolona atinge o pico máximo de concentração sérica 0,5, 0,9, 1,4, 2,4, e 5,4 horas, respectivamente, em equinos, cães, perus, galinhas e bovinos. A absorção oral é afetada pela presença de alimentos, podendo ser adiada. Uma das principais vantagens do uso das fluoroquinolonas é o seu largo volume de distribuição (com a exceção do SNC e do olho), de 1 a mais de 4 L/kg, sendo em muitos casos superior ao volume total de água do corpo, o que supõe que tais fármacos alcançam concentrações intracelulares altas. Outra vantagem seria a baixa

ligação com as proteínas plasmáticas (SCHOLAR, 2002; ALÓS, 2009; ALBARELLOS, LANDONI, 2009; SILVA, HOLLENBACH, 2010).

As fluorquinolonas são metabolizadas no fígado (ALBARELLOS, LANDONI, 2009). As vias metabólicas principais incluem a glucoronidação (cinafloxacino, grepafloxacino, esparfloxacino e moxifloxacino) e N-oxidação e desmetilação (levofloxacino e esparfloxacino), geralmente, envolvendo o sistema citocromo P450, principalmente a CYP1A2 (MARTINEZ et al., 2006; BOLON, 2009). Estas reações metabólicas e os produtos formados (que podem ser metabólitos ativos ou inativos) variam entre os compostos individuais (ALBARELLOS, LANDONI, 2009).

As fluorquinolonas são excretadas majoritariamente na urina, por meio da filtração glomerular e secreção tubular, mas também na bile, nas duas formas em altas concentrações como substância ativa (PINA, 2000; ALBARELLOS, LANDONI, 2009).

As fluoroquinolonas são bactericidas e agem inibindo a replicação e a transcrição do DNA bacteriano, por meio da interação com dois alvos relacionados, porém distintos, no interior da célula bacteriana a DNA-girase bacteriana (topoisomerase II) e a topoisomerase IV. A DNA girase é responsável pelo super enrolamento negativo, enquanto que a topoisomerase IV o remove, promovendo o relaxamento da molécula do DNA. Uma vez que ambas as enzimas são essenciais ao crescimento e divisão das células bacterianas, ao bloquearem a ação destas enzimas inibem todos os processos consequentes da sua ação levando, assim, à morte da célula bacteriana (SCHOLAR, 2002; ALBARELLOS, LANDONI, 2009; ALÓS, 2009; SILVA, HOLLENBACH, 2010).

As fluorquinolonas de modo geral são bastante eficazes devido à sua baixa concentração inibitória mínima (CIM). Para *P. aeruginosa*, por exemplo, a CIM é  $\geq 1,0$   $\mu\text{g/mL}$  e para *E. coli* é  $\geq 0,2$   $\mu\text{g/mL}$  (OTERO et al., 2001).

### **3.1.6 Toxicidade e interações medicamentosas**

Na medicina humana, têm sido descritas reações de fotossensibilidade (prurido, rash cutâneo, eritema e urticária), interações medicamentosas, efeitos sobre o sistema nervoso central (ataxia, crises epiléticas, desvanecios, insônia, sonolência e tremores) e cristalúria (conduzindo à uropatia obstrutiva). Muitos dos efeitos adversos citados também têm sido descritos para cães e gatos (WOLFSON, 1989; DEMBRY et al., 1999; SCHOLAR, 2002; BOLON, 2009; ALBARELLOS, LANDONI, 2009).

Em tratamentos prolongados de cães (período superior a três meses), tem-se relatado alteração da espermatogênese e/ou atrofia testicular. Além disso, a Medicina veterinária tem descrito alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia), artropatia em animais jovens e toxicidade ocular (degeneração retiniana em gatos e cataratas subcapsulares). A utilização de qualquer fluorquinolona é contra indicada para animais jovens. Recomenda-se também, administrar quinolonas com precaução a pacientes com insuficiência renal, uma vez que a maior parte é excretada por esta via (PINA, 2000; ALBARELLOS, LANDONI, 2009).

Vale ressaltar que a toxicidade das fluorquinolonas é dose e espécies dependentes. A maioria das reações é considerada leve e reversível após a descontinuação do tratamento (ALBARELLOS, LANDONI, 2009). Além disso, certas propriedades estruturais das quinolonas parecem correlacionar-se com certos tipos de efeitos adversos, especialmente com os compostos de terceira geração. Por exemplo, as quinolonas com um halogênio na posição C-8 parecem causar fototoxicidade frequente. Efeitos no sistema nervoso central são mais comumente associados com os não substituídos derivados 7-piperazina (DEMBRY et al., 1999; SCHOLAR, 2002; MARTINEZ et al., 2006).

Foram estudadas em humanos algumas interações medicamentosas, mas estas podem ser relevantes em espécies do âmbito veterinário, uma vez que o ciprofloxacino é um metabólito ativo do enrofloxacino e interage com a teofilina devido ao metabolismo das fluorquinolonas pela isoenzima 1A2 do sistema citocromo P450. Tal isoenzima é inibida pelo ciprofloxacino, o que previne o metabolismo ou a inativação das metilxantinas (caféina e teofilina), provocando o excesso dessas substâncias no SNC e a estimulação cardíaca (MARTINEZ et al., 2006).

### **3.1.7 Mecanismos de resistência**

Devido ao fato das fluorquinolonas poderem ser usadas para uma ampla gama de condições, o aparecimento de agentes patogênicos resistentes às fluorquinolonas vem aumentando e com isso comprometendo potencialmente a utilidade destes fármacos. Como resultado, é muito importante que estes antimicrobianos sejam reservados para situações onde eles são o tratamento de escolha e serem usados, em casos mais simples, os fármacos que têm menor probabilidade de gerar resistência (SCHOLAR, 2002).

A resistência bacteriana às fluoroquinolonas pode ocorrer pelos seguintes mecanismos: mutação das enzimas-alvo (por exemplo, DNA girase ou topoisomerase IV) e resistência por redução das concentrações intracelulares dos fármacos por meio de bombas de efluxo ou alterações nos canais porina. Além disso, pode existir a resistência mediada por plasmídeo, que antigamente acreditava-se que não era possível (WOLFSON, 1989; SCHOLAR, 2002; MARTINEZ et al., 2006; BOLON, 2009; CRUZ, 2009; SILVA, HOLLENBACH, 2010; PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010).

### **3.1.8 Uso na Medicina veterinária**

A primeira fluorquinolona aprovada para uso na medicina clínica foi o norfloxacin, seguida um pouco depois pelo ciprofloxacino em meados da década de 1980. Em relação à Medicina veterinária, a primeira fluorquinolona aprovada para uso em animais foi o enrofloxacin no final da década de 1980 (MARTINEZ et al., 2006). Este grupo de agentes antimicrobianos, a partir de então se tornou bastante popular e possui importantes vantagens, tais como efeitos bactericidas contra uma ampla gama de patógenos veterinários importantes, alta distribuição no tecido e poucos efeitos secundários. Desde então, as fluorquinolonas mais estudadas em animais domésticos são o enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin, orbixoflaxino, marbofloxacino, ibafloxacin, premafloxacin, ciprofloxacino e levofloxacin (ALBARELLOS, LANDONI, 2009).

A partir de 30 de abril de 2001, o Centro do FDA para Medicina Veterinária (CVM) propôs retirar as aprovações de duas novas aplicações de medicamentos para animais (NADAS) patrocinado pela Abbott Laboratories. Os NADAS previam a utilização de formulações de sarafloxacin para o tratamento de colibacilose em aves de capoeira (FDA, 2001a; FDA, 2001b). Com isso, aumentou a preocupação em relação ao aumento de agentes patogênicos de origem alimentar resistentes a fluoroquinolonas devido à administração desses produtos às aves de capoeira (aves domesticadas utilizadas na alimentação). Por razões semelhantes, também foi retirada a aprovação do enrofloxacin pela administração de aves dos EUA (FDA, 2005a; FDA, 2005b).

As principais indicações clínicas para fluoroquinolonas em cães e gatos são as infecções dos tecidos moles, pneumonia e infecções do trato urinário produzidas por bactérias Gram-negativas e estafilococos (ALBARELLOS, LANDONI, 2009).

A Organização Mundial de Saúde relata algumas recomendações referentes ao uso das fluoroquinolonas e quinolonas para uso em animais. Dentre estas:

1 - As quinolonas, como qualquer agente antimicrobiano, nunca devem ser usadas como substituto das boas práticas de manejo de animais;

2 - As quinolonas devem ser administradas de acordo com práticas que maximizem o efeito terapêutico e minimizem o risco de resistência, as quais incluem:

a) tratamentos efetuados somente com supervisão do veterinário ou em animais sob seus cuidados e com registros escritos de uso;

b) tratamentos baseados em diagnósticos laboratoriais, sempre que seja possível, em cultivos bacterianos e testes de susceptibilidade, mantendo registro destes testes nos estabelecimentos;

c) quando os resultados do cultivo e da suscetibilidade bacteriana são conhecidos, é preferível um antimicrobiano eficaz de espectro reduzido antes que uma quinolona.

3 - O registro de quinolonas deveria ser só para uso terapêutico e não para aumentar o rendimento (crescimento), deveriam ser registradas somente para prescrição farmacêutica veterinária, com apropriada observância dessa exigência.

4 - Deveria ser descartada a utilização de quinolonas em animais produtores de alimentos nas indicações além das permitidas (WHO, 1998).

## **3.2 Enrofloxacino**

### **3.2.1 Considerações gerais**

O enrofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração, desenvolvida nos anos 1980. Ele foi a primeira fluorquinolona para uso exclusivo na medicina veterinária (OTERO et al., 2001; MARTINEZ et al., 2006; AHN et al., 2012).

As suas propriedades físico-químicas são idênticas às observadas para as fluorquinolonas, apresentando um átomo de flúor na posição 6 que permite eficácia no combate a bactérias Gram-negativas e que permitiu o alargamento do seu espectro de ação de modo a abranger bactérias Gram-positivas; o anel piperazínico na posição 7 que aumentou a sua atividade antibacteriana, especialmente para *Pseudomonas* spp e os grupos carbonilas adjacentes, nas posições 3 e 4, fundamentais para a atividade antibacteriana e complexação da enzima DNA girase (OTERO et al., 2001; SOUSA,

2007). Além da atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, também têm sido utilizado para controle de alguns patógenos intracelulares (MITCHELL, 2006).

O enrofloxacino se assemelha bastante em termos estruturais ao ciprofloxacino, porém, possui o grupo etila como substituinte na posição *para* do anel piperazínico, o que o diferencia do ciprofloxacino, e confere-lhe uma maior lipofilicidade, aumentando, deste modo, a sua penetração nos tecidos, além de diminuir a toxicidade em nível de Sistema Nervoso Central (SNC) (OTERO et al., 2001; SOUSA, 2007).

Em um estudo realizado no Paraná, foi observado que o enrofloxacino é um dos ingredientes ativos mais utilizados como preventivo de doenças (PARANÁ, 2005). Porém, em setembro de 2005, o FDA retirou a aprovação do enrofloxacino para uso em água para tratar bandos de aves (FDA, 2005b). Foi evidenciado que o uso de fluorquinolonas em aves pode causar o desenvolvimento de espécies de *Campylobacter* resistentes, sendo um caminho para a potencial transmissão para os humanos (WHO, 1997). No entanto, enrofloxacino é atualmente aprovado pelo FDA para o tratamento de animais de companhia e outros animais produtores de alimentos como gado de corte com doença respiratória aguda bovina associada à *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnus*, assim como no tratamento de doença respiratória suína (AHN et al., 2012).

### 3.2.2 Farmacocinética e Farmacodinâmica

A farmacocinética do enrofloxacino é a mesma descrita para todas as fluorquinolonas, sendo assim uma das principais vantagens do uso do enrofloxacino o seu largo volume de distribuição, além da baixa ligação com as proteínas plasmáticas (SILVA, HOLLENBACH, 2010).

A biodisponibilidade oral do enrofloxacino é excelente em mamíferos monogástricos e bezerros pré-ruminantes, com até 80% da dose ingerida absorvida para a circulação sistêmica. Em ruminantes adultos a biodisponibilidade oral é apenas de 10% (MARTINEZ et al., 2006; MITCHELL, 2006).

O enrofloxacino é amplamente distribuído nos tecidos, devido ao baixo peso molecular e à baixa ligação com as proteínas plasmáticas, o que permite também que os metabólitos atravessem facilmente as membranas celulares (OTERO et al., 2001; MITCHELL, 2006; FLAMMER, 2013). Este fármaco segue um modelo de dois

compartimentos para administração oral e intravenosa, enquanto segue o modelo de um compartimento para administração por via subcutânea (MITCHELL, 2006).

O metabolismo do enrofloxacino varia entre as espécies. A biotransformação do enrofloxacino inclui N-desalquilação, conjugação glucuronídica com o nitrogênio na posição *para* do anel de piperazínico, oxidação na posição *orto* em relação à amina substituída e a abertura do anel piperazínico (MITCHELL, 2006). O enrofloxacino é extensivamente metabolizado pelo fígado, sendo transformado em ciprofloxacino, um metabólito equipotente, bem como vários outros metabólitos menores. A quantidade de ciprofloxacino produzido varia de espécie para espécie e pode contribuir para a atividade antimicrobiana. Níveis de ciprofloxacino são um pouco mais baixos em gatos (cerca de 20% do total do composto aparece como ciprofloxacino no sangue) quando comparado com os cães e gado (cerca de 50% do total do composto aparece como ciprofloxacino no sangue) (MARTINEZ et al., 2006; FLAMMER, 2013). O ciprofloxacino oriundo do metabolismo do enrofloxacino é benéfico em relação à atividade microbiológica, já que muitas bactérias Gram-negativas têm valores de CIM menores para o ciprofloxacino e é provável que o efeito antimicrobiano seja aditivo entre o enrofloxacino e o ciprofloxacino (OTERO et al., 2001).

O enrofloxacino é excretado primariamente por secreção tubular e filtração glomerular (FLAMMER, 2013). Entretanto, a meia-vida do enrofloxacino varia entre as espécies. Nas galinhas o enrofloxacino tem meia-vida prolongada (7,3 horas), em comparação com os mamíferos, incluindo os caninos (2,1 horas), vitelos (1,2 horas) e cavalos (3,3 horas). Além disso, nos répteis o enrofloxacino tem uma meia-vida muito maior (MITCHELL, 2006).

Em relação à farmacodinâmica, o enrofloxacino age como todas as fluorquinolonas, ou seja, altera a ação das enzimas bacterianas DNA-girase e topoisomerase tipo IV. Esta enzima está envolvida no desenrolamento, corte e selagem do DNA. Existem duas subunidades de DNA-girase: a subunidade A e a subunidade B. O enrofloxacino atua sobre a subunidade A. A inibição da DNA-girase leva à morte celular rápida das bactérias. A concentração de fluoroquinolonas necessária para alterar o DNA de células de mamíferos é duas ordens de grandeza maior do que a concentração contra o DNA bacteriano (MITCHELL, 2006).

### 3.2.3 Espectro de ação e uso clínico

O amplo espectro de ação do enrofloxacino, a distribuição tecidual favorável e a baixa toxicidade têm feito dele o fármaco de escolha no tratamento de vários processos infecciosos e tem sido administrado com sucesso em milhões de cães e gatos desde 1980 (CAVALCANTE et al., 2009).

É eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Staphylococci* (incluindo algumas cepas resistentes à meticilina), *Mycoplasma* e *Mycobacterium*, além de ser também eficaz contra organismos que são resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, antagonistas do ácido fólico e macrolídeos. O enrofloxacino apresentou efeito *in vitro* superior contra as bactérias Gram-positivas quando comparado ao efeito de outros antimicrobianos como gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol, penicilina G e oxacilina. Não é eficaz contra bactérias anaeróbicas, com eficácia variável contra infecções por *Streptococcus* sp. Sabe-se que o enrofloxacino tem um espectro de atividade semelhante ao do ciprofloxacino, mas com rápida biodisponibilidade (OTERO et al., 2001; BABAAHMADY, KHOSRAVI, 2011).

O enrofloxacino é usado em diversas espécies animais como bois, ovelhas, cães, gatos, porcos, cavalos, aves, dentre outros, para tratamento e prevenção de diversas enfermidades como diarreias e sepses causadas por *E. coli*, infecções do trato respiratório causadas por *Pasteurella haemolytica* e *Mycoplasma bovis*; síndrome Mastite-Metrite-Agalaxia (MMA); enterites causadas por *E. coli*, infecções de pele, infecções geniturinárias, otites, piodermites causadas por *Staphylococcus intermedius*; psitacosis; septicemia aguda causada por *Pasteurella multocida*, dentre outras doenças (OTERO et al., 2001).

Em aves, o enrofloxacino tem boa atividade contra o *Staphylococcus* spp., atividade moderada contra *Streptococcus* spp., atividade baixa contra *Enterococcus* e quase nenhuma atividade contra anaeróbicos. O enrofloxacino também é usado para tratar infecções aviárias causadas por *Chlamydia psittaci* e *Mycoplasma* (FLAMMER, 2013).

O uso no Brasil do enrofloxacino como aditivo alimentar ou como conservante de alimento para animais é proibido pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2009).

Tem sido observado que as fluorquinolonas exercem efeito pós-antimicrobiano (EPA) sobre várias cepas bacterianas. O enrofloxacino tem um efeito pós-antimicrobiano de 1 a 4 horas de duração (por dose e micro-organismo) contra *S. intermedius*, *P. multocida*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *S. aureus* (OTERO et al, 2001).

A eficácia das fluorquinolonas é afetada pelo pH do meio. Foi comprovado que a atividade é menor contra bactérias Gram-negativas em meio ácido do que em meio básico (OTERO et al., 2001). Wetzstein e Jong (1996) demonstraram que em pH ligeiramente ácido (característico de tecidos inflamados, abscessos ou fagócitos) a taxa de morte de algumas bactérias na presença de enrofloxacino é reduzida. Entretanto, em pH 8 a atividade bactericida do enrofloxacino quase não varia.

Comparado com outros derivados quinolônico de uso na medicina veterinária (flumequina, por exemplo) o enrofloxacino se destaca por um valor de CIM consideravelmente menor (fator 20-50) e a vantagem adicional de sua eficácia contra *Mycoplasma spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Streptococcus spp.* (OTERO et al., 2001).

O enrofloxacino tem sido avaliado como um método para eliminar as infecções por *Salmonella* sp. em gado e aves de capoeira (aves domesticadas utilizadas na alimentação). O enrofloxacino administrado ao gado, a 5 mg/kg/dia durante 10 dias eliminou a *Salmonella* em mais da metade do gado. Os isolados de *Salmonella* dos bovinos infectados que permaneceram depois do tratamento eram ainda sensíveis ao enrofloxacino (MITCHELL, 2006).

Enrofloxacino é amplamente utilizado na aquicultura como profilático e agente quimioterapêutico em doenças bacterianas. O fármaco demonstrou ser eficaz contra bactérias patogênicas comuns no meio aquático, incluindo *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Renibacterium salmoninarum* e *Aeromonas salmonicida* (KOC et al., 2009). O estudo realizado por Koc e colaboradores. (2009) indicou que é possível obter concentrações sanguíneas terapêuticas de enrofloxacino, em uma dose única (10 mg / kg de peso corporal) após a administração oral em truta (*S. trutta fario*) e, portanto, pode ser uma terapia eficaz para doenças em truta.

O enrofloxacino tem sido utilizado para tratar infecções bacterianas em répteis, porque é ativo contra a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas, isoladas a partir destas espécies (MITCHELL, 2006).

### 3.2.4 Reações adversas

Além das reações adversas já citadas para as fluorquinolonas como alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia), o enrofloxacino está relacionado com outras como a toxicidade ocular. Esta tem sido relatada em gatos, podendo causar cegueira por degeneração retiniana difusa evidenciada por alterações fundoscópicas (aumento da refletividade tapetal e atenuação vascular da retina), o que parece relacionar-se com doses elevadas, particularmente para enrofloxacino (> 5 mg / kg 24 h) (ALBARELLOS, LANDONI, 2009; CAVALCANTE et al., 2009).

Doses orais de enrofloxacino até 100 mg/kg (20 vezes a dose recomendada) não apresentaram efeitos adversos significativos sobre a composição do sangue e coagulação do sangue (BAHAAHMADY, KHOSRAVI, 2011).

Foi também demonstrado que o enrofloxacino não provocou quaisquer reações alérgicas. Além disso, não foram observados efeitos adversos no sistema nervoso central (SNC) de ratos, cães e gatos. A recomendação de não tratar cães com distúrbios do sistema nervoso central, por exemplo, epilepsia, é uma questão de precaução, que se aplica a todas as fluorquinolonas. Tem sido demonstrado causar uma erosão da cartilagem nas articulações dos cães em crescimento (BAHAAHMADY, KHOSRAVI, 2011).

Já foi relatada poliúria e depressão em papagaios cinzentos após 10 dias de tratamento oral na dose de 30 mg/kg, duas vezes ao dia; o dobro da dose recomendada. Lesões articulares em animais em crescimento e a indução de convulsões em animais predispostos a convulsões foram relatadas em mamíferos, mas não em psitacídeos (FLAMMER, 2013).

### 3.2.5 Resistência bacteriana

O mecanismo de resistência ao enrofloxacino é semelhante ao que ocorre com as demais fluorquinolonas, sendo por mutações cromossômicas, modificações na DNA-girase ou alterações na permeabilidade da membrana das bactérias. (MITCHELL, 2006). Atualmente, também é incluído como um principal mecanismo de resistência aquele mediado por plasmídeo, o que antigamente acreditava-se que não ocorria (PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010).

O aumento contínuo da resistência bacteriana ao enrofloxacino é devido a fatores como o fácil acesso ao fármaco, não sendo necessária uma prescrição do médico

veterinário, o uso do antimicrobiano nos alimentos dos animais com finalidade de prevenção e o uso abusivo do antimicrobiano, até mesmo em situações que podem ser usado um antimicrobiano com menor espectro de ação (PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010).

Estudos mostram que é possível ocorrer a transferência de plasmídeos de bactérias resistentes dos animais aos homens, sendo assim a microbiota intestinal de cães saudáveis passíveis de atuar como reservatório de genes ligados à resistência bacteriana (CRUZ, PAES e SIQUEIRA, 2012).

Trott e colaboradores (2004) demonstraram que o uso do enrofloxacino oral em cães aumenta a colonização e excreção de *Escherichia coli* multidroga resistente por causar a diminuição ou eliminação de coliformes comensais do trato gastrointestinal que controlam por competição o crescimento desse agente.

A resistência ao enrofloxacino é ocasionalmente relatada para *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Acinetobacter* sp. e é mais frequentemente relatada para *Pseudomonas aeruginosa* em relação ao uso em aves (FLAMMER, 2013).

É possível que o uso abusivo de enrofloxacino, ao nível veterinário, tenha resultado na persistência e propagação de *Salmonella* spp. resistente ao ciprofloxacino em animais para consumo, uma vez que este último, em determinadas condições, pode ser um produto da degradação do enrofloxacino (SOUSA, 2007).

### 3.3 Validação de métodos analíticos

Sabe-se que todo medicamento que está no mercado deve passar por um processo eficaz de controle de qualidade para que possa ser usado de forma segura pela população. O Controle de Qualidade pode ser entendido como um conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos, para que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (BRASIL, 1977). Para que isso seja realizado, métodos analíticos são continuamente desenvolvidos.

A necessidade de se mostrar a qualidade dos diversos métodos analíticos desenvolvidos para o controle de qualidade de produtos em geral, 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 as indústrias farmacêuticas. Além disso, o medicamento que é vendido sem um adequado controle de qualidade gera um uso

inseguro aos animais e humanos, levando a uma possível sobredose ou subdose, não garantindo a total eficácia do medicamento. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação documentada de 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 a validação de métodos analíticos, guias da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 899 (BRASIL, 2003), ICH - *International Conference Harmonization* (ICH, 2005) e USP (USP, 2012) fornecem diretrizes para a realização de tais validações de uma maneira eficiente e produtiva.

## 4 DESCRIÇÃO

### 4.1 DESCRIÇÃO GERAL

**Nome do fármaco:** Enrofloxacino (CAS 93106-60-6)

**Nome químico:** Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(4-etil-1-piperacil)-3-quinolínico carboxílico.

**Fórmula química:** C<sub>19</sub>H<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Massa molecular:** 359,40 g/mol

**Propriedades físico-químicas:** Pó cristalino amarelo claro ou levemente amarelado. Praticamente insolúvel em água, solúvel em cloreto de metileno, ligeiramente solúvel em metanol (O'NEIL, 2006; EP, 2010).

**Categoria:** Antimicrobiano

**Classe:** Fluorquinolona de segunda geração

**Comercialização no Brasil:** comercializado nas formas farmacêuticas de comprimidos, solução injetável e solução oral por diversos laboratórios como Intervet Brasil Veterinária LTDA, Bayer, Ouro Fino, Vetanco do Brasil, etc (BRASIL, 2012).

### 4.2 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi enrofloxacin adquirido da SIGMA-ALDRICH, lote SZBA336XV, validade 02/12/2014, com pureza de 99,0%.

### 4.3 MATÉRIA PRIMA DE ENROFLOXACINO

Foi utilizado enrofloxacino matéria-prima, gentilmente doado pela OURO FINO Agronegócios, lote: 120201.337, validade 23/03/2013, com pureza de 97,74%.

### 4.4 AMOSTRA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDO

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram enrofloxacino comprimidos Baytril<sup>®</sup> Flavour, 15 mg, lote 01437521, validade 03/2013, adquiridos no comércio.

#### 4.5 ADJUVANTES PRESENTES NO COMPRIMIDO

Os adjuvantes presentes na amostra foram: lactose monoidratada, celulose microcristalina, amido de milho, povidona, estearato de magnésio, aerosil e aroma artificial de carne (Irish Medicines Board). O placebo real e os dados das proporções de cada adjuvante presente no comprimido não foram obtidos com o fabricante dos comprimidos. Portanto, para o preparo do excipiente foi utilizado o Handbook of Pharmaceutical Excipients (2009), de forma a se propor uma amostra de placebo, preparada com as proporções apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Proporções propostas para o excipiente de comprimidos de enrofloxacino

<b>Adjuvante</b>	<b>Proporção (%)</b>
Lactose monoidratada	75,7
Celulose microcristalina	5
Amido de milho	10
Povidona	1
Estearato de magnésio	3
Aerosil	5
Aroma artificial de carne	0,3

## **5 ANÁLISE QUALITATIVA**

### **5.1 Determinação do peso médio dos comprimidos de enrofloxacino**

O teste de peso médio é indicado para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (comprimidos não revestidos, comprimidos revestidos, pastilhas, cápsulas duras e moles e supositórios). O teste permite verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso, sendo útil para o posterior preparo de amostras nas análises quantitativas (FB 5, 2010).

#### **5.1.1 Material**

Para esta análise foram utilizados comprimidos de enrofloxacino (Baytril® Flavour) e balança analítica Mettler® H51.

#### **5.1.2 Método**

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (2010). Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos.

#### **5.1.3 Resultados**

A Tabela 3 relaciona o peso individual dos 20 comprimidos de enrofloxacino com o peso médio e o desvio padrão relativo.

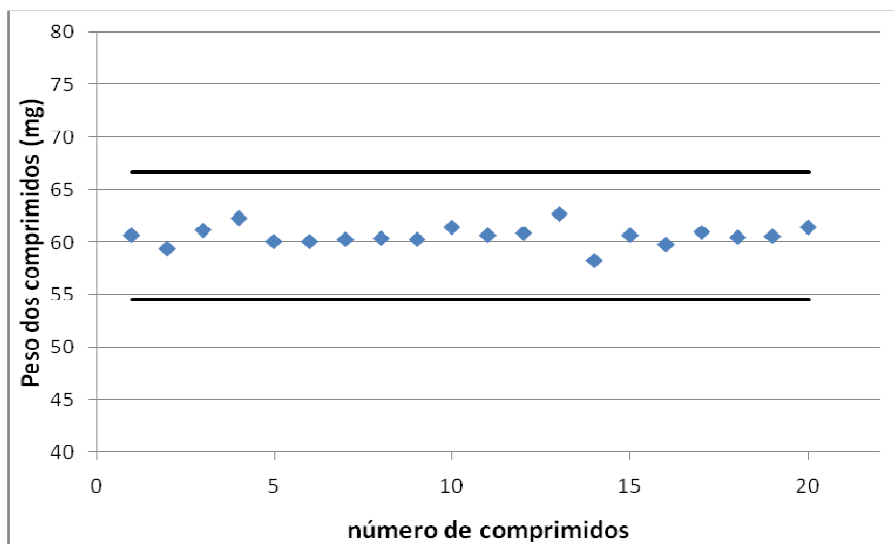
**Tabela 3.** Peso individual dos comprimidos de enrofloxacino, peso médio e desvio padrão relativo

<b>Comprimidos</b>	<b>Peso individual (mg)</b>	<b>Peso médio (mg)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>DPR (%)*</b>
1	60,7			
2	59,4			
3	61,1			
4	62,3			
5	60,1			
6	60,1			
7	60,3			
8	60,4			
9	60,3	60,6	0,0951	1,5684
10	61,4			
11	60,7			
12	60,9			
13	62,7			
14	58,3			
15	60,7			
16	59,8			
17	61,0			
18	60,5			
19	60,6			
20	61,4			

\*DPR (%): Desvio padrão relativo

A Figura 3 ilustra a variação dos pesos dos 20 comprimidos de enrofloxacino pesados.

**Figura 3.** Variação de peso dos vinte comprimidos de enrofloxacino.



#### 5.1.4 Discussão

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), tratando-se de comprimidos não revestidos com peso médio de 80 mg ou menos, pode-se tolerar não mais do que duas unidades fora do limite especificado, de  $\pm 10,0\%$ . No entanto, nenhuma unidade pode estar acima ou abaixo do dobro desta porcentagem, ou seja, de  $20,0\%$ .

As variações dos pesos dos comprimidos de enrofloxacino encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010). Neste caso, a variação permitida é  $\pm 10,0\%$  (peso máximo de 66,7 mg e peso mínimo de 54,5 mg) e foi encontrado como peso máximo 62,7 mg e peso mínimo 58,3 mg, estando todos dentro desta variação como mostrado na Figura 3. O desvio padrão relativo (DPR) apresentou valor dentro das especificações.

#### 5.2 Determinação da solubilidade

Quando a Farmacopeia Brasileira (2010) se refere a *partes*, quer dizer que 1 g de um sólido é submetido à dissolução no número de mililitros do solvente estabelecido no número de partes. A solubilidade de uma substância em dado solvente, à temperatura constante, é um parâmetro característico deste produto, podendo servir para fins de identificação e avaliação do grau de pureza de fármacos (FB, 2010).

As solubilidades aproximadas apresentadas neste estudo estão designadas por termos descritivos cujos significados estão relacionados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Termos descritivos de solubilidade e seus significados

<b>Termo descritivo</b>	<b>Solvente</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

### 5.2.1 Material

Para esta análise foi utilizada a matéria prima de enrofloxacino e os solventes, todos de grau analítico, utilizados foram: acetato de etila, acetona, acetonitrila, ácido acético, ácido clorídrico 0,1 M, água, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, hidróxido de sódio 0,1 M e metanol.

### 5.2.2 Método

Foram transferidas massas de 10 mg de enrofloxacino matéria prima em tubos de ensaio, acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, até completa dissolução, sob constante agitação. O ensaio foi realizado a 25°C e a solubilidade indicada como descrito na Farmacopeia Brasileira (2010).

### 5.2.3 Resultados

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no teste de solubilidade para enrofloxacino matéria prima em diferentes solventes, de acordo com os dados preconizados na Tabela 4 apresentada no item 5.2.

**Tabela 5.** Solubilidade de enrofloxacino matéria prima em diferentes solventes a 25 °C

<b>Solventes</b>	<b>Termo descritivo</b>
Acetato de etila	Muito pouco solúvel
Acetona	Pouco solúvel
Acetonitrila	Pouco solúvel
Ácido acético	Solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Muito pouco solúvel
Água	Insolúvel
Clorofórmio	Facilmente solúvel
Diclorometano	Ligeiramente solúvel
Etanol	Insolúvel
Éter etílico	Muito pouco solúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	Ligeiramente solúvel
Metanol	Pouco solúvel

#### 5.2.4 Discussão

A finalidade deste teste foi caracterizar a substância qualitativamente considerando sua polaridade, assim como, utilizar como ensaio preditivo na determinação da melhor solubilidade para o preparo das amostras para realização dos testes quantitativos.

A amostra se encontra dentro das especificações dos compêndios oficiais de solubilidade descritas para este fármaco (O'NEIL, 2006; EP, 2010).

#### 5.3 Determinação de umidade – método gravimétrico

O ensaio de determinação de umidade, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), tem como objetivo a determinação da quantidade de substância volátil de qualquer natureza presente na amostra.

A determinação de umidade foi realizada de acordo com a técnica para determinação da perda por dessecação utilizando balança por infravermelho, preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010). Tal método consiste em secar uma determinada quantidade de fármaco até atingir peso constante, em temperatura apropriada, durante o tempo necessário.

### 5.3.1 Material

A determinação de umidade do enrofloxacino matéria prima foi realizada com auxílio de um analisador de umidade por infravermelho, modelo IV-2000 Gehaka. Trata-se de uma balança com aquecimento por radiação infravermelha, que permite avaliar a umidade da amostra.

### 5.3.2 Método

Neste ensaio, foi pesado cerca de 1 g de enrofloxacino matéria-prima e transferido quantitativamente para o equipamento, onde permaneceu por 1 hora a 105°C. A análise foi realizada em triplicata. As determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010).

### 5.3.3 Resultados

Os percentuais de umidade determinados na matéria prima de enrofloxacino são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Umidade de enrofloxacino matéria prima determinada através de analisador de umidade por infravermelho

Ensaio	Umidade (%)
1	1,8
2	1,7
3	1,6
Média ± E.P.M.*	1,7 ± 0,06

\*E.P.M.: Erro Padrão da Média.

### 5.3.4 Discussão

A determinação de umidade é de extrema importância, uma vez que a análise de fármacos deve ser realizada com amostras secas. Quando as mesmas possuem alto teor de umidade, acima do especificado, pode-se gerar deterioração; isto pode significar má conservação das matérias primas ou causar prováveis erros de cálculo de teor ou potência.

A umidade média apresentada pela matéria prima de enrofloxacino foi de 1,7% (p/p). A determinação de umidade é de extrema importância, uma vez que altas taxas de

umidade podem levar à deterioração do fármaco ou demonstrar sua má conservação, além de induzir a erros de pesagem que, conseqüentemente, poderão levar a erros de cálculo de teor ou potência.

#### **5.4 Determinação da faixa de fusão**

Temperatura ou ponto de fusão de uma substância é a temperatura corrigida na qual esta se encontra completamente fundida. O intervalo de fusão de uma substância é aquele compreendido entre a temperatura corrigida na qual a substância começa a fluidificar-se ou a formar gotículas na parede do tubo capilar e a temperatura corrigida na qual está completamente fundida, o que é evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida (FB 5, 2010).

##### **5.4.1 Material**

A faixa de fusão foi realizada através do equipamento LS Logen Scientific, LS III Basic e tubos capilares de 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento com a substância química de referência e matéria prima.

##### **5.4.2 Método**

As substâncias (enrofloxacino-SQR e enrofloxacino matéria-prima) foram introduzidas em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram postos no equipamento. A análise foi realizada em triplicata para ambas as substâncias.

##### **5.4.3 Resultados**

Os resultados obtidos foram de 221 °C a 224,8 °C e de 222 °C a 225,6 °C, para SQR e matéria prima, respectivamente.

##### **5.4.4 Discussão**

A determinação da faixa de fusão é importante para avaliar a pureza da substância de trabalho. Portanto, o teste foi realizado apenas com a SQR e com a matéria prima, visto que o comprimido de enrofloxacino possui excipientes, os quais interferem na análise.

No Index Merck, a faixa de fusão descrita para o enrofloxacino é 219 °C a 221 °C. Os resultados são adequados, já que a SQR possui pureza de 99,0% e a matéria-prima de 97,74%.

### **5.5 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho**

A Farmacopeia Brasileira (2010) considera a espectrofotometria no infravermelho médio como um ensaio de identificação por excelência, visto que é capaz de distinguir substâncias com diferenças estruturais. Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante) a região compreendida entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho médio) é a mais empregada para fins de identificação (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FB 5, 2010; PAVIA et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar o enrofloxacino presente nos comprimidos.

#### **5.5.1 Material**

O teste foi realizado com enrofloxacino comprimido (amostra), enrofloxacino SQR, enrofloxacino matéria prima e amostra do excipiente do comprimido (placebo). O equipamento utilizado foi espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu<sup>®</sup> IR Prestige-21 e o reagente foi apenas brometo de potássio (KBr) (Synth, Diadema, Brasil).

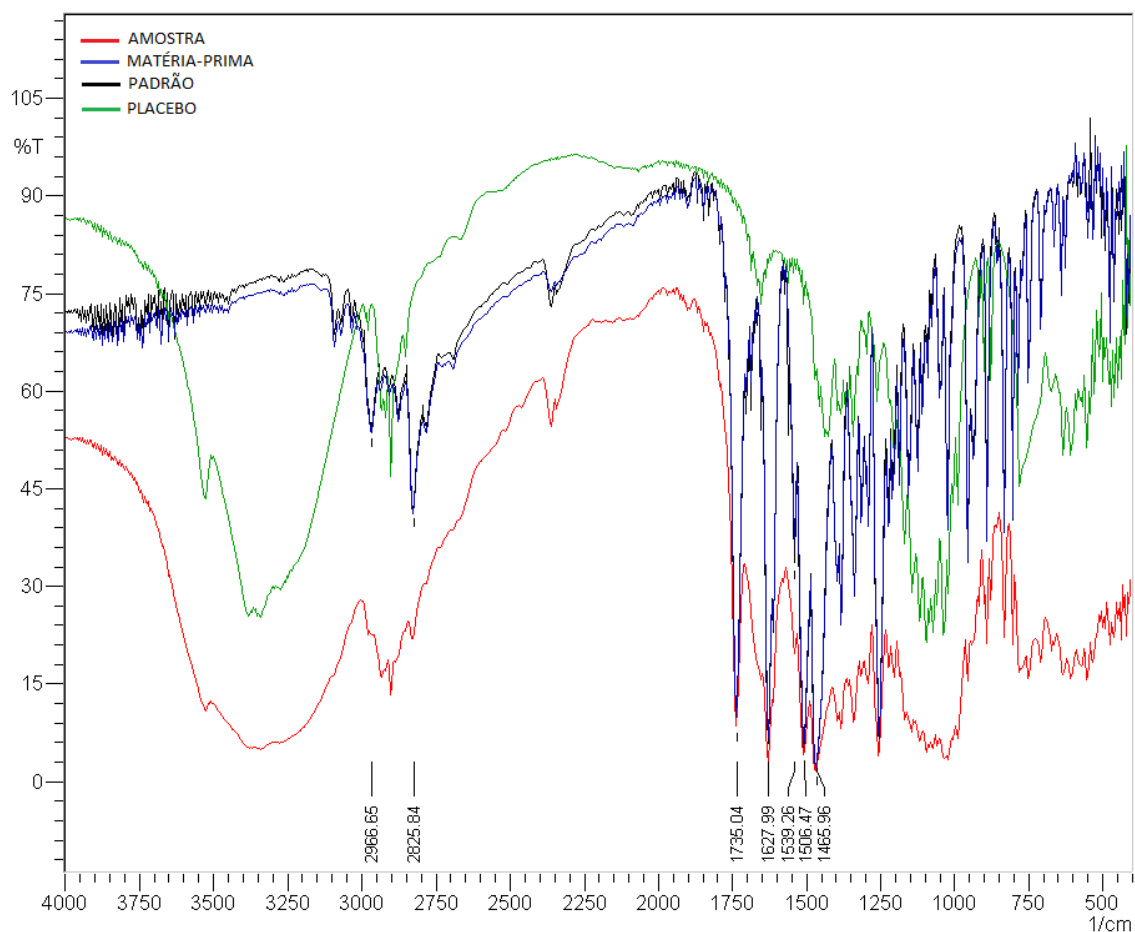
#### **5.5.2 Método**

Foram tomadas massas de enrofloxacino SQR, matéria prima, comprimido e placebo equivalentes a 1 mg e misturadas com quantidade de brometo de potássio, previamente dessecado a 105 °C, por, no mínimo 2 horas, de forma a preparar pastilhas de 150 mg. As leituras das pastilhas foram realizadas em transmitância, a fim de avaliar as bandas características dos grupamentos presentes na molécula do enrofloxacino.

### 5.5.3 Resultados

Os espectros obtidos estão representados na Figura 4.

**Figura 4.** Espectros na região do infravermelho médio sobrepostos de enrofloxacino comprimido, matéria prima, substância química de referência e placebo.



### 5.5.4 Discussão

A espectrofotometria na região do infravermelho situa-se entre as regiões do visível e das micro-ondas. Neste espectro, a correlação pico a pico é uma ótima evidência para a identificação da amostra. O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos de átomos originam picos de absorção que ocorrem em frequência próxima independente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN et al., 2007). Este método tem fundamental importância para ensaios de identificação.

Através destes espectros apresentados na Figura 4, pode-se caracterizar a estrutura química do enrofloxacino através de bandas comuns encontradas no

enrofloxacino comprimidos (amostra), enrofloxacino SQR (padrão) e enrofloxacino matéria prima, que são descritas na Tabela 7, identificando a presença de enrofloxacino na amostra de comprimido.

**Tabela 7.** Bandas características comuns encontradas nos espectros do produto acabado, matéria prima e SQR de enrofloxacino

<b>Bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Interpretação</b>
3000-2500	Estiramento OH
< 3000	Vibrações CHsp <sup>3</sup>
> 3000	Vibrações CHsp <sup>2</sup>
1737	Estiramento da carbonila
1627; 1507; 1468	Vibrações C=C de anel aromático

As bandas presentes na amostra que não aparecem nos espectros da matéria prima e SQR, são justamente aquelas que caracterizam as moléculas do excipiente presentes no comprimido, que são comprovadas com a comparação com o espectro do placebo. Dessa forma, tal método qualitativo, pode ser utilizado para identificar o enrofloxacino em amostras de comprimidos.

### 5.6 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação, utilizando a sílica normal como fase estacionária, está fundamentado, principalmente, no fenômeno de adsorção, ou seja, os analitos interagem com a superfície polar da fase estacionária de acordo com suas polaridades e geometria, compostos mais polares possuem maior afinidade pela fase estacionária, logo são mais retidos, possuindo um fator de retenção menor (COLLIN, BRAGA, BONATO, 2006; LANÇAS, 2009).

Desta forma, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de nova técnica por CCD, mais prática e simples, para identificação de enrofloxacino em comprimidos, com a utilização de solventes menos tóxicos e mais econômicos, que também seja capaz de detectar a presença de produtos de degradação, uma vez que já existem algumas técnicas descritas tanto para o enrofloxacino quanto para outras fluorquinolonas para

identificação e quantificação dos mesmos (THANGADURAI, SHUKLA e ANJANEYULU, 2002; CHOMA, 2006; CHOMA et al., 2009; BAK et al., 2011).

### 5.6.1 Material

A CCD foi desenvolvida utilizando vários solventes diferentes para obtenção de uma fase móvel adequada, empregando placas TLC Sílica gel 60 F<sub>250</sub>, fabricadas pela Merck, com as dimensões de 8 x 3 cm na fase de desenvolvimento do método e 10 x 12 cm para análise final. Para o teste foi utilizado enrofloxacino matéria prima, enrofloxacino SQR, enrofloxacino comprimidos e amostra de excipiente presente nos comprimidos (placebo).

### 5.6.2 Método

#### 5.6.2.1 Desenvolvimento do método

Para o preparo das soluções de análise, foram pesadas massas equivalentes a 2 mg de enrofloxacino e foram adicionados 4 mL de metanol. Em seguida, as amostras foram colocadas no sonificador por ultrassom por 10 minutos, por fim seus volumes foram completados com água purificada, obtendo-se soluções de 200 µg/mL. Antes de ser aplicada, a solução amostra foi filtrada com papel de filtro qualitativo. No desenvolvimento do método foram testadas 6 fases móveis citadas abaixo.

**Sistema 1:** metanol : água purificada (60:40, v/v)

**Sistema 2:** clorofórmio : metanol (60:40, v/v)

**Sistema 3:** metanol : água purificada (70:30, v/v)

**Sistema 4:** clorofórmio : metanol (70:30, v/v)

**Sistema 5:** metanol : água purificada (55:45, v/v)

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

Na execução do ensaio, a fase móvel foi transferida para cuba e foi esperado até sua saturação (30 minutos). As soluções, preparadas no dia da análise, foram aplicadas em quantidade de 10 µL diretamente na placa, com auxílio de uma microsseringa de vidro Hamilton<sup>®</sup> e a distância entre as aplicações foi de cerca de 1 cm. Depois, a placa foi colocada na cuba para eluição dos compostos. Quando a fase móvel atingiu o percurso de 6 cm, a placa foi retirada da cuba de vidro, para secagem, e depois foi realizada a revelação das manchas em uma câmara escura de luz UVC 254 nm. Por fim, as manchas foram observadas quanto à forma, posição, tamanho e cor. Também foram

determinados os fatores de retenção (Rf) referentes às manchas correspondentes ao padrão e à amostra.

### 5.6.2.2 Degradação forçada

Soluções de matéria prima de enrofloxacino (400,0 µg/mL) foram submetidas à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa, fotolítica e térmica com objetivo de avaliar se o sistema cromatográfico escolhido é capaz de detectar a degradação do enrofloxacino e revelar a presença de possíveis produtos de degradação.

A solução amostra foi preparada em HCl 0,01 M e NaOH 0,01 M para as hidrólises ácida e básica, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 80 °C. A degradação neutra foi realizada através da exposição de solução aquosa da amostra a temperatura de 80 °C, em banho-maria. Para a degradação oxidativa, a solução amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (p/v) e depois foi submetida à temperatura de 80 °C. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta, utilizando uma câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W. Além disso, a solução amostra, preparada normalmente, foi aquecida a 80 °C em banho-maria para a degradação térmica. Antes de serem injetadas na placa cromatográfica, as amostras foram diluídas 1:1 com metanol, obtendo uma concentração de 200 µg/mL. Foram injetados 10 µL de cada solução na placa cromatográfica.

Todas as amostras foram submetidas à análise por CCD com a fase móvel constituída por metanol : hidróxido de amônio (8:3, v/v) nos tempos de 0 h, 1 h, 6 h, 24 h, 48 h e 7 dias. As placas utilizadas foram TLC Sílica gel 60 F254 (Merck, Alemanha), com as dimensões de 10,0 x 12,0 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos. A fase móvel atingiu o percurso de 8 cm, a placa foi retirada da cuba de vidro, para secagem, e depois foi realizada a revelação das manchas em uma câmara escura de luz UVC 254 nm.

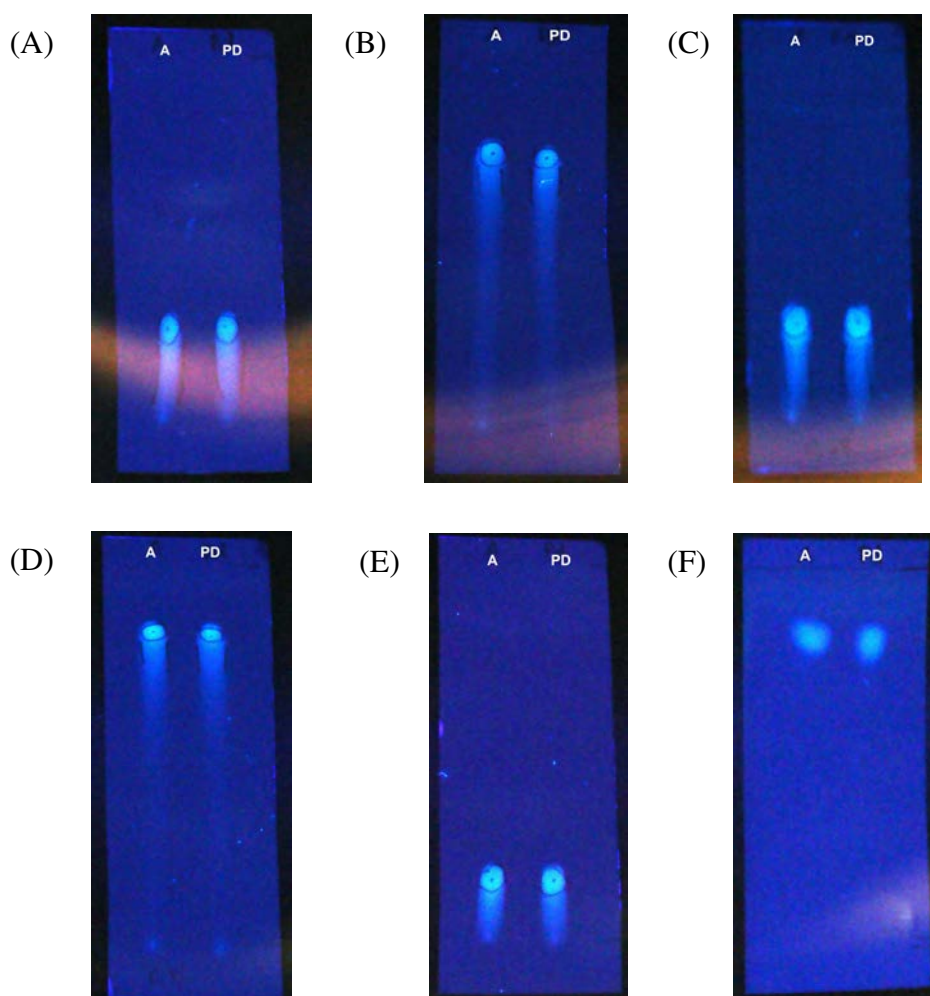
## 5.6.3 Resultados

### 5.6.3.1 Desenvolvimento do método

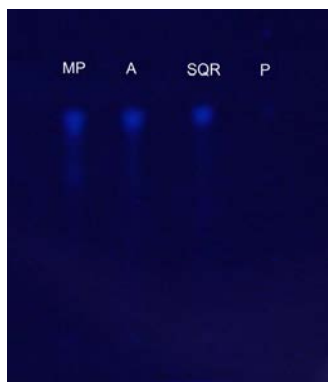
Após vários testes com diferentes fases móveis, o método foi desenvolvido utilizando como fase móvel metanol : hidróxido de amônio (8:3 v/v). A Figura 5 mostra os cromatogramas obtidos com as fases móveis testadas e a Figura 6 mostra o

cromatograma obtido com a fase móvel escolhida. A Tabela 8 mostra os valores de Rf obtidos nos cromatogramas das fases móveis testadas.

**Figura 5.** Cromatogramas obtidos pela revelação em câmara escura de UVC 254 nm. Fase estacionária: TLC Silica gel 60 F<sub>250</sub>. Fases móveis: (A) metanol : água purificada (60:40, v/v); (B) clorofórmio : metanol (60:40, v/v); (C) metanol : água purificada (70:30, v/v); (D) clorofórmio : metanol (70:30, v/v); (E) metanol : água purificada (55:45, v/v) e (F) metanol : hidróxido de amônio (8:3, v/v). PD: Enrofloxacino padrão secundário; A: Enrofloxacino comprimido (amostra).



**Figura 6.** Cromatograma de enrofloxacino obtido através de revelação câmara escura de UVC 254 nm. Fase estacionária: TLC Silica gel 60 F<sub>250</sub>. Fase móvel: metanol : hidróxido de amônio (8:3 v/v). MP: Enrofloxacino matéria prima; A: Enrofloxacino comprimido (amostra); SQR: Enrofloxacino substância química de referência e P: placebo (excipiente do comprimido).



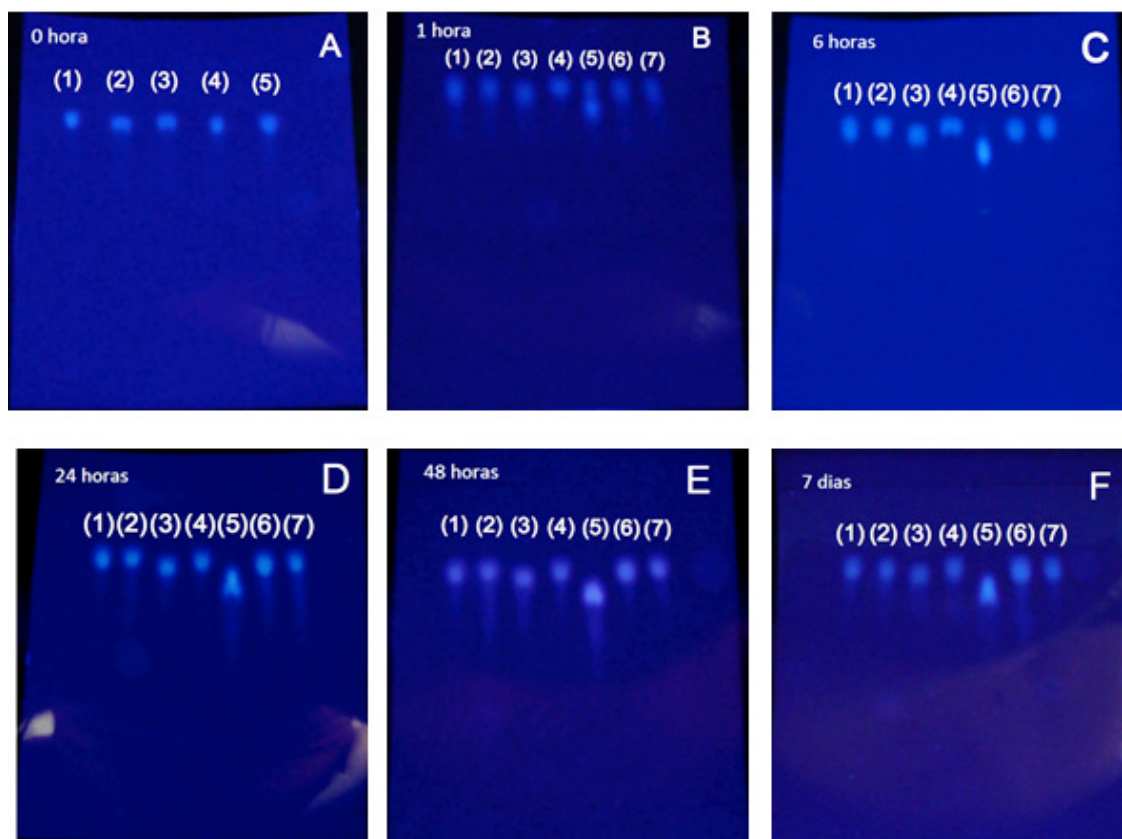
**Tabela 8.** Valores de Rf obtidos com as fases móveis testadas no desenvolvimento do método por CCD

Fase móvel	Resultado
<b>Sistema 1:</b> metanol : água purificada (60:40, v/v)	Rf = 0,26 , com rastro.
<b>Sistema 2:</b> clorofórmio : metanol (60:40, v/v)	Rf = 0,70, com rastro.
<b>Sistema 3:</b> metanol : água purificada (70:30, v/v)	Rf = 0,26, com rastro.
<b>Sistema 4:</b> clorofórmio : metanol (70:30, v/v)	Rf = 0,81, com rastro.
<b>Sistema 5:</b> metanol : água purificada (55:45, v/v)	Rf = 0,15
<b>Sistema 6:</b> metanol : hidróxido de amônio (8:3 v/v)	Rf = 0,82

### 5.6.3.2 Degradação forçada

A Figura 7 mostra os cromatogramas referentes à análise por CCD da degradação acelerada de enrofloxacino matéria prima.

**Figura 7.** Cromatogramas obtidos na degradação acelerada de enrofloxacino matéria-prima. (A): hidrólise neutra (1), ácida (2), básica (3), oxidativa (4), amostra íntegra (5); (B), (C), (D), (E) e (F): amostra íntegra (1), hidrólise neutra (2), ácida (3), básica (4), oxidativa (5), térmica (6), fotolítica (7).



## 5.6.4 Discussão

### 5.6.4.1 Desenvolvimento do método

A CCD é a mais simples e mais econômica das técnicas cromatográficas, quando se pretende a separação rápida e a identificação visual dos analitos. É uma técnica de rápida execução e custo não elevado, tendo grande utilidade nas análises qualitativas de medicamentos (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Os sistemas de solventes 2 (clorofórmio : metanol (60:40, v/v)), 4 (clorofórmio : metanol (70:30, v/v)) e 6 (metanol : hidróxido de amônio (8:3 v/v)) testados apresentaram adequados Rfs, pois todos foram capazes de separar a amostra, sendo possível identificar o enrofloxacino na amostra. Nos Sistemas 2 e 4, apesar da separação estar adequada, a amostra e o padrão apresentaram um rastro durante a eluição.

Portanto, o Sistema 6 foi o escolhido, pois a separação foi adequada e não apresentou rastro durante a eluição da amostra e do padrão.

As manchas no cromatograma obtidas com a solução da substância de referência e matéria prima foram similares em posição, cor e formato em relação à mancha obtida com a solução da amostra (Figura 6). O placebo (excipiente do comprimido) não apresentou mancha na placa cromatográfica, indicando seletividade do método. Todas as manchas apresentaram Rf (fator de retenção) igual a 0,78. Com tudo isso, pode-se afirmar que o método desenvolvido é eficaz para a identificação do enrofloxacino em comprimidos, sendo rápido, prático e de fácil execução.

#### **5.6.4.2 Degradação forçada**

Pela análise dos dados obtidos, é possível observar que a solução da matéria prima de enrofloxacino foi menos estável em condições oxidativas, onde ocorreu a máxima degradação em 24 horas (Figura 7D). A mancha referente ao enrofloxacino havia desaparecido, sugerindo a degradação total do fármaco.

Os resultados mostraram a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto, o qual pode ser aplicado para análise qualitativa de enrofloxacino na forma farmacêutica de comprimidos em ensaios de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco, uma vez que a presença dos excipientes não influencia na análise, como foi visto na Figura 6.

### **5.7 Cromatografia líquida de alta eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica (FB 5, 2010). É uma técnica bastante específica e seletiva, além de exata e precisa, sendo, assim, muito utilizada para identificação de fármacos em amostras.

Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e,

adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma (FB 5, 2010). Logo, com esse tipo de detector pode-se realizar a identificação dos fármacos comparando-se tanto o tempo de retenção quanto o espectro de absorção do produto em análise com a SQR, garantindo uma maior credibilidade ao resultado da análise.

### 5.7.1 Material

Foram utilizadas enrofloxacino SQR, enrofloxacino comprimidos e placebo, descritas nas seções 4.1.2, 4.1.3 e 4.1.4 respectivamente. A fase móvel foi composta por metanol (J.T. Baker, Xelostoc, México) e solução aquosa de ácido acético (glacial) PA ACS (Vetec, Brasil) na concentração de 5%, pH 2,6. Foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius, Gettinge, Alemanha) para filtrar a fase móvel e membrana com poro de 0,45 µm e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nazel, Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de enrofloxacino SQR, enrofloxacino comprimidos e placebo. As soluções constituintes da fase móvel foram desgaseificadas em ultrassom (Unique, Indaiatuba, Brasil).

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters, composto de bomba cromatográfica gradiente quaternária Waters 2695, injetor automático e detector PDA (Photodiode Array Detector) Waters 2696, equipado com software Empower 3 e coluna Eclipse Plus Zorbax C<sub>18</sub> Agilent (4,6 x 150 mm), 5 µm.

A água purificada utilizada para preparo do ácido acético 5% foi obtida de sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> (Malsheim, França).

### 5.7.2 Método

A fase móvel foi constituída por ácido acético 5%: metanol, pH 2,6 (75:25, v/v). A fase móvel foi filtrada sob vácuo e desgaseificada em ultrassom durante 30 minutos.

Foram pesados 2,5 mg de enrofloxacino-SQR e transferidos para balão volumétrico de 25 mL com 5 mL de metanol e colocados no ultrassom por 30 min. Em seguida, o volume foi completado com FM, obtendo-se solução com concentração final de 100 µg/mL (solução-mãe). Uma alíquota de 2,5 mL da solução-mãe foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração final de 10 µg/mL. Para os comprimidos, foi pesado o equivalente a 2,5 mg de enrofloxacino a partir do *pool* obtido dos comprimidos e seguiu o preparo como descrito para enrofloxacino-SQR. Para o placebo, foi pesado 2,5 mg de

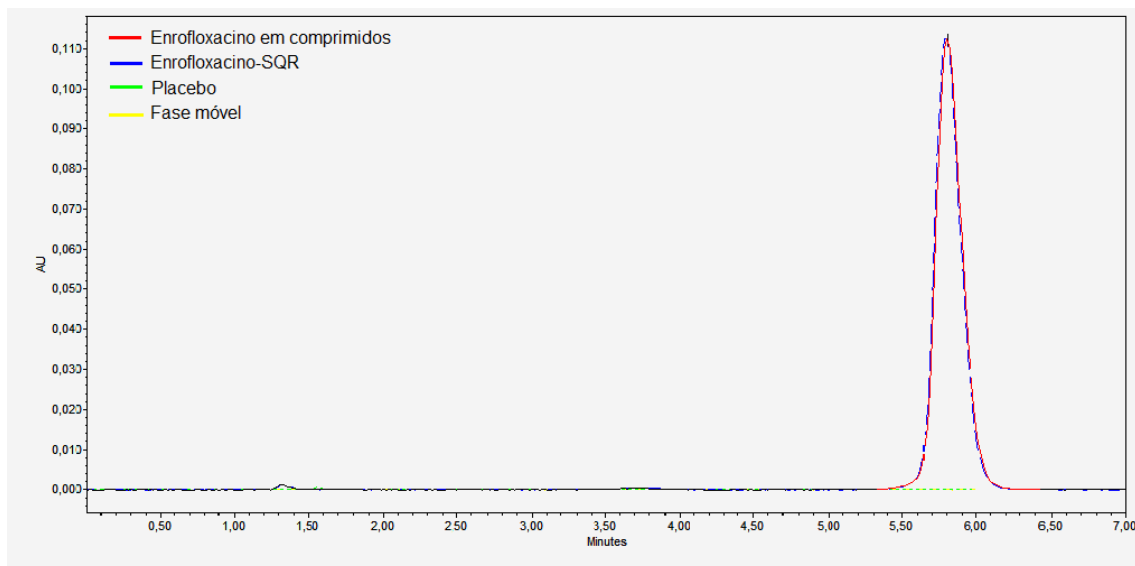
placebo e seguiu o preparo como descrito para enrofloxacino-SQR. Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 13 mm de diâmetro.

Após estabilização do sistema cromatográfico, 20  $\mu\text{L}$  das soluções foram injetados no cromatógrafo, e analisadas no comprimento de onda de 278 nm. A identificação dos comprimidos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção, perfil cromatográfico e por análise espectral.

### 5.7.3 Resultados

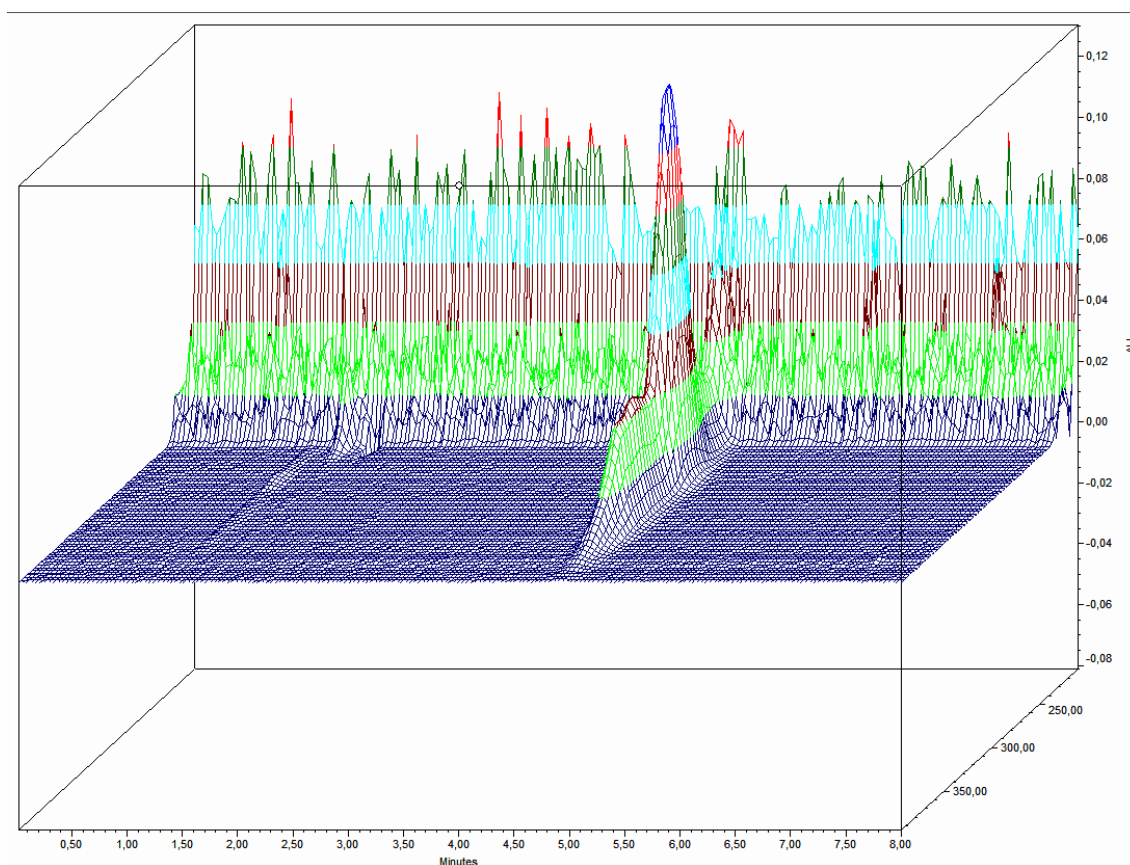
O cromatograma com a sobreposição dos cromatogramas de enrofloxacino-SQR, enrofloxacino comprimidos, placebo e fase móvel é representado pela Figura 8.

**Figura 8.** Cromatograma obtido por CLAE pela sobreposição dos cromatogramas da solução de enrofloxacino-SQR (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), enrofloxacino comprimidos (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), placebo (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e fase móvel. Fase móvel: ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax Agilent® C18 (150 x 4,6 mm), 5  $\mu\text{m}$ . Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda de 278 nm. Tempo de retenção: 5,7 minutos. Temperatura: 25  $^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

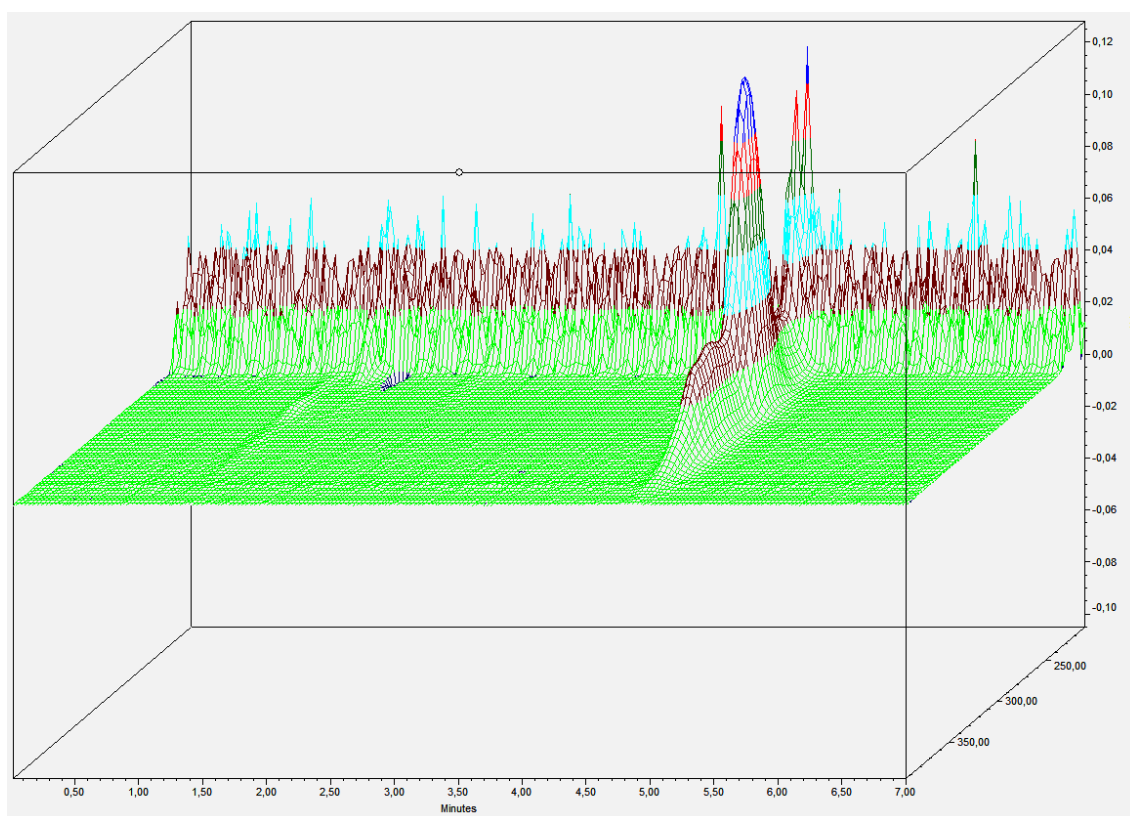


A varredura espectral apresenta o comprimento de onda de maior absorção do enrofloxacino escolhido para a análise, que foi de 278 nm (Figuras 9 e 10).

**Figura 9.** Espectro tridimensional do enrofloxacino-SQR (10 µg/mL) na varredura espectral de 200 a 400 nm, mostrando a máxima absorção em 278 nm; Fase móvel: ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax Agilent® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Tempo de retenção: 5,3 minutos. Temperatura: 25 °C ± 1.



**Figura 10.** Espectro tridimensional do enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL) na varredura espectral de 200 a 400 nm, mostrando a máxima absorção em 278 nm; Fase móvel: ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax Agilent® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Tempo de retenção: 5,3 minutos. Temperatura: 25 °C ± 1.



#### 5.7.4 Discussão

Com o objetivo de desenvolver e validar metodologia por CLAE, diversos sistemas eluentes foram testados, compostos por água, solução de ácido acético de várias concentrações e metanol, em diversas proporções e valores de pH. O sistema eluente que demonstrou pico de retenção adequado e tempo de eluição satisfatório foi o sistema definido para identificação e posterior validação do método analítico (ácido acético 5%: metanol, pH 2,6, 75:25 v/v).

Depois de estabelecidos os parâmetros analíticos, pode-se afirmar que a comparação dos tempos de retenção da solução de enrofloxacino-SQR e enrofloxacino comprimidos indica que o enrofloxacino está presente nas amostras. Além disso, os

adjuvantes contidos no comprimido e a fase móvel não interferem na análise, uma vez que não apresentam absorção no mesmo comprimento de onda da molécula de enrofloxacino, como pode ser visto na Figura 8.

Para maior certificação de que os picos apresentados nos cromatogramas são referentes à molécula de enrofloxacino, a varredura espectral de todas as amostras (enrofloxacino-SQR, enrofloxacino comprimidos, placebo e fase móvel) foi comparada mostrando semelhança entre o espectro do enrofloxacino comprimidos com o espectro do enrofloxacino-SQR e maior absorção em 278 nm como apresentados nas Figuras 9 e 10.

### **5.8 Conclusão das Análises Qualitativas**

As técnicas tradicionais de controle de qualidade utilizadas para análises qualitativa dos comprimidos contendo enrofloxacino foram bastante úteis e importantes, uma vez que foi verificado que os comprimidos não possuem adulteração. Além disso, forneceram maior conhecimento sobre as características do enrofloxacino, o que contribuiu para o preparo adequado das soluções utilizadas nas análises quantitativas.

## 6 ANÁLISE QUANTITATIVA

### 6.1 DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

#### 6.1.1 Introdução

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

O método turbidimétrico está descrito na Farmacopeia Brasileira (2010) e uma de suas principais vantagens é o menor tempo de análise em relação ao método de difusão em ágar.

Este método baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados/sensíveis ao agente antimicrobiano contido em um meio. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa. Desta maneira, permite a determinação da potência do fármaco através da medida da turbidez causada pela inibição do crescimento do micro-organismo por este antimicrobiano. A potência de antimicrobianos é avaliada comparando-se a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo suscetível em relação à dose de uma substância padrão do antimicrobiano que produz inibição similar. Sendo a potência ou atividade de um produto contendo antibiótico, a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo susceptível comparada com a dose de uma substância padrão que produz inibição similar (FB 5, 2010).

Existem poucos trabalhos que descrevem a quantificação de enrofloxacino por métodos microbiológicos (ELSHEIKH et al., 2002; SOUZA, BITTENCOURT, SOUZA FILHO, 2004), sendo todos pelo método de difusão em ágar.

#### 6.1.2 Ensaios preliminares para o estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a quantificação de enrofloxacino, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 9).

**Tabela 9.** Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para quantificação de enrofloxacino

<b>Parâmetros</b>	<b>Descrição</b>
Micro-organismos	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meios de cultura	caldo BHI
	caldo Casoy
Soluções diluentes	Água
	solução tampão pH 8,0
Concentrações do inóculo (%)	2,0
	4,0
	8,0
	10,0
Concentrações das soluções padrão e amostra (µg/mL)	2,0; 4,0; 8,0
	1,0; 2,0; 4,0
	0,8; 1,6; 3,2
	4,0; 8,0; 16,0
	3,0; 6,0; 12,0

### 6.1.3 Execução do ensaio

De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares, foram estabelecidos os parâmetros para desenvolvimento e validação do ensaio microbiológico por turbidimetria (Tabela 10).

**Tabela 10.** Parâmetros estabelecidos para a determinação de enrofloxacino comprimidos pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
Meios de cultura	caldo Casoy
Soluções diluentes	Água
Concentração do inóculo (%)	10,0%
Concentrações das soluções padrão e amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	4,0; 8,0; 16,0
Temperatura de incubação	$35 \pm 1^\circ\text{C}$
Tempo de incubação	4 horas

#### 6.1.4 Material

Foram utilizados enrofloxacino padrão secundário e comprimidos, descritos nas seções 4.3 e 4.4, respectivamente.

Foi utilizado o meio de cultura caldo de soja tríplica (Casoy) (Bacto, França) para manutenção da cepa do micro-organismo, caldo de soja tríplica (Casoy) (Bacto, França) para preparo e padronização do inóculo e realização do ensaio. Os meios de cultura, água e ponteiras foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . A água utilizada foi ultrapura, obtido por sistema de purificação de água Milli-Q (Malsheim, França).

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

#### 6.1.4.1 Preparo da solução de enrofloxacino padrão secundário

Foram pesados 5 mg de enrofloxacino padrão secundário, transferidos para balão volumétrico de 50 mL, adicionados 10 mL de solução de NaOH 0,1 M e levados para o sonificador por ultrassom por 30 minutos. Em seguida, o volume foi completado com a solução diluente (água destilada) definida para o ensaio, para obtenção de solução com concentração de 100 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações definidas para o ensaio (4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL), determinados P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>.

#### 6.1.4.2 Preparo da solução de enrofloxacino comprimido

Foram pesados o equivalente a 5 mg de enrofloxacino amostra, transferidos para balão volumétrico de 50 mL, adicionados 10 mL de solução de NaOH 0,1 M e levados para o sonificador por ultrassom por 30 minutos. Em seguida, o volume foi completado com a solução diluente (água destilada) definida para o ensaio, para obtenção de solução com concentração de 100 µg/mL. A amostra foi filtrada com papel de filtro quantitativo e desta solução, foram transferidas alíquotas (400, 800 e 1600 µL) para balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com a solução diluente, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações definidas para o ensaio (4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL), determinados A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>.

#### 6.1.4.3 Preparo do meio de cultura utilizado

O meio de cultura utilizado para a manutenção dos micro-organismos e os demais meios de cultura descritos na Tabela 10 utilizados para a execução dos ensaios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água deionizada, sob aquecimento, distribuídos nos tubos de ensaio (10 mL/tubo) e esterilizados em autoclave por 15 minutos à 121 °C e 1 atm.

#### 6.1.4.4 Preparo do inóculo

O micro-organismo teste *Staphylococcus epidermidis*, mantido em ágar caseína soja inclinado em tubo de ensaio, foi repicado para caldo de soja tríptica (Casoy) e incubado por 18 a 24 horas anteriores ao ensaio a 35 ± 1°C. A padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro a 580 nm com transmitância de 25 ± 2% (FB 5,

2010). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 10% em caldo de soja tríplica (Casoy).

### 6.1.5 Ensaio

Após o preparo do inóculo como descrito no item 6.1.4.4, foram distribuídos em tubos de ensaio idênticos contendo 10 mL de meio de cultura estéril, 200 µL da solução de enrofloxacino padrão secundário (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>) e de enrofloxacino comprimido (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>). Posteriormente, foi adicionado o caldo nutriente inoculado, na concentração (10%) definida para o ensaio. Desta forma, foram utilizados 20 tubos de ensaio em retas paralelas 3 x 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de enrofloxacino) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas três réplicas.

Os tubos foram incubados em banho-maria, à temperatura de 35,0 °C ± 1,0 °C, por 4 horas em agitador orbital. Após o período de incubação, foi interrompida a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% em cada tubo. Em seguida o aparelho foi zerado com tubo de ensaio contendo o controle negativo e as leituras de absorvância em cada tubo foram efetuadas no comprimento de onda de 530 nm.

#### 6.1.5.1 Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida como descrito na seção 6.1.5. Foram construídas curvas analíticas diariamente, durante três dias consecutivos. A reta foi construída em gráfico logarítimo da concentração em função da absorvância das suspensões, com as médias das absorvâncias de cada uma das concentrações da curva analítica.

#### 6.1.5.2 Cálculo da potência de enrofloxacino em comprimidos

A potência do enrofloxacino em comprimidos foi determinada conforme equação de Hewitt (2004), (Equação 1). A Equação 1 utiliza as médias das absorvâncias obtidas com as três concentrações de enrofloxacino padrão secundário e enrofloxacino em comprimidos, nos 18 tubos analisados em cada ensaio.

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

em que:

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

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

$$E = 1/4 [(A_3 + P_3) - (A_1 + P_1)]$$

Sendo,  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$  o valor médio das leituras de cada concentração da amostra e  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$  o valor médio das leituras de cada concentração do padrão.

## 6.1.6 Validação do método analítico

### 6.1.6.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita na seção 6.1.5.1, foram analisados para obtenção da equação da reta através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada pela análise de variância (ANOVA). Também foram avaliados os coeficientes de correlação.

### 6.1.6.2 Precisão

A precisão do método foi verificada quanto a dois parâmetros: intradia (repetibilidade) e interdias. A precisão interdia foi avaliada através da comparação das potências obtidas em 3 diferentes dias, observando o desvio padrão relativo (DPR%). A precisão intradia foi avaliada através da leitura de sete tubos, na mesma concentração ( $P_2$ ) e mesmas condições experimentais, observando o desvio padrão relativo (DPR%). Os desvios padrão relativos dos dados foram calculados estatisticamente.

### 6.1.6.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. Neste ensaio, preparou-se uma solução mãe de enrofloxacino padrão secundário, conforme item 6.1.4.1, com concentração de 100 µg/mL. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 400, 800 e 1600 µL para balões volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água e obtendo-se concentração final de 4,0; 8,0 e 16 µg/mL, correspondentes a  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ , respectivamente. Para preparo das soluções para avaliação das recuperações, volume de 200 µL da solução mãe de enrofloxacino comprimidos (item 6.1.4.2) de 100 µg/mL foi transferido para todos os balões volumétricos de 10 mL, adicionando a cada balão

volumes de 120; 440 e 1080 µL de solução mãe de enrofloxacino padrão secundário 100 µg/mL para obter as concentrações de 3,2; 6,4 e 12,8 µg/mL, referentes à recuperação de 80% (R<sub>1</sub>); 200; 600 e 1400 µL de solução mãe de enrofloxacino padrão secundário de 100 µg/mL para obter as concentrações de 4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL, referentes a recuperação de 100% (R<sub>2</sub>), e, por fim, 280; 760 e 1720 µL de solução mãe de enrofloxacino padrão secundário de 100 µg/mL para obter as concentrações de 4,8; 9,6 e 19,2 µg/mL, referentes à recuperação de 120% (R<sub>3</sub>).

Desta forma, obtiveram-se as seguintes concentrações pré-definidas:

Para o teste de recuperação 1: 3,2; 6,4 e 12,8 µg/mL, representando amostra de 80% de potência.

Para o teste de recuperação 2: 4,0; 8,0 e 16,0 µg/mL, representando amostra de 100% de potência.

Para o teste de recuperação 3: 4,8; 9,6 e 19,2 µg/mL, representando amostra de 120% de potência.

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = (PR / PT) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que:

*PR* = potência encontrada nas amostras de recuperação

*PT* = Potência teórica

#### 6.1.6.4 Robustez

Foi avaliada por meio de modificações nas condições experimentais estabelecidas, tais como: o volume de meio de cultura colocado nos tubos e o comprimento de onda de leitura dos resultados. As respostas obtidas com a solução padrão (P<sub>2</sub>) lida em triplicata nas diferentes condições foram analisadas estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* para avaliar a interferência das modificações.

#### 6.1.6.5 Especificidade/Seletividade

A especificidade foi avaliada por meio das soluções placebo. As amostras foram preparadas com o excipiente presente nos comprimidos de acordo com a seção 4.5. Foi

verificado se houve diferença nos valores de absorvâncias em relação ao controle positivo, quando estas soluções foram utilizadas.

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

### 6.1.7 Resultados

Os resultados dos valores de absorvância obtidos para as soluções de diferentes concentrações de enrofloxacino padrão secundário e enrofloxacino comprimidos estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Valores das absorvâncias determinadas para obtenção da curva analítica de enrofloxacino, pelo método turbidimétrico

	Concentração (µg/mL)	Absorvâncias*	Absorvância média	DPR (%)**
P <sub>1</sub>	4,0	0,756	0,791	5,39
		0,779		
		0,839		
P <sub>2</sub>	8,0	0,649	0,637	1,94
		0,625		
		0,637		
P <sub>3</sub>	16,0	0,500	0,488	7,38
		0,516		
		0,447		
A <sub>1</sub>	4,0	0,764	0,779	5,39
		0,746		
		0,826		
A <sub>2</sub>	8,0	0,642	0,637	1,57
		0,626		
		0,644		
A <sub>3</sub>	16,0	0,524	0,509	5,55
		0,527		
		0,476		

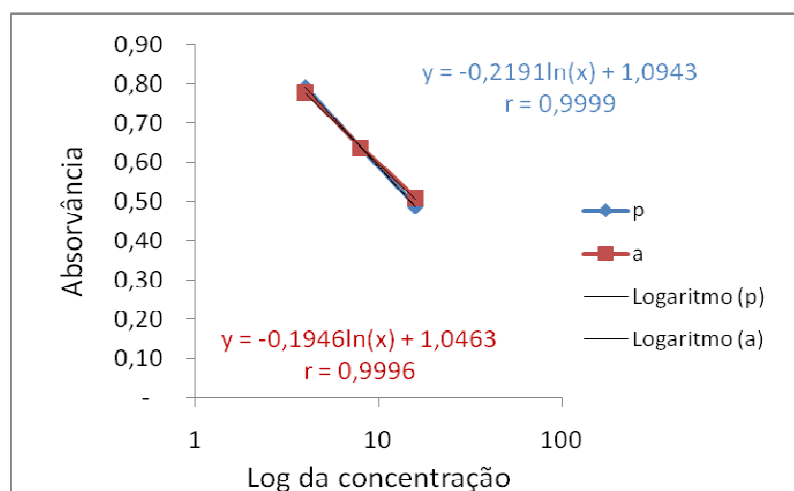
\*cada valor é a média de três determinações realizadas em um dia durante três dias;

\*\*DPR (%) = desvio padrão relativo.

As curvas analíticas de enrofloxacino padrão secundário e enrofloxacino comprimidos (Figura 11) foram construídas com as médias dos valores das absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados são:  $y = -0,2191\ln(x) + 1,0943$ , com coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9999, para enrofloxacino padrão secundário e  $y = -0,1946\ln(x) + 1,0463$ , com coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9996, para enrofloxacino comprimidos.

**Figura 11.** Representação gráfica da curva analítica de soluções de enrofloxacino padrão secundário e enrofloxacino comprimidos, em concentrações de 4,0; 8,0; 16,0  $\mu\text{g/mL}$ , no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.



### 6.1.7.1 Validação

#### 6.1.7.1.1 Linearidade

A validação da metodologia foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB 5, 2010) para ensaio 3 x 3 (Tabela 12). Também foram avaliados os coeficientes de correlação.

**Tabela 12.** Análise da variância dos valores das absorvâncias obtidas no ensaio microbiológico com a solução de enrofloxacino pelo método turbidimétrico

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Preparação	1	0,00004	0,00004	0,03	4,96
Regressão	1	0,24672	0,24672	212,31*	4,96
Desvio de paralelismo	1	0,00087	0,00087	0,75	4,96
Quadrático	1	0,00008	0,00008	0,07	4,96
Diferença de quadrático	1	0,00002	0,00002	0,02	4,96
Entre doses	5	0,24773	0,04955	42,63*	3,33
Entre tubos	2	0,00022	0,00011	0,10	4,10
Dentro (erro)	10	0,01162	0,00116		
Total	17	0,25957			

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

O método microbiológico turbidimétrico deve atender aos requisitos de regressão linear significativa, termos quadráticos não significativos e paralelismo não significativo (FB 5, 2010).

#### 6.1.7.1.2 Precisão

A repetibilidade forneceu DPR% de 0,64%.

A precisão interdias forneceu DPR% de 2,78%.

#### 6.1.7.1.3 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo teste de recuperação. Utilizando a Equação 2, obteve-se valor médio de exatidão de 100,00% e os valores estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Teste de recuperação do ensaio microbiológico, método turbidimétrico para análise de enrofloxacino

	Potência teórica (%)	Potência encontrada* (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR** (%)
R <sub>1</sub>	80,0	81,47	101,84		
R <sub>2</sub>	100,0	96,68	96,68	100,01	2,89
R <sub>3</sub>	120,0	121,83	101,53		

\*média de três determinações

\*\*DPR= desvio padrão relativo

#### 6.1.7.1.4 Robustez

Durante as análises da solução padrão sobre os parâmetros alterados e estabelecidos, o teste *t* de *Student* comprovou a robustez do método proposto em todos os parâmetros avaliados, conforme apresentado na Tabela 14.

**Tabela 14.** Avaliação da robustez do ensaio microbiológico, método turbidimétrico para análise de enrofloxacino

Variável	Alteração	<i>t</i> tab*	<i>t</i> cal*
Volume de meio de cultura (mL)	9,5	2,78	0,94
	10,5	2,78	1,56
Comprimento de onda de leitura (nm)	526	2,78	0,23
	534	2,78	0,77

\* *t* tab = *t* tabelado; *t* cal = *t* calculado.

\*\* Volume de meio de cultura da condição normal = 10 mL

\*\*\* Comprimento de onda de leitura da condição normal = 530 nm

#### 6.1.7.1.5 Especificidade/Seletividade

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

A seletividade, comprovada pelo teste de análise de variância, para comparar as inclinações das curvas analíticas obtidas com enrofloxacino padrão secundário e

enrofloxacino comprimidos, demonstrou valor de  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  de 0,75 e 4,96, respectivamente, indicando que não há interferência do excipiente nas análises, corroborando com os resultados de especificidade.

### 6.1.8 Cálculo da potência de enrofloxacino em comprimidos

A potência foi calculada em três dias consecutivos utilizando a equação de Hewitt, conforme apresentado na seção 6.1.5.2 e apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15.** Potência de enrofloxacino em comprimidos pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico

Dia	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR (%) interdía*
1	95,51		
2	100,83	97,84	2,78
3	97,17		

\*DPR = desvio padrão relativo

### 6.1.9 Discussão

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

*S. epidermidis* foi utilizado como micro-organismo teste diante dos resultados encontrados nos ensaios preliminares, por ser sensível ao enrofloxacino, ter um bom crescimento e boa manutenção no meio de cultura. Além disso, este micro-organismo está presente normalmente na pele e mucosas humanas, sendo, a cepa utilizada, considerada não patogênica (McCANN et al., 2008), dando assim uma maior segurança para a realização do teste se comparado a outros micro-organismos como *E. coli*. Além disso, a cepa utilizada no ensaio apresenta um tempo de geração adequado (4 horas), tornando o método mais rápido se comparado ao método por difusão em ágar.

A linearidade do método foi comprovada pelos coeficientes de correlação de 0,9999 e 0,9996 para enrofloxacino padrão secundário e amostra, respectivamente, os quais foram bastante próximos de 1,0000. Além disso, a análise de variância

demonstrou significativa regressão e ausência de desvios da linearidade e paralelismo nas curvas analíticas originadas do padrão secundário e amostra.

A seletividade foi comprovada estatisticamente pela análise de variância para comparar as inclinações das curvas analíticas obtidas com o enrofloxacino padrão secundário e amostra e os valores de  $F_{\text{cal}}$  e  $F_{\text{tab}}$  foram 0,75 e 4,96, respectivamente, demonstrando que o excipiente presente no comprimido não interfere nas análises. Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

Os testes de repetibilidade e precisão intermediária demonstraram DPR% de 0,64% e 2,78%, respectivamente, validando assim a precisão do método turbidimétrico para análise de enrofloxacino.

A potência de enrofloxacino indicada nas amostras analisadas, 97,84%, pode ser considerada adequada uma vez que mesmo sem especificações em farmacopeias ou algum outro compêndio oficial quando comparado com outras fluorquinolonas já descritas nas farmacopeias como o ciprofloxacino em comprimidos, em que o teor aceitável é de 95,0 a 105,0%, podemos considerar dentro dos padrões.

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada a média de 100,01%, comprovando a capacidade do método de determinar teores pré-definidos de maneira exata.

As pequenas alterações efetuadas no volume do meio de cultura e no comprimento de onda de leitura das amostras durante a avaliação da robustez, demonstraram que em todas as alterações o método mostrou-se robusto.

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

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

## 6.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO

### 6.2.1 Introdução

A espectrofotometria por infravermelho é um método comumente utilizado para análises de identificação, mas vem ganhando atenção na análise quantitativa de fármacos, devido às suas vantagens em relação a outros métodos físico-químicos, tais como curto tempo de análise, não utiliza solventes orgânicos, uso de pequenas quantidades de amostra, não requer extração da amostra e é usada para análise de medicamentos com problemas de solubilidade, uma vez que podem ser preparados sob a forma de pastilhas de KBr (LOPES, FASCIO, 2004; MORENO, SALGADO, 2012). Dentre estas vantagens, a mais importante é o fato de não utilizar solventes orgânicos e, dessa forma, não gerar resíduos. Com isso, diminui-se a quantidade de efluentes gerados pelas indústrias para serem tratados, o que resulta em economia para a indústria e benefícios para o meio ambiente.

Assim como ocorre em outros tipos de absorção de energia, as moléculas, quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas para atingir um estado maior de energia. Uma molécula absorve apenas frequências (energias) selecionadas de radiação do infravermelho. Como cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, e como dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos estão em dois ambientes levemente diferentes, os padrões de absorção no infravermelho, ou espectro infravermelho, em duas moléculas diferentes nunca são exatamente idênticos (PAVIA et al., 2010).

Atualmente os espectrofotômetros trabalham com uma operação matemática conhecida como transformada de Fourier, que pode separar as frequências das absorções individuais contidas no interferograma, produzindo espectro virtualmente idêntico ao obtido com um espectrofotômetro dispersivo. Com isso, os espectros possuem uma razão melhor de sinal/ruído, sendo mais rápido e mais sensível que um espectrofotômetro dispersivo (PAVIA et al., 2010).

A Farmacopeia Brasileira (2010) considera a espectrofotometria no infravermelho médio como um ensaio de identificação por excelência, visto que é capaz de distinguir substâncias com diferenças estruturais. Além disso, a espectrofotometria na região do infravermelho tem alta relevância na quantificação de substâncias orgânicas (LOPES, FASCIO, 2004). Das três regiões do infravermelho (próximo,

médio e distante) a região compreendida entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho médio) é a mais empregada para fins de identificação (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FB 5, 2010; PAVIA et al., 2010).

Algumas substâncias como darunavir, ampicilina sódica, ibuprofeno, roxitromicina e ceftazidima sódica (MATKOVIC et al., 2004; SHERAZI, ALI, MAHESAR, 2011; TÓTOLI, SALGADO, 2012; MORENO, SALGADO, 2012; KOGAWA, SALGADO, 2013) já possuem métodos de quantificação validados e descritos na literatura por espectrofotometria no infravermelho médio. Porém, o enrofloxacino não possui métodos de quantificação por espectrofotometria no infravermelho médio descritos na literatura.

Considerando todas as vantagens que esta técnica apresenta em relação aos outros métodos descritos para a quantificação de enrofloxacino em formulações farmacêuticas, o objetivo deste trabalho é propor um método analítico para quantificação de enrofloxacino em comprimidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Deste modo, a técnica poderá ser utilizada em análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco como uma alternativa às existentes, contribuindo economicamente com a indústria e trazendo benefícios para o meio ambiente.

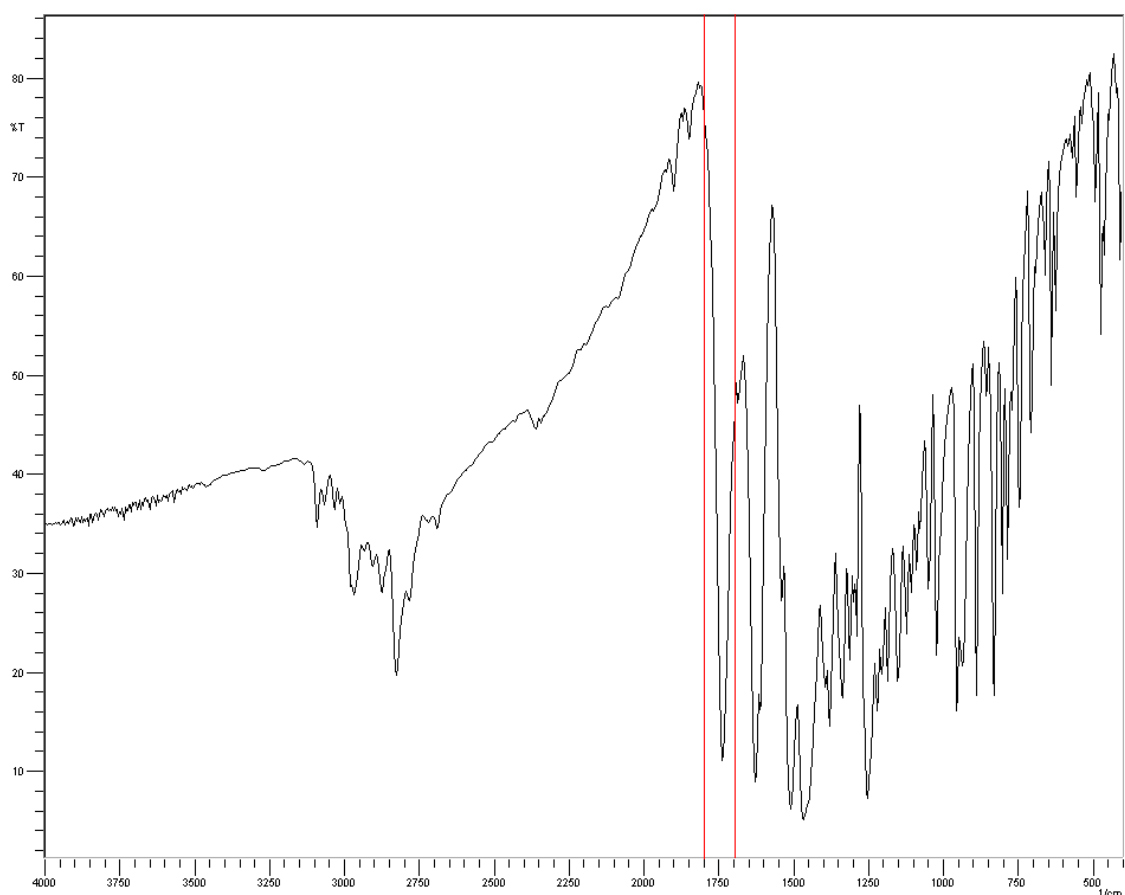
## 6.2.2 Material

### 6.2.2.1 Equipamento

As análises foram realizadas no espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu (Kyoto, Japan), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , com intervalos de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Após a obtenção dos espectros e com o auxílio do software IR Solution, a análise quantitativa foi realizada na região espectral compreendida entre 1805,372 a 1689,643  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 12), referente à banda de uma das carbonilas da molécula de enrofloxacino, e esta teve sua altura analisada em termos de absorvância. Esta região espectral foi escolhida devido ao fato de ser uma banda bem definida e característica da estrutura química do enrofloxacino, uma vez que está presente no espectro tanto do padrão secundário quanto da amostra, mas não está presente no espectro do placebo, assim, não ocorre interferência do excipiente na análise do comprimido de enrofloxacino.

O software Microsoft Excel (2007) foi utilizado para a construção da curva analítica.

**Figura 12.** Espectro de absorção por infravermelho do enrofloxacino-SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa.



### 6.2.2.2 Produtos químicos

Foram utilizados enrofloxacino padrão secundário e comprimidos, descritos nas seções 4.3 e 4.4, respectivamente. Além disso, foi utilizada uma amostra de placebo descrita na seção 4.5.

O brometo de potássio (KBr) utilizado para a confecção das pastilhas foi da marca Synth (Diadema, São Paulo, Brasil), de grau analítico. Antes de sua utilização, o KBr foi pulverizado e dessecado a 120 °C por 24 horas antes de cada análise.

### 6.2.3 Método

#### 6.2.3.1 Preparo das pastilhas de enrofloxacino padrão secundário

Foi realizada uma primeira diluição de 1:10, ou seja, 1 parte de padrão secundário para completar com 9 partes de KBr. Então, a partir dessa diluição foram tomadas massas de pó equivalentes a 2,0 mg de enrofloxacino (20,0 mg da diluição 1:10 em brometo de potássio) e devidamente homogeneizadas com 130 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 150 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância. As pastilhas foram obtidas com força de compressão de aproximadamente 92 kN por 10 minutos.

#### 6.2.3.2 Preparo das pastilhas de enrofloxacino comprimidos

Foi pesado o equivalente a 2 mg de enrofloxacino e devidamente homogeneizado com quantidade de brometo de potássio necessária para completar uma massa de 150 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância. As pastilhas foram obtidas com força de compressão de aproximadamente 92 kN por 10 minutos.

#### 6.2.3.3 Preparo do placebo

O placebo utilizado neste teste é o mesmo descrito na seção 4.5, seguindo o mesmo procedimento de diluição realizado com no preparo das pastilhas de enrofloxacino padrão secundário. As pastilhas foram obtidas com força de compressão de aproximadamente 92 kN por 10 minutos.

#### 6.2.3.4 Obtenção da curva analítica

Massas equivalentes a 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg de enrofloxacino padrão secundário (previamente diluída em brometo de potássio a 1:10, p/p) foram tomadas e diluídas em quantidades suficientes de brometo de potássio para a obtenção de pastilhas para leitura com massa total de 150 mg. As substâncias foram misturadas e pulverizadas até a obtenção de uma mistura homogênea. Assim, esta mistura foi comprimida em uma prensa mecânica por 10 minutos para formar pastilhas translúcidas, através das quais o feixe do espectrômetro pode passar.

### 6.2.3.5 Cálculo do teor de enrofloxacino na amostra

A concentração de enrofloxacino na amostra foi calculada pela Equação 3 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 4.

$$C_a = A_a \times \frac{C_{sr}}{A_{sr}} \quad (\text{Equação 3})$$

$$C_a\% = C_a \times \frac{100}{C_t} \quad (\text{Equação 4})$$

em que:

$C_a$  = concentração da amostra

$C_a\%$  = concentração percentual da amostra

$C_{sr}$  = concentração da substância referência (mg)

$A_a$  = absorvância da amostra

$A_{sr}$  = absorvância da substância de referência

$C_t$  = concentração teórica de enrofloxacino na amostra

## 6.2.4 Validação do método analítico

### 6.2.4.1 Linearidade

Para verificar a linearidade do método, foram utilizadas cinco concentrações de enrofloxacino padrão secundário (1,0 – 3,0 mg/pastilha), que foram avaliadas em três dias diferentes. A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a avaliação estatística foi feita pela ANOVA.

### 6.2.4.2 Seletividade

Foi realizada através da comparação dos gráficos obtidos com a leitura das pastilhas de enrofloxacino padrão secundário, enrofloxacino em comprimidos e placebo.

### 6.2.4.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão interdias. A repetibilidade (intradia) do método foi estudada pela realização de 7 determinações da amostra na concentração de 2 mg/pastilha, no mesmo dia e em

condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi analisado. A precisão interdias, por sua vez, foi avaliada através da realização do ensaio em três dias diferentes, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

#### 6.2.4.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de enrofloxacino padrão secundário foi adicionada à quantidade conhecida de placebo (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 16, em triplicata.

**Tabela 16.** Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método de espectrometria por infravermelho para enrofloxacino

Pastilha	Placebo (mg) (diluição 1:10, p/p em KBr)	Enrofloxacino padrão secundário (mg) (diluição 1:10, p/p em KBr)	Quantidade de KBr* (mg)	Concentração teórica final (mg/pastilha)
Amostra	10,0	-	140,0	0,0
R <sub>1</sub>	10,0	16,0	124,0	1,6
R <sub>2</sub>	10,0	20,0	120,0	2,0
R <sub>3</sub>	10,0	24,0	116,0	2,4
Padrão	-	10,0	140,0	1,0

\*Quantidade suficiente para o preparo de pastilhas com massa total de 150 mg.

A percentagem de recuperação foi calculada através da Equação 5, determinada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002):

$$R\% = \left[ \frac{(C_f - C_u)}{C_a} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

na qual:

Cf = concentração da substância de referência + concentração da amostra

Cu = concentração da amostra

Ca = concentração da substância de referência adicionada

#### 6.2.4.5 Robustez

Foi avaliada por meio de modificações nas condições experimentais estabelecidas, tais como tempo de compressão da pastilha e à pressão utilizada para a compressão da pastilha. As respostas obtidas com as pastilhas de padrão (concentração de trabalho, 2 mg/pastilha) nas diferentes condições foram analisadas estatisticamente utilizando o teste *t* de *Student* para avaliar a interferência das modificações.

#### 6.2.4.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva, conforme descrito na literatura (ICH, 2005). Foram realizadas três curvas diferentes para a obtenção dos dados necessários para os cálculos. Os valores foram calculados através das Equações 6 e 7.

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 6})$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 7})$$

em que:

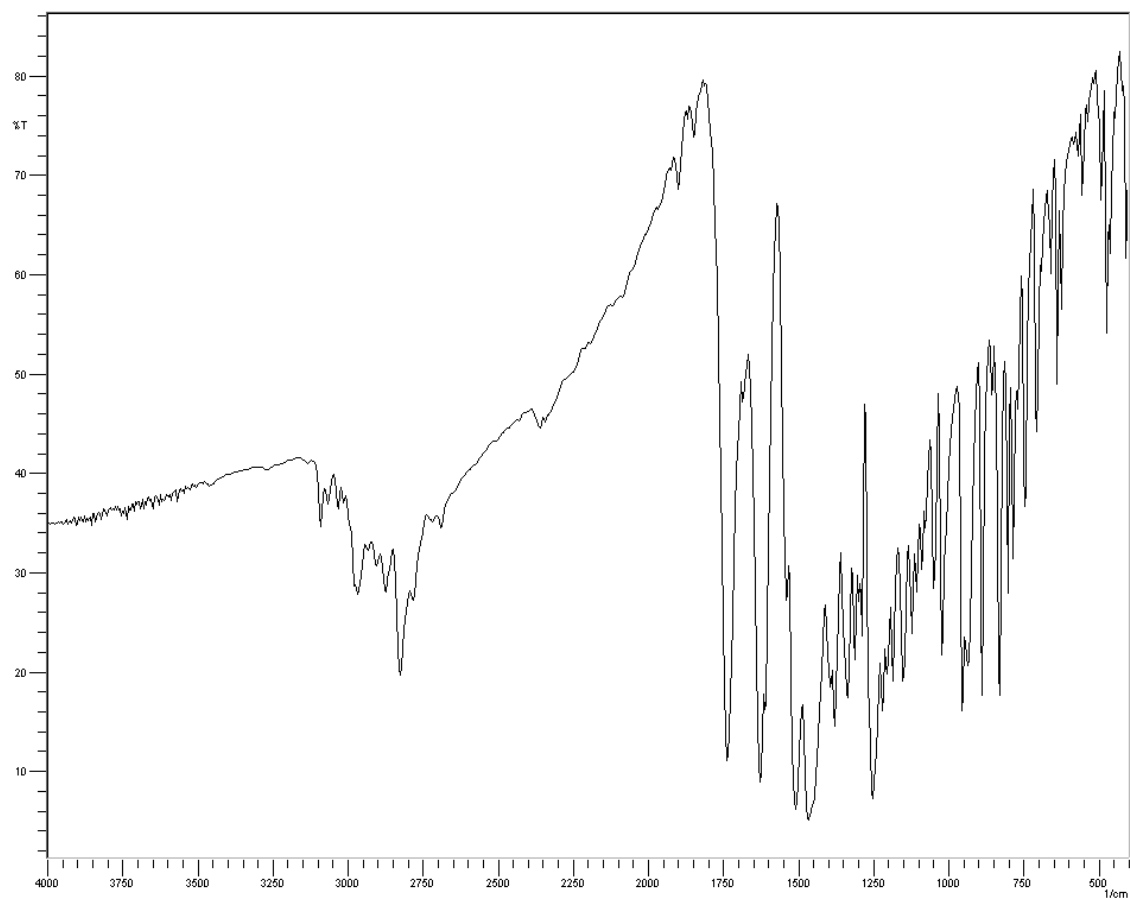
$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

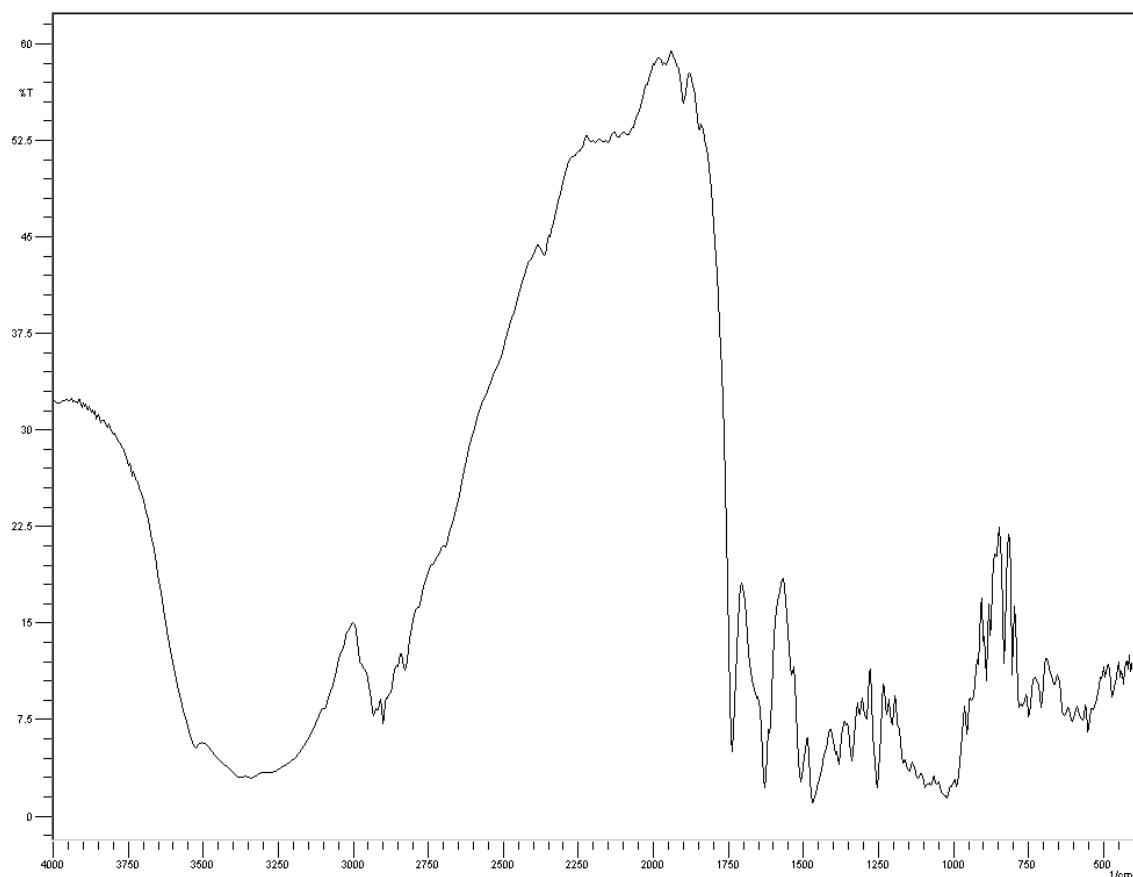
#### 6.2.5 Resultados

Os espectros de absorção na região do infravermelho médio obtido para o enrofloxacino padrão secundário e comprimidos são apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

**Figura 13.** Espectro de absorção na região do infravermelho médio de enrofloxacinó padrão secundário na concentração de 2 mg/pastilha de KBr.



**Figura 14.** Espectro de absorção na região do infravermelho médio de enrofloxacino em comprimidos na concentração de 2 mg/pastilha de KBr.

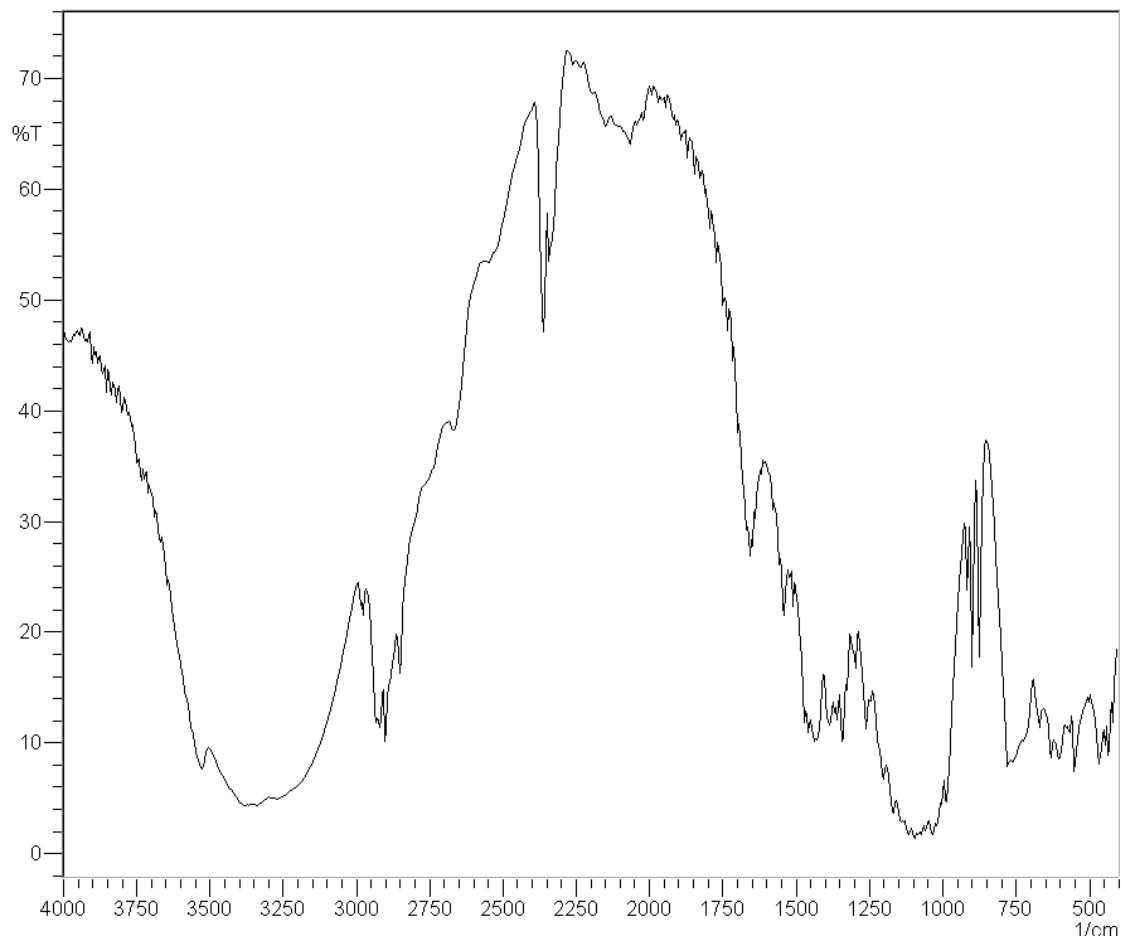


### 6.2.5.1 Validação

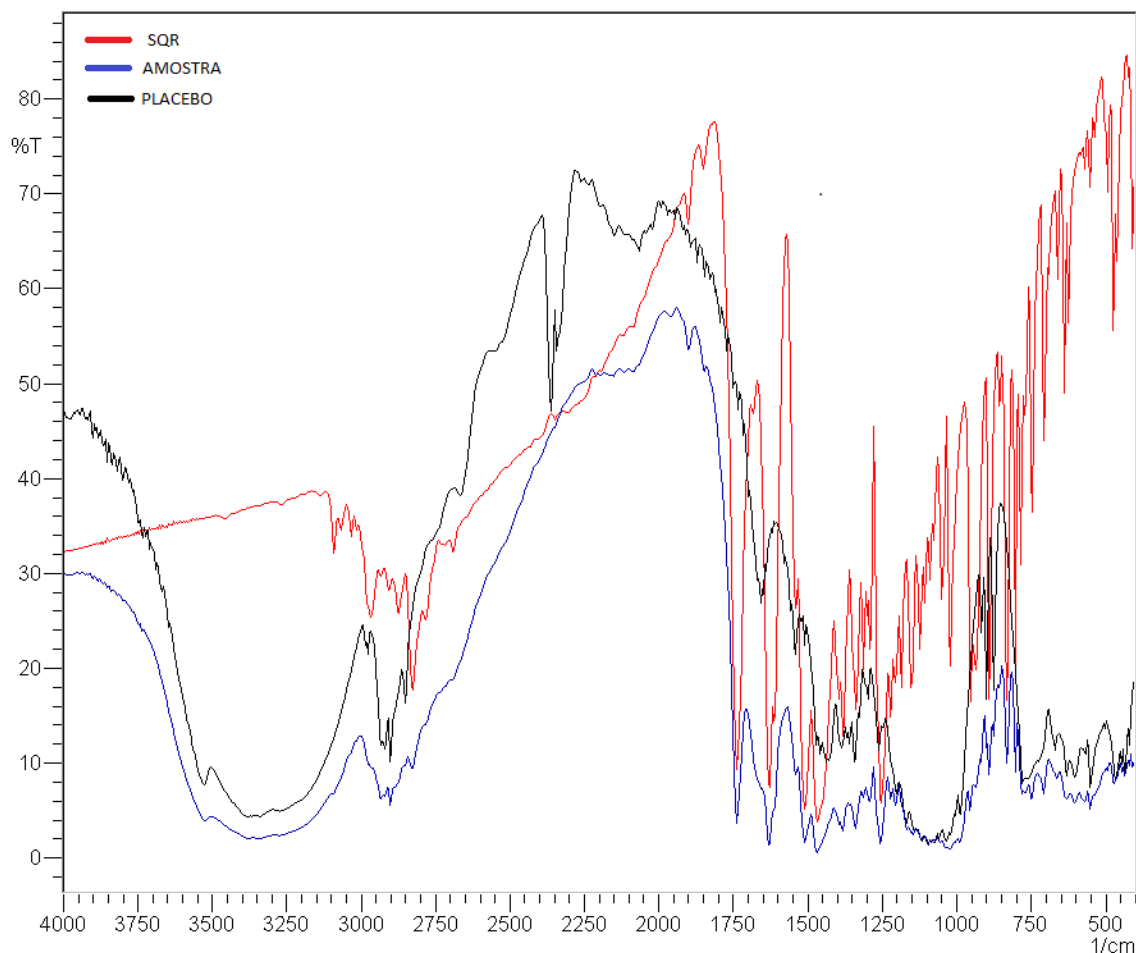
#### 6.2.5.1.1 Seletividade

O espectro de absorção na região do infravermelho médio obtido para o placebo é apresentado na Figura 15 e a sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho médio do enrofloxacino padrão secundário, comprimidos e do placebo é apresentado na Figura 16.

**Figura 15.** Espectro de absorção na região do infravermelho médio do placebo na concentração de 2,0 mg/pastilha de KBr.



**Figura 16.** Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho médio de enrofloxacino padrão secundário, comprimidos e placebo na concentração de 2,0 mg/pastilha de KBr.



Por meio desse parâmetro, observando os gráficos, a região espectral escolhida para a análise do teor por meio da absorvância foi a região espectral compreendida entre 1805,372 e 1689,643, correspondente a banda representante do estiramento da carbonila presente na estrutura química do enrofloxacino e que não está presente no espectro de absorção do placebo (Figura 16).

#### 6.2.5.1.2 Linearidade

Os resultados dos valores das áreas obtidas para a curva analítica de enrofloxacino padrão secundário estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Valores de absorvância referente a banda de estiramento da carbonila para obtenção da curva analítica do método de quantificação de enrofloxacino por espectrofotometria na região do infravermelho médio

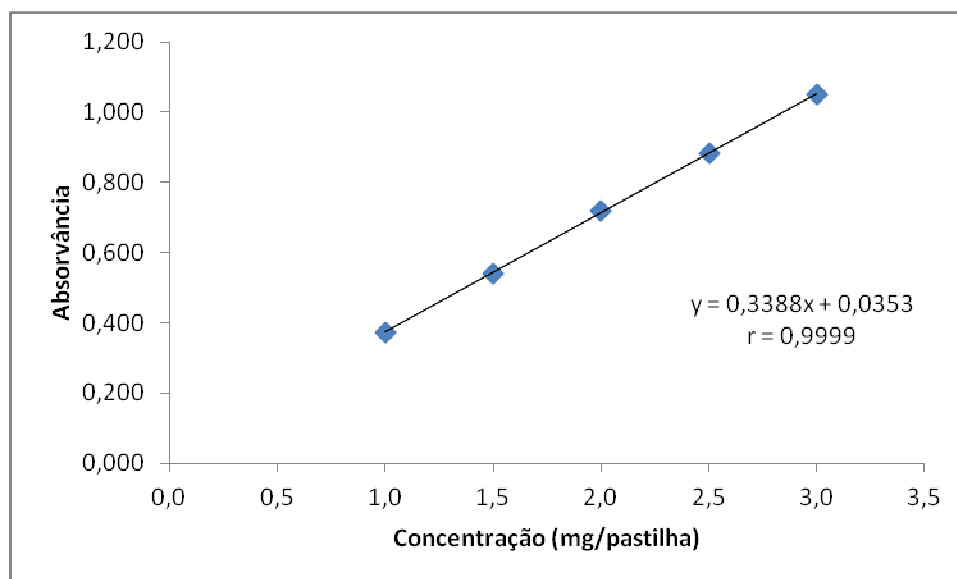
Concentração (mg/pastilha)	Absorvâncias*	Absorvância média	DPR (%)**
1,0	0,372	0,373	0,697
	0,376		
	0,372		
1,5	0,543	0,541	1,048
	0,534		
	0,545		
2,0	0,715	0,719	0,474
	0,721		
	0,720		
2,5	0,879	0,882	1,448
	0,871		
	0,896		
3,0	1,034	1,050	1,758
	1,045		
	1,070		

\*cada valor é a média de três determinações realizadas em um mesmo dia, durante três dias;

\*\*DPR(%) = desvio padrão relativo.

A curva analítica de enrofloxacino padrão secundário (Figura 17) foi construída com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 0,3388x + 0,0353$ , com coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9999.

**Figura 17.** Representação gráfica da curva analítica de enrofloxacino pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de enrofloxacino padrão secundário é apresentada na Tabela 18.

**Tabela 18.** Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados na obtenção da curva analítica de enrofloxacino padrão secundário, utilizando o método por IR

Fontes de variação	GL	Soma de quadrados	Variância	F calc	F tab
Entre concentrações	4	8,5635E-01	2,1409E-01	2532,57*	3,48
Regressão linear	1	8,5615E-01	8,5615E-01	10128,01*	4,96
Desvio da linearidade	3	1,9154E-04	6,3847E-05	0,76	3,71
Resíduo	10	8,4533E-04	8,4533E-05	-	-
Total	14	8,5719E-01	-	-	-

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

### 6.2.5.1.3 Precisão

A repetibilidade forneceu DPR% de 1,63%. Para a precisão interdias obteve-se valor de DPR% de 0,75%.

### 6.2.5.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi comprovada através da análise de pastilhas em três concentrações pré-estabelecidas. Os valores encontrados no teste de recuperação de enrofloxacino estão na Tabela 19.

**Tabela 19.** Determinação da exatidão do método analítico para análise de enrofloxacino por IR

Níveis	Enrofloxacino padrão secundário adicionado (mg)	Enrofloxacino padrão secundário encontrado* (mg)	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R <sub>1</sub>	1,6	1,59	99,40		
R <sub>2</sub>	2,0	1,98	99,09	98,0	2,21
R <sub>3</sub>	2,4	2,29	95,51		

\* média de três determinações

### 6.2.5.1.5 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O valor calculado para o limite de detecção foi de 0,12 mg e o limite de quantificação foi de 0,36 mg.

### 6.2.5.1.6 Robustez

Os resultados obtidos para a robustez do método para quantificação de enrofloxacino em comprimidos por espectrofotometria na região do infravermelho médio encontram-se na Tabela 20.

**Tabela 20.** Avaliação da robustez do método por espectrofotometria na região do infravermelho para análise de enrofloxacino

Variável	Alteração	<i>t</i> tab	<i>t</i> calc
Tempo de	5,0	2,78	1,48
compressão (min)	15,0	2,78	0,03
Força de	76	2,78	0,00
compressão (kN)	86	2,78	0,57

\* *t* tab = *t* tabelado; *t* calc = *t* calculado.

\*\* Tempo de compressão normal = 10 min

\*\*\* Força de compressão normal = 92 kN

#### 6.2.5.2 Cálculo do teor de enrofloxacino em comprimidos

O teor foi calculado em três dias consecutivos utilizando Equação 3 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 4, conforme apresentado na seção 6.2.3.4 e nas Tabelas 21 e 22.

**Tabela 21.** Teor de enrofloxacino em comprimidos em percentagem pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho médio

Dia	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR (%) interdia
1	99,53		
2	99,12	99,74	0,75
3	100,57		

\*DPR = desvio padrão relativo

**Tabela 22.** Teor de enrofloxacino em comprimidos em mg/pastilha pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho médio

<b>Dia</b>	<b>Teor (mg/pastilha)</b>	<b>Teor médio (mg/pastilha)</b>	<b>DPR (%) interdia</b>
1	1,99		
2	1,98	1,99	0,77
3	2,01		

\*DPR = desvio padrão relativo

### 6.2.6 Discussão

O primeiro parâmetro de validação realizado foi a seletividade. Através dele pode-se observar que a banda representante do estiramento da carbonila presente na estrutura química do enrofloxacino poderia ser usada para a análise quantitativa, medindo a sua absorvância, uma vez que esta banda só se mostra presente no espectro da amostra e da matéria prima, não sendo observada no espectro do placebo, indicando, assim, a seletividade do método proposto.

A curva analítica para enrofloxacino padrão secundário foi construída através da disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações, mostrando uma linearidade adequada na faixa entre 1,0 e 3,0 mg/pastilha, como mostrado na Figura 17. O coeficiente de correlação (r) apresentado foi de 0,9999, valor muito próximo à 1,0000, o que mostra a excelente linearidade do método. A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de enrofloxacino padrão secundário apresentada na Tabela 18 mostra que o método proposto não apresenta desvio de linearidade, a um nível de significância de 5%, já que o F calculado (0,76) mostrou-se menor que o F tabelado (3,71), confirmando a linearidade do método.

Os testes de repetibilidade e precisão interdia demonstraram DPR% adequados (abaixo de 5%), validando assim a precisão do método espectrofotométrico.

A quantidade de enrofloxacino presente nas amostras analisadas, 99,78%, encontra-se adequada, já que é bastante próxima de 100%, indicando a proximidade entre o valor teórico e o real presente nos comprimidos analisados.

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação através da adição de quantidade conhecida de enrofloxacino padrão secundário ao placebo, sendo

estimada a média de 98,0%, comprovando a capacidade do método de determinar teores pré-definidos de maneira exata.

As pequenas alterações realizadas para o teste de robustez não causaram interferência significativa nos resultados, demonstrando a robustez do método.

O ensaio para análise quantitativa por espectrofotometria na região do infravermelho médio tem ganhado destaque na literatura, como método alternativo para doseamento de fármacos, já que é um método que não produz resíduos ambientais, além de ter outras vantagens como rapidez de análise e o baixo custo, podendo ser adotado por indústrias do setor químico-farmacêutico. O nosso grupo de pesquisa já possui alguns artigos publicados nessa linha de pesquisa (TÓTOLI, SALGADO, 2012; MORENO, SALGADO, 2012; KOGAWA, SALGADO, 2013).

Enfim, os resultados experimentais permitiram o desenvolvimento e a validação de uma técnica limpa, tanto para o meio ambiente como para os operadores, rápida e de baixo custo de manutenção ambiental. Portanto, é uma técnica adequada para quantificar o enrofloxacino em comprimidos e pode ser utilizada como uma alternativa ambientalmente favorável em análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

## **6.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

### **6.3.1 Introdução**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação fundamentado na distribuição dos componentes de uma mistura (amostra) entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, sólida, contida em uma coluna cilíndrica (FB 5, 2010).

A CLAE é o método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como de uma imensa variedade de outros compostos de massa molar alta e / ou estabilidade térmica baixa. Possui como vantagens em relação aos outros métodos de quantificação o tempo reduzido de análise, alta resolução, adequada análise qualitativa, precisão e exatidão na análise quantitativa, versatilidade, boa detecção e mecanização (equipamento automático). Mesmo com tantas vantagens algumas limitações podem ainda ser citadas como o alto custo na instrumentação, alto custo de operação, falta de um bom detector universal e necessidade de experiência do operador (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Este método de análise é utilizado em várias áreas da ciência, com destaque para o acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos tanto como análise quantitativa quanto qualitativa, entre muitas outras aplicações (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

O enrofloxacino encontra-se descrito apenas na forma de matéria-prima na Farmacopeia Europeia (2010). O teste de substâncias relacionadas é realizado através da CLAE, onde utiliza-se coluna C<sub>18</sub> de 150 x 4,6 mm e 5 µm, temperatura de 40 °C, sendo a fase móvel composta de metanol e solução de ácido fosfórico (2,9 g/L) na proporção de 15:85 (v/v) previamente ajustado para pH 2,3 com trietilamina e tempo de retenção de 16 minutos para o enrofloxacino.

Buscando-se na literatura, outros métodos por CLAE são encontrados para a quantificação do enrofloxacino em diferentes matrizes, tais como formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e alimentos de origem animal (Tabela 23).

**Tabela 23.** Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de enrofloxacino utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna analítica Spherisorb Fenil (100 x 4,6 mm, 3 µm). Fase móvel: acetonitrila, metanol e água (15:2:83, v/v) contendo dodecanossulfonato 3 mM, octanossulfonato 1,5 mM, ácido fosfórico 0,4% (85%, v/v) e 0,4% (v/v) de trietilamina	UV-VIS e DAD: 278,6 nm	Soro e tecido prostático canino	20 minutos	Tyczkowska et al. (1989)
Coluna Wakosil II 5C <sub>18</sub> -HG (150 x 4,6 mm). Fase móvel: tampão fosfato 0,05 M (pH 2,4) e acetonitrila (80:20 v/v) contendo ácido 1-heptanossulfônico 2,5 mM	Fluorescência Excitação: 295 nm Emissão: 455 nm	Tecido de galinha	16 minutos	Horie et al. (1994)
Coluna analítica Spherisorb Fenil (250 x 4,6 mm, 3 µm). Fase móvel: acetonitrila, metanol, trietilamina e ácido fosfórico (85%) e água (9:9:0,45:0,4:81,15, v/v) contendo dodecanossulfonato 0,005 M	DAD: 278 nm	Leite e plasma de boi	16 minutos	Tyczkowska et al. (1994)

Continua na próxima página

**Tabela 23.** Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de enrofloxacino utilizando CLAE

<b>Condições</b>	<b>Sistema de detecção</b>	<b>Matrizes</b>	<b>Tempo de corrida aproximado</b>	<b>Referência</b>
Coluna analítica Shim-pack CLC-ODS (M) (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: acetato de sódio (pH 4,7; 0,1 M) e acetonitrila (60:40, v/v) pH 5,0	UV-vis 278 nm	Enrofloxacino injetável 5%	2,0 minutos	Souza, Bittencourt e Marsh (2002)
Coluna analítica C <sub>14</sub> Zorbax Bonus RP (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: ácido orto-fosfórico (pH 3,4; 0,05 M) e acetonitrila (87:13, v/v)	DAD 277 nm	Leite de cabra	10 minutos	Cinquina et al. (2003)
Coluna Spherisorb S5 C <sub>8</sub> (100 x 4,6 mm). Fase móvel: 0,16% de ácido orto-fosfórico com 20 mL de acetonitrila por litro (pH 3,0 ajustado com solução de hidróxido de tetrabutilamônio)	Fluorescência Excitação: 310 nm Emissão: 445 nm	Fezes de porco	12 minutos	Sunderland et al. (2004)

Continua na próxima página

**Tabela 23.** Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de enrofloxacino utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna Prodigy RP C <sub>18</sub> (250x4,6 mm, 5 µm). Fase móvel para análise do plasma: 16% acetonitrila, metanol [13:1, v/v] e 84% de água contendo 0,4% de trietilamina e 0,4% de ácido fosfórico [35%]. Fase móvel para análise de tecido endometrial: 14% de acetonitrila e 86% de água sem metanol	Fluorescência Excitação: 294 nm Emissão: 500 nm	Plasma e tecido endometrial de cavalos	14 minutos e 20 minutos	González et al. (2006)
Coluna X-Terra MS C <sub>18</sub> (50x2,1 mm, 2,5 µm). Gradiente, Fase móvel (A): solução aquosa de ácido acético 0,1%; Fase móvel (B): acetonitrila, água e ácido acético (90:10:0,1 v/v)	Espectro de massas	Músculo de vitela	10 minutos	Rubies et al. (2007)
Coluna analítica Pursuit RP C <sub>18</sub> (150x4,6 mm, 5 µm). Gradiente, Fase móvel (A): tampão fosfato 25 mM com pH 3,0 ajustado com trietilamina; Fase móvel (B): acetonitrila	Fluorescência Excitação: 278 nm Emissão: 445 nm	Plasma e secreção nasal de porcos	22 minutos	Bimazubute et al. (2008)

Continua na próxima página

**Tabela 23.** Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de enrofloxacino utilizando CLAE

Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
Coluna C <sub>18</sub> Genesis (50 x 2,1 mm; 4 µm). Fase móvel: Gradiente de 0,2% de ácido fórmico contendo 0,1 mM de ácido oxálico (A) e 100% de acetonitrila (B)	Espectro de massas	Músculo de boi e porco	7 minutos	Granelli et al. (2009)
Coluna Varian Pursuit XRs (250 x 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel: acetonitrila 17% e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM 83% com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (85%)	DAD: 270 nm	Água	10 minutos	Poliwoda, Krzyzak e Wieczorek (2010).
Coluna Neucleosil RP C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 10 µm). Fase móvel (A): solução aquosa de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,18% e acetonitrila (80:20 v/v) com pH 2,4. Fase móvel (B): solução aquosa de perclorato de sódio 0,65% e acetato de amônio 0,31% para ajustar o pH para 2,2 e ácido orto-fosfórico e acetonitrila (81:19 v/v)	UV-vis 294 nm	Injetável	20 minutos	Amin, Dessouki e Agwa (2011).
Coluna Waters XTerra MS C <sub>18</sub> (150 x 3,0 mm, 3,5 µm). Fase móvel: Gradiente com A: acetonitrila e B: ácido fórmico 0,1% em água com pH 2,74	DAD: 280 nm	Fígado de galinha	12 minutos	Moema, Nindi e Dubi (2012).

Com o objetivo de otimizar o sistema, foi desenvolvido um novo método analítico para quantificação de enrofloxacino por CLAE, utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e solução de ácido acético 5%, visando tornar o método mais simples, mais seguro para o operador e mais econômico e ainda minimizar os problemas que a presença de soluções-tampão na constituição de fases móveis poderia causar no sistema cromatográfico.

### 6.3.2 Ensaios preliminares

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

### 6.3.3 Material

A SQR e a forma farmacêutica comprimido utilizado neste trabalho estão descritas na seção 4.2 e 4.3.

Utilizaram-se como solventes: metanol grau CLAE (J.T. Baker e CARLO ERBA Reagents); água purificada (Milli-Q); ácido acético PA ACS (Vetec-Química Fina) nas concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0% v/v grau analítico. Os solventes foram filtrados através de membrana de nitrato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius) e degaseificados em ultra-som (Unique) durante 30 minutos. Foi utilizada membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de enrofloxacino-SQR e enrofloxacino comprimidos. As amostras foram pesadas em balança analítica (Sartorius) modelo CPA 225D. O pH da fase móvel foi medido em peagâmetro digital modelo PG 2000 (Gehaka) e degradadas em banho-maria modelo 314/3 (Nova Ética).

O sistema cromatográfico consiste em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters, composto de bomba cromatográfica gradiente quaternária Waters 2695, injetor automático e detector PDA (Phoyodiode Array Detector) Waters 2996; equipado com software Empower 3.0. Foram utilizadas colunas Eclipse Plus C18 Agilent 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4,6 mm), Kinetex Phenomenex<sup>®</sup> C18 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4,6 mm) e Agilent Zorbax C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm 5  $\mu\text{m}$ .

### **6.3.4 Método**

#### **6.3.4.1 Preparo da fase móvel**

As fases móveis foram compostas de diferentes proporções das soluções (solução aquosas de ácido acético 1,0, 2,5 e 5,0 %) e solventes (acetonitrila e metanol) e as misturas foram realizadas manualmente. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom durante 30 minutos para degaseificação antes do uso.

#### **6.3.4.2 Preparo da solução de enrofloxacino-SQR**

No preparo das soluções, 2,5 mg de enrofloxacino SQR foram pesados e transferidos com auxílio de 5 mL de metanol para balão volumétrico âmbar de 25 mL. Em seguida, levou-se a solução ao ultrassom por 30 minutos, completando, por fim, o volume com a fase móvel (solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (75:25) v/v) para a obtenção de solução com concentração de 100 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25 mL para gerar soluções com a concentração final requerida e completada até o menisco com fase móvel. As soluções foram filtradas utilizando-se filtros de seringa de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

#### **6.3.4.3 Preparo da solução de enrofloxacino em comprimidos**

Foram pesados, a partir do peso médio de 20 comprimidos, o equivalente a 2,5 mg de enrofloxacino e transferidos com auxílio de 5 mL de metanol para balão volumétrico âmbar de 25 mL. Em seguida, levou-se a solução ao ultrassom por 30 minutos, completando, por fim, o volume com a fase móvel (solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (75:25) v/v) para a obtenção de solução com concentração de 100 µg/mL. Alíquota de 2,5 mL desta solução foi transferida para balões volumétricos âmbar de 25 mL para gerar soluções com a concentração final de 10 µg/mL e completada até o menisco com fase móvel. As soluções foram filtradas utilizando-se filtros de seringa de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

#### **6.3.4.4 Preparo da solução de placebo**

No preparo da solução placebo, 2,5 mg de excipiente (seção 4.5) foram pesados e transferidos com auxílio de 5 mL de metanol para balão volumétrico âmbar de 25 mL. Em seguida, levou-se a solução ao ultrassom por 30 minutos, completando, por fim, o volume com a fase móvel (solução aquosa de ácido acético 5%: metanol (75:25) v/v)

para a obtenção de solução com concentração de 100 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25 mL para gerar soluções com a concentração final requerida e completada até o menisco com fase móvel. As soluções foram filtradas utilizando-se filtros de seringa de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

### 6.3.5 Desenvolvimento do Método

Diversas condições cromatográficas foram testadas, a fim de encontrar aquela que permitisse a quantificação confiável do fármaco, verificação da presença de produto de degradação, redução da assimetria do pico, redução de danos ao sistema cromatográfico, além de diminuir a geração de resíduos. As condições testadas durante o desenvolvimento do método estão apresentadas na Tabela 24.

**Tabela 24.** Condições testadas durante o desenvolvimento do método por CLAE específico - indicativo de estabilidade para a determinação de enrofloxacino em comprimidos

Fase móvel	Proporção (v/v)	Coluna
ácido acético 5%: metanol*	70:30	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm
ácido acético 2,5%: metanol*	70:30	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm
ácido acético 1%: metanol *	70:30	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm
ácido acético 5%: metanol**	65:35	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm
ácido acético 5%: metanol**	65:35	Agilent Eclipse Plus C <sub>18</sub> 250x4,6 mm 5 µm
água : metanol pH 3,5 ajustado com TFA**	60:40	Agilent Eclipse Plus C <sub>18</sub> 250x4,6 mm 5 µm
água:metanol pH 3,14 ajustado com TFA**	70:30	Agilent Eclipse Plus C <sub>18</sub> 250x4,6 mm 5 µm
água : metanol pH 3,5 ajustado com TFA**	65:35	Agilent Eclipse Plus C <sub>18</sub> 250x4,6 mm 5 µm
ácido acético 2,5%: metanol**	80:20	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm
ácido acético 2,5%: metanol**	75:25	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm
ácido acético 5%: metanol**	75:25	Agilent Zorbax C <sub>18</sub> 150x4,6 mm 5 µm

\*A segunda diluição do preparo da amostra de 20 µg/mL foi realizada com água.

\*\*A segunda diluição do preparo da amostra de 20 µg/mL foi realizada com a própria fase móvel.

De acordo com os resultados obtidos, os parâmetros estabelecidos para desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE estão apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25.** Parâmetros estabelecidos para a determinação de enrofloxacino em comprimidos, pelo método por CLAE específico - indicativo de estabilidade

<b>Fase móvel</b>	ácido acético 5% : metanol (75:25 v/v)
<b>Coluna</b>	Eclipse Plus Agilent Zorbax C18 (150x4,6 mm 5 µm)
<b>Vazão</b>	1,0 mL/min
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Comprimento de onda</b>	278 nm
<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Solvente</b>	Fase móvel

### 6.3.6 Validação do método analítico por CLAE

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP, 2012). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

#### 6.3.6.1 Especificidade/Seletividade e estudos de estresse

A especificidade/seletividade é a habilidade de um método analítico medir a resposta do analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005). Estes termos são empregados indistintamente ou com diferentes interpretações. No caso de métodos indicativos de estabilidade, para se considerar um método “específico indicativo de estabilidade” este deve ser capaz de medir de forma inequívoca o (s) fármaco, na presença de produtos de degradação, adjuvantes e aditivos que poderão estar presente na formulação. No caso de ser “seletivo indicativo de estabilidade” o método deve ser capaz de medir inequivocadamente o (s) fármaco e todos os produtos de degradação na presença de adjuvantes e aditivos, que se espera estar presente na formulação (BAKSHI, SINGH, 2002).

A capacidade indicadora de estabilidade e de especificidade do método foi determinada submetendo a solução de enrofloxacino comprimidos à degradação acelerada por condições ácida, básica, oxidativa neutra e fotolítica para avaliar a interferência na quantificação de enrofloxacino nos comprimidos (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005). Todas as amostras foram diluídas para concentração de 10,0 µg/mL em balão volumétrico âmbar de 25,0 mL e filtradas antes da injeção, partindo de uma solução mãe de 100 µg/mL preparada de acordo com o descrito na seção 6.3.3.3.

- *Degradação oxidativa*: foi transferida alíquota de 2,5 mL da solução mãe da amostra para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a solução de peróxido de hidrogênio 3% para a obtenção de solução com concentração de 10,0 µg/mL. Esta solução foi exposta à temperatura de 66 °C em banho-maria por 1h.
- *Degradação ácida e alcalina*: foi transferida alíquota de 5,0 mL da solução mãe da amostra para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a solução de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M para a obtenção de soluções com concentração de 20,0 µg/mL. Estas soluções foram expostas a temperatura de 66 °C em banho-maria por 1h. Para a análise por CLAE as amostras foram neutralizadas com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, ficando na concentração de 10 µg/mL.
- *Degradação neutra*: foi transferida alíquota de 2,5 mL da solução mãe da amostra para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água para a obtenção de solução com concentração de 10,0 µg/mL. Esta solução foi exposta a temperatura de 66 °C em banho-maria por 1 h.
- *Degradação fotolítica*: foi transferida alíquota de 2,5 mL da solução mãe da amostra para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel para a obtenção de solução com concentração de 10,0 µg/mL. Esta solução foi exposta à luz UVA (320 a 400 nm) e visível (400 a 700 nm) ao mesmo tempo em câmara UV-vis por 1 h.

Desta maneira, a capacidade indicadora de estabilidade e especificidade do método cromatográfico foi estabelecida através da resolução obtida entre o pico principal do enrofloxacino e seus produtos de degradação e da pureza do pico do enrofloxacino nos cromatogramas. Além disso, uma solução do excipiente da

formulação farmacêutica (placebo) foi analisada pelo método para indicar a seletividade do mesmo.

#### **6.3.6.2 Linearidade**

Para a curva analítica foram preparadas soluções de enrofloxacino-SQR na concentração de 100 µg/mL (solução mãe), conforme descrito na seção 6.3.3.2. A partir da solução mãe, foram transferidas alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mL para balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações finais de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 µg/mL. As curvas analíticas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada a análise de variância (ANOVA), para análise de parâmetros estatísticos. Também foi avaliado o coeficiente de correlação.

#### **6.3.6.3 Precisão**

Foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária.

Para o ensaio de repetibilidade, sete réplicas da solução de enrofloxacino-SQR com concentração de 10 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, mesmo analista e no mesmo laboratório. O desvio padrão relativo (DPR%) entre as análises foi calculado.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR%) obtido no cálculo do teor da solução de enrofloxacino comprimidos com concentração de 10 µg/mL em três dias consecutivos. Além disso foi realizada análise do teor por analistas diferentes em dois dias diferentes, calculando e comparando o desvio padrão relativo (DPR%) para as respostas obtidas pelos diferentes analistas.

#### **6.3.6.4 Exatidão**

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração 80 (R1), 100 (R2) e 120% (R3) em relação à concentração de trabalho, de solução de enrofloxacino-SQR e às soluções de placebo. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 8,0; 10,0 e 12,0 µg/mL em balões volumétricos de 25 mL. A

porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira foi possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 26.

**Tabela 26.** Preparo das soluções de enrofloxacino para o teste de recuperação do método CLAE específico- indicativo de estabilidade

	<b>Volume adicionado de Excipiente (100 µg/mL) (mL)</b>	<b>Volume adicionado de ENRO-SQR (100 µg/mL) (mL)</b>	<b>Concentração teórica final (µg/mL)</b>
Excipiente	2,5	-	0,0
R <sub>1</sub>	2,5	2,0	8,0
R <sub>2</sub>	2,5	2,5	10,0
R <sub>3</sub>	2,5	3,0	12,0
SQR	-	2,5	10,0

#### 6.3.6.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de 7 variações nas condições cromatográficas (Tabela 27). Realizou-se a análise do teor de enrofloxacino em comprimidos nas diferentes condições, avaliando as alterações de modo isolado e simultâneo, aplicando o Teste de Youden e Steiner. O teste de Youden e Steiner permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2011).

**Tabela 27.** Condições cromatográficas alteradas no ensaio de robustez no desenvolvimento de método cromatográfico para determinação de enrofloxacino em comprimidos

Parâmetro	Condição normal	Variação
A/a Fabricante da Coluna	Agilent – A	Phenomenex – a
B/b Vazão	1,0 mL/min – B	0,9 mL/min – b
C/c Temperatura	25 °C – C	30 °C – c
D/d Variação da concentração do metanol na Fase móvel	25% - D	24,8% - d
E/e Tempo de extração	30 min – E	25 min – e
F/f Concentração da solução aquosa de ácido acético	5% – F	4,8% – f
G/g Marca do metanol	J.T. Baker – G	Carlo Erba - g

A coluna utilizada para realizar o ensaio de robustez é considerada equivalente em termos de separação cromatográfica, sendo realmente diferente apenas em relação ao fabricante, já que através da comparação de colunas pelo programa USP-PQRI (U.S. Pharmacopeial Convention - Product Quality Research Institute) de selecionar colunas de seletividade equivalente utilizando um valor F. Entre as colunas utilizadas na robustez o F encontrado foi de 2,13, ou seja, menor que 3, o que indica boa similaridade (USP, 2014).

Na Tabela 28 é apresentada a combinação fatorial utilizada no teste, no qual letras maiúsculas referem-se às condições normais do método analítico e letras minúsculas às alterações dos parâmetros analíticos.

**Tabela 28.** Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden e Steiner

Parâmetro analítico	Combinação Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Marca da coluna	A	A	A	A	a	a	a	a
Vazão	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura	C	c	C	c	C	c	C	c
Concentração de metanol na FM	D	D	d	d	d	d	D	D
Tempo de extração	E	e	E	e	e	E	e	E
Concentração do ácido acético	F	f	f	F	F	f	f	F
Marca do metanol	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Foi realizado um teste, analisando, nas diferentes condições simultaneamente, a robustez em relação ao teor de enrofloxacino nos comprimidos. Em cada ensaio foram avaliadas as soluções de enrofloxacino-SQR e enrofloxacino comprimidos.

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

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

em que:

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

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

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

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

Equação 9

em que:

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

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

#### 6.3.6.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram estimados a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, conforme as Equações 6 e 7, descritas na seção 6.2.4.6, respectivamente.

#### 6.3.6.7 Adequabilidade do sistema

Para assegurar o desempenho do cromatógrafo a líquido antes e durante a realização das análises, foram efetuadas seis injeções da mesma solução de enrofloxacino-SQR na concentração de 10 µg/mL, avaliando o desvio padrão relativo (DPR%) dos parâmetros de tempo de retenção e área do pico e também através dos valores de assimetria do pico ( $S$ ), número de pratos ( $N$ ), fator de capacidade ( $k'$ ) e pureza do pico.

O número de pratos ( $N$ ) é definido como uma medida da eficiência da coluna cromatográfica e é calculado pela Equação 10 (FB 5, 2010; JP, 2011, USP, 2012).

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

em que:  $t_r$  = tempo de retenção da substância analisada

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

O fator capacidade ( $k'$ ) é a medida da posição do pico de interesse relativo ao volume morto (composto não retido) (FDA, 1994; USP, 2012), e calcula-se pela Equação 11.

$$k' = (t_r - t_0) / t_r \quad (\text{Equação 11})$$

em que:  $t_r$  = tempo de retenção da substância analisada  
 $t_0$  = tempo do composto não retido (volume morto)

O fator de simetria ( $S$ ) é calculado pela Equação 12 (FB 5, 2010; JP, 2011; USP, 2012).

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

em que:  $W_{0,05h}$  = largura do pico medido a 5% da sua altura  
 $f$  = distância entre a linha perpendicular do pico máximo e a tangente do pico a 5% da altura do pico.

A pureza do pico foi calculada pelo próprio *software* do equipamento. São gerados dois valores para o pico de interesse que é o *purity angle* e o *purity threshold*, devendo o primeiro valor ser menor que o segundo para considerar o pico de interesse puro.

#### **6.3.6.8 Estabilidade da solução de enrofloxacino**

Para avaliar a estabilidade da solução de enrofloxacino, foi preparada uma amostra de trabalho de enrofloxacino na concentração de 10 µg/mL, conforme descrito no item 6.3.3.3 e foi armazenada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz em frasco âmbar por 24 horas.

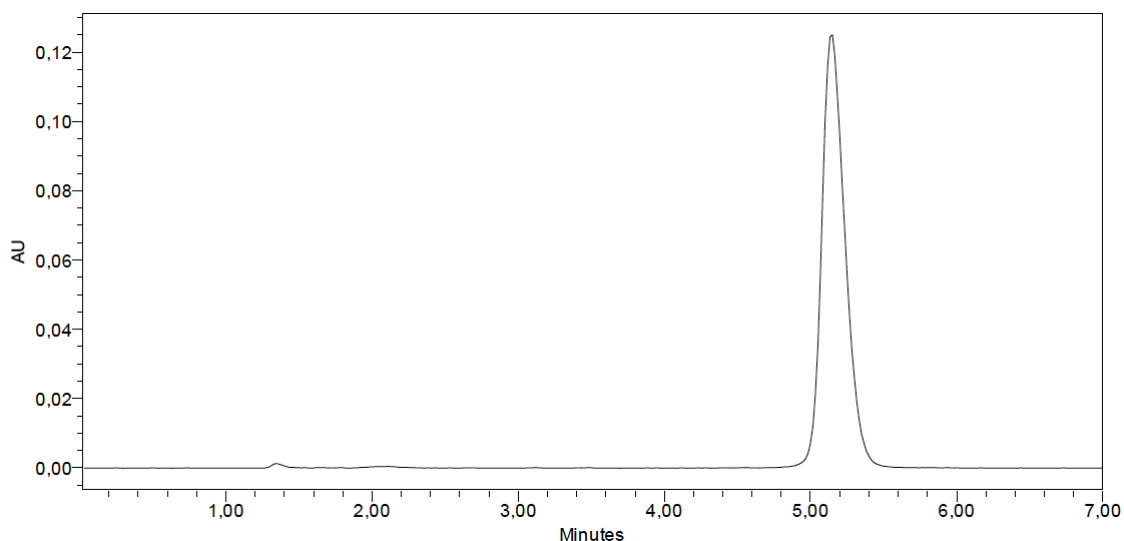
#### **6.3.7 Cálculo do teor dos comprimidos de enrofloxacino**

O teor foi calculado com base nos resultados de áreas obtidos em três dias consecutivos pelo mesmo analista, utilizando as Equações 3 e 4 descritas na seção 6.2.3.4.

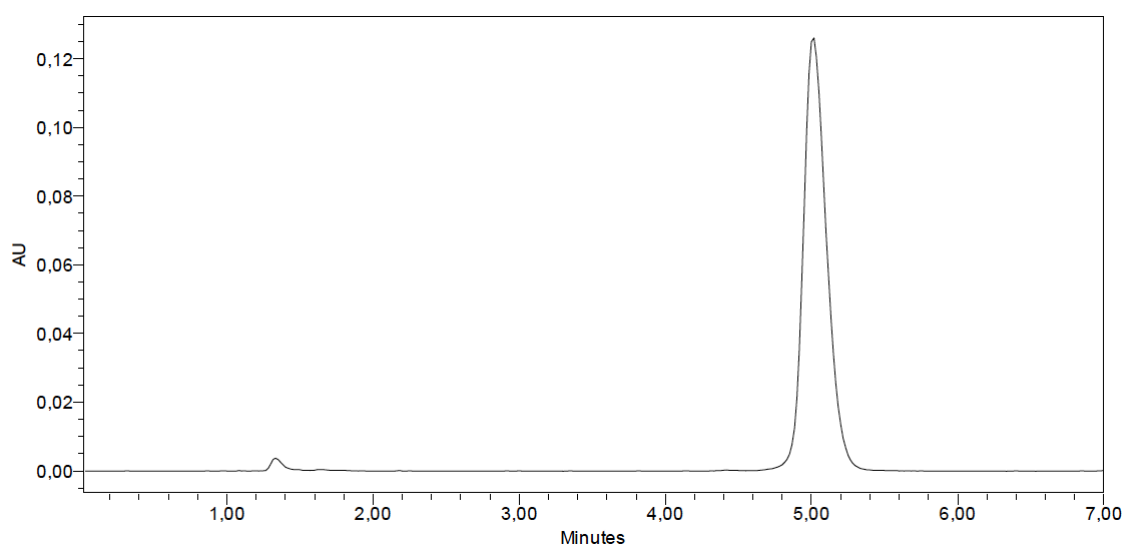
#### **6.3.8 Resultados**

Os cromatogramas obtidos com o método proposto são apresentados nas Figuras 18 e 19, para enrofloxacino-SQR e comprimidos, respectivamente.

**Figura 18.** Cromatograma de enrofloxacino-SQR (10,0 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: solução aquosa de ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm).



**Figura 19.** Cromatograma de enrofloxacino em comprimidos (10,0 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: solução aquosa de ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Agilent Zorbax C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm).



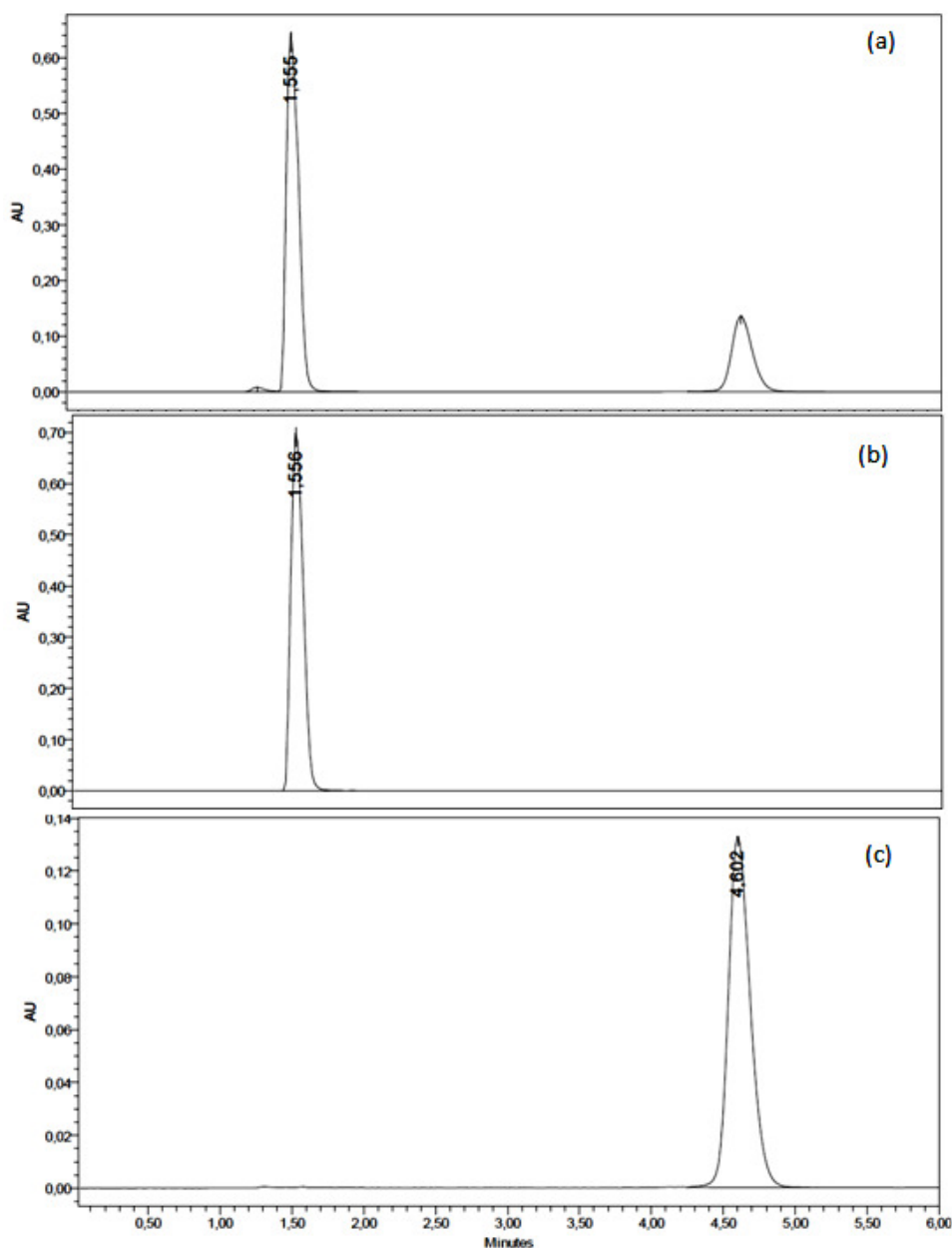
### 6.3.8.1 Validação

#### 6.3.8.1.1 Especificidade/Seletividade e estudos de estresse

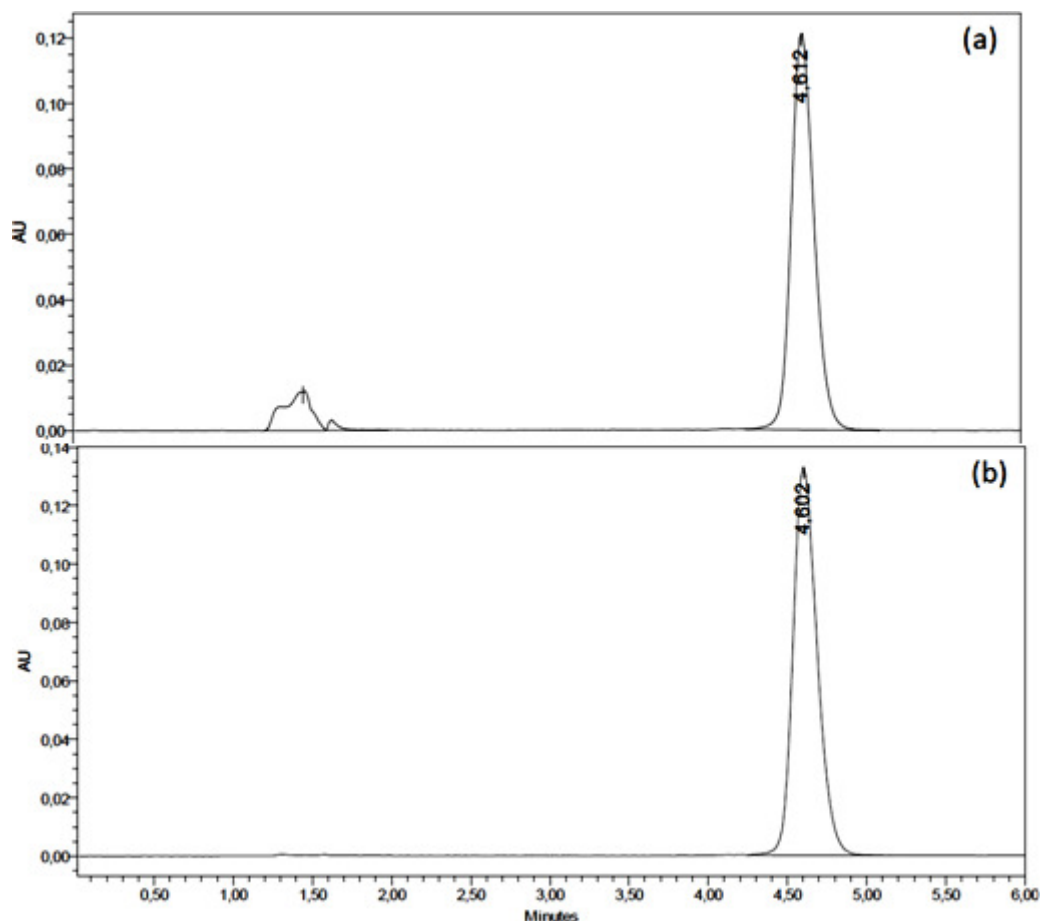
As Figuras 20 a 24 mostram os cromatogramas obtidos após as degradações forçadas, com picos correspondentes aos produtos de degradações (picos com tempo de retenção inferior a 4,7 minutos) bem resolvidos do pico principal do enrofloxacino

(tempo de retenção: 4,7 minutos). Assim, foi demonstrada a especificidade do método para a análise de comprimidos de enrofloxacin.

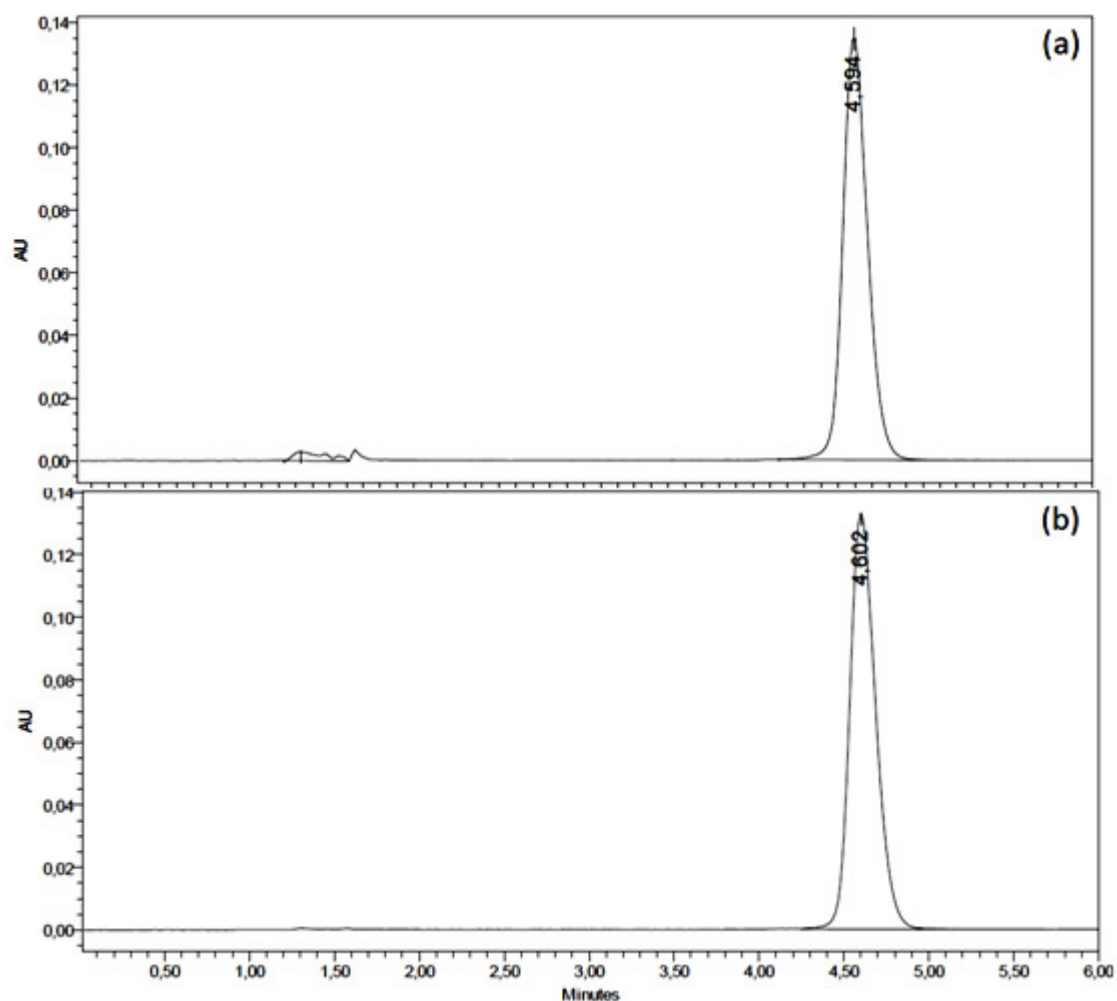
**Figura 20.** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacin em comprimidos (10 µg/mL), em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax® C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,6 minutos. Amostra submetida à degradação oxidativa (a); solução de peróxido de hidrogênio 3% (b) e amostra íntegra (c).



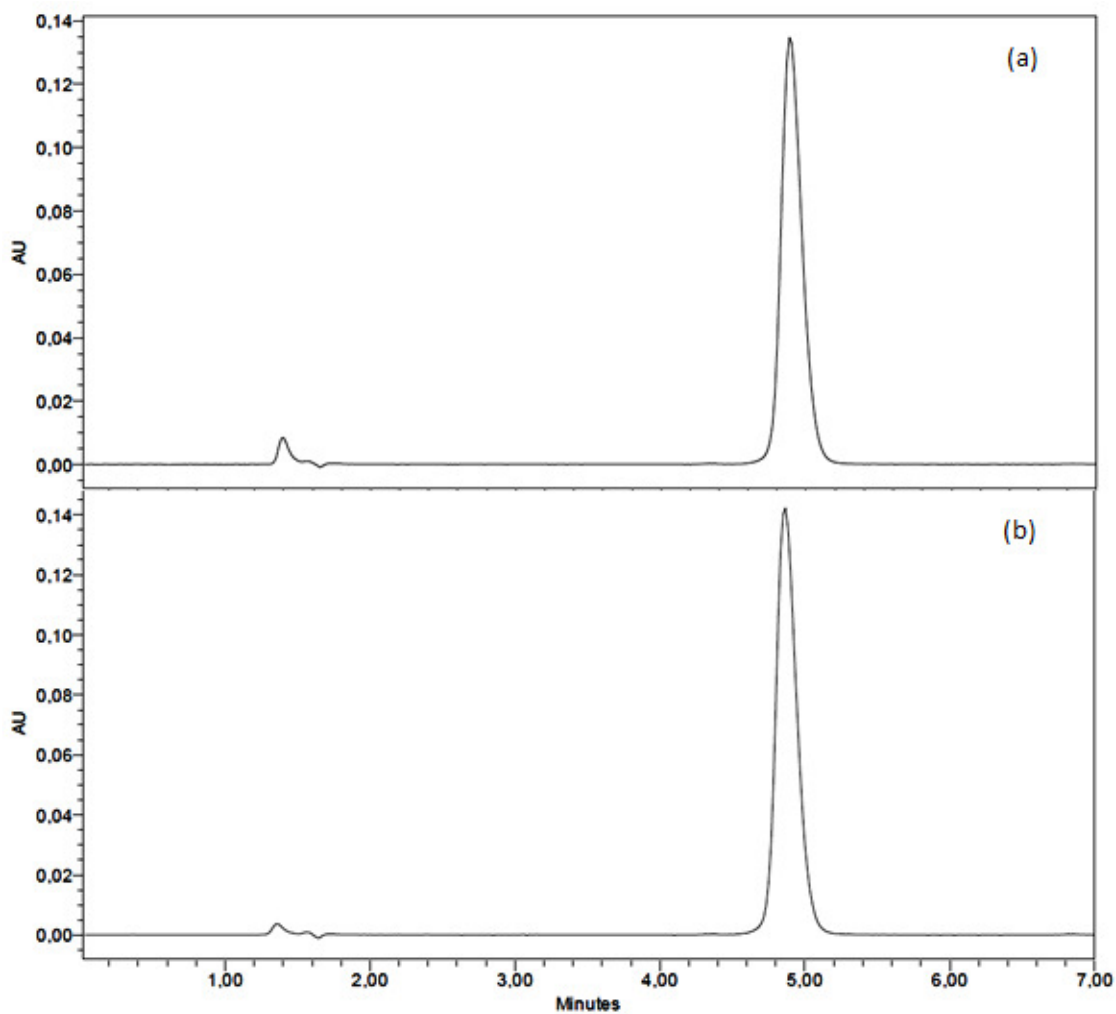
**Figura 21.** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em HCl 0,01 M, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax® C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,6 minutos. Amostra submetida à degradação ácida (a) e amostra íntegra (b).



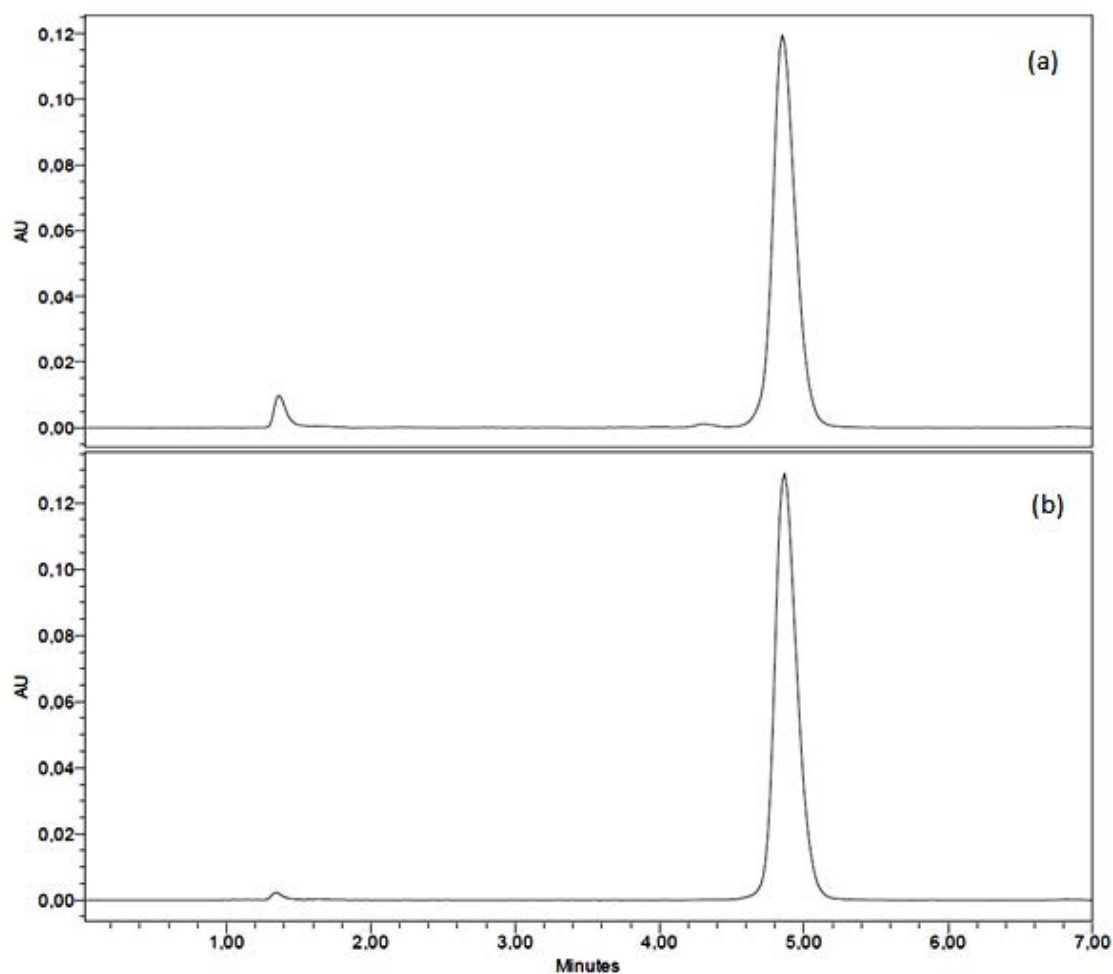
**Figura 22.** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em NaOH 0,01 M, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax® C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,6 minutos. Amostra submetida à degradação (a) e amostra íntegra (b).



**Figura 23.** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em água, em temperatura de 66 °C por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax® C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,8 minutos. Amostra submetida à degradação neutra (a); amostra íntegra (b).

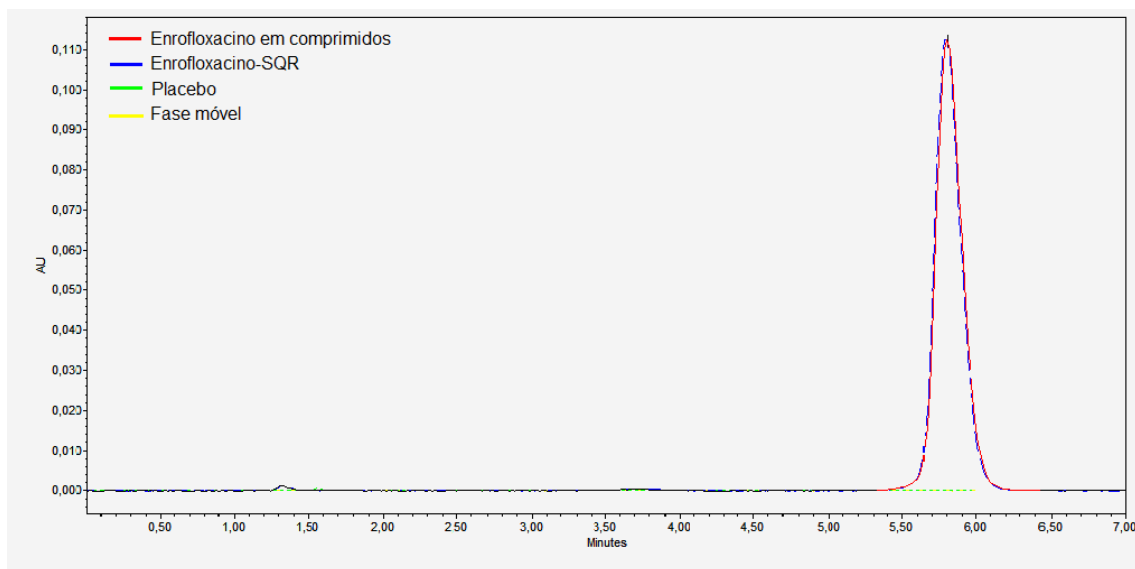


**Figura 24.** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), em fase móvel, exposto em câmara UV por 1 hora. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax® C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm. Tempo de retenção: 4,8 minutos. Amostra submetida à degradação fotolítica (a); amostra íntegra (b).



A Figura 25 mostra os cromatogramas do enrofloxacino-SQR, enrofloxacino em comprimidos, placebo e fase móvel sobrepostos, indicando que não há interferência do placebo e da fase móvel na análise do pico do enrofloxacino na amostra e no padrão, confirmando a especificidade do método para a análise de enrofloxacino.

**Figura 25.** Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de enrofloxacino em comprimidos (10 µg/mL), enrofloxacino-SQR (10 µg/mL), placebo (10 µg/mL) e fase móvel. Fase móvel: ácido acético 5% : metanol (75:25, v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax® C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm.



#### 6.3.8.1.2 Linearidade

Os resultados dos valores das áreas obtidas para a curva analítica de enrofloxacino-SQR estão apresentados na Tabela 29.

**Tabela 29.** Valores das áreas referentes ao pico de enrofloxacino-SQR para obtenção da curva analítica do método cromatográfico, utilizando como fase móvel ácido acético 5%:metanol (75:25, v/v) a 278 nm

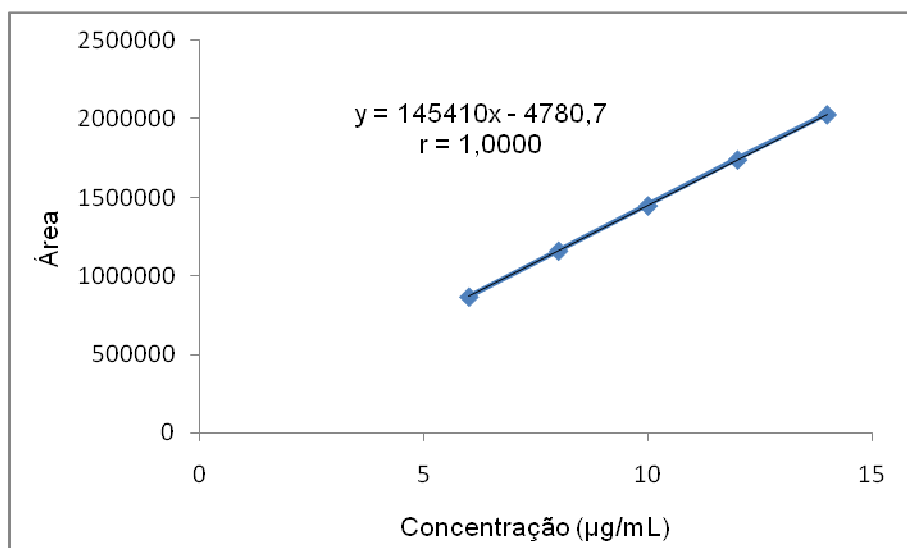
Concentração (µg/mL)	Áreas*	Área média	DPR (%)**
	853989		
6,0	874988	866461	1,27
	870407		
	1142670		
8,0	1173657	1160217	1,37
	1164324		
	1423734		
10,0	1467895	1448529	1,56
	1453957		
	1719070		
12,0	1758289	1741470	1,16
	1747052		
	1991164		
14,0	2065061	2029939	1,83
	2033591		

\*cada valor é a média de três determinações realizadas em um mesmo dia, durante três dias;

\*\*DPR (%) = desvio padrão relativo percentual.

A curva analítica de enrofloxacino-SQR (Figura 26) foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 145410x - 4780,7$ , com coeficiente de correlação (r) igual a 1,0000.

**Figura 26.** Curva analítica da enrofloxacino-SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel. Fase móvel: ácido acético 5%:metanol (75:25 v/v). Fase estacionária: Eclipse Plus Zorbax C18 Agilent (150 x 4,6 mm), 5 µm. Vazão: 1,0 mL/min. Comprimento de onda: 278 nm.



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de enrofloxacino-SQR é apresentada na Tabela 30.

**Tabela 30.** Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de enrofloxacino-SQR utilizando o método de CLAE específico indicativo de estabilidade

Fontes de variação	GL	Soma de quadrados	Variância	F calc	F tab
Entre concentrações	4	2,5373E+12	6,3433E+11	1189,05*	3,48
Regressão linear	1	2,5359E+12	2,5359E+12	4753,59*	4,96
Desvio da linearidade	3	1,3938E+09	4,6459E+08	0,87	3,71
Resíduo	10	5,3348E+09	5,3348E+08		
Total	14	2,5427E+12			

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

#### 6.3.8.1.3 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no desvio padrão relativo. Sete soluções de enrofloxacino-SQR preparadas na concentração de 10,0 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, fornecendo DPR de 0,11%.

Os resultados da precisão interdias, realizada através de análises do padrão e da amostra em três dias consecutivos, e precisão entre-analistas (intermediária), estão apresentados na Tabela 31.

**Tabela 31.** Valores determinados para a precisão interdias e entre-analistas do método para enrofloxacino em comprimidos por CLAE

Dia	Interdias				Entre-analistas				
	Teor (mg/comp.)	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR* (%)	Analista	Teor (mg/comp.)	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR* (%)
1	15,11	101,69			A dia 1	14,91	99,59		
2	14,75	99,24	100,94	1,46	B dia 1	15,09	100,79	100,19	0,79
3	15,14	101,88			A dia 2	15,12	101,56		
					B dia 2	14,88	100,00	100,78	1,09

\*DPR= desvio padrão relativo

**6.3.8.1.4 Exatidão**

A exatidão do método foi comprovada através da análise de soluções em três concentrações pré-estabelecidas. Os valores encontrados no teste de recuperação de enrofloxacino utilizando CLAE estão na Tabela 32.

**Tabela 32.** Preparo das soluções de enrofloxacino para o teste de recuperação do método CLAE específico- indicativo de estabilidade

	Conc. ENRO-SQR adicionada (µg/mL)	Conc. ENRO-SQR encontrada* (µg/mL)	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)	DPR** (%)
R <sub>1</sub>	8	8,01	100,14		
R <sub>2</sub>	10	10,01	100,15	100,14	0,01
R <sub>3</sub>	12	12,02	100,13		

\*média de três determinações

\*\*DPR= desvio padrão relativo

**6.3.8.1.5 Robustez**

Foi determinada pelos testes de Youden e Steiner (Tabela 27). Foi realizado um teste, analisando, nas diferentes condições simultaneamente, a robustez em relação ao teor de enrofloxacino nos comprimidos e aplicou-se as Equações 8 e 9 para avaliação da

significância dos efeitos. Nenhum efeito apresentou resultado significativo. Os resultados obtidos no teste de Youden e Steiner são apresentados na Tabela 33. O valor de referência obtido na Equação 9 foi de 5,05 de modo que qualquer valor acima deste, é considerado significativo.

**Tabela 33.** Resultados de cada variação obtidos nos Testes de Youden e Steiner

<b>Teste de Youden e Steiner</b>	
<b>Efeito</b>	<b>Teor *(%)</b>
Marca da coluna	$98,91 - 100,20 = -1,29$
Vazão	$98,13 - 100,98 = -2,85$
Temperatura	$98,12 - 100,99 = -2,87$
Concentração de metanol na FM	$101,27 - 97,84 = 3,43$
Tempo de extração	$101,40 - 97,72 = 3,68$
Concentração do ácido acético	$99,97 - 99,14 = 0,83$
Marca do metanol	$99,13 - 99,98 = -0,86$

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

\*\*Critério de referência calculado: 5,05.

#### 6.3.8.1.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os valores calculados para LD e LQ pelo método cromatográfico foram 0,18 µg/mL e 0,54 µg/mL, respectivamente.

#### 6.3.8.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foi verificada pela análise quantitativa, através do cálculo dos desvios padrões relativos (DPR%) do tempo de retenção e área do pico principal de seis injeções da mesma solução de enrofloxacino-SQR e através dos valores de assimetria do pico, número de pratos, fator capacidade e pureza de pico. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 34 e 35.

**Tabela 34.** Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para o enrofloxacino

<b>Parâmetros avaliados</b>					
<b>Recomendação (FDA, 2000)</b>	<b><math>S \leq 2</math></b>	<b><math>k' &gt; 2</math></b>	<b><math>N &gt; 2000</math></b>	<b>-</b>	<b>-</b>
	<b>Fator de assimetria</b>	<b>Fator de retenção</b>	<b>Pratos</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Área</b>
	1,25	2,203	4958,82	5,12	1426088
	1,25	2,204	4980,17	5,13	1418908
	1,25	2,199	4962,70	5,12	1430597
	1,23	2,198	4960,76	5,12	1428877
	1,25	2,199	4962,70	5,12	1419763
	1,29	2,198	4974,34	5,12	1423339
Média	1,25	2,200	4966,58	5,12	1424595
DPR (%)	1,57	0,13	0,17	0,09	0,33

\*DPR= desvio padrão relativo

**Tabela 35.** Parâmetro de pureza de pico avaliado na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para o enrofloxacino

<b>Pureza de pico</b>	
<b><i>Purity angle*</i></b>	<b><i>Purity threshold</i></b>
0,151	0,343
0,156	0,342
0,161	0,351
0,165	0,359
0,158	0,349
0,163	0,355

\**Purity angle* deve ser menor que *Purity threshold* (EMPOWER).

### 6.3.8.3 Cálculo do teor dos comprimidos de enrofloxacino

O teor obtido para os comprimidos de enrofloxacino através do método cromatográfico está apresentado na seção 6.3.7.1.3 na Tabela 30.

### 6.3.8.4 Estabilidade da solução de enrofloxacino

A solução de enrofloxacino foi estável por, pelo menos, 24 horas quando armazenada em temperatura ambiente, apresentando teor inicial de 99,68% e após 24 horas foi de 99,74%, apresentando DPR% entre eles de 0,04%.

## 6.3.9 Discussão

### 6.3.9.1 Desenvolvimento do método

A CLAE é considerada uma das técnicas mais eficientes para separação, detecção e quantificação de fármacos (FB 5, 2010). Durante o desenvolvimento do método analítico proposto neste trabalho, diversas fases móveis, colunas e solventes foram testados, a fim de se obter as melhores condições para a validação e aplicação do método cromatográfico específico indicativo de estabilidade para análise quantitativa de enrofloxacino em comprimidos.

Inicialmente os resultados não foram satisfatórios em vista de o pico do enrofloxacino ter apresentado-se muito próximo ao volume morto, apresentado tempo de retenção considerado longo ou por não ter sido simétrico. Foi possível verificar que quanto maior a proporção de solvente polar, menor foi o tempo de corrida, concordando com a literatura (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; LANÇAS, 2009).

Apesar do enrofloxacino em pH 2,6 ser solúvel mais em meio aquoso, como já descrito anteriormente, ou seja, possuir maior afinidade pela fase móvel, na condição de solução aquosa de ácido acético 5% e metanol (65:35, v/v), o fármaco interage em maior quantidade com a fase móvel, apresentando um tempo de retenção muito próximo ao volume morto, o que não é interessante. Já na condição de solução aquosa de ácido acético 5% e metanol (75:25, v/v), é observado que o fármaco interage de forma equilibrada tanto com a fase estacionária quanto com a fase móvel, o que gera um tempo de análise adequado e um pico bem resolvido em relação ao volume morto. Enfim, foram obtidos resultados satisfatórios depois de diversas tentativas, ao utilizar a fase móvel composta por ácido acético 5%: metanol pH 2,6 (75:25, v/v).

Em seguida, foram testados, como solventes para a segunda diluição no preparo das amostras, água e fase móvel. Ao utilizar água, o pico obtido foi assimétrico e ao utilizar fase móvel, foi simétrico, por isso, foi escolhida como solvente para o preparo das soluções.

A coluna menor (150 x 4,6 mm) foi escolhida, pois apresentou maior número de pratos do que a coluna maior. O que ocorre normalmente é que para colunas com mesmo tamanho de partícula, mas com comprimentos diferentes, a coluna de maior comprimento possui maior número de pratos; em nosso caso ocorreu o contrário, ou seja, a coluna maior apresentou menor número de pratos. Isso pode ser justificado pelo fato da coluna de maior comprimento ser mais velha e mais usada do que a de menor comprimento. Logo, a coluna de menor comprimento possuiu maior número de pratos e, portanto, maior eficiência, sendo a escolhida para validação.

Portanto o método desenvolvido possui vantagens como tempo de análise adequado, conseqüentemente menor gasto de fase móvel, fácil preparo das amostras e da fase móvel, mostrando-se, assim, um método mais econômico, rápido e prático para a análise do enrofloxacino em comprimidos se comparado aos métodos já descritos na literatura bem como ao descrito para a matéria-prima na Farmacopeia Europeia de 2010.

#### **6.3.9.2 Validação do método**

O método cromatográfico por fase reversa foi validado baseado na literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

O teste de adequabilidade do sistema (*system suitability*) tem como finalidade verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico desenvolvido está adequada para as análises a serem realizadas (FB 5, 2010). O número de pratos é indicativo da eficiência da coluna cromatográfica e, em geral, considera-se que o número de pratos deve ser  $> 2000$  (FDA, 1994). O valor encontrado pelo método proposto foi 4966,58 com DPR% de 0,17, sendo adequado. O fator de assimetria do pico cromatográfico deve ser  $\leq 2,0$  (FDA, 1994), sendo que valores iguais a 1, indicam que o pico é perfeitamente simétrico (FB 5, 2010) e o método proposto encontrou 1,25, com DPR% de 1,57, estando bem próximo da perfeita simetria. O fator de capacidade é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel, sendo considerado satisfatório o valor do fator capacidade  $> 2,0$  (FDA, 1994) e o valor encontrado pelo método proposto foi 2,20, com DPR% de 0,13. Além disso, a pureza de pico foi calculada pelo *software* do

cromatógrafo, indicando que o pico de enrofloxacino encontra-se puro nas análises, uma vez que o valor de *purity angle* encontra-se menor que o valor de *purity threshold*. Diante dos resultados obtidos, todos os requisitos para o teste de adequabilidade do sistema foram satisfatórios, demonstrando que o sistema é adequado para as análises propostas.

A separação foi alcançada com tempo de retenção médio de, aproximadamente, 5,12 minutos (Figura 18). Todas as condições avaliadas nos testes de degradações forçadas resultaram na diminuição da área do pico do enrofloxacino e quando houve formação de produtos de degradação, estes apresentaram-se bem resolvidos do pico do enrofloxacino. O desenvolvimento de picos adicionais, relativos aos produtos de degradação, sob condições de estresse avaliadas bem como a análise de amostra preparada com excipiente, confirmaram a especificidade do método, uma vez que os picos do enrofloxacino e dos produtos de degradação apresentaram-se bem resolvidos, mantendo a pureza do pico principal, e o excipiente não apresentou pico nas condições analisadas.

Em todas as condições de degradação forçada foram observados picos de produtos de degradação em diferentes tempos, sendo o produto de degradação no tempo de 1,3 minutos o mais recorrente. Todas as degradações forçadas foram realizadas chegando à quantidade de perda percentual do princípio ativo entre 5 a 20% (ALSANTE et al., 2007), sendo assim adequadas para serem utilizadas como um ensaio de seletividade do método proposto, uma vez que, todos os picos de degradação adicionais podem ser considerados produtos primários de degradação e não produtos secundários, que não eram de interesse para a validação do método. Além disso, os picos dos produtos de degradação encontram-se bem resolvidos em relação ao pico de interesse, mantendo assim a pureza do pico do enrofloxacino.

O método analítico proposto apresentou regressão linear significativa no intervalo de concentração de 6,0 a 14,0 µg/mL com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 1,0000.

A exatidão foi comprovada pela recuperação média de enrofloxacino-SQR de 100,14%, pois valores entre 98 a 102% atendem os requisitos legais deste ensaio (ICH, 2005).

Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram DPR% inferior a 2%, comprovando a precisão do método proposto, uma vez que a literatura preconiza DPR% menor ou igual a 5,0% (FDA, 1994).

Os limites de quantificação e de detecção calculados foram 0,54 e 0,18 µg/mL, respectivamente, demonstrando que o método proposto é capaz de detectar e quantificar pequenas concentrações de enrofloxacino em comprimidos com confiabilidade.

O teor de enrofloxacino (base seca) encontrado nos comprimidos foi, em média, 100,94%, considerado adequado, já que está próximo a 100%, indicando que a quantidade de fármaco presente no comprimido indicada na embalagem do produto é próxima da real.

O método proposto mostrou-se robusto quando avaliado pelo teste de Youden e Steiner, demonstrando não haver efeito considerado significativo nas condições estudadas em relação à análise de teor do fármaco.

Como relatado anteriormente (Tabela 24) existem diversos métodos por CLAE para análise do enrofloxacino, porém a maioria é voltada para análise de resíduos em fluidos biológicos e para solução injetável do enrofloxacino, utilizando fases móveis diferentes da que foi utilizada neste trabalho. Entretanto, um dos objetivos deste estudo foi o desenvolvimento de um método cromatográfico específico indicativo de estabilidade que utiliza uma fase móvel menos agressiva ao equipamento e à coluna e menos dispendiosa, além de menor geração de resíduos. Procurou-se também o desenvolvimento de um método cromatográfico rápido, com tempo de retenção adequado, de aproximadamente 5 minutos.

O nosso grupo de pesquisa já possui alguns artigos publicados com métodos de análises por CLAE desenvolvidos para fluorquinolonas, visando sempre a utilização de fases móveis menos agressivas ao equipamento e à coluna e menos dispendiosas, além de menor geração de resíduos (SALGADO, LOPES, 2006; TOZO, SALGADO, 2006; CAZEDEY et al., 2011; CHIERENTIN e SALGADO, 2013).

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

## 7 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS

A comparação entre métodos analíticos é uma ferramenta necessária para determinar se os procedimentos são analiticamente equivalentes. Desta maneira, com a finalidade de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos neste trabalho para a quantificação de enrofloxacino em comprimidos, foi realizada uma análise estatística dos teores médios de enrofloxacino obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA), considerando nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos na determinação quantitativa do enrofloxacino pelos métodos propostos encontram-se na Tabela 36. A análise estatística destes valores experimentais obtidos para o doseamento do enrofloxacino pelos diferentes métodos propostos encontra-se na Tabela 37.

**Tabela 36.** Valores obtidos na determinação do teor do enrofloxacino em comprimidos utilizando os métodos propostos

Parâmetros	Métodos		
	MICRO <sup>1</sup>	IR <sup>2</sup>	CLAE <sup>3</sup>
	95,51	99,53	101,69
Teor (%)	100,83	99,12	99,24
	97,17	100,57	101,88
Teor médio (%)	97,84	99,74	100,94

<sup>1</sup>MICRO: Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

<sup>2</sup>IR: Método por espectrofotometria na região do infravermelho

<sup>3</sup>CLAE: Método por cromatografia líquida de alta eficiência

**Tabela 37.** Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento do enrofloxacino em comprimidos pelos métodos propostos

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F cal	F tab*
Entre grupos	2	14,6647	7,3323	2,17	5,14
Dentro dos grupos	6	20,2713	3,3786		
Total	8	34,9360			

\*Significativo para  $p < 5\%$

Analisando-se os dados obtidos através da análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 37, observa-se que os teores de enrofloxacino determinados pelas diferentes técnicas não apresentaram diferença estatisticamente significativa para  $p < 0,05$ , já que o valor de F calculado (2,17) se apresentou inferior ao valor de F tabelado (5,14).

## 8 DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, o enrofloxacino foi a substância ativa escolhida para o estudo devido ao fato de ser um antimicrobiano exclusivo de uso veterinário utilizado em muitos países e em diversas espécies animais. Além disso, vários estudos indicam que o uso intensivo de um maior número de antimicrobianos na medicina veterinária de forma incorreta pode acarretar em resistência bacteriana para o homem, devido à possível presença de resíduos dos antimicrobianos de uso veterinário no solo, água e/ou alimentos de consumo humano. Assim é necessária uma atenção maior em relação ao controle de qualidade desses medicamentos. Além disso, foi percebido que, embora haja diferentes métodos analíticos descritos na literatura para este fármaco, havia a necessidade do desenvolvimento de metodologias, considerando a minimização do uso de solventes orgânicos ou a utilização de solventes menos tóxicos para os operadores, além de métodos mais práticos e rápidos.

Quanto à análise qualitativa do enrofloxacino, os métodos propostos, os quais incluem a análise das características físicas, teor de umidade, solubilidade, faixa de fusão, cromatografia em camada delgada, CLAE e espectrofotometria na região do infravermelho, foram relativamente simples e constituíram passos importantes para assegurar que o fármaco analisado possuía as características preconizadas pela literatura e pelo fabricante. Deve ser destacado o desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia em camada delgada. O método desenvolvido emprega fase móvel simples e é capaz de separar possíveis produtos de degradação, o que demonstra sua capacidade indicativa de estabilidade.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados três métodos analíticos, com características e custos diferentes: ensaio microbiológico por turbidimetria, espectrofotometria na região do infravermelho e CLAE. A validação foi realizada com base nos guias ICH (2005) e RDC nº 899 (BRASIL, 2003), os quais indicam as diretrizes a serem seguidas durante a validação de um método analítico.

Em se tratando da validação dos métodos quantitativos, foi possível verificar que todos eles apresentaram linearidade adequada, com coeficientes de correlação ( $r$ ) superiores a 0,999, o que foi confirmado através da análise de variância dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas. Os valores encontrados para a precisão dos três métodos foram considerados adequados, pois todos apresentaram DPR% inferiores a 5%. Com relação à exatidão, os três métodos apresentaram resultados

satisfatórios, uma vez que todos os valores obtidos ficaram bem próximos a 100%, indicando alta proximidade do resultado teórico para o real. Todos se mostraram também robustos para os parâmetros testados (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O método de CLAE ainda mostrou ser específico - indicativo de estabilidade, pois amostras do enrofloxacino em comprimidos foram submetidas a condições forçadas de degradação ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica, e, em todos os casos o método cromatográfico foi capaz de separar o pico do enrofloxacino dos demais produtos de degradação, mantendo-o puro e possível de ser quantificado.

Atualmente, a “Química verde”, que é um conceito baseado no desenvolvimento sustentável visando à diminuição do impacto ambiental ocasionado pelos métodos analíticos, é um assunto bastante discutido em todo o mundo e buscado pelos diversos pesquisadores, já que garantir e realizar o controle de qualidade de produtos e processos sem prejudicar o meio ambiente vem ao encontro das necessidades globalizadas.

Durante o desenvolvimento dos três métodos analíticos, houve a preocupação de se minimizar a utilização de solventes orgânicos ou desenvolver técnicas que não os utilizassem, já que esta é uma estratégia cada vez mais adotada pelos laboratórios químicos e farmacêuticos com objetivo de minimizar os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente.

Além disso, no decorrer deste trabalho, também foram buscadas técnicas rápidas, simples e econômicas, com a finalidade de contribuir com o controle de qualidade do enrofloxacino em comprimidos na indústria farmacêutica.

Desta forma, nas condições do presente trabalho, pode-se afirmar que os métodos cromatográfico, espectrofotométrico e microbiológico forneceram resultados satisfatórios para todos os atributos da validação. Assim sendo, este trabalho permitiu o desenvolvimento e a validação de três métodos analíticos para a quantificação de enrofloxacino em comprimidos.

## 9 CONCLUSÃO

- No presente trabalho foi possível desenvolver e validar novos métodos analíticos para a determinação de enrofloxacino em comprimidos.
- As características qualitativas do enrofloxacino foram determinadas satisfatoriamente através da análise de suas características físicas, umidade e solubilidade, faixa de fusão, além dos métodos por espectrofotometria na região do infravermelho, CCD e CLAE, os quais se mostraram adequados para a identificação do fármaco no produto farmacêutico.
- O método por CCD, além de ser adequado para a identificação do fármaco no produto farmacêutico, ainda possibilitou a separação e detecção de produtos de degradação, mostrando sua capacidade indicativa de estabilidade.
- As análises quantitativas permitiram desenvolver e validar alguns métodos analíticos para determinação de enrofloxacino em comprimidos, tais como CLAE, ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico e espectrofotometria na região do infravermelho médio. Os métodos avaliados no presente trabalho mostraram-se precisos, exatos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre eles.
- O ensaio microbiológico realizado através do método turbidimétrico se mostrou adequado para a determinação da potência do enrofloxacino em comprimidos. Além disso, possui a vantagem de não utilizar solventes orgânicos em suas análises, o resultado é mais rápido do que os métodos microbiológicos já descritos e exige equipamento de custo reduzido em relação aos outros métodos validados, embora demande maior tempo de execução. O método por difusão em ágar apresenta como desvantagem, frente ao método por turbidimetria, a dificuldade do fármaco se difundir no meio sólido.
- O método espectrofotométrico na região do infravermelho médio, embora não seja muito utilizado para fins de quantificação, se mostrou adequado para o propósito, apresentando as vantagens de ser um método novo, rápido e que não utiliza solventes orgânicos em suas análises, podendo ser uma alternativa econômica e ambientalmente favorável para a quantificação deste fármaco. Além disso, este fato é um incentivo para se aplicar a espectrofotometria na região do infravermelho médio para a quantificação de outros fármacos, assim como foi feito com o enrofloxacino.

- 
- Quanto ao método cromatográfico, a ausência de soluções tampão na composição da fase móvel e de acetonitrila, que é mais tóxica que o metanol, o preparo simples da fase móvel e o menor tempo de análise são características vantajosas em relação aos outros métodos existentes. Além disso, apresentou a vantagem de permitir a separação de produtos de degradação, embora gere maior quantidade de resíduos de solventes orgânicos quando comparado aos outros dois métodos quantitativos validados neste trabalho.
  - Os três métodos quantitativos desenvolvidos mostraram-se apropriados para a quantificação do enrofloxacino em comprimidos, podendo ser usados como alternativas para análises do controle de qualidade deste fármaco.
  - Por fim, este trabalho ressalta a importância de uma rigorosa validação de métodos analíticos para o controle de qualidade dos medicamentos de uso veterinário comercializados, pois dados analíticos confiáveis são fundamentais para a eficácia terapêutica e segurança destes produtos, evitando sobredoses e contribuindo para a diminuição da resistência bacteriana tanto em animais quanto nos seres humanos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#3.25>> Acesso em: 24 set. 2013.

AHN, Y.; LINDER, S.W.; VEACH, B.T.; YAN, S.S.; FERNÁNDEZ, A.H.; PINEIRO, S.A.; CERNIGLIA, C.E. In vitro enrofloxacin binding in human fecal slurries. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.62, p.74–84, 2012.

ALBARELLOS, G.A.; LANDONI, M.F. Current concepts on the use of antimicrobials in cats. **Vet. J.**, v.180, p.304–316, 2009.

ALÓS, J-I. Quinolonas. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v.27, n.5, p.290–297, 2009.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 59, p. 29–37, 2007.

AMIN, A.S.; DESSOUKI, H.A.; AGWA, I.A. Ion-pairing and reversed phase liquid chromatography for the determination of three different quinolones: Enrofloxacin, lomefloxacin and ofloxacin. **Arab. J. Chem.**, v. 4, p. 249–257, 2011.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17. ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v. 1, p. xx.

BABAAMADY, E.; KHOSRAVI, A. Toxicology of baytril (enrofloxacin). **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 5, n. 18, p. 2042-2045, 2011.

BABIC, S.; HORVAT, A.J.M.; PAVLOVIC, D.M.; KTELAN-MACAN, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. **Trac-Trend. Anal. Chem.**, v. 26, n. 11, p. 1043-1061, 2007.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1011–1040, 2002.

BEDREGAL, P.; TORRES, B.; UBILLÚS, M.; MENDOZA, P.; MONTOYA, E. Robustness in NAA evaluated by Youden and Steiner test. **J. Radioanal. Nuclear Chem.**, v. 278, n. 3, p. 801-806, 2008.

BIMAZUBUTE; M.A., ROZET, E.; DIZIER, I.; GUSTIN, P.; HUBERT, PH.; CROMMEN, J.; CHIAP, P. Liquid chromatographic determination of enrofloxacin in nasal secretions and plasma of healthy pigs using restricted access material for on-line sample clean-up. **J. Chromatogr. A**, v. 1189, p. 456–466, 2008.

BOLON, M. K. The newer fluorquinolones. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, n. 4, p. 1027-1051, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#3.25>>. Acesso em 10 out. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1. Disponível em: <[http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/vm/vm1.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf)> Acesso em: 09 out 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 26 de 09 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>>. Acesso em: 09 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Compêndio de produtos veterinários – SINDAN**. Brasília: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal, 2012. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 09 out 2013.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). London: Her Majesty's Stationery Office, v. 1, 2011.

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

CAVALCANTE, L.F.H.; GOUVÊA, A.S.; MARQUES, J.M.V. Degeneração retiniana em gatos associada ao uso de enrofloxacin – Artigo de Revisão. **Acta Vet. Bras.**, v. 3, n. 2, p. 62-68, 2009.

CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. A validated stability-indicating LC method for orbifloxacin in the presence of degradation products. **Curr. Pharm. Anal.**, v. 7, n. 3, p. 1-6, 2011.

CHIERENTIN, L., SALGADO, H.R.N. Development and validation of a simple, rapid, and stability-indicating high performance liquid chromatography method for quantification of norfloxacin in a pharmaceutical product. **J. Chromat. Separation Techniq.**, v. 4, n. 2, p. 1-5, 2013.

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

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.

CRUZ, A.R.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Vet. e Zootec.**, v. 19, n. 4, p.601-610, 2012.

CRUZ, A.R. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2009 (Mestrado em Medicina Veterinária).

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

DEMBRY, L.M.; FARRINGTON, J.M.; ADRIOLE, V.T. Fluorquinolone antibiotics: adverse effects and safety profiles. **Infect. Dis. Clin. Prac.**, v. 8, n. 9, p. 421-428, 1999.

ELSHEIKH, H.A.; TAHA, A.A.W.; KHALAFALLAH, A.I.; OSMAN, I.A.M. Disposition kinetics of enrofloxacin (Baytril 5%) in sheep and goats following intravenous and intramuscular injection using a microbiological assay. **Res. Vet. Sci.**, v.73, p. 125-129, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (EP), 7th. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010, p.1922-1923.

FB. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, Anvisa, 2010.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: **Analytical Procedures and Methods Validation**. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, 2000.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Animal Drugs, Feeds, and Related Products; Sarafloxacin for Poultry; Withdrawal of Approval of NADAs [DOCID: fr30ap01-7]. **Federal Register**, v. 66, n.83, p.21282, 2001a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/043001d.htm>>. Acesso em: 09 out. 2013.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Abbott Laboratories' Sarafloxacin, for Poultry; Withdrawn of Approval of NADAs [Docket No. 01 N-01 701]. **Federal Register**, 2001b.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Animal Drugs, Feeds, and Related Products; Enrofloxacin for Poultry; Withdrawal of Approval of New Animal Drug Application [Docket No. 2000N-1571]. **Federal Register**, v. 70, n. 146, p. 44048, 2005a.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Enrofloxacin for poultry; final decision on withdrawal of new animal drug application following formal evidentiary public hearing; availability [Docket No. 2000N-1571]. **Federal Register**, v. 70, n. 146, p. 44105, 2005b.

FLAMMER, K. Uso da enrofloxacina (baytril®) em psitacídeos. Disponível em: <[http://www.zoo.ba.gov.br/biblioteca/veterinaria/uso\\_enrofloxacina\\_psitacideos.pdf](http://www.zoo.ba.gov.br/biblioteca/veterinaria/uso_enrofloxacina_psitacideos.pdf)>. Acesso em: 24 set. 2013.

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

GRANELLI, K.; ELGERUD, C.; LUNDSTRÖM, A.; OHLSSON, A.; SJÖBERG, P. Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 637, p. 87-91, 2009.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2004. p. 18-21.

HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N.; NAKAZAWA, H. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by highperformance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 653, p. 69-76, 1994.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Geneva, 2005.

IHRKE, P.J.; PAPICH, M.G.; DEMANUELLE, T.C. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. **Vet. Dermatol.**, v. 10, p. 193-204, 1999.

INMETRO - **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

ISHII, J.B.; FREITAS, J.C.; ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 6, p. 533-537, 2011.

JP. JAPANESE Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011. p. 385-387.

KOC, F.; UNEY, K.; ATAMANALP, M.; TUMER, I.; KABAN, G. Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations. **Aquaculture**, v. 295, p. 142-144, 2009.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v. 3, n. 1, p.1-6, 2013.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna (HPLC/CLAE)**. Campinas: Átomo, 2009. p. 202-215.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 10–28, 2006.

MATKOVIC, S.R.; VALLE, G.M.; GALLE, M.; BRIAND, L.E. Desarrollo y Validación del análisis quantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopía infrarroja. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 527-532, 2004.

McCANN, M.T.; GILMORE, B.F.; GORMAN, S.P. Staphylococcus epidermidis device-related infections pathogenesis and clinical management. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 60, p. 1551–1571, 2008.

MITCHELL, M.A. Therapeutic review: Enrofloxacin. **J. Exot. Pet Med.**, v. 15, n. 1, p. 66-69, 2006.

MOEMA, D.; NINDI, M.M.; DUBE, S. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v. 730, p. 80– 86, 2012.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 2, p. 6-11, 2012.

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

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

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14th. ed. Whitehouse Station, 2006. p.3596.

OTERO, J.L.; MESTORINO, N.; ERRECALDE, J.O. Enrofloxacin: Una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria - Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. **Analecta Vet.**, v. 21, n. 1, p. 31-41, 2001.

PALLO-ZIMMERMAN, L.M., BYRON, J.K., GRAVES, T.K. Fluoro-quinolonas: Then and now. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 32, p. E1-E8, 2010.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde (SESA). Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte no Estado do Paraná. Curitiba: SESA/ISEP, 2005. Disponível em: <<http://200.189.113.52/ftp/Visa/alimentos/Relatoriofrangodecorte.doc>>. Acesso em: 09 out. 2013.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 17-99.

PINA, E.S. **Antibióticos e Quimioterápicos na Clínica Veterinária de Pequenos Animais**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.

POLIWODA, A.; KRZYZAK, M.; WIECZOREK, P.P. Supported liquid membrane extraction with single hollow fiber for the analysis of fluoroquinolones from environmental surface water samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 3590–3597, 2010.

QIANG, Z.; ADAMS, C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. **Water Res.**, v. 38, p. 2874–2890, 2004.

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.

RUBIES, A.; VAQUERIZO, R.; CENTRICH, F.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M.; PRAT, M.D. Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 72, p. 269–276, 2007.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6 ed. London: Chicago Pharmaceutical Press, 2009.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O. Determination of gatifloxacin in bulk and tablet preparations by liquid chromatography. **J. AOAC Int.**, v. 89, p. 642-645, 2006.

SCHELLACK, G. **Farmacologia: uma abordagem didática**. São Paulo: Editora Fundamento Educacional, 2006. p. 154-155.

SCHOLAR, E.M. Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. **Am. J. Pharm. Educ.**, v. 66, p. 164-172, 2002.

SHERAZI, S.T.H.; ALI, M.; MAHESAR, S.A. Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations. **Vib. Spectrosc.**, v. 55, p. 115-118, 2011.

SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, n. 2, p.363-369, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2007. p. 70-122.

SOUSA, I.C.S.C. Interação da enrofloxacin com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas. Universidade do Porto, 2007 (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar).

SOUZA, M.J.; BITTENCOURT, C.F.; MORSCH, L.M. LC determination of enrofloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1195–1199, 2002.

SOUZA, M.J.; BITTENCOURT, C.F.; FILHO, P.S.S. Microbiological assay for enrofloxacin injection. **Int. J. Pharm.**, v. 271, p. 287–291, 2004.

SUNDERLAND, J.; LOVERING, A.M.; TOBIN, C.M.; MACGOWAN, A.P.; ROE, J.M.; DELSOL, A.A. A reverse-phase HPLC assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig faeces. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 23, p. 390–393, 2004.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 103-108, 2012.

TOZO, C.G.G.; SALGADO, H.R.N. Determination of lomefloxacin in tablet preparations by liquid chromatography. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 5, p. 1305-1308, 2006.

TROTT, D.J.; FILIPPICH, L.J.; BENSINK, J.C.; DOWNS, M.T.; MCKENZIE, S.E.; TOWNSEND, K.M.; MOSS, S.M.; CHIN, J.J.-C. Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliforms and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 439–443, 2004.

TYCZKOWSKA, K.; HEDEEN, K.M.; AUCOIN, D.P.; ARONSON, A.L. High-Performance Liquid Chromatographic Method for the simultaneous determination of Enrofloxacin and its primary metabolite Ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue. **J. Chromatogr.**, v. 493, p. 337-346, 1989.

TYCZKOWSKA, K.L.; VOYKSNER, R.D.; ANDERSON, K.L.; PAPICH, M.G. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 658, p. 341-348, 1994.

ULU, S.T. Rapid and sensitive spectrofluorimetric determination of enrofloxacin, levofloxacin and ofloxacin with 2,3,5,6-tetrachloro-p-benzoquinone. **Spectrochim. Acta A**, v. 72, p. 1038–1042, 2009.

USP 35–NF 30. The United States Pharmacopeia. Chapter <1225> Validation of compendial procedures. Rockville, Convention, 2012.

USP. U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION. PQRI Database. Disponível em: <<http://www.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2014.

WETZSTEIN H.G.; De JONG, A. In Vitro bactericidal activity and postantibiotic effect of fluorquinolones used in veterinary medicine. **Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v. 18, n. 2, p. 22-29, 1996.

WILLIAM, A.P.J. Antimicrobianos: Sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprim, quinolonas e agentes para infecção do trato urinário. In: GILMAN, A.G. Goodman & Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2005. p. 883-886.

WOLFSON, J.S. Quinolone Antimicrobial Agents: Adverse Effects and Bacterial Resistance. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 8, n. 12, p. 1080-1092, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals**. In: Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13-17 October 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Use of quinolones in food animals and potential impact on human health**. In: Report and proceedings of a WHO meeting, Geneva, Switzerland, 2-5 June 1998. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC ZDI 98.10.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2013.