UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Vanessa Fernandes dos Santos

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DIFLOXACINO EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

Araraquara (SP)

2011

Vanessa Fernandes dos Santos

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DIFLOXACINO EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a graduação do curso de Farmácia Bioquíca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Júlio Mesquita Filhopara obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientadora: Profa. Dra Hérida Regina Nunes Salgado

Araraquara (SP)
2011

" Um dia sem rir é um dia desperdiçado "

Charles Chaplin

Dedicatória

Aos meus pais Geny e Roberto e
aos meus padrinhos Déborah e Carlos,
sem vocês nada seria possível.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter colocado oportunidades e pessoas tão importantes em minha vida que propiciaram que eu chegasse até aqui.

Aos meus Pais Geny e Roberto por toda coragem e amor que tiveram ao tomar a decisão de me ter em suas vidas, por todos os ensinamentos, paciência, carinho e apoio que me deram durante todos esses anos.

Aos meus Padrinhos Déborah e Carlos por todo imenso carinho e enorme incentivo em cada passo do meu caminho e pelos afilhados.

Ao meu irmão Roberto Wagner por todo carinho, proteção, todos os momentos que vivemos juntos e toda dedicação sempre dispensadas a mim.

Ao meu irmão Robinson por por todos os cuidados e carinho.

Aos meus queridos sobrinhos, por todos os momentos alegres, pelos choros e mamadeiras que me fizeram "descansar" e ter forças para voltar e continuar.

À Maria de Fátima Fernandes dos Santos por toda sua coragem para que eu tivesse uma vida melhor.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas por tudo que me ensinou e proporcionou.

À Professora Dra. Hérida Regina Nunes Salgado pelas excelentes oportunidades, confiança, ensinamentos, carinho, compreensão perante as inúmeras atividades que estive envolvida durante o período de graduação principalmente pela amizade dispensada a mim durante estes quatro anos.

À minha querida doutoranda Edith Cristina Laignier, por toda paciência, por todos ensinamentos, pelas conversas, pela ajuda nos inúmeros projetos, pelos puxões de orelha quando necessário e quem diria pelos abraços tão bons e acolhedores. Se não fosse você com toda certeza não teria conseguido.

Ao doutor Rudy Bonfílio pela amizade e pelo grande auxílio na etapa de extração do fármaco.

Ao meu amado Centro Acadêmico de Ciências Farmacêuticas, por ter me proporcionado ensinamentos, amizades, laços e momentos incríveis os quais levarei por toda minha vida.

À República Lolitas, por terem sido a família que escolhi para viver esses anos em Araraquara, por terem suportado minhas dores e minhas alegrias, por terem sorrido e chorado ao meu lado e por todo amor que criamos uma pelas outras durante estes anos fantásticos. Vocês sempre estarão nas minhas melhores lembranças e em meu coração. Um agradecimento especial a nossa bonequinha Stef,que este ano se foi para nos mostrar o quanto é importante aproveitarmos cada segundo que passamos juntas e o quanto devemos valorizar o amor que temos unas pelas outras e que agora olha por nós junto de Deus.

Ao meu anjo Cassiano Ricardo, pessoa tão especial em minha vida que veio para alegrar meus dias e me lembrar que por mais que tudo pareça estar dando errado estamos juntos...SEMPRE. Muito obrigada por me acalmar, me aconselhar estar ao meu lado e me fazer tão feliz.

Ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos por estar ao meu lado em alguns dos momentos que mais precisei, por ter me ajudado a levantar, continuar e me lembrar todos os dias das coisas boas que existem em mim. Muito obrigada por não me deixar desistir.

À Maria de Fátima Rodrigues por todo auxílio dentro do laboratório, paciência e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de Controle de qualidade pela convivência e conselhos diários para o desenvolvimento dos projetos.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Cinetífica - PIBIC, pelo consentimento da bolsa que proporcionou a realização do trabalhos.

À todos os amigos, colegas e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que de forma direta ou indireta auxiliaram ou torceram para que esse trabalho fosse concluído.

Sumário

Resumo....8
1. Introdução 10
2. Objetivos 13
2.1. Objetivos gerais....13
2.2. Objetivos específicos 13
3. Revisão Bibliográfica....14
3.1. Quinolonas 14
3.1.1. Estrutura geral e mecanismos de ação das quinolonas 18
3.1.2. Uso veterinário das quinolonas....19
3.1.3. Difloxacino....20
3.2. Validação analítica 21
3.2.1. Seletividade....23
3.2.2. Linearidade....24
3.2.3. Intervalo 24
3.2.4. Precisão 25
3.2.4.1.Repetibilidade (precisão intra-corrida): 26
3.2.4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corridas): 26
3.4.5. Exatidão 26
3.2.6. Robustez....27
3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 28
3.4. Espectrofotometria na região UV 29
3.5. Tratamento de resíduos 31
4. Material e Métodos 31
4.1. Material geral 31
4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 32
4.2.1 Material 32
4.2.2. Método 33
4.2.2.1. Preparo da fase móvel 33
4.2.2.2. Preparo da solução padrão 33
4.2.2.3. Preparo da solução amostra....30
4.2.3. Ensaio....30
4.3. Espectrofotometria na região UV 34
4.3.1.Material 34
4.3.2. Método 35
4.3.2.1. Preparo da solução padrão 35
4.3.2.2. Preparo da solução de amostra....35
4.3.3. Ensaio....35
5. Resultados 36
5.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 36
5.1.1. Curva analítica 36
5.1.2. Exatidão 38
5.1.3. Precisão 39
5.1.4. Doseamento....41
5.1.5. Limite de quantificação e detecção 41
5.1.6. Seletividade....42
5.1.7. Robustez....46
5.2. Espectrofotometria na região UV 47

5.2.1. Curva Analítica 46
5.2.2. Precisão 48
5.2.3.Exatidão 50
5.2.4. Limites de Detecção e Quantificação.....51
5.2.5. Robustez.....52
5.2.6. Doseamento.....53
5.2.7.Seletividade.....53
6. Discussão e Conclusão.....54
7. Referências Bibliográficas 56

Resumo

O difloxacino - DIFX - é um antimicrobiano de amplo espectro de ação pertence à 3ª geração das quinolonas, e foi especialmente desenvolvido para o uso veterinário aprovado em vários países. Seu uso é indicado para infecções cutâneas, superficiais ou profundas, infecções genitourinárias, respiratórias e digestivas, causadas por diversos patógenos como *Staphylococus* sp*, Escherichia coli, Pseudomonas* spp*., Esnterobacter* spp*., Mycoplasma* spp*., Salmonella, Klebsiella, Streptococus* spp. e outras cepas suscetíveis. Na literatura foi possível encontrar alguns estudos envolvendo difloxacino em matéria prima e matrizes biológicas, entretanto para a forma farmacêutica comprimidos revestidos nada foi encontrado. Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias analíticas para determinação e quantificação de difloxacino comprimidos revestidos por espectrofotometria na região UV e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). No método de espectrofotometria na região UV a curva analítica mostrou-se linear entre 3,0 e 8,0 µg/mL (r = 0,9999), com exatidão e precisão satisfatórias, os coeficientes de variação intradia e interdia foram 1,92 e 1,87 respectivamente. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) apresentaram valores de 0,32 e 0,11 µg/mL, respectivamente. A porcentagem de difloxacino encontrada nas amostras foi de 105,05 %. Para o método por CLAE, a curva analítica mostrou-se linear no intervalo de 1,0 e 6,0 µg/mL (*r*=0,9997), a exatidão da metodologia proposta foi calculada pelo método de adição de padrão apresentando uma média de 100,06%. Os valores de precisão foram satisfatórios, com coeficientes de variação intradia e interdia de 1,35 e 1,64 %, respectivamente. O limite de detecção apresentou valor de 0,07 µg/mL e quantificação de 0,24 µg/mL. O doseamento da amostra de Dicural® comprimidos revestidos foi encontrado 94,70% de difloxacino.

Palavras Chave: CLAE, espectrofotometria, difloxacino, metodologia analítica, validação

1. Introdução

Cada vez mais é possível encontrar na literatura inúmeros estudos envolvendo a qualidade, eficácia e segurança de medicamentos. Ao longo da história foi possível observar o crescimento do uso desenfreado de um número cada vez maior medicamentos, assim como todos os efeitos que estes podem causar no organismo humano isoladamente ou em conjunto com outros medicamentos. Fato este que desncadeou uma preocupação cada vez maior com o controle de qualidade desses produtos por seus usuários e principalmente por seus fabricantes.(LA ROCA *et al.*, 2007). O controle de qualidade é a parte da garantia da qualidade responsável por realizar os processos de amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de organização e liberação que assegurem que os produtos farmacêuticos passem por todos os ensaios necessários, que estes ensaios sejam devidamente validados e que nenhum produto seja utilizado pelo consumidor sem que sua qualidade seja julgada e analisada como satisfatória (BRASIL, 2003b). Esse longo processo é essencial para garantir que o produto final seja totalmente seguro e atinja os objetivos que foram propostos em suas especificações (SANTORO, 1988).

O crescimento das indústrias farmacêuticas e de políticas governamentais com o propósito de aumentar o acesso aos tratamentos farmacológicos disponíveis para a população mais carente desencadearam um processo de ampla comercialização desses produtos e o consequente uso indiscriminado de medicamentos por todas as classes econômicas (MAGALHÃES e*t al.*, 2003). O uso indiscriminado pode gerar falhas terapêuticas e em alguns casos problemas de saúde mais graves do que os iniciais, bem como promover o desenvolvimento das chamadas “superbactérias”, que por conta da recorrente exposição à doses subterapêuticas de antimicrobianos,

tornam-se multirresistentes aos antibióticos e antimicrobianos existentes no mercado. Esse quadro atinge não só a população humana, mas também os animaisque possuem contato cada vez mais intenso com esta população e também ficam expostos. Associado a este quadro, o aumento da longevidade da população no país e a nova estrutura familiar geraram, concomitantemente, o grande aumento do número de famílias que possuem animais domésticos. Estas famílias possuem com estes animais uma estreita relação, que além de gerar grande preocupação e cuidados por parte de seus donos, também é responsável pela transmissão de doenças e infecções entre as duas espécies. Este cenário cresce ainda mais entre a população idosa. Os hábitos de vida adotados por humanos e animais vai além do âmbito doméstico, atingindo também as vias públicas, desencadeando um grande número de infecções nesses animais, ampliando a necessidade do desenvolvimento de medicamentos capazes de controlar essas infecções e para garantir que esses animais recebam medicamentos seguros e eficientes, é imprescindível garantir a qualidade desses produtos (LOPES *et al.*, 2009; MEDEIROS, 2006). Neste contexto, o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas eficazes para determinar e quantificar substâncias para utilização animal é extremamente importante para o não agravamento desta situação.

O difloxacino é um antimicrobiano de amplo espectro de ação pertencente à terceira geração das quinolonas, e sua atividade se deve a inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV das bactérias.

As quinolonas de terceira geração, fluorquinolonas, possuem ótima atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bactérias anaeróbias e micoplasma. Além disto, estes compostos têm uma excelente biodisponibilidade

mesmo quando administrados por via oral e um efeito prolongado devido à sua grande meia-vida. Esses fármacos também apresentam vantagens sobre as quinolonas das gerações anteriores por sua baixa toxicidade no sistema nervoso central e sua pequena interação com as enzimas do citocromo P450 (CYP 450) (MARTINEZ *et al*., 2006).

O difloxacino foi a primeira difluorquinolona a ser especialmente desenvolvida para o uso veterinário, apresentando-se sob as formas comprimidos revestidos – aprovado em 1997. Seu uso é indicado para infecções de pele, tegumentares e do trato urinário de cães, causadas por *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Staphilococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Klebsiela* e outras bactérias suscetíveis, mas estudos recentes têm testado o uso de difloxacino em coelhos (VARÒN *et al.*, 2008; ABD EL-ATY,*et al.* 2005), em camelos (ABO-EL-SOOUD e GOUDAH, 2009) e outros animais (HASSOUAN *et al.*, 2007; DINGA *et al*., 2006).

Entretanto, mesmo com as amplas indicações, a comprovação de sua eficiência e seu crescente uso em diversos animais, não é possível encontrar métodos analíticos para este fármaco em nenhuma das principais farmacopeias. Na literatura existem alguns relatos de métodos envolvendo a análise de difloxacino em amostras biológicas por CLAE com detector de fluorescência (JIMÉNES *et al.,* 2011*,* ABO-EL-SOOUD e GOUDAH, 2009; ZHAO *et al,* 2007; HASSOUAN *et al.*, 2007; MARIN *et al.,* 2007) e UV (HERMO *et al*., 2006) e na forma de solução injetável com detecção UV (NAGESWARA e NAGARAJU, 2004) e detecção eletroquímica (CÁRCERES *et al.,* 2004). Entretanto, não foram encontrados na literatura métodos para a quantificação de difloxacino comprimi revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência e métodos que envolsessem espectrofotometria na região UV para

nenhuma das formas farmacêuticas existentes.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas para a determinação e quantificação de difloxacino comprimidos revestidos.

2.2. Objetivos específicos

Desenvolver de metodologia analítica para identificação e quantificalçai de difloxacino comprimidos revestidos através de espectrofotometria na região UV.

Desenvolver de metodologia analítica para identificação e quantificação de difloxacino comprimidos revestidos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando fase móvel que apresente baixa produção de resíduos.

Validar os métodos analíticos desenvolvidos de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, sensibilidade, precisão e robustez preconizados pelas agências reguladoras.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Quinolonas

As quinolonas fazem parte de uma classe de antimicrobianos sintéticos que atuam contra diversas bactérias e são utilizadas no tratamento de infecções tanto de animais quanto de humanos.

Em 1962, a partir da cloroquina, foi sintetizado o ácido nalidíxico (Fig. 1), o primeiro representante da classe das quinolonas (LESHER *et al*., 1962). Sua atividade era bem limitada, atuando apenas contra algumas bactérias Gram-positivas e tendo baixa atividade contra bactérias Gram-negativas, além de serem observados frequentes efeitos adversos no sistema nervoso central. Devido sua baixa absorção seu uso terapêutico logo foi restringido para o tratamento de infecções urinárias (BARLOW, 1963). A partir da descoberta deste fármaco houve grande interesse por parte dos pesquisadores em desenvolver novos compostos desta classe, com maior atividade e menores efeitos tóxicos.

A grande evolução das quinolonas ocorreu em 1980, quando foi desenvolvida a primeira quinolona fluorada, o norfloxacino, que possuía alta atividade contra bactérias Gram-negativas e algumas bactérias Gram-positivas, mas os membros desta classe ainda continuaram com uma pequena absorção quando administradas por via oral (TAVARES, 1996; BALL, 2000). Foi também durante a década de 80 que foi aprovada a primeira quinolona para uso animal, o enrofloxacino, que permitiu a ampliação das indicações de uso das quinolonas, além de aumentar significativamente as pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, com diferentes modificações moleculares em seu núcleo central, dando aos fármacos

características farmacológicas e farmacocinéticas cada vez melhores. Estas características, distintas para cada molécula, permitem a classificação das quinolonas em quatro gerações distintas (BALL, 2000).

As quinolonas de primeira geração foram as primeiras a serem desenvolvidas, e são associadas à sua baixa biodisponibilidade no organismo e a sua limitada distribuição nos tecidos. Os antimicrobianos desta geração são representados por fámacos como ácido nalidíxico (Fig. 1), ácido oxolínico (Fig. 2), ácido pepemídico (Fig. 3) entre outros. Estes fármacos são ativos contra enterobactérias (Gram-negativas) e geralmente são utilizadas para o tratamento de infecções no trato genitourinário.

.

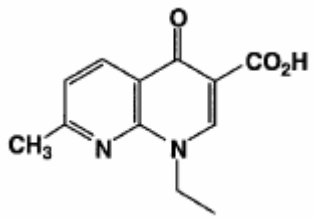

Fig. 1: Estrutura química do ácido nalidíxico

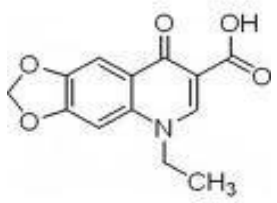

Fig. 2: Estrutura química do ácido oxanílico

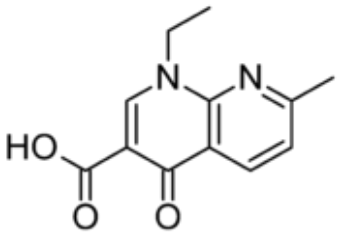

Fig. 3: Estrutura química do ácido pipemídico

A segunda geração destes fármacos possui uma melhor atividade contra as

enterobactérias e outras bactérias Gram-negativas, também possuem uma pequena atividade contra bactérias Gram-positivas. Algumas mudanças estruturais permitiram as quinolonas desta geração uma melhor biodisponibilidade e distribuição nos tecidos. Os fármacos desta geração são utilizados contra infecções urinárias, pielenofrites, gonorréria e infecções causadas por *P. aeruginosa* e são representadas por moléculas como norfloxacino (Fig. 4), ciprofloxacino (Fig. 5) e ofloxacino (Fig. 6) (ANDRIOLE, 1999).

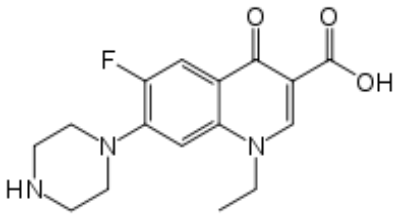

Fig. 4: Estrutura química norfloxacino

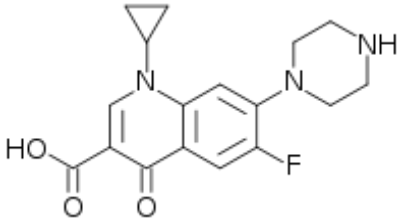

Fig. 5: Estrutura química do ciprofloxacino

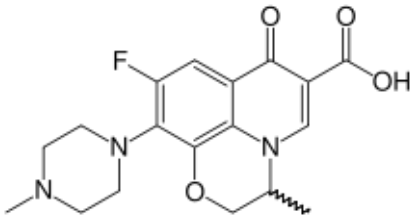

Fig. 6: Estrutura química ofloxacino

Os antimicrobianos quinolônicos de terceira geração possuem um espectro de ação mais amplo, além das atividades presentes nas outras gerações também agem muito bem contra bactérias Gram-positivas, bactérias anaeróbias e micobactérias. Os fármacos dessa geração possuem ainda excelente biodisponibilidade, inclusive quando administrados por via oral, tempo de meia-vida prolongado e baixa toxicidade no sistema nervoso central, além de ótima atividade contra infecções do

trato respiratório. Dentro desta classe de compostos quinolônicos encontramos fármacos como gatifloxacino (Fig. 7), levofloxacino (Fig. 8) e o difloxacino (Fig. 9), fármaco utilizado neste estudo (TAVARES, 1996; ANDRIOLE, 1999; BALL, 2000; MARTINEZ *et al*,. 2006).

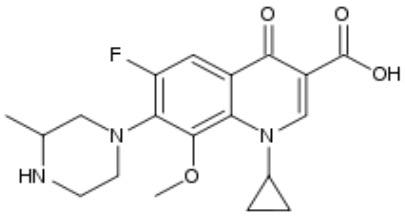

Fig. 7: Estrutura química gatifloxacino

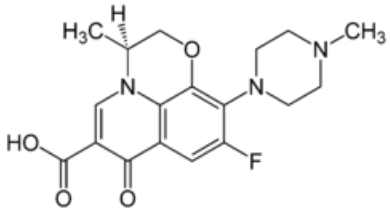

Fig. 8: Estrutura química levofloxacino

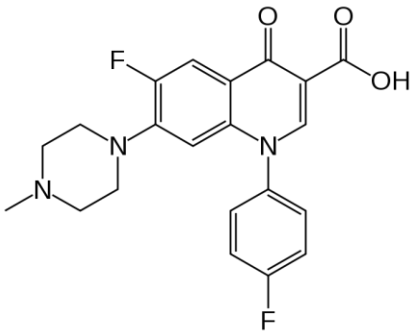

Fig. 9: Estrutura química difloxacino

A quarta geração é responsável pela maior atividade contra patógenos Gram-negativos, atuam ainda contra Gram-positivos e patógenos presentes no trato respiratório e é representada por fármacos como o clinafloxacino (Fig. 10) (TAVARES, 1996; ANDRIOLE, 1999; BALL, 2000; MARTINEZ *et al*,.2006).

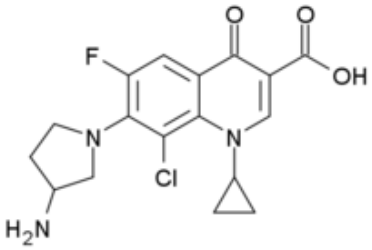

Fig. 10: Estrutura química clinafloxacino

Alguns autores consideram a distinção entre os fármacos de cada geração não muito bem delineada, principalmente quando estão classificados na segunda ou terceira geração (MARTINEZ *et al*,. 2006).

3.1.1. Estrutura geral e mecanismos de ação das quinolonas

Os antimicrobianos da classe das quinolonas são caracterizados pela presença de um anel heteroaromático bicíclico ligado a um ácido carboxílico na posição 3 e uma cetona na posição 4, essas características são essenciais para a atividade antimicrobiana desses fármacos como pode ser observado na Fig. 11 (ZHANG e HAEMERS, 1991; ANDRIOLE, 1999).

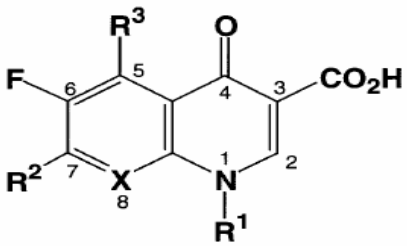

Fig. 11: estrutura geral das quinolonas

Nos compostos desenvolvidos mais recentemente é possível encontrar pequenos substituintes como metila e grupos amino na posição C-5 e substituições na posição 8 como fluor, cloro e metila que são responsáveis pelo aumento da atividade antibacteriana (ANDRIOLE, 1999; APPELBAUM e HUNTER, 2000; CAZZOLA *et al.,* 2001).

As quinolonas têm sua ação através da inibição da DNA girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV impedindo que as bactérias sejam capazes de se replicar. Esse efeito ocorre por conta da ligação do anel quinolônico ao complexo DNA-girase, tendo um rápido efeito bactericida.

3.1.2. Uso veterinário das quinolonas

O bom desempenho das quinolonas frente à diversas infecções fez com que seu uso fosse ampliado e novas moléculas fossem desenvolvidas exclusivamente para o uso animal. A primeira quinolona aprovada para utilização animal foi o enrofloxacino no final da década de 80. Desde então o número de medicamentos dessa classe, utilizados para este fim, só aumentou em diversos países (PEREIRA, 2009). Inicialmente o uso de antibióticos em animais para consumo humano era reservado para a profilaxia e o tratamento de infecções, porém em alguns países o uso dessa classe de medicamentos em doses subterapêuticas tem a finalidade de aumentar a velocidade do crescimento desses animais, aumentando ainda mais o contato desnecessário de animais e humanos com antimicrobianos potentes, gerando resistência bacteriana (FDA, 2005; WHO, 2008; PEREIRA, 2009).

O crescente uso desses medicamentos ao longo dos anos desencadeou um problema de saúde pública que atinge animais e humanos, a grande resistência bacteriana frente a essas substâncias (WHO, 1997; HARBOTTLE *et al.*, 2006). Este

fato levou o Comitê dos Medicamentos para Uso Veterinário da União Européia (CMV)a declarar que a resistência a patógenos estava aumentando exponencialmente por conta desses fármacos, e por isto seu uso deveria ser mais controlado (EMEA, 2007).

3.1.3. Difloxacino

O difloxacino foi especialmente desenvolvido para o uso veterinário (MARTINEZ *et al*,. 2006). Seu uso é indicado para infecções cutâneas, superficiais ou profundas, infecções genitourinárias, respiratórias e digestivas, causadas por diversos patógenos como *Staphylococcus* sp*, Escherichia coli, Pseudomonas* spp*., Esnterobacter* spp*., Mycoplasma* spp*., Salmonela, Klebsiella, Streptococcus* spp. e outras cepas suscetíveis isolada de cães (VAN BAMBEKE *et al*., 2005). No Brasil, o difloxacino é comercializado pelo laboratório Fort Dodge com o nome comercial de Dicural®, sob a forma farmacêutica comprimidos revestidos.O revestimento é formado por uma estrutura palatável que possui a finalidade de aumentar a adesão dos cães ao tratamento, além de possuir em sua molécula substituintes que aumentem sua biodisponibilidade no organismo dos animais tratados, aumentando também a eficácia terapêutica em relação a outros fármacos. Sob esta forma, o difloxacino foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em novembro de 1997, sendo indicada para o tratamento de diversas infecções capazes de acometer o organismo dos cães (FEDERAL REGISTER, 1997).

Mesmo tendo seu uso destinado para cães, recentemente alguns estudos têm testado o uso de difloxacino em diferentes animais como cavalos, bovinos, ovelhas e coelhos (CARRILLO, 2008), camelos (ABO-EL-SOOUD e GOUDAH, 2009), galináceos (Pereira, 2009), peixes (DING *et al*., 2006; LING e XIAN, 2009) e

ovelhas (MARÍN *et al.*, 2007).

3.2. Validação analítica

A validação é o processo pelo qual comprova-se que todos os procedimentos analíticos empregados para a avaliação da substância ou produto são adequados aos objetivos a que são destinados, além disso na etapa de validação são estabelecidosos critérios de aceitação para todos os sistemas que deverão empregados nos procedimentos analíticos antes do início do procedimeto analítico propriamente dito (OMS, 2010).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para determinações qualitativas, quantitativas e/ou semi-quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003a).

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o "processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer" (USP, 2008) .

Os métodos analíticos podem ser classificados em quatro categorias de acordo com a sua finalidade (BRASIL, 2003a), como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	*Finalidade do teste*
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003a

Na Tabela 2 é possível observar os ensaios necessários para a validação de métodos analíticos de acordo com a sua classificação nas categorias descritas na Tabela 1.

Tabela 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

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

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

Fonte: BRASIL, 2003a

3.2.1. Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para a análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela

obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.

3.2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 3.

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, deve-serealizar transformação matemática, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação *(r)* deve ser = 0,99 de acordo com a RE 899 de 2001 (BRASIL, 2003a) e = 0,999 segundo o ICH, 2005.

3.2.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do

intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

Tabela 3. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analiticos

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De ± 20% sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor.

Fonte: BRASIL, 2003a

3.2.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: Repetibilidade, Precisão intermadiária e

Reprodutibilidade, nos métodos desenvolvidos forma aplicadas repetitibilidade e precisão intermediária(BRASIL, 2003a).

3.2.4.1.Repetibilidade (precisão intra-corrida):

Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste; (BRASIL, 2003a)

3.2.4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corridas):

Concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003a).

3.4.5. Exatidão

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente como pode ser visto na Equação 1.

Equação 1

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

Um método comum para a realização da exatidão é a adição de padrão que consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. O método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (SNYDER *et al.*, 2007).

3.2.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a suscetibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções

devem ser incluídas no procedimento.

A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

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

Preparo das Amostras	· Estabilidade das soluções analíticas · Tempo de extração
Espectrofotometria	· Variação do pH da solução · Temperatura · Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	· Variação do pH da fase móvel · Variação na composição da fase móvel · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Velocidade do gás de arraste

(BRASIL, 2003a).

A validação dos métodos analíticos é tão importante quanto a própria análise para o controle de qualidade, pois confere confiabilidade aos métodos analíticos empregados, garantindo a total qualidade e segurança da matéria prima, fármaco e/ou medicamento que irá ser manipulado, prescrito e administrado.

3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica considerada indispensável em vários laboratórios. A cromatografia líquida é classificada em diversos modelos de separação, mas todas elas dependem de dois parâmetros básicos: a estrutura e a composição da fase estacionária, e a natureza da interação entre a fase móvel e a fase estacionária com determinados mecanismos de separação.

O emprego da cromatografia líquida de alta resolução para solucionar alguns problemas analíticos, necessita não só da instrumentação adequada, mas também combinação correta de condições instrumentais, como tipo de coluna, fase móvel, temperatura, quantidade de amostra injetada e outros (CIOLA, 1988).

A CLAE ocorre dentro das colunas cromatográficas, essas colunas são preenchidas por fase estacionária extremamente compactada -conveniente de acordo com a amostra- e são projetadas para suportar altas pressões. Essas colunas normalmente são curtas e com paredes grossas, para evitar a deformação da fase estacionária. Na técnica de CLAE tem-se um sistema de bombeamento que é responsável por garantir uma vazão adequada através da coluna, e um sistema detector, que converte a mudança de concentração de compostos da amostra na fase móvel eluente em um sinal, que pode ser registrado por um processador conveniente. Os detectores mais empregados na CLAE são fotômetros no UV e os espectrofotômetros UV/VIS (CIOLA, 1998), mas estudos utilizando detectores de fluorescência e eletroquímicos também podem ser encontrados.

3.4. Espectrofotometria na região UV

A técnica de espectrofotometria na região UV/VIS é uma das técnicas analíticas mais empregadas na realização de ensaios para determinação e quantificação de substâncias devido sua grande robustez, baixo custo e ampla aplicabilidade. Esta técnica é fundamentada pela lei de Lambert-Beer, que é a expressão matemática que relaciona a absorção da luz com as propriedades dos materiais que são atravessados por esta luz, como sua concentração por exemplo, na região ultravioleta, visível e infravermelho (LOBINSKI *et al, 1992;* PERKAMPUS, 1992; LENZ, 1997).

A partir da Lei de Lambert Beer é possível medir a absorção de radiação em determinado comprimento de onda a partir da Equação 2 representada a seguir:

Equação 2

$$\mathbf{A = \log(Io/I) = \varepsilon bc},$$

Em que :

A = absorvância

Io = intensidade da radiação monocromática que incide na amostra

I = intensidade da radiação que emerge da amostra

ε = absortividade molar

c = concentração da espécie absorvente

b = distância percorrida pelo feixe através da amostra.

A absortividade molar é uma grandeza característica da espécie absorvente e está relacionada com o comprimento de onda da luz incidente. Quanto maior for o

valor de ε, maior será a capacidade dessa substância de absorver luz de determinado comprimento de onda em condições pré-estabelecidas de temperatura (LENZ, 1997).

A lei de Lambert-Beer somente pode ser utilizada caso a radiação incidente seja monocromática, ou seja, possua apenas um comprimento de onda, e os centros absorventes atuem independentemente uns dos outros no processo de absorção.

Nesta técnica, o comprimento mais adequado para a determinação da concentração de uma dada substância é aquele onde a determinação é mais precisa, ou seja, onde têm-se o maior valor de absorção e consequentemente a absorção mais intensa, ou seja no pico de absorvância(LOBINSKI *et al, 1992; LENZ, 1997)*.

3.5. Tratamento de resíduos

Os resíduos oriundos das atividades laboratoriais do presente projeto foram recolhidos, segundo protocolo estabelecido pela Comissão Local de Resíduos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, e foram encaminhados para tratamento específico.

4. Material e Métodos

4.1. Material geral

A substância química de referência (SQR) utilizada para a realização dos ensaios foi o difloxacino (Sigma-Aldrich) com teor rotulado de 98,2% de pureza. O padrão apresentou-se como um pó fino, branco e higroscópico.

As amostras de difloxacino utilizadas foram comprimidos revestidos contendo 15 mg de difloxacino, com o nome comercial Dicural®, produzidos pelo Laboratório

Fort Dodge. Os comprimidos apresentados eram comprimidos brancos revestidos por uma cobertura palatável de cor amarelada.

4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.1 Material

O sistema cromatográfico utilizado para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi composto por cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters®, bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters® 2487. A coluna utilizada durante os ensaios foi a Symmetry Waters® C_{18} 5 µm (250 x 4,6 mm).

Na preparação das soluções de padrão e amostra de difloxacino o solvente utilizado foi ácido clorídrico 0,1 *M.*

As soluções foram levadas a ultra-som (Unique) durante 30 minutos para total dissolução do princípio ativo e para a filtração das amostras foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm (Waters®).

4.2.2. Método

4.2.2.1. Preparo da fase móvel

Durante os testes preliminares houve uma grande preocupação em encontrar uma fase móvel que fosse de preparo rápido e fácil, permitisse que o fármaco eluísse pela coluna de maneira adequada, mas que principalmente gerasse uma baixa quantidade de resíduos. A fase móvel escolhida para o desenvolvimento de todos os ensaios foi composta por ácido acético 5% e metanol na proporção 70:30 (v/v). Depois de preparada, a fase móvel foi filtrada e foi levada ao ultrassom por 30 minutos para evitar a formação de bolhas que pudessem interferir no processo.

Todos os reagentes utilizados para o preparo da fase móvel foram reagentes classificados como reagentes de grau CLAE.

4.2.2.2. Preparo da solução padrão

Para o preparo das soluções de padrão, pesaram-se 10,0 mg de difloxacino substância química de referência. Essa quantia de fármaco foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. O balão foi parcialmente completado com ácido clorídrico 0,1 *M* e levado ao ultrassom por 30 minutos, em seguida o volume foi completado até 100 mL obtendo-se uma solução com concentração final de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões de 10 mL e completadas com o mesmo solvente para gerar soluções com diferentes concentrações para que fossem realizados os ensaios.

4.2.2.3. Preparo da solução amostra

Antes do preparo da solução amostra de difloxacino foi realizado o peso médio dos comprimidos, em que foram pesados 20 comprimidos de Dicural® e a partir da média de peso dos 20 comprimidos foram feitas as conversões para pesagem das amostras. Pesou-se o equivalente a 10,0 mg do fármaco e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, que foi levado ao ultrassom por 30 minutos para garantir a total solubilização do princípio ativo. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, gerando solução amostra de difloxacino com concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões de 10 mL e completadas com o mesmo solvente para gerar soluções com diferentes concentrações para que fossem realizados os ensaios.

4.2.3. Ensaio

Para o desenvolvimento do método de determinação e quantificação de difloxacino em comprimidos revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência, após a realização dos testes preliminares onde foram testadas fase móvel, coluna, comprimentos de onda, fluxo, temperatura e volume de injeção, foram padronizadas as condições descritas na Tabela 5, que foram utilizadas durante toda a validação do método.

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas na CLAE

Fase móvel	Ácido acético 5%: metanol (70:30,(v/v)
Coluna	Symmetry Waters® C_{18} 5 µm (250 x 4,6 mm)
Comprimento de onda	279 nm
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20,0 µL
Velocidade de registro	0,5 cm/min
Temperatura	Temperatura ambiente

Antes do início de qualquer ensaio o cromatógrafo foi estabilizado de acordo com as condições descritas por cerca de 30 minutos. As soluções de padrão e amostra foram filtradas em filtro (0,45 µm) antes de serem injetadas.

4.3. Espectrofotometria na região UV

4.3.1.Material

Para o desenvolvimento e validação do método por espectrofotometria na região UV foi utilizado espectrofotômetro UV/Vis, Shimadzu, modelo Uvmini-1240. Na preparação das soluções de padrão e amostra de difloxacino o solvente utilizado

foi ácido clorídrico 0,1 *M* e as soluções foram levadas a ultrassom (Unique) durante 30 minutos para total dissolução.

4.3.2. Método

4.3.2.1. Preparo da solução padrão

Para o preparo das soluções de padrão, pesaram-se 10,0 mg de difloxacino substância química de referência. Essa quantia de fármaco foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. O balão foi parcialmente completado com ácido clorídrico 0,1 *M* e levado ao ultrassom por 30 minutos, em seguida o volume foi completado até 100 mL obtendo-se uma solução com concentração final de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões de 10 mL e completadas com o mesmo solvente para gerar soluções com diferentes concentrações para que fossem realizados os ensaios.

4.3.2.2. Preparo da solução de amostra

Antes do preparo da solução amostra de difloxacino foi realizado o peso médio dos comprimidos, onde foram pesados 20 comprimidos de Dicural® e a partir da média de peso dos 20 comprimidos foram feitas as conversões para pesagem das amostras. Pesou-se o equivalente a 10,0 mg do fármaco e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, que foi levado ao ultrassom por 30 minutos para garantir a total solubilização do princípio ativo. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, gerando solução amostra de difloxacino com concentração de 100,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões de 10 mL e completadas com o mesmo solvente para gerar soluções com diferentes concentrações para que fossem realizados os ensaios.

4.3.3. Ensaio

Para as análises espectrofotométricas, inicialmente foram preparadas soluções em 18 concentrações diferentes a partir da solução com concentração de 100,0 µg/mL, para o estabelecimento da faixa de linearidade do método. Todas as soluções foram imediatamente lidas depois de preparadas em espectrofotômetro UV/VIS. Os parâmetros estabelecidos nos testes preliminares estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Condições utilizadas no ensaio de espectrofotometriana região UV

Branco	Ácido Clorídrico 0,1 *M*
Comprimento de onda	279 nm
Temperatura	Temperatura ambiente

5. Resultados

5.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após a realização dos testes preliminares e da padronização das condições para realização dos ensaios foram obtidos cromatogramas com picos únicos, simétricos e com tempo de retenção médio de 3,7min (Fig. 12).

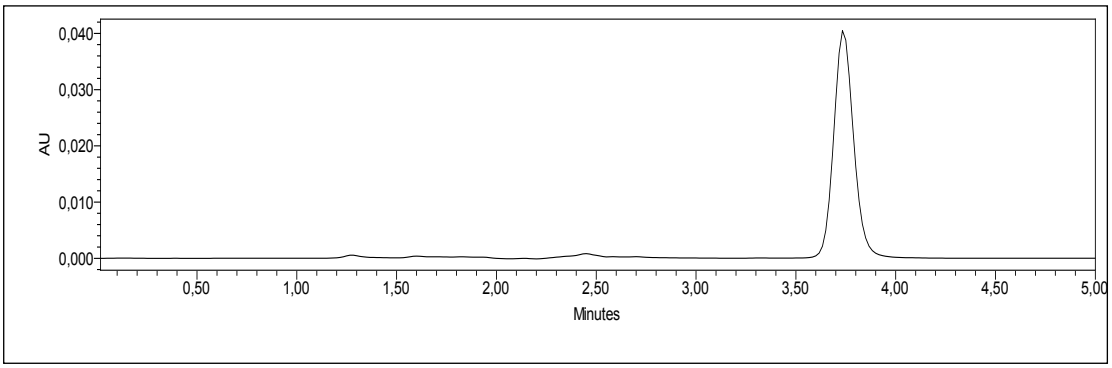

Fig. 12: Cromatograma da solução padrão de difloxaino na concentração de 6 µg/mL.

5.1.1. Curva analítica

O intervalo apresentou-se linear entre 1,0 µg/mL e 6,0 µg/mL que foram utilizadas para construir a curva analítica. Para construção da curva analítica as 6 concentrações foram preparadas e medidas em triplicata. Foram feitas 3 curvas em três dias diferentes e o coeficiente de correlação foi determinado a partir da média de todas as curvas. O coeficiente de correlação obtido foi 0,9997 (Fig. 13) e os valores médios das áreas referentes ao pico do difloxacino podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores médios das áreas referentes ao pico de difloxacino SQR

Concentração (µg/mL)	Áreas	Área média	CV%
	87223		
1,0	87752	86777,7	1,45
	85358		
	172007		
2,0	169744	171771,7	1,12
	173564		
	255231		
3,0	251130	253623,7	0,86
	254510		
	334654		
4,0	338283	331649,0	2,58
	322010		
	446203		
5,0	437893	442048,0	1,33
	443683		
	492875		
6,0	491930	494549,3	0,76
	498843		

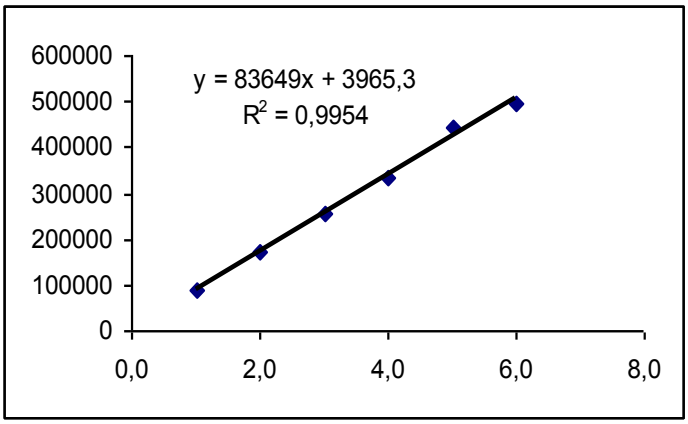

Fig. 13: Curva analítica de difloxacino obtida pelo método por CLAE

5.1.2. Exatidão

A exatidão foi calculada pelo método da adição de padrão, em que diferentes quantidades conhecidas de padrão são adicionadas a quantidades constantes de amostra. As soluções utilizadas neste ensaio foram preparadas em balão volumétrico de 10mL que foram completados com ácido clorídrico 0,1 *M* de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Preparo das soluções para o teste de recuperação de difloxacino

	Volume adicionado de amostra (100µg/mL)	**Volume adicionado de DIFX SQR (100 µg/mL)**	**Concentração final (µg/mL)**
Amostra	200µL	-	2,0
R1	200µL	80, µL	2,8
R2	200µL	150 µL	3,5
R3	200µL	220 µL	4,2
Padrão	-	200µL	2,0

A porcentagem de difloxacino recuperada após a realização das análises foi calculada pela Equação 1 representada a seguir:

Equação 1

$$\%R = [(Cr - Ca)/Cp] \times 100$$

Em que:

Cr = concentração final (µg/mL)

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Cp = Concentração teórica da solução de padrão adicionada (µg/mL)

Na Tabela 9 é possível observar o valor das recuperações médias obtidas no ensaio de exatidão.

Tabela 9: Valores médios de recuperação obtidos pelo método por CLAE

	DIFX adicionado (µg/mL)	**DIFX encontrado (µg/mL)**	**Recuperação (%)**	**Recuperação Média (%)**
R1	2,5	2,68	100,62	
R2	3,5	3,40	101,42	*100,6*
R3	4,2	4,07	98,16	

5.1.3. Precisão

A precisão do método foi realizada a partir da análise de 7 soluções de difloxacino substância química de referência com concentração de 3,5 µg/mL no mesmo dia (precisão intradia) que resultou em um coeficiente de variação de 1,35% (Tabela 10) e em dias diferentes (precisão interdia) obtendo-se um coeficiente de variação de 1,64 % (Tabela 11).

Tabela 10: Valores obtidos no ensaio de precisão intradia do método por CLAE

P1	Média	CV(%)	P2	Média	CV (%)	CV (%) médio
281417			288756			
283856			284667			
282122			286974			
283782	281417	1,95	285778	285629	0,76	1,35
280393			281690			
270322			285906			
288026			285629			

Em que:

P1 = áreas obtidas a partir da leitura de 7 soluções padrão analisadas primeiramente

P2 = àreas obtidas a partir da leitura de 7 novas soluções de padrão realizadas no memso dia

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 11: Valores obtidos no ensaio de precisão interdia do método por CLAE

P1	Média	CV(%)	P3	Média	CV (%)	CV (%) médio
281417			290920			
283856			287755			
282122			290950			
283782	281417	1,95	289586	287866	1,32	1,64
280393			280299			
270322			289706			
288026			285843			

Em que:

P1 = áreas obtidas a partir da leitura de 7 soluções padrão analisadas primeiramente

P3 = àreas obtidas a partir da leitura de 7 novas soluções de padrão realizadas em dias diferentes

CV = Coeficiente de variação

5.1.4. Doseamento

O doseamento foi realizado a partir da comparação de 7 soluções de padrão na concentração de 3,5 µg/mL e 7 soluções de difloxacino amostra com a mesma concentração em 3 dias diferentes. O valor médio de difloxacino encontrado na amostra de Dicural® comprimidos revestidos foi de 94,70 % como pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12: Doseamento de difloxacino comprimidos revestidos pelo método por CLAE

Dia	Teor de DIFX		Teor médio (%)	CV (%)
	µg/mL	(%)		
1	3,33	95,26		
2	3,30	94,48	94,70	0,51
3	3,30	94,36		

5.1.5. Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção foram calculados com base nas equações da reta obtidas a partir das curvas analíticas. O limite de detecção foi calculado a partir da Equação 4:

Equação 4

$$LD = 3,0 \times d/a$$

O limite de quantificação foi calculado a partir da Equação 5:

Equação 5

$$LQ = 10 \times d/a$$

Em que:

d = desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas

a = média dos coeficientes angulares da reta.

A partir destes cálculos foram obtidos valores para os limites de detecção e quantificação iguais a 0,07 e 0,24 µg/mL, respectivamente.

5.1.6. Seletividade

A seletividade do método foi calculada a partir da comparação entre os valores obtidos a partir das leituras de 7 soluções amostra e 7 soluções padrão , utilizando-se os teste *t* de student e teste F (INMETRO, 2007), em ambos os testes o valor calculado foi menor que o valor tabelado, indicando que não há interferências dos excipientes no ensaio. Para confirmar a seletividade foi realizada a degradação de difloxacino untilizando NaOH 1 *M* e H2O2 1 % e luz UVC. Nos cormatogramas é possível observar que houve degradação de difloxacino, gerando picos de absorção em tempo médio de 2,5 minutos e na sobreposição dos cromatogramas é possível verificar que a área do pico de difloxacino é menor em relação ao padrão não degradado.

Para realização da degradação de padrão de difloxacino, 600µL da solução padrão de difloxacino foi transferida em triplicata para balão volumétrico de 10mL,

adicionou-se 5mL de solução de NaOH 1 *M e* após um período de 3 horas o balão foi completado com HCl 0,1*M e* essa solução foi lida sob as mesmas condições estabelecidas para o restante o ensaio, como resultado foi obtido o cromatograma apresentado na Fig. 13.

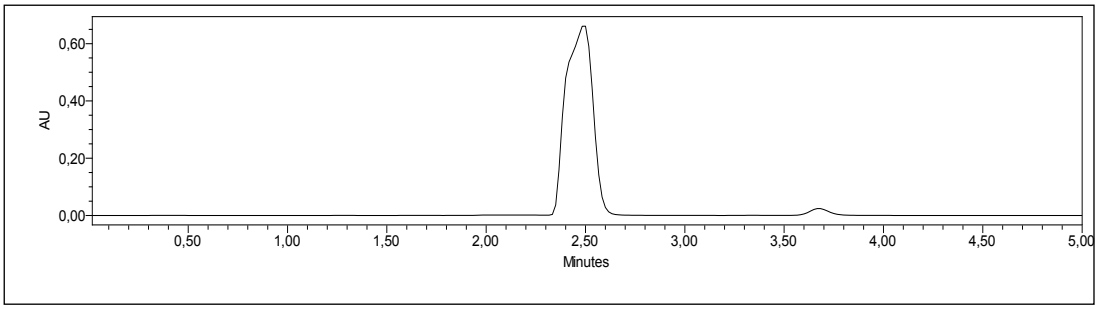

Fig. 13: Cromatograma da solução padrão de difloxacino degradada por NaOH 1 *M*

Na Fig. 14 é possível observar a sobreposição dos cromatogramas de difloxacino solução padrão e difloxacino degradado por NaOH 1 *M*, onde é possível observar que o tempo de retenção do pico gerado pelo produto de degradação(2,5 min) é distintoa do tempo de retenção do pico do analito(3,7min).

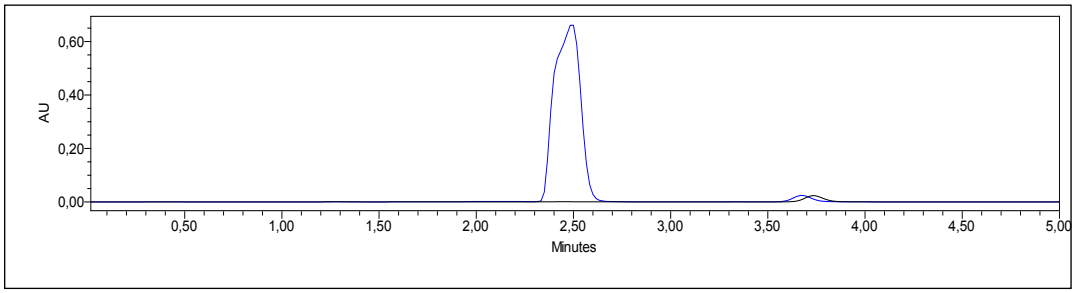

Fig 14: sobreposição do cromatograma da solução padrão de difloxacino e difloxacino degradado por NaOH 1 *M* (azul).

Para a realização da degradação de padrão de difloxacino, 600µL da solução padrão de difloxacino foi transferida em triplicata para balão volumétrico de 10mL adicionou-se 5mL de de solução H_2O_2 1 % e após um período de 3 horas o balão

foi completado com HCl 0,1*M e* essa solução foi lida sob as mesmas condições estabelecidas para o restante o ensaio, como resultado foi obtido o cromatograma apresentado na Fig.15.

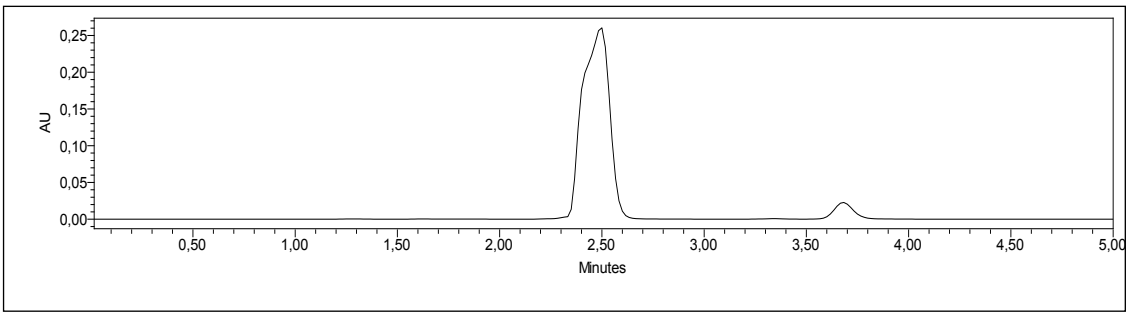

Fig 15: Cromatograma da solução padrão de difloxacino degradada por H_2O_2 1%.

Na Fig. 16 é possível observar a sobreposição dos cromatogramas de difloxacino solução padrão e difloxacino degradado por H_2O_2 1%, onde é possível observar a alteração do tempo de retenção do pico de interesse além do aparecimento de um novo pico.

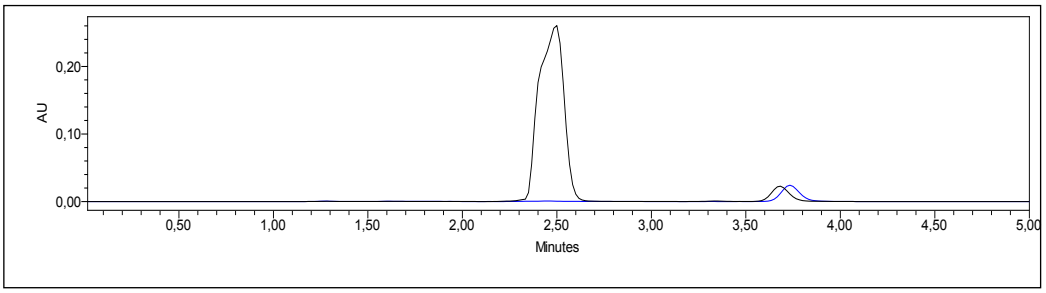

Fig 16: Sobreposição do cromatograma da solução padrão de difloxacino e difloxacino degradado por H_2O_2 1% (preto).

Para realização da degradação de padrão de difloxacino, 600µL da solução padrão de difloxacino foi transferida em triplicata para balão volumétrico de 10mL e completada com HCl 0,1 *M* obtendo-se uma solução com concentração de 6,0 µg/mL. Essa solução foi levada a luz UVC 540nm por três dias e injetada no

cromatógrafo sob as mesmas condições estabelecidas para o restante do ensaio, como resultado foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 17.

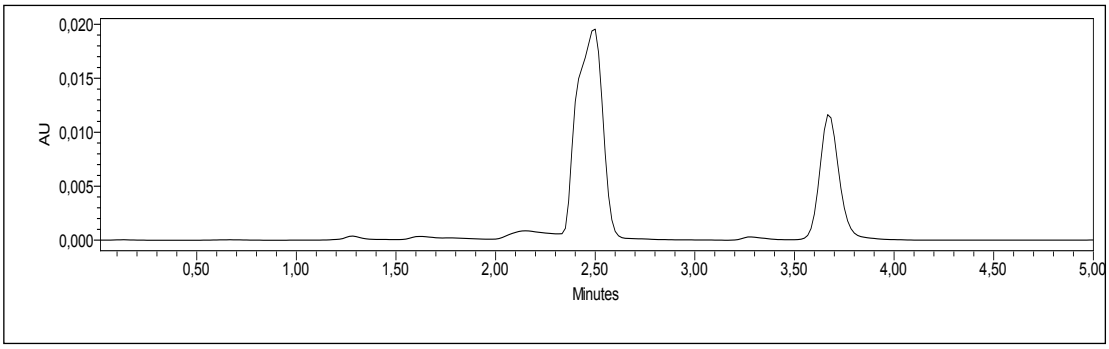

Fig. 17: Cromatograma da solução padrão de difloxacino degradada por Luz UVC.

Na Figura 18 é possível observa a sobreposição dos cromatogramas de difloxacino solução padrão e difloxacino degradado por Luz UVC, onde é possível observar que o tempo de retenção do pico gerado pelo produto de degradação (2,5 min) é distintoa do tempo de retenção do pico do analito (3,7min).

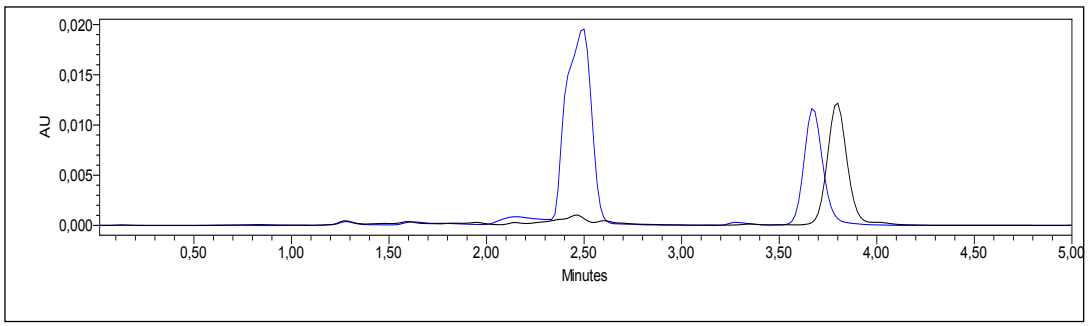

Fig. 18: sobreposição do cromatograma da solução padrão de difloxacino e difloxacino degradado por Luz UVC (azul).

Na Figura 19 é possível observar a sobreposição do cromatograma da solução padrão não degradada e das soluções de difloxacino padrão degradadas pelos diferentes solventes e pela luz UVC.

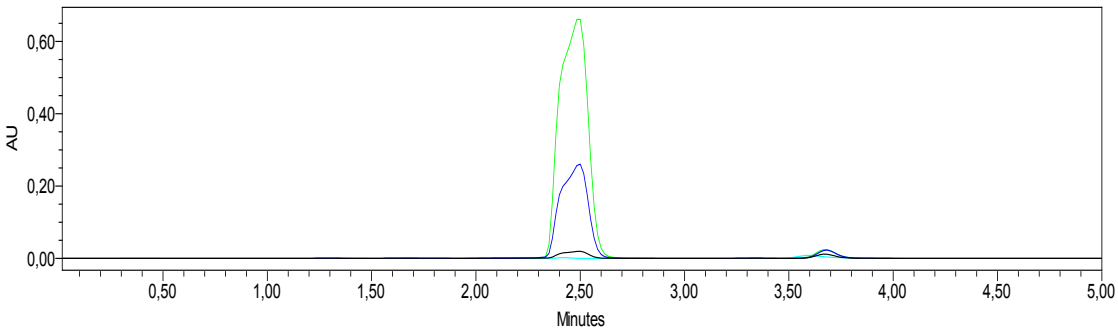

Fig 19: sobeposição das soluções de difloxacino padrão (azul claro) e degradado por NaOH 0,1 *M* (verde),H_2O_2 (azul escuro) e luz UVC (preto).

Com a sobreposição desses cromatogramas, comprova-se visualmente que o método é seletivo, pois é capaz de detectar uma pequena diferença entre as áreas das soluções degradadas e não degradadas, uma alteração nos tempos de retenção, além dos novos picos gerados em um tempo médio de 2,5minutos.

5.1.7. Robustez

A robustez do método foi avaliada variando-se o comprimento de onda utilizado no ensaio. Foram realizadas as leituras variando-se o comprimento de onda de 279 nm para 276 nm e a partir dos testes F e *t* de student foi possível verificar com 95% de confiança que não há diferença na metodologia perante uma pequena variação do comprimento de onda (INMETRO, 2007), pois os valores de *t* e F calculados (1,31 e 0,27, respectivamente) foram menores que os valores de *t* e F tabelados (2,18 e 4,28 respectivamente).

5.2. Espectrofotometria na região UV

5.2.1. Curva Analítica

O intervalo apresentou-se linear entre 3,0 a e 8,0 µg/mL, que foram utilizadas

para construir a curva analítica. Para construção da curva analítica as 6 concentrações foram preparadas e medidas em triplicata. Foram feitas 3 curvas em três dias diferentes e o coeficiente de correlação foi determinado a partir da média de todas as curvas (Tabela 13). O coeficiente de correlação obtido foi 0,9999 (Fig. 18).

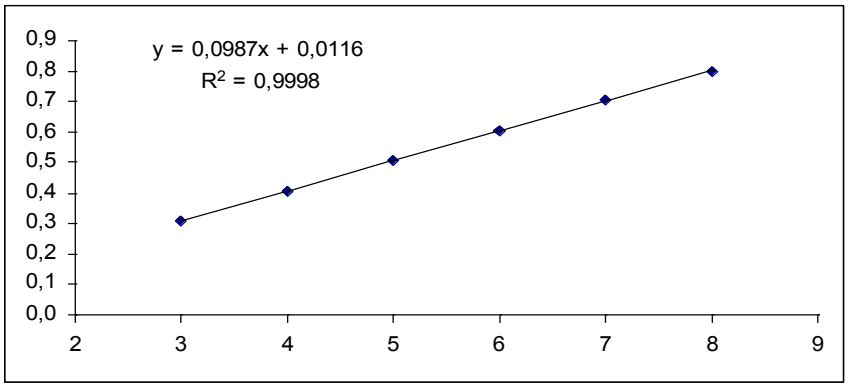

Fig 18: Curva analítica difloxacinoobtida por espectrofotometria na região UV.

Tabela 13: Valores médios dos valores de absorvância obtidos a partir da leitura das soluções de difloxacino substância de referência pelo método por espectrofotometria na região UV.

Concentração (µg/mL)	Absorvâncias	Absorvâncias médias	CV%
	0,2815		
3,0	0,2965	0,2905	2,73
	0,2935		
	0,3781		
4,0	0,3646	0,3739	2,16
	0,3790		
	0,4618		
5,0	0,4691	0,4679	1,20
	0,4728		
	0,5681		
6,0	0,5562	0,5627	1,07
	0,5638		
	0,6504		
7,0	0,6509	0,6496	0,27
	0,6476		
	0,7395		
8,0	0,7443	0,7457	0,95
	0,7534		

5.2.2. Precisão

Os valores de precisão foram obtidos a partir da leitura de sete soluções de difloxacino na concentração de trabalho 5,5 µg/mL. A precisão intradia foi realizada em um mesmo dia por diferentes analistas com um coeficiente de variação de 1,87% (Tabela 14). A precisão interdia foi realizada em dias diferentes e o coeficiente obtido foi de 1,92%, como pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 14: Valores obtidos no ensaio de precisão intradia por espectrofotometria na região UV.

P1	Média	CV(%)	P2	Média	CV (%)	CV (%) médio
0,5652			0,5599			
0,5493			0,5403			
0,5548			0,5471			
0,5595	0,5581	1,60	0,5594	0,5516	2,05	1,87
0,5690			0,5677			
0,5447			0,5364			
0,5648			0,5510			

Em que:

P1 = áreas obtidas a partir da leitura de 7 soluções padrão analisadas primeiramente

P2 = àreas obtidas a partir da leitura de 7 novas soluções de padrão realizadas no memso dia

CV = Coeficiente de variação

Tabela 15: Valores obtidos no ensaio de precisão interdia por espectrofotometria na região UV.

P1	Média	CV(%)	P3	Média	CV (%)	CV (%) médio
0,5652			0,5333			
0,5493			0,5671			
0,5548			0,5464			
0,5595	0,5581	1,60	0,5537	0,5569	2,25	1,92
0,5690			0,5638			
0,5447			0,5725			
0,5648			0,5621			

Em que:

P1 = áreas obtidas a partir da leitura de 7 soluções padrão analisadas primeiramente

P2 = àreas obtidas a partir da leitura de 7 novas soluções de padrão realizadas em dias diferentes

CV = Coeficiente de variação

5.2.3.Exatidão

A exatidão foi calculada pelo método da adição de padrão, em que diferentes quantidades conhecidas de padrão são adicionadas a quantidades constantes de amostra. As soluções utilizadas neste ensaio foram preparadas em balão volumétrico de 10mL que foram completados com ácido clorídrico 0,1 *M* de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16. Preparo das soluções utilizadas no ensaio de recuperação pelo método UV

	Volume adicionado de amostra (100µg/mL)	**Volume adicionado de padrão (100µg/mL)**	**Concentração Final(µg/mL)**
Amostra	200 µL	-	2,0
R1	200 µL	240 µL	4,4
R2	200 µL	350 µL	5,5
R3	200 µL	460 µL	6,6
Padrão		200 µL	2 ,0

A porcentagem de difloxacino recuperada após a realização das análises foi calculada pela seguinte Equação 3:

Equação 3

$$\%R = [(Cr - Ca)/Cp] \times 100$$

Em que:

*Cr = concentração final (*µg/mL)

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Cp = Concentração teórica da solução de padrão adicionada (µg/mL)

A recuperação média obtida pelo método de espectrofotomeria na região UV foi de 98,6 %, como é possível observar na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de recuperação obtidos no método de espectrofotometria na região UV

	DIFX adicionado (µg/mL)	**DIFX encontrado (µg/mL)**	**Recuperação (%)**	**Recuperação Média (%)**
R1	2,4	2,39	99,88	
R2	3,5	3,42	97,77	98,6
R3	4,6	4,51	98,16	

5.2.4. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação como indicado nas Equações 4 e 5.

Equação 4 Equação 5

LOD = 3,3 x s/ a LOQ = 10 x s/ a

Em que:

s = desvio padrão dos coeficientes lineares de todas as curvas analíticas realizadas.

a = média dos coeficientes angulares de todas as curas analíticas realizadas.

Os valores de LOD e LOQ obtidos por este método foram 0,11 e 0,32 µg/mL, respectivamente.

5.2.5. Robustez

No ensaio de robustez foram testadas variações de comprimento de onda de 279nm para 277nm e 281nm e variações de tipo de balão utilizado, balões transparentes e balões âmbar. O calculo da robustez foi realizado matematicamente através dos testes F e teste t de *Student*. No teste F é possível verificar se os valores encontrados para as duas variáveis possuem a mesma variabilidade, e no teste t, verifica-se se as médias obtidas são estatisticamente iguais, utilizando estes dois testes em conjunto é possível verificar se pequenas variações no método não interferem nos resultados obtidos (robusto)(INMETRO,2007) .

O método apresentou-se robusto para variações de comprimento de onda, com valores de F calculado menores que os de F tabelado, assim como os valores de *t*. Entretanto o mesmo não ocorreu para o parâmetro balões incolores e balões âmbar, resultado já esperado devido a grande fotosensibilidade das quinolonas (

MARINEZ *et al*, 2006).

5.2.6. Doseamento

A quantidade de difloxacino encontrada na amostra de Dicural® foi calculada comparando-se as absorvâncias obtidas com as soluções de padrão e as absorvâncias obtidas com as soluções de amostra. A porcentagem de difloxacino encontrada nas amostras de Dicural® comprimidos revestidos foi de 105,05% como pode ser obsrvado na TAbela 18.

Tabela 18: Doseamento de difloxacino comprimidos revestidos pelo método espectrofotométrico na região UV

Dia	Teor de DIFX		Teor médio (%)	CV (%)
	µg/mL	(%)		
1	5,24	104,88		0,59
2	5,26	105,17	105,05	0,25
3	5,29	105,10		0,32

5.2.7.Seletividade

A seletividade do método de espectrofotometria na região UV foi calculada a partir da comparação entre os valores obtidos a partir das leituras de 7 soluções amostra e 7 soluções padrão , utilizando-se os teste *t* de student e teste F (INMETRO, 2007), em ambos os testes o valor calculado foi menor que o valor tabelado, indicando que não há interferências dos excipientes no ensaio, porém os valores de *t* e F encontrados foram maiores dos que os encontrados no método por CLAE..

6. Discussão e Conclusão

O uso indiscriminado e incorreto de antimicrobianos que se desencadeou após o aparecimento da indústria farmacêutica, tem cada vez mais impacto na sociedade, pois além das terapias não surtirem efeito, esse uso pode desencadear processos de mutações microbianas gerando bactérias multirresistentes a antibióticos e antimicrobianos. Por isso desenvolver metodologias analíticas que sejam precisas, capazes de detectar pequenas quantidades de substância na amostra, rápidas e de fácil execução pelo manipulador é de extrema importância tanto para os produtores de medicamentos quanto para os consumidores que terão a garantia de receber medicamentos de qualidade. Essa preocupação deve estender-se para medicamentos veterinários, pois são cada vez mais comuns no mercado e não são fiscalizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e sim pelo Ministério da Agricultura. Ambos os métodos apresentados neste estudo foram desenvolvidos, validados e apresentaram resultados satisfatórios de acordo com os parâmetros estabelecidos pela RDC 899 (BRASIL, 2003a) e pelo INMETRO (2007), que garantem a eficácia do método desenvolvido.

O desenvolvimento de dois métodos para quantificação de uma mesma substância é interessante, pois possibilita a realização de testes confirmatórios e a escolha da metodologia a ser realizada pelo fabricante de acordo com sua estrutura, equipamentos, funcionários disponíveis e momento da produção. O método espectrofotométrico na região UV por exemplo, pode ser uma alternativa para indústrias e farmácias de pequeno porte, e durante o processo produtivo, já que é um método mais rápido, de menor custo, não necessita de operador altamente qualificado, utiliza solventes em menor quantidade e gera poucos resíduos. Porém, o

método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência apresentou-se mais seletivo e mais sensível, além de apresentar baixa geração de resíduos, sendo o mais indicado para a rotina de laboratórios de controle de qualidade de indústrias de grande porte com condições estruturais e financeiras para arcar com os custos para compra e manutenção dos equipamentos necessários.

As metodologias não se mostraram robustas para a variação de cor dos balões utilizados para o preparo das soluções, indicando a fotossensibilidade das soluções preparadas a partir de difloxacino e a importância do cuidado no preparo dessas soluções para a execução dos testes durante a rotina.

Após todos os ensaios realizados, desenvolvidos e validados é possível concluir que os métodos apresentados podem ser utilizados na rotina de laboratórios de controle de qualidade de grandes indústrias, além disso a metologia desenvolvida por espectrofotometria na região UV é uma boa alternativa para indústrias menores por ser uma metodologia simples, rápida e de baixo custo para identificação e quantificação de difloxacino comprimidos revestidos.

7. Referências Bibliográficas

ABD-EL-ATY, A.M.; GOUDAH, A.;ISMAIL, M.; SHIMODA, M.Disposition Kinetics of Difloxacin in Rabbit after Intravenous and Intramuscular Injection of Dicural . **Veterinary Research Comunications**, v.29, n.4, p. 297- 304, 2005.

ANDRIOLE, V.T. **The Quinolones.** 3. ed. Yale University School of Medicine, New Haven, 2000.

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

BALL, P. New antibiotics for community-acquired lower respiratory tract infections: improved activity at a cost. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.263-72, 2000.

BARLOW, A.M. Nalidixic acid in infections of urinary tract. Br. Med. J., v.2, p.1308-1310, 1996.

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

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

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, v.1, 2007

CÁRCERES, M.I.R.; GUIBERTAU, A.C.; DÍAZ, T.G.; MARTÍNEZ, M.A.C. Simultaneous determination of quinolones for veterinary use by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of**

Chromatography B, v.878, n.3-4, p.398-402, 2010.

CARRILLO, M. P. Aplicación de fluoroquinolonas en Medicina Veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacocinéticos/farmacodinámicos. Universidad de Murcia (doctorado en farmacología).

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

CLEMENTE, M.; HERMO, M.P.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography–UV, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle. **Journal of Chromatography A,** Volume 1135, Issue 2, 1 December 2006, Pages 170-178.

DING, F.; JIYUE, C.; LIBAO, M.; QIANHENG, P.; ZHIPING, F.; XIAOCONG, L. Pharmacokinetics and tissue residues of difloxacin in crucian carp (Carassius auratus) after oral administration. **Aquaculture**, v.256, n.1-4, p.121-128, 2006.

EMEA - European Medicines Agency *Veterinary Medicines and Inspections,Committee For Medicinal Products for Veterinary Use* (CVMP).Public statement on the use of (fluoro)quinolones in food-producing animals in the european union: development of resistance and impact on human and animal health London 15February, 2007.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. São Paulo: Ed. FIocruz, 2010.

FEDERAL REGISTER, Freedom of information summary, NADA 141-096, November 20, 1997.

FDA. FDA announces final decision about veterinary medicine, 2005.

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

FANGKE DING, JIYUE CAO, LIBAO MA, QIANSHENG PAN, ZHIPING FANG, XIAOCONG LU. Pharmacokinetics and tissue residues of difloxacin in crucian carp (Carassius auratus) after oral administration. **Mendley Biological Sciences**, v.256, n.1-4, p. 121-128, 2006.

GALARINI, R.; FIORONI, L.; ANGELUCCI, F.; TOVO, G. R.; CRISTOFANI, E. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A,** v.1216, n.46, p.8158-8164, 2009.

HARBOTTLE,H., THAKUR, S., ZHAO, S., WHITE, D.G.. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology** v.17 n.2:, p. 111-124, 2006

HASSOUAN, M.K.; BALLESTEROS; ZAFRA, A.; VILCHÉZ, J.L.; NAVALÓN, A. Multiresidue method for simultaneous determination of quinolone antibacterials in pig kidney samples by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v.859, n.2, p.282-288, 2007

HERMO, M.P.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromagraphy–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1104, n.1-2, p. 135-139, 2006.

JIMÉNES, V.; RUBIES, A.; CENTRICH, F. COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Cromatograph A**, v.1218,n.11, p.v1443-1451, 2011.

K. ABO-EL-SOOUD, A. GOUDAH. Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of difloxacin in dromedary camels (*Camelus dromedaius*). **The Veterinary Journal,** v. 179, n. 2, p. 282-286, 2009.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO,JLS.; NUNES, L.C.C.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. Rev. Bras. Farm., v88, n4, p. 177- 180, 2007.

LESHER, G. Y., FROELICH, E. J., GRUETT, M. D., BAILEY, J. H., AND BRUNDAGE, R. P. 1, 8-naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. J. med. pharm. Chem., v.1063. ,n. 5, 1962.

LING, Z. Y. and XIAN L. Y. Effects of fish cytochromes P450 inducers and inhibitors on difloxacin N-demethylation in kidney of Chinese idle (*Ctenopharyngodon idellus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, November,2009.

LOPES G.T, ROSA J; ELY L.S; ENGROFF P, DE CARLI G.A. Incidência de parasitos intestinais em pessoas idosas e avaliação da possível transmissão através do contato entre os indivíduos idosos e cães e gatos domésticos na cidade de Porto Alegre. X Salão de Iniciação Científica PUCRS , 2009. p. 956-958.

MAGALHÃES, L.C.G. Estratégia empresariais e crescimento na indústria farmacêutica Brasileira: Investimentos, fusões e aquisições, 1988-2002. Texto para discução, Instituto de Pesquisas Econômicas Aplicadas, 2006.

MARÍN, P.; VARÓN, E. F.; ESCUDERO, E.; CÁRCELES, C.M. Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of difloxacin in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.83, n.2, p.234-238, 2007.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. **The Veterinary**

Journal, v.172, n.1, p.10-28, 2006. Saúde

MEDEIROS, F.N.S. Sáude Animal animal: Brasil já é o segundo maior produtor de insumos Inovação. Uniemp v.2 n.3 Campinas jul./ago. 2006.

NAGESWARA, R.; NAGARAJU, V. Separation and determination of synthetic impurities of difloxacin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p. 729-735, 2004.

OMS, Boas práticas da OMS para laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos. OMS séries de informes técnicos, n. 957. Anexo 1 , 2010.

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

PEREIRA, A.M.P.T. Determinação de resíduos de fluorquinolonas em amostras de tecido muscular de frangos e respectivo impacto na saúde humana. Disertação para obtenção de grau de mestre, Faculdade de Medicina de Coimbra. Coimbra, 2009.

SANTORO, M. R. M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

SNYDER, L. R. ; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; ***Practical HPLC Method Development***, 2ª ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15.

SI-JUN ZHAO, CUN LI, HAI-YANG JIANG, BING-YU LI, JIAN-ZHONG SHEN. Simultaneous Determination of 7 Quinolones Residues in Animal Muscle Tissues by High Performance Liquid Chromatography. **Chinese Journal of**

Analytical Chemistry, v. 35, n. 6, p.786-790, 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP). 31th ed. United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2008.

VAN BAMBEK, F.; MICHOT, J.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n.11, p.256-280, 2005.

VARÓN, E. F., CÁECELES C. M.; MARÍN, P;VANCRAEYNEST , D; MONTES, A; SOTILLO, J; GARCÍA MARTINEZ, J.D. Disposition kinetics and pharmacocinetics-pharmacodynamic integration of difloxacin againist Staphylococcus aureus from rabbits. **Researsh in Veterinary Science**, v.84, n.1, p. 90-94, 2008.

WHO. The medical impact of the use of antimicrobial drugs in food animals. Report of the World Health Organization´s Meeting, Berlim p. 13-17, 1997.

WHO. Antimicrobial resistance from food animals. INFOSAN information note No. 2 – Antimicrobial Resistance, 2008.

ZHANG, M.Q.; HAEMERS, A. Quinolone antimicrobial agents: structure-activity relationships. **Pharmazie**, v.46, p.687-700, 1991.