

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA**



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE OFLOXACINO COLÍRIO POR TURBIDIMETRIA**

ROBERTA KAROLEEN MOURA NOBRE

ARARAQUARA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE OFLOXACINO COLÍRIO POR TURBIDIMETRIA**

ROBERTA KAROLEEN MOURA NOBRE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar e acima de tudo. Muito obrigada pelas bênçãos e proteções concedidas, hoje e sempre.

Aos meus pais, por tornar esse sonho possível.

Ao Anderson, por estar sempre ao meu lado.

À professora Hérica, muito obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e apoio durante a execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, muito obrigada pela convivência e por tornar melhor a rotina de trabalho, em especial à Edith Cristina e à Josilene pelas dúvidas esclarecidas e por toda a paciência.

Aos amigos, por todo o apoio, confiança, carinho e pela amizade imprescindível de todos vocês, em especial à Gabriela, à Tabata, ao Daniel, ao Pedro e ao Warley.

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso aos meus pais e irmão, Humberto, Cida e Willian, que apesar da distância, se mostraram sempre presentes e permitiram que o sonho de cursar uma faculdade se tornasse realidade. A eles sou eternamente grata por todo amor, carinho e dedicação.

1. RESUMO

O ofloxacino, uma fluorquinolona de segunda geração, foi sintetizada em 1982, apresenta eficácia e segurança no tratamento comprovadas. A determinação da potência dos antimicrobianos é importante no controle e na garantia da qualidade das preparações farmacêuticas e faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados no doseamento desses fármacos. Dentre os ensaios microbiológicos, os mais comumente empregados são o de difusão em ágar e o turbidimétrico. Na literatura, apenas são encontradas descrições de ensaios para o ofloxacino utilizando o método de difusão em ágar. O método turbidimétrico tem como uma das principais vantagens, a necessidade de menor tempo de análise. O método consiste na avaliação quantitativa de substâncias em função da turbidez de suas suspensões, proporcional a seu poder de difração sobre luz incidente (efeito Tyndall) (FB 5, 2010).

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método microbiológico analítico para quantificação do ofloxacino que possa ser usado para análises rotineiras em laboratórios de controle de qualidade. Os parâmetros estudados para a validação do método analítico para quantificação do ofloxacino não atenderam a todas as especificações recomendadas. Assim sendo, pode-se concluir que este trabalho de conclusão de curso, não conseguiu atingir seu objetivo que era de desenvolver e validar uma metodologia analítica. O método demonstrou desenvolvimento complexo e trabalhoso e não apresentou o paralelismo e exatidão necessários para validação.

Palavras-chave: controle de qualidade, método microbiológico por turbidimetria, ofloxacino, validação

Sumário

Lista de Tabelas	6
Lista de Figuras	8
1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	9
3. OBJETIVO	10
4. REVISÃO DE LITERATURA	10
HISTÓRIA	10
MECANISMO DE AÇÃO	12
ESPECTRO DE AÇÃO	12
USO TERAPÊUTICO DO OFLOXACINO EM SOLUÇÃO OFTÁLMICA	13
EFEITOS ADVERSOS	13
INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS	14
CONTRA-INDICAÇÕES	14
CONTROLE DE QUALIDADE	14
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	16
5. EXPERIMENTAL	18
MATERIAL	18
MÉTODO	19
ENSAIOS PRELIMINARES	21
CURVA ANALÍTICA	29
VALIDAÇÃO	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para determinação do ofloxacino em solução oftálmica.21
- Tabela 2** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 4%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*. ...22
- Tabela 3** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*. ...22
- Tabela 4** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*. ...23
- Tabela 5** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 4%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.23
- Tabela 6** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.24
- Tabela 7** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.24
- Tabela 8** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 4%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.25
- Tabela 9** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.25
- Tabela 10** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.26
- Tabela 11** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.26
- Tabela 12** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.27
- Tabela 13** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.27
- Tabela 14** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo-teste *S. epidermidis*.28
- Tabela 15** - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo-teste *E.coli*.28

Tabela 16 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo teste <i>E. coli</i>	28
Tabela 17 - Parâmetros estabelecidos para a determinação de ofloxacino em solução oftálmica para ensaio microbiológico – método turbidimétrico	29
Tabela 18 - Preparo das soluções para o teste de recuperação.....	31
Tabela 19 - Valores das absorvâncias obtidas no método turbidimétrico durante o teste de linearidade	32
Tabela 20 - Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico do ofloxacino pelo método turbidimétrico	33
Tabela 21 - Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução padrão de ofloxacino, pelo método turbidimétrico	35
Tabela 22 - Valores experimentais obtidos na exatidão do ofloxacino padrão, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico	35
Tabela 23 – Valores de absorvâncias medidas durante o teste de precisão intradia.....	35
Tabela 24 - Valores de absorvâncias medidas durante o teste de precisão interdia.....	36
Tabela 25 - Valores de absorvâncias medidas durante o teste de precisão e entre analistas	36
Tabela 26 - Valores da determinação da robustez do método turbidimétrico, na concentração 12,0 µg/mL	36

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura química do ácido nalidíxico.	10
Figura 2 - Quinolonas de segunda geração.	11
Figura 3 - Curvas analíticas de soluções de ofloxacino, substância referência, e amostra, em concentrações de 6,0; 12,0 e 24,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.	32

2. INTRODUÇÃO

As fluorquinolonas são um grupo de compostos de origem sintética, que apresentam eficácia terapêutica e farmacológica e são empregadas no tratamento de infecções oculares desde o início dos anos 90 (STROMAN, 2005).

O ofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração, disponível na forma farmacêutica solução oftálmica, (VADE-MÉCUM, 2007) e é o segundo fármaco mais prescrito no mundo (ANDREU et al., 2007).

O espectro de ação do ofloxacino é amplo e atua contra os micro-organismos aeróbios Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pneumoniae*; aeróbios Gram-negativos como *Haemophilus influenzae* e *P. aeruginosa*; e espécies anaeróbias como *Propionibacterium acnes* (ANVISA, 2012).

O desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para este fármaco é justificado devido seu potencial terapêutico, grande emprego em terapias microbianas e baixo custo, como também pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos antimicrobianos está relacionada ao desenvolvimento de cepas resistentes, como consequência da administração de doses subterapêuticas.

Dessa forma, a importância da determinação da potência dos antimicrobianos para o controle e a garantia da qualidade das preparações farmacêuticas é observada e faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados no doseamento desse fármaco.

3. OBJETIVO

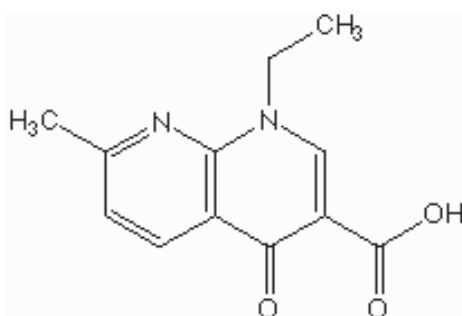
Desenvolver um método microbiológico analítico de quantificação do ofloxacino que possa ser usado para análises rotineiras em laboratórios de controle de qualidade.

4. REVISÃO DE LITERATURA

HISTÓRIA

A primeira quinolona utilizada comercialmente foi o ácido nalidíxico, mostrado na figura 1, em 1962, descoberta como um subproduto da síntese da cloroquina, por Lesher e colaboradores (OLIPHANT et al., 2002).

Figura 1- Estrutura química do ácido nalidíxico.



Na década de 70, outros dois compostos foram introduzidos, o ácido oxolínico e a cinoxacino, análogos estruturais do ácido nalidíxico. Por apresentarem restrito espectro de atividade antibacteriana, rápido desenvolvimento de resistência e certas limitações farmacocinéticas, o interesse por este grupo diminuiu rapidamente (BERGAN, 1988).

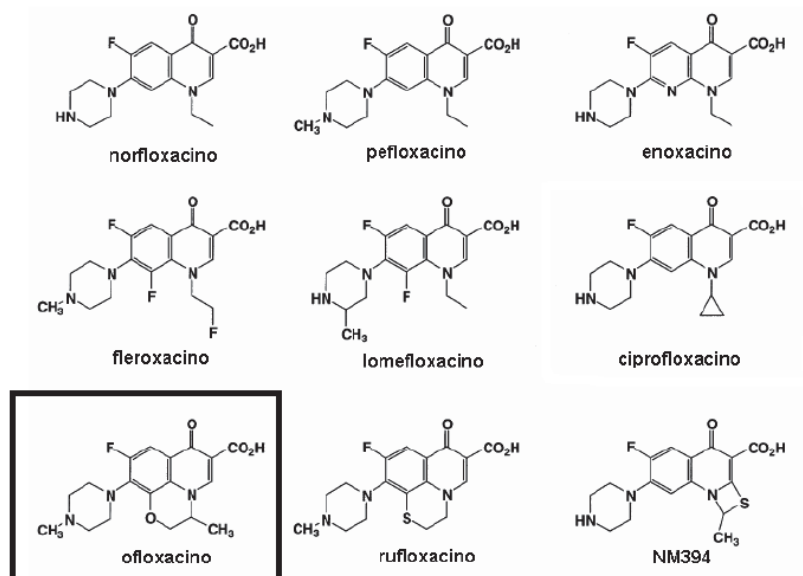
Anos depois, após intensas pesquisas realizadas a partir destas primeiras quinolonas, originaram as denominadas quinolonas de segunda geração, as fluoroquinolonas. O norfloxacino foi apresentado, por Ito e colaboradores, (TAVARES, 2001), destacando-se por ser a primeira quinolona fluorada para uso humano e com boa atividade contra bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* e

outros Gram-positivos, porém apresentou baixa absorção oral o qual limitou sua utilização nos tratamentos de infecções do trato intestinal e urinário.

As fluoroquinolonas foram sintetizadas, através de modificações do núcleo central, concedendo-lhes diferente farmacocinética e atividade antimicrobiana (ANDRIOLE, 2005).

As quinolonas de segunda geração surgiram a partir da década de 80 e deram origem as fluoroquinolonas. A maioria das fluoroquinolonas apresenta grande atividade contra bactérias gram-negativas. São também suscetíveis às quinolonas alguns patógenos adquiridos em hospitais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. As fluoroquinolonas exibem atividade baixa contra a maioria das bactérias anaeróbias e contra leveduras e fungos patogênicos nas infecções causadas por estes micro-organismos. São representantes dessa classe as quinolonas ciprofloxacino, norfloxacino e ofloxacino. O uso extenso das fluorquinolonas na clínica se deve à sua potência, espectro de atividade e farmacologia. Ciprofloxacino, ofloxacino (figura 2) e levofloxacino, são indicados em diversas patologias (SOUSA, 2006; CATTOIR et al., 2009).

Figura 2 - Quinolonas de segunda geração.



A terceira geração de antimicrobianos quinolônicos são os análogos di e trifluorados do ácido nalidíxico, que incluem o lomefloxacino e o esparfloxacino. (SOUSA, 2006).

As quinolonas de quarta geração apresentam maior atividade contra micro-organismos Gram-negativos e apresentam atividade aumentada contra Gram-positivos e patógenos do trato respiratório (TAVARES, 2001; ANDRIOLE, 2005).

MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo de ação pode ser explicado pela inibição da DNA-girase, principalmente em bactérias Gram-negativas e pela inibição da topoisomerase IV em Gram-positivas. Estas são enzimas bacterianas essenciais na duplicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano.

O ofloxacino causa lise bacteriana, quando se usam as concentrações iguais ou um pouco superiores às concentrações inibitórias mínimas (CIM) (ANVISA, 2012).

ESPECTRO DE AÇÃO

De acordo com estudos *in vivo*, foi demonstrado que o ofloxacino tem amplo espectro de ação contra a maioria dos seguintes micro-organismos:

- Aeróbicos Gram-positivos mais comuns como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pneumoniae*;
- Aeróbicos Gram-negativos como *Enterobacter cloacae*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens*.
- E espécies Anaeróbicas como *Propionibacterium acnes*.

Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o ofloxacino é ativo no tratamento contra a maior parte das cepas dos micro-organismos descritos a seguir:

- Aeróbicos Gram-positivos como *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus pyogenes*.
- Aeróbicos Gram-negativos como *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*, *Acinetobacter calcoaceticus* var. *wolfii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Moraxella lacunata*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella sonnei*.
- E outros como *Chlamydia trachomatis* (ANVISA, 2012).

USO TERAPÊUTICO DO OFLOXACINO EM SOLUÇÃO OFTÁLMICA

O ofloxacino é indicado para o tratamento de doenças infecciosas dos olhos causadas por bactérias sensíveis ao ofloxacino, como infecção das pálpebras, conjuntivite, úlcera de córnea, infecção pós-operatória e outras. O produto também é indicado para prevenção de infecção no pós-operatório (ANVISA, 2012).

EFEITOS ADVERSOS

Foram relatadas raras reações adversas com uso de ofloxacino colírio. Em menos de 1% dos casos foi relatado o aparecimento de alteração de pele do tipo eczema de intensidade leve, na face. As reações mais frequentes são: ardor ocular ou desconforto ocular transitórios. Outras reações que podem ocorrer são: sensação de pontada nos olhos, vermelhidão e coceira nos olhos, visão turva, sensação de presença de corpo estranho nos olhos, edema dos olhos, das pálpebras ou face, intolerância à luz, secura dos olhos, entre outras (ANVISA, 2012).

INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

As fluoroquinolonas raramente demonstram sinergismo ou antagonismo com outros agentes. Podem ser utilizadas combinações de terapias para melhorar a monoterapia e aditivos dos compostos ativos, exceto com imipenem em algumas infecções por *P. aeruginosa* e com rifampicina em doenças causadas por *Staphylococcus* (ANDRIOLE, 2005).

Não são conhecidas interações entre ofloxacino e outros medicamentos. Não foram realizados estudos específicos de interações medicamentosas com a solução oftálmica. Entretanto, foi observado que a administração sistêmica de algumas quinolonas pode aumentar as concentrações plasmáticas da teofilina, interferir com o metabolismo da cafeína e aumentar os efeitos do anticoagulante oral warfarina e seus derivados, e tem sido associada com elevações transitórias da creatinina sérica em pacientes tratados concomitantemente com ciclosporina (ANVISA, 2012).

CONTRA-INDICAÇÕES

A solução oftálmica é contra-indicada em pacientes com antecedentes de hipersensibilidade ao ofloxacino, a outras quinolonas, ou a qualquer dos componentes da fórmula do produto (ANVISA, 2012).

CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade é imprescindível para o desempenho adequado de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos, em relação à sua segurança, eficácia e aceitabilidade. A implementação das boas práticas de fabricação é exigida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme as normas

técnicas oficialmente estabelecidas. Também é preconizada a realização de ensaios de controle de qualidade em todos os processos de fabricação (PINTO et al., 2010).

Ensaio microbiológico é o procedimento no qual se determina a potência ou atividade de um produto contendo antibiótico comparando a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo susceptível em relação à dose de uma substância padrão ou preparação biológica de referência do antibiótico que produz inibição similar (FB 5, 2010).

Dentre os ensaios microbiológicos, os mais comumente empregados na determinação da potência de antimicrobianos são o método de difusão em ágar e o método turbidimétrico, ambos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010) nos métodos gerais para outros fármacos.

O método de difusão em ágar depende da difusão do antibiótico através de uma camada de ágar solidificado em uma extensão tal que o crescimento do micro-organismo seja totalmente inibido em uma área ou zona ao redor do reservatório contendo solução do antibiótico. Neste método, correlaciona-se o tamanho da zona de inibição com a dose da substância ensaiada. Este é o método mais amplamente utilizado para determinação de potencia de antibióticos. O método de difusão emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de mono ou bicamada, através do qual a substância a ser testada se difunde. A solução-teste é aplicada sobre a superfície deste meio, em uma área restrita, e as placas são então incubadas: o crescimento do micro-organismo ocorre respeitando, porém, áreas onde tenha ocorrido a difusão do antibiótico que tenha atividade contra o micro-organismo em questão, gerando contraste e resultando na chamada zona de inibição de crescimento (PINTO et al., 2010).

O método turbidimétrico depende da inibição do crescimento de uma cultura microbiana em uma solução uniforme do antibiótico em meio fluido, o qual deve ser favorável ao crescimento microbiano rápido quando da ausência do antibiótico. Este método considera a relação entre a proporção de crescimento de uma população microbiana no meio líquido e a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2010).

O ensaio turbidimétrico consiste na adição da substância-teste à suspensão do organismo-teste presente em meio nutriente e, após incubação da mistura, realiza-se leitura da resposta através da leitura da turbidez da suspensão. O ensaio microbiológico não mede quantidades da substância, e sim respostas que podem ser convertidas em quantidades de substância ativa, com o auxílio de uma curva padrão. Estes métodos, devidamente padronizados e validados, são fundamentais para se determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos. (PINTO et al., 2010).

Não são encontradas descrições de ensaios microbiológicos para análise quantitativa utilizando o método de turbidimetria. Diante disso, o método turbidimétrico será testado e se eficaz, poderá ser utilizado por ser um método mais rápido que o de difusão em ágar.

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação de metodologia analítica tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar

especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

Os parâmetros utilizados nas análises são descritos pela Resolução 899/2003 da ANVISA e são transcritos abaixo:

- **Linearidade:** corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (analito), dentro de um intervalo especificado.
- **Precisão:** representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. A precisão pode ser classificada em:
 - *Repetibilidade (precisão intradia):* concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.
 - *Precisão intermediária (precisão interdias):* concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- **Especificidade e Seletividade:** é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- **Exatidão:** representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

Fármaco: aplica-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou compara os resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

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

5. EXPERIMENTAL

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

EQUIPAMENTOS

- Aparelho de sonicação - Sonicator-ultrasonic liquidprocessor (HEAT SYSTEMS modelo XL 2020)
- Autoclave (PHOENIX)
- Balança analítica (METTLER, modelo H10)
- Balança semi-analítica (MICRONAL B160)
- Câmara fluxo laminar
- Estufa bacteriológica (ODONTOBRÁS, modelo ECD 1.2)
- Estufa de secagem e esterilização (NOVA ÉTICA)
- Espectrofotômetro (Beckman modelo DU®530)
- Micropipetador (5-20 µL)
- Micropipetador (20-200 µL)
- Micropipetador (100-1000 µL)
- Peagômetro (METTLER modelo Delta 345)
- Pipetador automático (BOECO)
- Shaker (Marconi® modelo MA420)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Caldo BHI (BD)
- Ágar Casoy
- Formaldeído 12%

MICRO-ORGANISMOS

- Cepas: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150 e *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393

MÉTODO

O padrão de ofloxacino utilizado no ensaio é identificado pelo lote SZBA125XV adquirido através da empresa SIGMA-ALDRICH Ltda (São Paulo – Brasil) com teor declarado de 99,8%. Foram utilizadas amostras de solução oftálmica, contendo 0,3% de ofloxacino produzidas pela empresa EMS S/A (Campinas, Brasil), que foram adquiridas comercialmente diretamente da empresa. Cada mL da solução oftálmica continha 3,0 mg de ofloxacino.

Para manutenção dos micro-organismos-teste foi utilizado o meio de cultura ágar Casoy, inclinado, em tubos de ensaio. Para a execução dos ensaios foram utilizados os caldos BHI e Casoy. Estes foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C, 1atm. Foram empregados tubos de ensaio com 20,0 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro.

Os meios de cultura, água purificada e ponteiros foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Os materiais e vidrarias não volumétricas foram esterilizados em estufa a 180 °C por 1 hora. Para a incubação dos micro-organismos utilizou-se aparelho incubador Shaker Marconi® modelo MA420 e estufa ECD 1.2

digital (Odontobrás®). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro Beckman modelo DU® 530.

PREPARO DO INÓCULO

As culturas de *S. epidermidis* utilizadas foram mantidas em tubo com ágar Casoy inclinado, a 8°C. Para preparo do inóculo foram repicadas com alça de platina para caldo BHI e Casoy e mantidas, para seu desenvolvimento, em estufa microbiológica à temperatura de $35,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo a 530 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de $25,0\% \pm 2,0\%$ (FB 5, 2010).

PREPARO DA SOLUÇÃO DE OFLOXACINO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Foram pesados 10 mg de ofloxacino, substância de referência, e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água purificada, para obtenção de solução com concentração de 100 µg/mL.

A partir desta solução, foram tomadas alíquotas de 150, 300, 600, 1200, 2400 e 4800 µL e transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Completou-se o volume com água deionizada, obtendo-se dessa forma soluções com concentrações finais 1,5; 3,0; 6,0; 12,0, 24,0 e 48,0 µg/mL, respectivamente.

PREPARO DAS AMOSTRAS DE OFLOXACINO EM SOLUÇÃO OFTÁLMICA

O conteúdo de 10 frascos contendo cloridrato de ofloxacino em solução oftálmica 0,3% foi adicionado em um frasco de vidro âmbar. Partindo-se deste pool de amostra, alíquotas de 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 µL e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações finais 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24 e 48,0 µg/mL, respectivamente.

ENSAIOS PRELIMINARES

Os parâmetros testados nos ensaios preliminares constam na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para determinação do ofloxacino em solução oftálmica.

Parâmetros	Descrição
Micro-organismos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Meios de cultura	Caldo BHI Caldo Casoy Água purificada
Soluções diluentes	Solução tampão pH 8,0
Concentrações do inóculo	4,0 %, 8,0 % e 10,0%
Concentrações da Solução de amostra	1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0; 48,0 µg/mL

Primeiramente foram realizados ensaios para testar como a solução de amostra respondia aos parâmetros a serem testados. Utilizou-se caldo BHI e Casoy, água e tampão fosfato pH 8,0 como diluente e micro-organismos *S. epidermidis* e *E. coli*, variando-se as concentrações do inóculo em 4%, 8% e 10%, como demonstrado nas tabelas abaixo.

Tabela 2 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 4%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,5	0,552	0,503	0,045	8,95
	0,495			
	0,463			
3,0	0,651	0,652	0,023	3,45
	0,630			
	0,675			
6,0	0,628	0,572	0,055	9,64
	0,550			
	0,539			
12,0	0,480	0,527	0,069	13,01
	0,496			
	0,606			
24,0	0,359	0,330	0,31	9,45
	0,334			
	0,297			
48,0	0,189	0,178	0,011	5,97
	0,168			
	0,176			

Tabela 3 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,5	0,624	0,631	0,032	5,084
	0,603			
	0,666			
3,0	0,693	0,710	0,020	2,889
	0,705			
	0,733			
6,0	0,642	0,575	0,069	11,922
	0,545			
	0,539			
12,0	0,566	0,515	0,054	10,538
	0,522			
	0,458			
24,0	0,403	0,393	0,034	8,532
	0,356			
	0,421			
48,0	0,282	0,292	0,028	9,568
	0,271			
	0,324			

Observando-se os resultados, a concentração 1,5 µg/mL não apresentava uma boa resposta, então decidi não testá-la mais. Dessa forma, continuei o teste preliminar utilizando as outras concentrações, demonstradas nas tabelas a seguir.

Tabela 4 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração				
(µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,760	0,772	0,039	5,103
	0,740			
	0,816			
6,0	0,807	0,793	0,012	1,567
	0,786			
	0,785			
12,0	0,758	0,706	0,064	9,001
	0,724			
	0,635			
24,0	0,535	0,549	0,016	2,941
	0,567			
	0,547			
48,0	0,451	0,445	0,006	1,348
	0,445			
	0,439			

Tabela 5 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 4%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração				
(µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,397	0,379	0,015	3,988
	0,369			
	0,373			
6,0	0,452	0,430	0,059	13,648
	0,369			
	0,469			
12,0	0,304	0,333	0,046	13,804
	0,309			
	0,386			
24,0	0,267	0,270	0,005	1,924
	0,267			
	0,276			
48,0	0,200	0,195	0,006	3,291
	0,198			
	0,188			

Tabela 6 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração				
(µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,756	0,818	0,058	7,146
	0,827			
	0,872			
6,0	0,819	0,731	0,077	10,538
	0,710			
	0,665			
12,0	0,589	0,596	0,008	1,373
	0,605			
	0,594			
24,0	0,481	0,453	0,024	5,425
	0,443			
	0,435			
48,0	0,355	0,355	0,001	0,162
	0,355			
	0,356			

Tabela 7 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração				
(µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	1,029	1,007	0,022	2,134
	0,986			
	1,007			
6,0	0,942	0,943	0,004	0,375
	0,947			
	0,939			
12,0	0,820	0,771	0,075	9,719
	0,809			
	0,685			
24,0	0,534	0,541	0,012	2,135
	0,534			
	0,554			
48,0	0,458	0,449	0,009	2,004
	0,440			
	0,449			

Os mesmos parâmetros foram testados utilizando o micro-organismo teste *E. coli*, como demonstrados nas tabelas 8 a 10.

Tabela 8 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 4%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E.coli*.

Concentração				
(µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,185	0,185	0,010	5,405
	0,195			
	0,175			
6,0	0,122	0,136	0,001	1,559
	0,125			
	0,161			
12,0	0,086	0,081	0,005	6,827
	0,075			
	0,081			
24,0	0,062	0,061	0,009	14,704
	0,052			
	0,070			
48,0	0,035	0,031	0,003	11,631
	0,035			
	0,028			

Tabela 9 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.

Concentração				
(µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,320	0,387	0,059	15,421
	0,435			
	0,405			
6,0	0,333	0,298	0,031	10,414
	0,289			
	0,273			
12,0	0,233	0,213	0,017	8,253
	0,206			
	0,200			
24,0	0,171	0,163	0,007	4,294
	0,160			
	0,158			
48,0	0,123	0,126	0,003	2,779
	0,126			
	0,130			

Tabela 10 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo Casoy, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.

Concentração				
($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,607	0,604	0,005	0,860
	0,607			
	0,598			
6,0	0,357	0,353	0,006	1,803
	0,366			
	0,336			
12,0	0,254	0,259	0,010	3,901
	0,271			
	0,253			
24,0	0,276	0,261	0,029	11,200
	0,279			
	0,227			
48,0	0,154	0,157	0,009	2,779
	0,150			
	0,168			

Analisando os resultados obtidos, e observando que a concentração de inóculo 4% não apresentava boa resposta, decidi seguir os testes, sem utilizá-la, como demonstrado nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.

Concentração				
($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,374	0,379	0,004	1,067
	0,381			
	0,381			
6,0	0,333	0,303	0,034	11,435
	0,281			
	0,298			
12,0	0,198	0,197	0,005	2,551
	0,202			
	0,192			
24,0	0,158	0,162	0,003	2,226
	0,165			
	0,163			
48,0	0,111	0,111	0,007	6,782
	0,103			
	0,118			

Tabela 12 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com água como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.

Concentração				
($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
3,0	0,433	0,416	0,022	5,36
	0,391			
	0,425			
6,0	0,331	0,321	0,001	0,220
	0,330			
	0,302			
12,0	0,237	0,219	0,016	7,475
	0,205			
	0,215			
24,0	0,228	0,202	0,026	12,871
	0,202			
	0,176			
48,0	0,160	0,159	0,001	0,725
	0,158			
	0,160			

Também foram realizados testes utilizando tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e utilizando meio de cultura BHI, como demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Média	Desvio padrão	DPR (%)
6,0	0,534	0,545	0,021	3,760
	0,563			
	0,539			
12,0	0,470	0,422	0,041	9,792
	0,396			
	0,401			
24,0	0,606	0,590	0,014	2,444
	0,578			
	0,586			
48,0	0,618	0,580	0,063	10,903
	0,507			
	0,615			

Tabela 14 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo teste *S. epidermidis*.

Concentração (µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio padrão	DPR (%)
6,0	0,615	0,579	0,008	1,464
	0,603			
	0,520			
12,0	0,510	0,439	0,061	14,085
	0,404			
	0,402			
24,0	0,529	0,606	0,067	11,041
	0,650			
	0,639			
48,0	0,600	0,576	0,066	11,517
	0,627			
	0,501			

Tabela 15 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 8%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.

Concentração (µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio padrão	DPR (%)
6,0	0,434	0,434	0,021	4,724
	0,463			
	0,405			
12,0	0,248	0,248	0	0
	0,248			
	0,210			
24,0	0,199	0,204	0,006	2,695
	0,204			
	0,158			
48,0	0,148	0,148	0,009	6,407
	0,148			
	0,139			

Tabela 16 - Valores de absorvância obtidos com inóculo a 10%, utilizando caldo BHI, com tampão fosfato pH 8,0 como meio diluente e micro-organismo teste *E. coli*.

Concentração (µg/mL)	Absorvância	Média	Desvio padrão	DPR (%)
6,0	0,470	0,445	0,033	7,468
	0,423			
	0,442			
12,0	0,294	0,294	0,001	0,520
	0,292			
	0,295			
24,0	0,259	0,252	0,007	2,777
	0,252			
	0,245			
48,0	0,179	0,181	0,001	0,845
	0,181			
	0,182			

Analisando-se todos os resultados obtidos nos testes preliminares, estabeleceu-se que os parâmetros a serem utilizados no ensaio eram as concentrações 6,0; 12,0 e 24,0 µg/mL, utilizando água como diluente, com inóculo a 8%, em caldo BHI, com o micro-organismo-teste *S. epidermidis*, como demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17- Parâmetros estabelecidos para a determinação de ofloxacino em solução oftálmica para ensaio microbiológico – método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
Meio de cultura	Caldo BHI
Soluções diluentes	Água purificada
Concentração do inóculo	8,0 %
Concentrações da soluções padrão e amostra	6,0; 12,0; 24,0 µg/mL

CURVA ANALÍTICA

A curva analítica foi obtida distribuindo-se em tubos idênticos, 10,0 mL de caldo BHI estéril, 200 µL de cada uma das soluções do padrão e da amostra descritas anteriormente. Em cada tubo, foi adicionado 0,8 mL de caldo nutriente contendo o inóculo. Foram usados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas modelo 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 do ofloxacino) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo), portanto o ensaio foi realizado em triplicata. Os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação, à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C, por 4 horas. Após o período de incubação,

interrompeu-se a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

Em seguida, foi determinada a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm. O aparelho foi zerado em absorvância zero através de branco contendo 10,0 mL de caldo e 500 µL de formaldeído 12% (controle negativo).

VALIDAÇÃO

LINEARIDADE

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo também foi observada.

PRECISÃO

A precisão intradia foi testada através de sete análises do ofloxacino com concentração teórica de 12,0 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições ambientais. Também foi testada a precisão entre analistas e em três dias diferentes para precisão interdia. As precisões intra e interdia do método foram avaliadas através do coeficiente de variação dos resultados de absorvâncias obtidos.

EXATIDÃO

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. Foram preparados três níveis de concentração para a recuperação. Cada concentração foi preparada em triplicata, segundo a Tabela 18.

Tabela 18 - Preparo das soluções para o teste de recuperação.

	Volume adicionado (μL) de amostra (3mg/mL)	Volume (μL) adicionado de padrão (1 mg/mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$) *
Amostra	20	-	6,0
R1	20	360	9,6
R2	20	600	12,0
R3	20	840	14,4
Padrão	-	600	6,0

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água.

A porcentagem de ofloxacino recuperada foi calculada pela equação da reta, seguido pela equação abaixo (AOAC, 2002).

$$\%R = [(C_r - C_a) / C_p] \times 100, \text{ em que:}$$

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

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

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

ROBUSTEZ

A robustez do método foi avaliada pela variação do comprimento de onda, de 530 nm para 528 nm e 532 nm.

Foram utilizadas soluções do fármaco nas mesmas concentrações do ensaio de precisão, porém os parâmetros analíticos foram variados. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao coeficiente de variação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

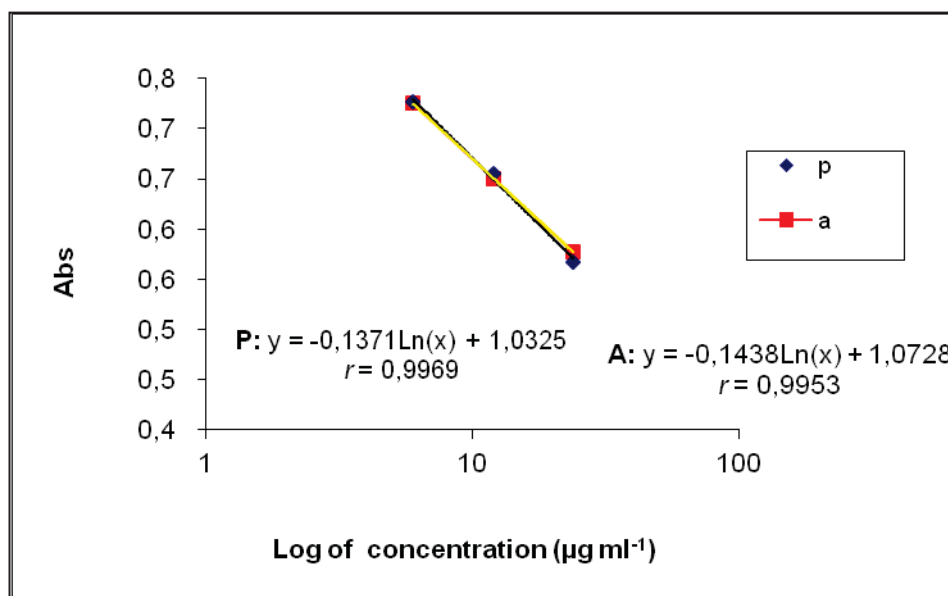
Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de ofloxacino, substância de referência (padrão) e amostra são demonstradas na Tabela 19.

Tabela 19 - Valores das absorvâncias obtidas no método turbidimétrico durante o teste de linearidade

	P1 (6 µg/mL)	P2 (12 µg/mL)	P3 (24 µg/mL)	A1 (6 µg/mL)	A2 (12 µg/mL)	A3 (24 µg/mL)
1	0,633	0,602	0,581	0,631	0,580	0,580
2	0,817	0,721	0,520	0,772	0,641	0,605
3	0,737	0,649	0,606	0,780	0,733	0,552
Média	0,729	0,658	0,569	0,728	0,651	0,579
DPR%	12,701	9,119	7,775	11,500	11,850	4,637

P = padrão; A = amostra. *Cada valor corresponde a média de três determinações

Figura 3 - Curvas analíticas de soluções de ofloxacino, substância referência, e amostra, em concentrações de 6,0; 12,0 e 24,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.



As curvas analíticas de ofloxacino substância referência e amostra (Figura 3) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas

analíticas obtidas durante os ensaios. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,1371\ln(x) + 1,0325$, com um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9969, para o ofloxacino substância referência e $y = -0,1438\ln(x) + 1,0728$ com $R^2 = 0,9953$, para o fármaco em solução oftálmica.

Fazendo uma análise visual do gráfico é possível observar que ele não apresenta paralelismo, já que as retas se cruzam. O paralelismo é um dos requisitos obrigatórios para se concluir a validação.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de ofloxacino é mostrada na Tabela 20.

Tabela 20 - Análise da variância dos dados obtidos no ensaio microbiológico do ofloxacino pelo método turbidimétrico

Fontes de variação	gL	SQ	QM	Fcal	Ftab.
Preparação	1	0,0001	0,0001	0,05	4,96
Regressão	1	0,0715	0,0715	22,27	4,96
Paralelismo	1	0,0001	0,0001	0,02	4,96
Quadrático	1	0,0000	0,0000	0,01	4,96
Desvio de linearidade					
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,00	4,96
Tratamentos	5	0,07	0,01	4,47	3,33
Blocos (placas ou tubos)	2	0,02	0,01	3,66	4,10
Dentro (erro)	10	0,03	0,00	
Total	17	0,13	

*significativo para $p < 0,05$; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: variância

Os resultados encontrados pela ANOVA do ensaio turbidimétrico seriam suficientes para validar o método, uma vez que os valores de razão de variância (Fcalculado e Ftabelado) dos três parâmetros críticos estão de acordo com os

requisitos farmacopeicos. O “desvio de paralelismo” e o “desvio de linearidade” foram não significativos e a “regressão linear” foi significativa; desta forma os requisitos mínimos necessários para validar o método seriam alcançados, se as curvas não se cruzassem. Diante desses resultados, o método não apresentou o paralelismo necessário para a validação.

O cálculo da potência foi realizado através da equação de HEWITT (HEWITT, 2004), sendo que os ensaios foram realizados em 3 dias diferentes e cada ensaio representa a média de três determinações.

Equação de Hewitt:

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100$$

Na qual:

$$M = F/b$$

$$b = E/l$$

$$E = \frac{1}{4} \times [(A_3 + P_3) - (A_1 + P_1)]$$

$$F = \frac{1}{4} \times [(A_1 + A_2 + A_3) - (P_1 + P_2 + P_3)]$$

l = logaritmo da razão das doses

Os valores da potência de ofloxacino em solução oftálmica são demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21 - Valores experimentais obtidos para o doseamento de solução padrão de ofloxacino, pelo método turbidimétrico

Dia	Potência (%)*	Média	DPR (%)
1	96,42		
2	99,63	99,44	2,94
3	102,26		

*Cada valor corresponde à média de três determinações

Na tabela 22 são apresentados os valores de recuperação para cada nível de concentração-teste pelo método turbidimétrico.

Tabela 22 - Valores experimentais obtidos na exatidão do ofloxacino padrão, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)	DP	DPR%
R1	71,242			
R2	100,45	86,447	14,641	16,936
R3	87,650			

*Os valores da recuperação apresentados correspondem a média de três determinações.

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação, os valores da precisão intradia, interdia e entre analistas foram de 5,628%, 8,678% e 6,419%, respectivamente, e os valores estão demonstrados nas tabelas 23, 24 e 25.

Tabela 23 – Valores de absorvâncias medidas durante o teste de precisão intradia.

Leitura	Absorvância em 12µg/mL
1	0,627
2	0,642
3	0,615
4	0,614
5	0,688
6	0,698
7	0,686
DPR%	5,628

Tabela 24 - Valores de absorvâncias medidas durante o teste de precisão interdia

Dia	Absorvância em 12µg/mL
	0,576
1	0,615
	0,614
	0,732
2	0,720
	0,712
	0,694
3	0,629
	0,624
DPR%	8,678

Tabela 25 - Valores de absorvâncias medidas durante o teste de precisão e entre analistas

Analista	Absorvância em 12µg/mL
	0,600
1	0,691
	0,598
	0,576
2	0,615
	0,614
DPR%	6,419

A robustez do método foi determinada pela variação do comprimento de onda de leitura no espectrofotômetro e os valores estão demonstrados na tabela 26.

Tabela 26 - Valores da determinação da robustez do método turbidimétrico, na concentração 12,0µg/mL

	P2 (12µg/mL)*	Potência (%)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
528 nm	0,626	86,066			
530 nm	0,658	105,255	98,944	11,154	11,273
532nm	0,647	105,512			

*corresponde à média de três determinações

No desenvolvimento do método turbidimétrico para solução oftálmica ofloxacino as concentrações testadas da amostra variaram de 1,5 a 48,0 µg/mL. Com os testes preliminares, foram escolhidas as concentrações 12,0; 24,0 e 48,0 µg/mL, pois apresentaram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A utilização do micro-organismo *S. epidermidis* baseia-se na facilidade de crescimento, manuseio e manutenção deste micro-organismo, além da sua sensibilidade frente ao ofloxacino.

Apesar das curvas analíticas apresentarem linearidade, elas não tem paralelismo, o que inviabiliza a conclusão da validação. A análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de correlação são 0,9969 e 0,9953 para a substância química de referência e para as amostras, respectivamente, valores dentro do recomendado.

O doseamento foi calculado pela média das potências, com valor igual a 99,44% e apresentou coeficiente de variação igual a 2,94%, limite dentro do recomendado (BRASIL, 2003a).

A precisão do teste foi confirmada pelos testes de precisão intradia, interdia de e entre analistas, 5,628, 8,678 e 6,419%, respectivamente. Confirmando a precisão do método para análise de solução oftálmica de ofloxacino.

No teste de exatidão, obteve-se recuperação média encontrada de 86,447%. Esse valor é baixo e o teste ainda apresentou um desvio padrão relativo com valor 16,936%, valor esse acima do aceitável. Por se tratar de um método biológico, esse poderia ser um valor aceitável, caso o DPR% apresentado fosse menor que 15%.

O método se mostrou robusto para a variação do comprimento de onda de leitura no espectro. O valor do desvio padrão relativo foi 11,273%, valor este que respeita o limite aceitável para um ensaio microbiológico (BRASIL, 2003a). Durante a etapa de validação a robustez do método também foi testada variando-se o tempo de incubação no *shaker*, porém este parâmetro não se demonstrou robusto logo é importante seguir rigorosamente o tempo de incubação, para que não ocorram variações no ensaio.

Dessa forma, resultados obtidos não apresentaram o paralelismo e a exatidão necessária para concluir o desenvolvimento do método e posterior validação.

7. CONCLUSÃO

Os métodos analíticos físico-químicos são, em geral, mais atrativos, devido, entre outros fatores, a alta precisão que apresentam. No entanto, eles não fornecem verdadeira indicação sobre a atividade biológica das substâncias e, ao se tratar de fármacos com atividade antimicrobiana, a determinação da potência por meio de métodos microbiológicos ganha importância.

A atividade de antibióticos pode ser demonstrada através do efeito inibitório sobre o crescimento microbiano. Ou seja, uma pequena alteração na atividade antimicrobiana pode demonstrar alguma alteração pequena, que não seriam detectáveis por métodos químicos.

O método turbidimétrico considera a relação entre a proporção de crescimento de população microbiana no meio líquido e a concentração da substância ensaiada, sendo muito utilizada para doseamento de antimicrobianos e vitaminas.

Este método apresenta algumas vantagens, como rapidez, facilidade operacional, medida objetiva da resposta, maior sensibilidade a baixas doses, ausência de efeitos de difusão e exatidão.

Os métodos microbiológicos são os únicos capazes de determinar a potência de agentes antimicrobianos e, embora consumam maior tempo de análise, esta desvantagem pode ser praticamente eliminada com a validação do ensaio turbidimétrico.

Uma das vantagens dos métodos microbiológicos é não necessitar de equipamentos especializados e de alto custo, além de não utilizar solventes potencialmente tóxicos para o analista e para o meio ambiente. Apresenta ainda outras vantagens, como rapidez, desempenho relativamente simples e facilidade operacional, medida objetiva da resposta, maior sensibilidade a baixas doses, ausência de efeitos de difusão e exatidão. Porém muitos aspectos devem ser considerados no seu desenvolvimento para garantir que eles sejam suficientemente seguros e exatos, tais como: temperatura de incubação, micro-organismo utilizado, robustez do método, vidrarias calibradas, entre outras características.

A desvantagem deste método é não poder ser aplicado a soluções turvas e coloridas e a formulações com substâncias ativadoras ou inibidoras de crescimento microbiano, pois elas interferem na leitura dos resultados. Necessita também de um equipamento para leitura da resposta e deve ser imprescindível a ausência de contaminação grosseira interferir na leitura fotométrica. O método é também menos preciso comparado ao método de difusão em ágar.

Foi realizado o desenvolvimento de um método analítico para quantificação de ofloxacino colírio por turbidimetria. Durante o desenvolvimento do método estabeleceu-se os parâmetros que apresentavam melhor resposta.

No estudo de validação, foram aplicados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez, utilizando a substância química de referência de ofloxacino e a amostra de solução oftálmica de ofloxacino, nas concentrações 12,0, 24,0 e 48,0 µg/mL, empregando-se o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150.

Os parâmetros estudados para a validação do método analítico para quantificação do ofloxacino não atenderam a todas as especificações recomendadas. Dessa forma, os resultados obtidos na tentativa da validação, foi negativo, e portanto, não foi possível validar o método. Assim sendo, pode-se concluir que este trabalho de conclusão de curso, não conseguiu atingir seu objetivo que era de desenvolver e validar uma metodologia analítica. O método demonstrou desenvolvimento complexo e trabalhoso e não apresentou o paralelismo e exatidão necessários para validação.

Pode-se enumerar diversos fatores para o desenvolvimento do método não ter apresentado resultado satisfatório. Os ensaios devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e validados. O operador precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo. Além disso, os materiais utilizados nos ensaios devem ser usados exclusivamente durante o desenvolvimento e validação para evitar contaminação, e devem ser adequadamente lavados, e durante o desenvolvimento desse trabalho, foi necessário dividir as vidrarias, o que impedia o uso exclusivo. As cepas dos micro-organismos podem se apresentar estressadas, dependendo das condições do laboratório, de preparo, incubação, do clima e esses fatores não

podem ser controlados, por isso os métodos microbiológicos são delicados de se trabalhar.

O desenvolvimento desse trabalho possibilitou aplicar conhecimentos teóricos e práticos adquiridos em aula e aprofundá-los de acordo com os temas abordados e o ensaio realizado. O trabalho proporcionou também acréscimo de conhecimento através da realização de pesquisas em bancos de dados e levantamento bibliográfico. Contribuiu também para o desenvolvimento do pensamento crítico e científico, principalmente ao deparar-me com dificuldades e imprevistos durante a realização do projeto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, E.; LIU, L.; DIERICK, K.; GUYOMARD, S.; NABET, P.; RICO, S.; LOUIS, P.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, p. 757-766, 1998.
2. ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICO, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Trends Anal. Chem.**, v.26, n.6, p.534-556, 2007.
3. ANDRIOLE, V.T. The quinolones: past, present, and future. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, p.S113, 2005.
4. ANVISA. Bulário Eletrônico. OFLOX® Allergan. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25518-2-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25518-2-0].PDF) Acesso em: 10 setembro de 2012.
5. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1, p.20.
6. BERGAN, T. Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. ANDRIOLE, V.T. **The Quinolones**. New York: Academic Press, 1988. pp. 119-154.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação

- de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1.
8. CATTOIR, V. NORDMANN P. Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram negative bacterial species: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.8, p.1028-1046, 2009.
 9. Farmacopeia brasileira. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010.
 10. GAVIN, J. J. Analytical microbiology III. Turbidimetric methods. **Appl. Microbiol.**, v. 5, p. 235-243, 1957.
 11. HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis, a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC Press, 2004. 260p.
 12. OLIPHANT, C. M. GARY M. GREEN, M.D., **Quinolones: A Comprehensive Review**. University of Wyoming School of Pharmacy, **Am. Fam. Physician**, v.65, n.3, p.455-465, 2002.
 13. PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.261-287.
 14. SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 40, p. 443–446, 2006.
 15. SOUSA, J. **Manual de antibióticos antibacterianos**. 2. Ed. Porto, Universidade Fernando Pessoa, 2006.
 16. STROMAN, D.W.; DAJCS, J.J.; CUPP, G.A.; SCHLECH, B.A. In vitro and in vivo potency of moxifloxacin and moxifloxacin ophthalmic solution 0.5%. A new topical fluoroquinolone. **Surv. Ophthalmol.**, v.50, (suppl 1), p.S16–S31, 2005.
 17. TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo, Atheneu, 2001.
 18. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. Atheneu, 2008.
 19. USP. 31 UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 31st ed. United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2008.
 20. VADE-MÉCUM DE MEDICAMENTOS. 12. ed. São Paulo: Soriak, 2006/2007.
 21. WOLFSON, J.S.; HOOPER, D.C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.28, p.581-586, 1991.