

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

MARIA JULIA MARTINS DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
MINIATURIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ENROFLOXACINO EM  
COMPRIMIDOS PALATÁVEIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO  
VISÍVEL

ARARAQUARA

2017

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

Maria Julia Martins de Souza

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
MINIATURIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ENROFLOXACINO EM  
COMPRIMIDOS PALATÁVEIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO  
VISÍVEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, para a obtenção do título de Farmacêutico-Bioquímico.

**Co-orientação:** Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Kogawa

**Orientação:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, que tanto se esforçaram para que eu tivesse uma educação de qualidade e sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, sendo de alegria ou dificuldade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por ter me proporcionado um ensino de excelência, gratuitamente e de qualidade. Nela tive a oportunidade de aprender com professores excelentes, que contribuíram para a minha formação e construção pessoal e profissional, mas gostaria de agradecer em especial àqueles que me cativaram e me motivaram a ser alguém melhor. Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hérída Regina Nunes Salgado, por ter me aceitado como orientanda de braços tão abertos, por sempre ser tão acessível e estar disposta a ajudar seus alunos. Estou muito orgulhosa de ter concluído um trabalho como sua aluna.

À Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Kogawa, por sua co-orientação tão paciente e solícita, por ter me ajudado tanto e por sua humildade em tirar todas as minhas dúvidas, mesmo que fossem elementares.

Ao Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes, por ter me auxiliado em todos os testes realizados, por ter me ensinado tanto e sempre estar presente em todos os momentos, incluindo os que tudo dava errado.

À Maria de Fátima Rodrigues Moreti, por ter feito o meu treinamento no laboratório com tanta dedicação e paciência e por sempre ser tão solícita a todos, ajudando sempre que fosse possível.

Às minhas queridas irmãs de coração, que tive a grande sorte de ganhar na República Askerozas. Foram anos inesquecíveis e a certeza de que são amizades eternas é o que me conforta neste momento. Em épocas críticas da graduação onde várias vezes eu pensei em desistir, chegar em casa e conversar com elas era o que me incentivava em seguir em frente.

Aos meus amigos de classe, os Capivaras, que compartilharam comigo todos os momentos da graduação, onde adquirimos tanta cumplicidade, que dura até hoje e espero ser para sempre.

Ao CNPq, pela concessão do equipamento espectrofotômetro UV-Vis BMG LabTech Spectrostar Nano, adquirido no projeto 471712/2013-2.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química das quinolonas .....	15
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ácido nalidíxico (CAS 389-08-2) .....	16
<b>Figura 3.</b> Estrutura química das fluorquinolonas .....	17
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do enrofloxacino (CAS 93106-60-6).....	17
<b>Figura 5.</b> Variação de peso dos vinte comprimidos de enrofloxacino .....	33
<b>Figura 6.</b> Varredura de comprimentos de onda obtidos na análise espectrofotométrica de soluções de ENRO-Comp de 50, 100 e 200 µg/mL.....	41
<b>Figura 7.</b> Varredura de comprimentos de onda obtidos na análise espectrofotométrica de solução de cloreto férrico 0,5 % .....	42
<b>Figura 8.</b> Análise espectrofotométrica de solução de ENRO-Comp 500 µg/mL complexado com solução de cloreto férrico 0,5%.....	42
<b>Figura 9.</b> Análise espectrofotométrica de solução de ENRO-Comp a 300 µg/mL complexado com solução de cloreto férrico 0,5% .....	43
<b>Figura 10</b> Análise espectrofotométrica de solução de ENRO-Comp a 150 µg/mL complexado com solução de cloreto férrico 0,5 % .....	43
<b>Figura 11.</b> Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para a solução de enrofloxacino comprimido em concentrações de 20 a 400 µg/mL.....	45
<b>Figura 12.</b> Curva analítica de enrofloxacino SQR em concentração de 100 a 200 µg/mL, pelo método espectrofotométrico na região visível em 430 nm.....	46
<b>Figura 13.</b> Gráfico de resíduos .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino .....	22
<b>Tabela 2.</b> Variação de peso dos comprimidos segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) .....	32
<b>Tabela 3.</b> Relação do peso individual dos comprimidos de enrofloxacino, média e desvio padrão relativo.....	33
<b>Tabela 4.</b> Preparo das soluções de ENRO-Comp para construção da curva de Ringbom.....	36
<b>Tabela 5.</b> Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região visível .....	38
<b>Tabela 6.</b> Variáveis utilizadas na avaliação da robustez do método analítico para análise de enrofloxacino comprimidos por espectrofotometria na região visível .....	39
<b>Tabela 7.</b> Ensaios da avaliação de robustez do método analítico para análise de enrofloxacino comprimidos por espectrofotometria na região visível .....	39
<b>Tabela 8.</b> Absorvâncias da solução de enrofloxacino comprimido através de leitura em espectrofotômetro a 430 nm.....	44
<b>Tabela 9.</b> Valores de absorvância de enrofloxacino SQR, determinados pelo método espectrofotométrico na região visível em 430 nm para a obtenção da curva analítica .....	46
<b>Tabela 10.</b> Análise de variância de valores de absorvância determinados da curva analítica de enrofloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região visível.....	47
<b>Tabela 11.</b> Resultados dos resíduos.....	48
<b>Tabela 12.</b> Determinação da precisão do método analítico para análise de enrofloxacino por espectrofotometria na região visível .....	48
<b>Tabela 13.</b> Determinação da exatidão do método analítico para análise de enrofloxacino comprimidos por espectrofotometria na região visível .....	49
<b>Tabela 14.</b> Medidas de absorvância obtidas na avaliação da robustez do método espectrofotométrico de quantificação de enrofloxacino.....	49
<b>Tabela 15.</b> Análise de variância de valores de absorvância obtidos na determinação de robustez do método espectrofotométrico de quantificação de enrofloxacino.....	50
<b>Tabela 16.</b> Cálculos de teor dos comprimidos de enrofloxacino.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorvância
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a Curva
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFT	Cromatografia de Fluxo Turbulento
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLM	Cromatografia Líquida Micelar
C <sub>máx</sub>	Concentração plasmática máxima
Comp.	Comprimido
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Eletroforese Capilar
EIE	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FQs	Fluorquinolonas
ENRO	Enrofloxacino
ENRO-Comp	Enrofloxacino comprimidos
ENRO-SQR	Enrofloxacino Substância Química de Referência
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IV	Infra-Vermelho
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
RDRQ	Região Determinante de Resistência a Quinolonas
SQR	Substância Química de Referência
S <sub>ENRO</sub>	Solução de enrofloxacino
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

## RESUMO

O enrofloxacino é um antimicrobiano de uso oral, da classe das fluorquinolonas de segunda geração, sendo a primeira fluorquinolona a ser utilizada na medicina veterinária para o tratamento de infecções bacterianas. Devido ao seu amplo espectro, é amplamente comercializado e por este motivo o Controle de Qualidade em suas formas farmacêuticas é tão importante. O desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis é necessário para a garantia da segurança, qualidade e eficácia terapêutica dos fármacos presentes nos medicamentos. Trabalhos anteriores na literatura descrevem diversos métodos analíticos para determinação e quantificação do enrofloxacino, porém, não são miniaturizados. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico quantitativo miniaturizado para análise de enrofloxacino em comprimidos palatáveis de prescrição veterinária, por meio de espectrofotometria na região visível a 430 nm, utilizando cloreto férrico como reagente complexante e água como solvente. Apesar de ser considerado tóxico, o cloreto férrico é utilizado em pouca quantidade, assim como a amostra, o enrofloxacino SQR e a água, reduzindo a geração de resíduos e consequentemente reduzindo danos ao meio ambiente e ao analista, atendendo os princípios da Química Verde. É um método rápido e de fácil execução, além de não ser necessário preparo da amostra. O enrofloxacino é insolúvel em água, porém, foram utilizadas soluções de baixas concentrações, o que não influenciou na condução dos testes. Utilizou-se espectrofotômetro UV-Vis BMG LabTech Spectrostar Nano, solução de 0,5% de cloreto férrico como complexante e microplacas de 96 poços. A validação do método foi conduzida seguindo os guias da *International Conference on Harmonisation (ICH)* e a Legislação Brasileira. O método demonstrou linearidade entre as concentrações de 100 a 200 µg/mL, seletividade, precisão (intradia de DPR 0,75%, interdia de DPR 0,44% e entre-analista de DPR 0,56%) e exatidão de 98,51%. O método foi considerado robusto quando submetido a alteração em tempo de análise e comprimento de onda, porém, demonstrou não garantir resultados confiáveis quando submetido a variação de marca de microplaca.

**Palavras-chave:** controle de qualidade, enrofloxacino, espectrofotometria de luz visível, miniaturizado, química verde, validação.

## ABSTRACT

Enrofloxacin, an antimicrobial orally absorbed, is a second generation fluorquinolone, and the first fluorquinolone used in veterinary medicine to the treatment of bacterial infections. Due to its broad-spectrum activity, it is widely commercialized and because of it, the Quality Control of its pharmaceutical forms is so important. The development of reliable analytical methods is necessary to ensure the safety, quality and therapeutical effectiveness of medicines. In the literature, previous works describe diverse analytical methods to determination and quantification of enrofloxacin, but none of them was miniaturized. In this work, a miniaturized quantitative analytical method for analysis of enrofloxacin in veterinary palatable tablets was developed by spectrophotometry in the visible region at 430 nm, using iron chloride as complexing agent and water as solvent. Although iron chloride is considered toxic, it is used in small quantities, like the sample, enrofloxacin RS and water, reducing the generation of residues and consequently reducing damages to environment and to the analyst, attending to Green Chemistry principles. It is a quick and easy method, in addition to that a previous preparation of sample is not necessary. Enrofloxacin is insoluble in water, but the solutions of low concentrations did not influence in the tests conduction. The method used a spectrophotometer UV-Vis BMG LabTech Spectrostar Nano, 0.5% iron chloride solutions as complexing agent and 96-well microplate. Method validation was conducted according to the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines and the Brazilian law. The method showed linearity from 100 to 200  $\mu\text{g/mL}$ , selectivity, precision (intraday RSD 0.75%, interday RSD 0.44% and internalyst RSD 0.56%) and accuracy of 98.51%. The method was considered robust when submitted to variation in time of analysis and wavelength, but showed that does not guarantee reliable results when submitted to brand of microplate variation.

**Keywords:** enrofloxacin, green chemistry miniaturized, quality control, spectrophotometry in the visible region, validation.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVO.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1. Quinolonas .....	15
3.2. Fluorquinolonas.....	16
3.3. Enrofloxacino.....	17
3.3.1. Características estruturais.....	17
3.3.2. Mecanismo de ação .....	18
3.3.3. Farmacocinética .....	18
3.3.4. Espectro de ação e uso clínico .....	18
3.3.5. Reações adversas e toxicidade.....	19
3.3.6. Mecanismos de resistência .....	19
3.4. Controle de qualidade.....	20
3.5. Métodos analíticos.....	21
3.6. Validação de métodos analíticos.....	28
3.7. Química Verde.....	28
3.8. Complexação com cloreto férrico .....	29
4. DESCRIÇÃO .....	30
4.1. Descrição geral .....	30
4.2. Material.....	30
4.2.1. Substância química de referência (SQR) .....	30
4.2.2. Forma farmacêutica .....	31
4.2.3. Solventes e reagentes .....	31
4.2.4. Equipamentos .....	31
5. ANÁLISE QUALITATIVA.....	31

5.1.	Determinação do peso médio dos comprimidos de enrofloxacino .....	31
5.1.1.	Método.....	32
5.1.2.	Resultados e discussão .....	32
6.	ANÁLISE QUANTITATIVA .....	34
6.1.	Espectrofotometria de absorção na região do visível (VIS) .....	34
6.1.1.	Preparo das soluções de enrofloxacino SQR.....	34
6.1.2.	Preparo das soluções de enrofloxacino comprimidos .....	34
6.1.3.	Preparo das soluções de cloreto férrico 0,5%.....	34
6.1.4.	Validação .....	34
6.1.4.1.	Seletividade .....	34
6.1.4.2.	Curva de Ringbom .....	35
6.1.4.3.	Linearidade.....	36
6.1.4.4.	Precisão .....	37
6.1.4.4.1.	Repetibilidade .....	37
6.1.4.4.1.1.	Intradia .....	37
6.1.4.4.2.	Precisão intermediária .....	37
6.1.4.4.2.1.	Interdias .....	37
6.1.4.4.2.2.	Interanalistas.....	37
6.1.4.5.	Exatidão.....	37
6.1.4.6.	Robustez.....	38
6.1.4.7.	Limites de Detecção e de Quantificação .....	39
6.1.5.	Cálculo do teor de enrofloxacino nos comprimidos .....	40
6.1.6.	Resultados .....	41
6.1.6.1.	Seletividade .....	41
6.1.6.2.	Curva de Ringbom .....	43
6.1.6.3.	Linearidade.....	45
6.1.6.4.	Precisão .....	48
6.1.6.5.	Exatidão.....	48

6.1.6.6.	Robustez.....	49
6.1.6.7.	Limites de Detecção e Quantificação.....	50
6.1.6.8.	Teor.....	50
6.1.7.	Discussão.....	51
7.	CONCLUSÃO.....	53
8.	REFERÊNCIAS.....	54

## 1. INTRODUÇÃO

O enrofloxacino é uma fluorquinolona de segunda geração, derivado do ácido nalidíxico. Foi desenvolvido na década de 1980, destinado especialmente para a Medicina Veterinária, sendo a primeira quinolona a ser utilizada para o tratamento de bactérias em várias espécies de animais (OTERO et al., 2001). O amplo espectro e a propriedade de deixar pouco ou nenhum resíduo de sua biotransformação em tecidos comestíveis impulsionou ainda mais sua utilização na Medicina Veterinária, sendo aplicável, portanto em animais de criação em fazendas (BABAAHMADY; KHOSRAVI, 2011).

A segurança do enrofloxacino tem sido extensivamente testada e foi provado que é pouco tóxico nas vias intravenosa e oral. Efeitos secundários significativos ocorreram apenas em animais de laboratório que receberam doses 10 vezes superiores às recomendadas. O composto não é teratogênico ou mutagênico e, na maioria das pesquisas científicas, não houve evidência de risco para os aplicadores ou consumidores (BABAAHMADY; KHOSRAVI, 2011).

A ampla utilização e comercialização do enrofloxacino aumentam a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos diversos, que sejam acessíveis à rotina de produção industrial do medicamento, que causem menos danos ao meio ambiente e que gerem resultados confiáveis.

O Controle de Qualidade na indústria farmacêutica é o conjunto de medidas de análise da qualidade de cada lote de medicamentos para que contemplem todas as especificações estabelecidas. Algumas das medidas são o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a identificação e quantificação do princípio ativo nas diversas formas farmacêuticas. Dados analíticos não confiáveis podem causar decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreversíveis. O método analítico deve ser validado a fim de obter resultados confiáveis sobre a amostra testada (LA ROCA et al., 2007).

A validação demonstra que o método é apropriado para a finalidade pretendida, devendo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017). Os métodos utilizados na avaliação de conformidade de produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade, entre outros (LA ROCA et al., 2007).

Dados mostram que desde o início do século XIX, que representa o início do crescimento da produção e utilização de produtos químicos, até os dias de hoje, o que

atinge aproximadamente 200 anos, houve degradação e poluição do meio ambiente equivalente a mais de 10.000 anos de história (FARIAS; FÁVARO, 2011). Devido às altas taxas de poluição e degradação do meio ambiente, na década de 90 foram propostas medidas para a minimização da produção de resíduos, ao invés de apenas ocorrer o tratamento do resíduo no fim da linha de produção. Este conceito é chamado de “*Green Chemistry*” ou “Química Verde”. A inutilização de solventes ou uso de substâncias inócuas e o uso de fontes renováveis como matéria-prima são exemplos de atitudes propostas pela Química Verde (LENARDÃO et al., 2003), cujos princípios foram propostos por Anastas (1999). Atualmente, vários pesquisadores (TÓTOLI e SALGADO, 2015; KOGAWA e SALGADO, 2017) têm se dedicado a cumprir com os requisitos da Química Verde.

Métodos espectroscópicos na região do ultravioleta para análise de fármacos são amplamente utilizados na produção de medicamentos, como glimepirida (BONFILIO et al., 2011), ciprofloxacino (CAZEDEY et al., 2012; CAZEDEY e SALGADO, 2012), orbifloxacino (CAZEDEY; SALGADO, 2014), norfloxacino (CHIERENTIN; SALGADO, 2013), darunavir (CORRÊA et al., 2014), flucloxacilina (FIORENTINO; SALGADO, 2012), lomefloxacino (GOMES; SALGADO, 2005), doxiciclina (KOGAWA; SALGADO, 2013), rifaximina (KOGAWA; SALGADO, 2016), linezolida (LOPES; SALGADO, 2008), esparfloxacino (MARONA; SCHAPOVAL, 1999), ceftazidima (MORENO; SALGADO, 2009), cefazolina (PEDROSO; SALGADO, 2013), gatifloxacino (SALGADO; OLIVEIRA, 2005), ácido cafeico (SPAGNOL et al., 2015), cefuroxima (VIEIRA; SALGADO, 2011) e daptomicina (TÓTOLI; SALGADO, 2015). Por espectrofotometria na região do visível, esparfloxacino (MARONA; SCHAPOVAL, 2001), ceftazidima (MORENO; SALGADO, 2008) e tigeciclina (SILVA et al., 2012).

O enrofloxacino é um antimicrobiano amplamente utilizado (BABAAHMADY; KHOSRAVI, 2011) e, portanto, o desenvolvimento de novos métodos analíticos e o aprimoramento dos existentes para sua análise é muito importante, tendo como objetivo final sempre diminuir os riscos à saúde da população, dos animais e ao meio ambiente. Assim, neste trabalho foi desenvolvido e validado um método rápido e de fácil execução para quantificação de enrofloxacino em comprimidos palatáveis por meio de espectrofotometria na região visível, utilizando ensaio miniaturizado, que garante a diminuição do volume dos reagentes utilizados, o que vai ao encontro dos princípios da Química Verde.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

O trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método analítico quantitativo miniaturizado, ambientalmente e economicamente favorável, para determinação de enrofloxacino em comprimidos palatáveis por espectrofotometria na região visível.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Análise qualitativa através da determinação do peso médio;
- Desenvolvimento do método analítico miniaturizado para quantificação de enrofloxacino em comprimidos por espectrofotometria na região visível;
- Validação do método analítico, com avaliação dos parâmetros:
  - ❖ Linearidade;
  - ❖ Seletividade;
  - ❖ Precisão;
  - ❖ Exatidão;
  - ❖ Robustez;
  - ❖ Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

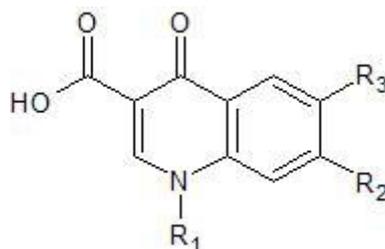
#### 3.1. Quinolonas

As quinolonas possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bacilos Gram-negativos aeróbicos, estafilococos e cocos Gram-negativos, além de possuírem biodisponibilidade oral, o que as torna uma classe muito importante de antibacterianos. Possuem rápida absorção após administração oral e sua biodisponibilidade considerada boa a excelente, sendo na maior parte dos casos superior a 50% e em alguns, perto de 100% (GOODMAN & GILMAN, 2006; ALÓS, 2009).

Esta classe de fármacos possui atividade bactericida rápida dependente de concentração. Neste caso, devem ser considerados parâmetros importantes para prever a resposta antimicrobiana e a capacidade surgimento de resistências, que são o quociente da concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) e concentração inibitória mínima (CIM). Outro parâmetro farmacodinâmico utilizado é o quociente da área sob a curva de concentração sérica/tempo e a Concentração Inibitória Mínima (AUC/CIM) (ALÓS, 2009).

As quinolonas têm uma estrutura formada por dois anéis, um nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3, como mostra a Figura 1.

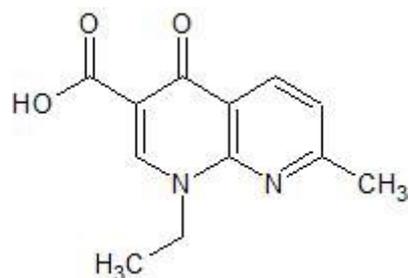
**Figura 1.** Estrutura química das quinolonas



Fonte: autora.

O ácido nalidíxico (Figura 2) é uma importante quinolona, utilizada no desenvolvimento do enrofloxacino.

**Figura 2.** Estrutura química do ácido nalidíxico (CAS 389-08-2)



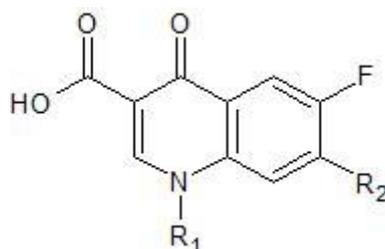
Fonte: autora.

### 3.2. Fluorquinolonas

As quinolonas possuem utilidade terapêutica limitada e rápido desenvolvimento de resistência bacteriana. A partir delas, foram introduzidas as 4-quinolonas fluoradas, ou fluorquinolonas, apresentando ampla atividade antibacteriana e grande eficácia após administração oral no tratamento de várias doenças infecciosas. Estes fármacos apresentam poucos efeitos colaterais e grande diminuição no desenvolvimento de resistência bacteriana (GOODMAN & GILMAN, 2006).

As fluorquinolonas são claramente mais ativas contra bactérias Gram-negativas do que as quinolonas de primeira geração, como ácido nalidíxico ou ácido pipemídico. Apresentam atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e contra as bactérias Gram-positivas, em vários graus. Devido ao seu espectro de atividade e potência, as fluorquinolonas são utilizadas para tratar uma variedade de infecções, como do trato urinário, sexualmente transmissíveis, gastrointestinais, ósseas, de pele, trato respiratório e oculares (ALÓS, 2009).

As fluorquinolonas (Figura 3) foram obtidas através da adição de um átomo de flúor na posição 6, aumentando significativamente sua potência e espectro em comparação às quinolonas. Este aumento é devido à melhor penetração nos tecidos e à melhor ligação às topoisomerasas bacterianas. São potentes contra bactérias Gram-negativas, sendo esta potência aumentada com a presença de um grupo piperazínico ou metil-piperazínico na posição 7. Além disso, substituintes metila em grupos piperazínicos melhoram a biodisponibilidade oral (GOODMAN & GILMAN, 2006; ALÓS, 2009).

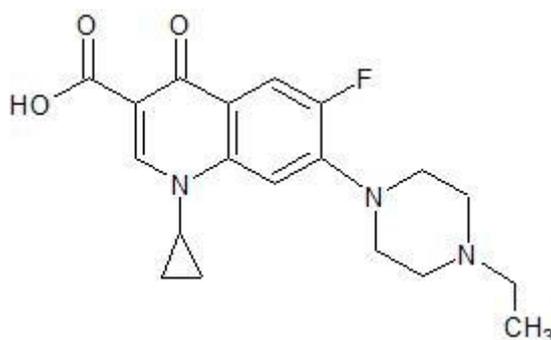
**Figura 3.** Estrutura química das fluorquinolonas

Fonte: autora.

### 3.3. Enrofloxacinó

#### 3.3.1. Características estruturais

O enrofloxacinó (Figura 4) possui um átomo de flúor na posição 6, sendo uma fluorquinolona, o que aumenta sua ligação à DNA girase bacteriana e aumenta a penetração celular em 70 vezes em comparação às quinolonas que não têm flúor nesta posição. Além disso, esta substituição aumenta sua eficácia contra agentes patogênicos Gram-negativos e expande o espectro de atividade ao atuar contra agentes patogênicos Gram-positivos. Na posição 7, apresenta um anel de 4-metilpiperazin-1-il, cujo volume espacial confere maior potência em relação às quinolonas que possuem moléculas lineares nesta posição. A presença de um grupo etila na posição 4 do anel aumenta a absorção digestiva e disponibilidade, fazendo com que o enrofloxacinó atinja o dobro da concentração plasmática do ciprofloxacino, que tem uma estrutura semelhante, mas não tem o referido radical. O enrofloxacinó possui baixo peso molecular, o que favorece a sua penetração nos tecidos (OTERO et al., 2001).

**Figura 4.** Estrutura química do enrofloxacinó (CAS 93106-60-6)

Fonte: autora.

### 3.3.2. Mecanismo de ação

O enrofloxacino atua no DNA cromossômico bacteriano, ligando-se a algumas das topoisomerasas e inibindo o processo de síntese do DNA. Em Gram-negativos, a topoisomerase inibida é principalmente a DNA-girase, cuja função mais importante é manter um nível de enrolamento do DNA que facilite a formação dos complexos de replicação e transcrição. A ligação do fármaco à DNA-girase provoca uma mudança conformacional na enzima, causando sua inibição (OTERO et al., 2001; GOODMAN & GILMAN, 2006; ALÓS, 2009).

### 3.3.3. Farmacocinética

As fluorquinolonas são amplamente distribuídas pelo corpo. O volume de distribuição é alto, atingindo concentrações intracelulares altas. Várias são eliminadas majoritariamente pela via renal, outras por vias não renais (moxifloxacino) e outras por ambas as vias (norfloxacino, ciprofloxacino). Também são excretadas em parte pela parede intestinal, o que explica a sua eficácia em doenças diarreicas (ALÓS, 2009).

O enrofloxacino é biotransformado a ciprofloxacino, o que é benéfico no ponto de vista microbiológico, uma vez que a CIM do ciprofloxacino em relação a muitas bactérias é menor do que a do enrofloxacino, sendo provável que o efeito antimicrobiano seja aditivo entre o fármaco original e metabólito (OTERO et al., 2001).

### 3.3.4. Espectro de ação e uso clínico

O enrofloxacino apresenta eficácia comprovada no tratamento de doenças bacterianas, como infecções no trato respiratório, mastites, agalaxias, enterites, infecções na pele, infecções nos tratos digestivo e geniturinário e otites em bovinos, ovinos, equinos, suínos, caninos, felinos, aves, entre outras espécies (OTERO et al., 2001).

É utilizado no tratamento de doenças causadas por bactérias intracelulares como *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* e *Brucella* (LIZONDO et al., 1996). Sua atividade contra os enterococos é regular a baixa, com maiores percentuais de sensibilidade em *Enterococcus faecalis* do que em *Enterococcus faecium*. Com exceção dos casos de pacientes com má absorção intestinal, a via oral é mais indicada pela facilidade de administração, pelo menor risco de efeitos adversos e custo mais baixo (ALÓS, 2009).

### 3.3.5. Reações adversas e toxicidade

Os efeitos adversos mais frequentes são náuseas, distúrbios no trato gastrointestinal superior, cefaleia, insônia e tonturas. Porém, cada quinolona tende a produzir um perfil característico efeitos adversos. Várias quinolonas são associadas a danos nos tendões, podendo se manifestar como tendinite ou ruptura do tendão. É previsto que os sintomas se iniciem depois de 6 dias de tratamento. Outra manifestação de toxicidade é a sua ação em cartilagens, sendo então contraindicadas para crianças e mulheres grávidas, exceto em casos de infecções pulmonares em crianças com fibrose cística, infecções complicadas do trato urinário ou exposição a *Bacillus anthracis* (ALÓS, 2009).

Diversos estudos de segurança do enrofloxacino em vários animais demonstram que o fármaco é seguro e tolerado. Não foram observados efeitos na composição do sangue ou função renal e não foi observada teratogenicidade ou mutagenicidade. Como o medicamento apresenta efeitos mínimos sobre organismos anaeróbios, que representam uma porção considerável da flora intestinal, a incidência de efeitos colaterais intestinais é menor comparando-se aos antibacterianos de outras famílias. Além disso, não há evidências de alterações no sistema cardiovascular (BABAAHMADY; KHOSRAVI, 2011).

### 3.3.6. Mecanismos de resistência

O principal mecanismo de resistência às fluorquinolonas se deve a alterações na enzima alvo, a DNA-girase para Gram-negativos e a topoisomerase IV para Gram-positivos. Este mecanismo se origina a partir de mutações espontâneas nos genes que codificam as subunidades da DNA-girase (*gyrA*) ou da topoisomerase IV (*parC*). As mutações tendem a ocorrer em uma região particular destes genes, chamada Região Determinante de Resistência a Quinolonas (RDRQ). Alterações nos aminoácidos na RDRQ alteram a estrutura do local onde as quinolonas se ligam à DNA-girase, diminuindo sua afinidade e desenvolvendo a resistência (OTERO, 2001 et al.; ALÓS, 2009).

O mecanismo de resistência por permeabilidade foi demonstrado apenas em bactérias Gram-negativas, sendo causado pela diminuição na expressão de uma proteína da membrana exterior (porinas *OmpF*, *OmpC* em *E. coli*), ou devido a mudanças nos

lipopolissacarídeos. Isto resulta em uma menor acumulação do antibacteriano, e consequentemente na diminuição da suscetibilidade bacteriana (OTERO et al., 2001).

Algumas bactérias expressam sistemas de efluxo ativo, expulsando as quinolonas de seu interior. Este sistema foi inicialmente descrito em *E. coli*, e, em seguida em outras bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, ocorrendo devido à superexpressão de um gene que codifica uma proteína de membrana envolvida no mecanismo de efluxo ativo de fluorquinolonas e outros fármacos. A magnitude dos aumentos de CIM, resultantes de sobreexpressão de genes que codificam proteínas de bombas de expulsão depende de cada quinolona e de cada sistema de expulsão (ALÓS, 2009; OTERO et al., 2001).

A resistência cruzada entre as fluorquinolonas utilizadas em animais e no uso humano é um aspecto importante para a Saúde Pública. Há uma associação entre a introdução de fluorquinolonas na criação de animais destinados ao consumo humano e o aumento substancial de cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes à quinolona em aves, carne de aves e humanos infectados. Além disso, estudos confirmam a semelhança entre *Campylobacter* spp. resistentes a fluorquinolonas, isoladas de animais e humanos. Há também uma relação entre a introdução de fluorquinolonas na produção animal e o surgimento de cepas de *Salmonella typhimurium* e variantes de *S. typhimurium* resistentes a estes antimicrobianos (OTERO et al., 2001).

O uso do enrofloxacino em aves foi proibido em 2005, devido a estudos que mostraram que o uso deste fármaco em aves pode causar resistência a *Campylobacter*. Essa bactéria pode ser transmitida pelos alimentos e é normalmente abrigada no sistema digestivo de galinhas e perus (BABAAHMADY; KHOSRAVI, 2011).

### **3.4. Controle de qualidade**

Controle de qualidade é o conjunto de medidas destinadas a garantir a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade (F. BRAS, 2010). A percepção de alterações no medicamento antes de sua comercialização é importante, por poder evitar danos à saúde do paciente. Essas alterações podem resultar em queda do efeito terapêutico do fármaco, sua inativação ou formação de compostos nocivos à saúde (ERMER, 2001; LA ROCA et al., 2007).

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para determinação de medicamentos é de suma importância para o controle de qualidade. A demonstração

da qualidade dos métodos utilizados também tem sua importância, pois dados analíticos não confiáveis podem levar a decisões inadequadas e prejuízos financeiros (ERMER, 2001; LA ROCA et al., 2007).

Uma alteração não detectada previamente à comercialização de um medicamento antimicrobiano, que seja responsável por diminuição no efeito terapêutico do fármaco, pode causar a seleção de bactérias resistentes a ele e futuramente contribuir para o crescimento da resistência destas bactérias ao fármaco em questão.

### **3.5. Métodos analíticos**

Os métodos de quantificação de enrofloxacino encontrados na literatura de 2000 a 2017 estão listados na Tabela 1, especificando suas condições, sistema de detecção e matrizes.

**Tabela 1.** Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino

<b>Método/Deteção</b>	<b>Condições</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
EC em 275 nm	Eletrólito de corrida: tampão fosfato (0,05 M, pH 7,4), ácido trifluoroacético 4% e acetonitrila (25:75). Fase estacionária: capilar de sílica não-tratada (47 cm x 75 µm).	Músculo de ave	BARRÓN et al., 2001
EC em 260 nm	Eletrólito de corrida: 10 mM de fosfato de sódio monohidrogenado (ajustado para pH 9,0 com solução de ácido fosfórico). Fase estacionária: capilar de sílica fundida (64,5 cm x 75 µm).	Plasma suíno	HERNÁNDEZ et al., 2002
EC-F em 325 nm	Eletrólito de corrida: ácido fosfórico 85%, trietilamina, ácido acético glacial, hidróxido de sódio e diclorometano. Fase estacionária: capilar de sílica fundida (70 µm x 375 µm).	Músculo de ave	HORSTKÖTTER et al., 2002
Espectrofotometria UV-Vis	Complexação com ácido cloranílico: 520 nm. Complexação com tetracianoetileno: 290 nm.	Solução oral 10%	MOSTAFA et al., 2002
Espectrofotometria UV-Vis	Complexação com azul de bromotimol (pH 2,3-2,5; detecção a 420 nm) e alaranjado de metila (pH 3,6; detecção a 424 nm).	Solução oral	MOSTAFA et al., 2002
Voltametria adsortiva por redissolução	Solução tamponante Britton-Robinson 0,04 M, pH 7,0. Tempo de acumulação: 60 s.	Cápsulas e urina de cão	NAVALÓN et al., 2002
CLAE-UV em 278 nm	Coluna C-18 absorbosphere (150 x 2,6 mm, 5µm). Fase móvel: acetato de sódio (pH 4,7; 0,1 M) e acetonitrila (60:40, v/v, pH 5,0). Vazão: 1,5 mL/min.	Solução injetável	SOUZA et al., 2002

Continua na próxima página.

EC: eletroforese capilar

EC-F: eletroforese capilar com detecção por fluorescência

CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

**Tabela 1. (Cont).** Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino

<b>Método/Deteção</b>	<b>Condições</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
EIE-AM	Fígado e músculo de galinha: 10 ppb. Leite bovino: 1 ppb.	Fígado e músculo de galinha e leite bovino	WATANABE et al., 2002
CLAE-UV em 277 nm	Coluna C <sub>14</sub> Zorbax Bonus-RP. Fase móvel: ácido orto-fosfórico 0,05 M (pH 3,4) e acetonitrila (87:13 v/v). Vazão: 1 mL/min. Injeção: 20 µL.	Leite caprino	CINQUINA et al., 2003
CLAE-F	Coluna Spherisorb S5 C <sub>8</sub> . Fase móvel: ácido orto-fosfórico 0,16 % (ajustado para pH 3,0 com solução de hidróxido de tetrabutylamônio) e acetonitrila (20:1000, v/v). Injeção: 20 µL	Fezes suínas	SUNDERLAND et al., 2003
CLAE-F em 280 e 460 nm	Coluna polimérica PLRP-S. Fase móvel: solução de ácido fórmico, metanol e acetonitrila (75:13:12, v/v/v).	Leite e plasma bovino	IDOWU; PEGGINS, 2004
Espectrofluorimetria	Espectrofluorimetria: 0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Fluorescência em 450 nm e excitação em 290 nm.	N/I	SALEM, 2005
Espectrometria-AA	Coagulação com sulfato de cobalto (pH ajustado a 8,1 por solução tamponante).	N/I	SALEM, 2005
Espectrofotometria UV-Vis	Oxidação por vanadato de amônio com ácido sulfúrico. 766 nm.	N/I	SALEM, 2005

Continua na próxima página.

EIE-AM: ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA*) utilizando anticorpos monoclonais

CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

CLAE-F: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

Espectrofotometria-AA: espectrofotometria de absorção atômica

**Tabela 1. (Cont).** Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino

<b>Método/Deteção</b>	<b>Condições</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
EC	Deteção amperométrica de fim de coluna. Fase móvel: solução tamponante de fosfato pH 8,0 (20 mM/L) e diclorometano. Fase estacionária: capilar de sílica fundida (25 mm x 375 mm). Injeção a 18kV por 10 s.	N/I	WANG et al., 2005
CLAE-F	Coluna C-18 Hypersil-BDS (250 mm x 4,6 mm, 5µm). Fase móvel: acetonitrila/solução aquosa de 50 mM de ácido cítrico e 100 mM de acetato de amônio pH 4 (9:91, v/v). Excitação: 278 nm. Emissão: 465 nm. Vazão: 2,2 mL/min. Injeção: 20 µL.	Clara e gema de ovo	ZENG et al., 2005
CLAE em 294 nm e 500 nm	Coluna C <sub>18</sub> de fase-reversa. Fase móvel: 16 % de ACN, metanol (13:1, v/v), 0,4% de trietilamina e 0,4% de ácido fosfórico. Vazão: 1,2 mL/min. Injeção: 100 µL.	Plasma e tecidos endometriais equinos	GONZÁLEZ et al., 2006
Espectroscopia de Fluorescência	Quelação com Európio (III) e fenantrolina. 615 nm.	Soro sanguíneo	SHTYKOV et al., 2007
Quimioluminescência de injeção de fluxo	Oxidação por Ru(phen) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> -Ce(IV). Concentração ENRO: 3,6 µg/mL.	Formulações comerciais, plasma e tecido de ave	REZAEI; MOKHTARI, 2008
CLAE-IM em 280 nm	Coluna Optimapak. Fase móvel: água e acetonitrila (80:20, v/v, contendo 0,1% de ácido trifluoroacético). Vazão: 0,7 mL/min. Injeção: 20 µL.	Leite	YAN et al., 2008

Continua na próxima página.

EC: eletroforese capilar

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-F: cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência

Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Ce(IV): fenantrolina-Rutênio(III)-Cério(IV)

CLAE-IM: cromatografia líquida de alta eficiência com extração de fase sólida por impressão molecular

**Tabela 1. (Cont).** Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino

<b>Método/Deteção</b>	<b>Condições</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
Voltametria adsortiva por redissolução catódica	Complexação com Cobre (II). Eletrodo de mercúrio; deteção a – 0,30 V; faixa de concentração de ENRO: 10 – 80 nmol/L.	N/I	ENSAFI et al., 2009
CFT-M	Coluna Chromolith Speed Rod (50mm×4,6mm RP 18e). Injeção: 20 µL.	Tecidos comestíveis de animais de fazenda	KREBBER et al., 2009
Espectrofluorimetria	Complexação com 2,3,5,6-tetracloro- <i>p</i> -benzoquina. Excitação: 363 nm. Emissão: 488 nm.	Comprimidos	ULU, 2009
Voltametria	Eletrodo de vidro. Faixa de concentração: 2,0 a 780,0 µg/mL.	Plasma e urina	ENSAFI et al., 2010
CLAE-F em 300 e 448 nm	Coluna de fase-reversa C <sub>18</sub> Phenomenex Gemini. Fase móvel: acetonitrila e 0,05 M de solução tamponante de acetato (pH a 3,8 ajustado com ácido fosfórico 85%). Injeção: 2 µL. Vazão: 0,5 mL/min.	Plasma de ave	JAKUBOWSKI et al., 2010
CLAE-UV em 278 nm	Coluna C <sub>18</sub> Apollo (250 x 4,6 mm). Fase móvel: 0,04 M de solução de fosfato tamponante (pH 3,0) e acetonitrila (82:18, v/v). Vazão: 1 mL/min.	Plasma suíno	CHOI et al., 2011
EC-UV a 268 nm	Eletrólito de corrida: 50 mM de ácido fosfórico (pH 8,4) e 1,0 M HCl. Fase estacionária: capilar de sílica fundida (75 µm x 60,2 cm).	Leite bovino	PIÑERO et al., 2012

Continua na próxima página.

CFT-M: cromatografia de fluxo turbulento – espectrofotometria de massas

CLAE-F: cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência

CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por radiação ultravioleta

EC-UV: eletroforese capilar com deteção por radiação ultravioleta

**Tabela 1. (Cont).** Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino

<b>Método/Deteção</b>	<b>Condições</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
CLAE-deteção por fotodíodo a 275 nm	Coluna Perfect sil ODS-2 120 (250 mm x 4 mm, 5 µm). Fase móvel: ácido trifluoroacético 0,1 % (pH 1,0), acetonitrila e metanol. Vazão: 1 mL/min. Injeção: 20 µL.	Tecido de salmão	EVAGGELOPOULOU; SAMANIDOU, 2013
CLAE-F em 448 nm	Coluna Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4.6 mm, 5 µm) Fase móvel: água (com 4 % de ácido acético), acetonitrila/metanol (84:8:8, v/v/v). Vazão: 1 mL/min. Injeção: 20 µL.	Leite caprino	PIÑERO et al., 2013
Espectrofotometria visível	Complexação com Paládio (II). Deteção a 530 nm; Oxidação por solução alcalina de permanganato de potássio. Deteção a 604 nm; Oxidação por solução ácida de permanganato de potássio. Deteção a 520 nm.	N/I	EL-DIDAMONY; ABOELSOAD, 2014
Espectrofluorimetria	Complexação com Zircônio (IV). Deteção mín: 280 nm e máx: 440 nm.	N/I	EL-DIDAMONY; ABOELSOAD, 2014
CLAE em 278 nm	Fase móvel: metanol e solução aquosa de ácido acético glacial 5 %, pH 2,6.	Comprimidos	REBOUÇAS, 2014
Espectrofotometria IV	Espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu® IR Prestige-21. Patilhas de KBr.	Comprimidos	REBOUÇAS, 2014
CCD	Placas TLC Sílica gel 60 F <sub>250</sub> , Merck.	Comprimidos	REBOUÇAS, 2014

Continua na próxima página.

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-F: cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência

IV: infravermelho

CCD: cromatografia de camada delgada

**Tabela 1. (Cont).** Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de enrofloxacino

<b>Método/Deteção</b>	<b>Condições</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
Espectrofotometria UV-Vis	Oxidação por Cério (IV) em meio ácido: 320 nm. Oxidação por cério (IV) em meio ácido, com ácido N-fenilntranílico: 440 nm. Oxidação por cério (IV) em meio ácido, com vermelho de alizarina S: 420 nm.	Comprimidos	RAJENDRAPRASAD; BASAVIAIAH, 2015
CLM-F	Coluna C-18 Kromasil (150 x 4,6 mm, 5µm). Fase móvel: 0,05 M de SDS, 7,5% de 1-propanolol e 0,5 % de trietilamina (pH 3 por solução tamponante). Vazão: 1 mL/min. Injeção: 20 µL.	Carne bovina e suína	TERRADO-CAMPOS et al., 2017

CLM-F: cromatografia líquida micelar com deteção por fluorescência

### 3.6. Validação de métodos analíticos

Através de estudos experimentais, a validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para atingir resultados confiáveis, o método deve apresentar linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez adequados à análise (BRASIL, 2017).

A linearidade é a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais (dentro de um intervalo) à concentração do analito. A exatidão expressa a proximidade da comparação entre o valor que é convencionalmente aceito como verdadeiro ou um valor de referência e o valor encontrado no experimento. A precisão expressa a proximidade da comparação entre uma série de medições obtidas por amostragens múltiplas da mesma amostra através de condições previstas. A precisão deve ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ensaio entre analista) (ICH, 2005).

O limite de detecção (LD) é a mínima quantidade de analito numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a mínima quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas. A robustez mede a capacidade do método de manter resultados confiáveis quando submetido a variações em seus parâmetros (ICH, 2005).

### 3.7. Química Verde

Na implementação de um desenvolvimento sustentável, a química deve manter e melhorar a qualidade do meio ambiente através de medidas que diminuam ou previnam danos. Isto demanda o aprimoramento dos processos, a fim de gerar menos resíduos tóxicos. Esta conduta representa a química verde, sendo a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias tóxicas. As iniciativas da química verde abrangem todas as áreas da ciência, através dos princípios da sustentabilidade (PRADO, 2003).

A aplicação da química verde na indústria farmacêutica teve outras razões além das ambientais. As sínteses conduzidas atendendo aos princípios da química verde utilizam menor quantidade de matéria-prima, reduzindo o custo da fabricação do produto. Utilizando menos matéria-prima, o tempo de manuseio do material é reduzido, simplifica-

se as operações, há menor geração de resíduos e os gastos com tratamento e eliminação são reduzidos (FARIAS; FÁVARO, 2011).

### 3.8. Complexação com cloreto férrico

As quinolonas são conhecidas por se ligarem a muitos íons metálicos. Em estudo de biodisponibilidade de ciprofloxacino, fluorquinolona de segunda geração, no qual o fármaco foi administrado juntamente a sulfato de ferro, foi possível verificar grande diminuição em seu pico sérico de concentração. Provavelmente isso é resultado da diminuição da absorção do ciprofloxacino, devido à formação de complexos com ferro. A proximidade entre os grupos cetona e carboxila da molécula de ciprofloxacino garantiu sua atividade quelante. Este mecanismo de complexação com ferro foi também observado com o ácido nalidíxico e o norfloxacino (KARA et al., 1991).

Foi realizado um estudo da interação de fluorquinolonas com íons metálicos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ ), através de determinação quantitativa por eletroforese capilar. Foram analisados: enrofloxacin, ciprofloxacino, lomefloxacino, levofloxacino, ofloxacino, norfloxacino e esparfloxacino. Foram determinadas constantes de formação de complexos para os diferentes metais e fármacos, confirmando suas propriedades de complexação, conforme concentração. O  $\text{Fe}^{3+}$  apresenta maior constante de formação de complexo, seguido pelo  $\text{Al}^{3+}$  e então, o  $\text{Mg}^{2+}$  (URBANIÁK et al., 2007).

Um método para determinação de ciprofloxacino através de espectrofotometria na região visível utilizando solução de nitrato de ferro (III) 1 % em ácido nítrico 1 % mostrou ser viável. A complexação do fármaco com a solução de nitrato de ferro (III) 1 % em ácido nítrico 1 % gerou coloração amarelo-alaranjada, com absorção máxima em 435 nm (FRATINI; SCHAPOVAL, 1996).

Considerando os estudos encontrados e a disponibilidade do reagente cloreto férrico no laboratório, a possibilidade de utilizá-lo no desenvolvimento de um método de quantificação de enrofloxacin foi cogitada.

## 4. DESCRIÇÃO

### 4.1. Descrição geral

**Nome genérico:** enrofloxacino (CAS 93106-60-6)

**Nome químico:** ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(4-etil-1-piperacínil)-3-quinolínico carboxílico (USP, 2016)

**Fórmula química:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (USP, 2016)

**Massa molecular:** 359,39 g/mol (USP, 2016)

**Propriedades físico-químicas:** apresenta-se como pó cristalino amarelo claro. É muito pouco solúvel em água a pH 7,0 (USP, 2016).

**Categoria:** antimicrobiano

**Classe:** fluorquinolona de segunda geração

**Comercialização no Brasil:** está disponível no comércio nas formas de comprimidos, soluções injetáveis e soluções orais pelos laboratórios: Bayer, Bimeda Brasil, Biovet, Bravet, Centagro, Chemitec, Coveli, Des-Vet, Hertape, Hipra, Indubras, Interchange, Intervet Brasil Veterinária LTDA, J.A. Saúde Animal, Jofadel, Labgard, MSD, Microsules do Brasil, Mundo Animal, Ouro Fino, Pharmalogic/Minerthal, Sanphar, Sespo, Tortuga Cia. Zootécnica Agrária, Trouw Nutrition, UCBVet. Vallée, Vansil, Venco, Vetanco do Brasil, Vetoquinol e Vitalfarma LTDA (BRASIL, 2012).

### 4.2. Material

#### 4.2.1. Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi enrofloxacino SIGMA-ALDRICH de St. Louis, EUA (lote: SZBA336XV; teor declarado: 99,0%).

#### **4.2.2. Forma farmacêutica**

Os produtos farmacêuticos analisados foram comprimidos de enrofloxacino Baytril® Flavour, concentração de 15 mg/unidade, lote 01437521, adquiridos no comércio.

#### **4.2.3. Solventes e reagentes**

No decorrer das análises, o solvente utilizado foi água purificada e o reagente utilizado foi solução de cloreto férrico 0,5% Synth®.

#### **4.2.4. Equipamentos**

Para as leituras espectrofotométricas, foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis BMG LabTech Spectrostar Nano e microplacas de 96 poços. Para as pesagens, foi utilizada balança analítica OHAUS Corporation, modelo DV215CD, distribuída por Toledo do Brasil.

### **5. ANÁLISE QUALITATIVA**

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

O teste se aplica a formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (comprimidos revestidos, não revestidos, pastilhas, cápsulas duras e moles e supositórios). O procedimento permite verificar se unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso, sendo aptas para um posterior preparo de amostras em análises quantitativas (F. Bras, 2010).

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), comprimidos revestidos com peso médio de 80 mg ou menos não podem apresentar mais que duas unidades fora dos limites especificados de  $\pm 10\%$ . Além disso, nenhuma unidade pode estar acima ou abaixo do dobro desta porcentagem, ou seja, 20 %. A Tabela 2 ilustra as especificações quanto ao peso médio de comprimidos.

**Tabela 2.** Variação de peso dos comprimidos segundo a Farmacopeia Brasileira (2010)

<b>Formas farmacêuticas em dose unitária</b>	<b>Peso médio (mg)</b>	<b>Limites de variação (%)</b>
Comprimidos não revestidos ou revestidos com filme	Até 80 ou menos	± 10,0
Comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais	Mais que 80 e menos que 250	± 7,5
Comprimidos vaginais e pastilhas	250 ou mais	± 5,0

### 5.1.1. Método

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (2010). Aleatoriamente, 20 comprimidos do mesmo lote foram pesados individualmente em balança analítica, para posterior cálculo da média.

### 5.1.2. Resultados e discussão

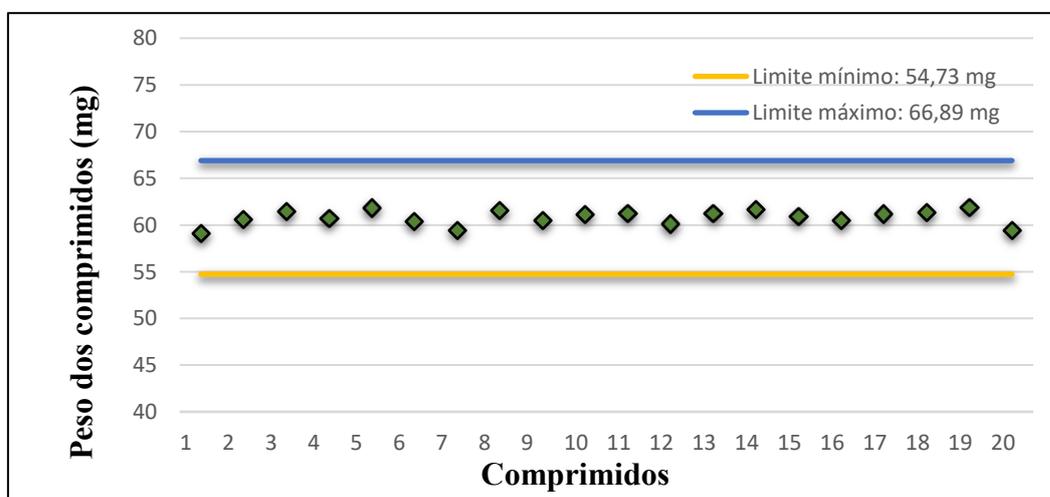
A Tabela 3 relaciona o peso individual de 20 comprimidos com peso médio e desvio padrão relativo.

**Tabela 3.** Relação do peso individual dos comprimidos de enrofloxacino, média e desvio padrão relativo

Comprimido	Peso individual (mg)	Peso médio (mg)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
1	59,10			
2	60,56			
3	61,46			
4	60,69			
5	61,82			
6	60,40			
7	59,46			
8	61,57			
9	60,51			
10	61,14	60,81	0,80	1,32
11	61,22			
12	60,12			
13	61,26			
14	61,68			
15	60,90			
16	60,50			
17	61,17			
18	61,32			
19	61,86			
20	59,48			

A Figura 5 ilustra a variação de peso dos vinte comprimidos de enrofloxacino.

**Figura 5.** Variação de peso dos vinte comprimidos de enrofloxacino



As variações de peso dos comprimidos de enrofloxacino se encontram dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010) de  $\pm 10\%$  (peso máximo de 66,89 mg e peso mínimo de 54,73 mg) e foi encontrado como peso máximo 61,86 mg e peso mínimo 59,1 mg, estando todos dentro desta variação, como mostra a Figura 5. O desvio padrão relativo apresentou valor de 1,32%.

## **6. ANÁLISE QUANTITATIVA**

### **6.1. Espectrofotometria de absorção na região do visível (VIS)**

#### **6.1.1. Preparo das soluções de enrofloxacino SQR**

Para todas as soluções de enrofloxacino SQR, o seu teor de 99% foi considerado na pesagem. Foi utilizada água purificada como solvente em todos os preparos. As soluções foram feitas em balões volumétricos de 5 mL.

#### **6.1.2. Preparo das soluções de enrofloxacino comprimidos**

A dosagem dos comprimidos de enrofloxacino, de 15 mg e seu peso médio de 60,81 mg foram considerados na pesagem para todas as soluções, utilizando água purificada como solvente. As soluções foram feitas em balões volumétricos de 5 mL.

#### **6.1.3. Preparo das soluções de cloreto férrico 0,5%**

No preparo das soluções do cloreto férrico, foram transferidos 0,05 g do reagente para balão volumétrico de 10 mL, completando-se com água purificada.

#### **6.1.4. Validação**

##### **6.1.4.1. Seletividade**

O parâmetro da seletividade foi avaliado a partir da determinação do comprimento de onda em que o comprimido de enrofloxacino apresentasse maior absorvância, sem que houvesse interferência do reagente cloreto férrico na leitura.

Foi realizada uma varredura utilizando soluções de comprimido de concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , sem o reagente. A partir da solução de 200  $\mu\text{g/mL}$ , foram feitas as diluições para 100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  de cada solução para microplaca de 96 poços, que foi submetida à análise espectrofotométrica.

O comportamento espectrofotométrico do cloreto férrico também foi analisado através de varredura, em que foi possível obter o comprimento de onda no qual o reagente

apresenta maior absorvância. Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto férrico 0,5% para microplaca de 96 poços para posterior análise espectrofotométrica.

Também foram realizadas varreduras para diferentes concentrações de soluções de comprimido de enrofloxacino, a fim de fazer comparação com as varreduras das soluções de amostra e de cloreto férrico. A partir de uma solução de 1 mg/mL de enrofloxacino, foram feitas diluições para 600 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  de cada solução para microplacas de 96 poços, juntamente com 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto férrico 0,5%. Quando transferidas para a microplaca juntamente com o reagente, as soluções obtêm a metade da concentração inicial, portanto foram analisadas soluções de 500, 300 e 150  $\mu\text{g/mL}$  de enrofloxacino complexado com cloreto férrico.

#### **6.1.4.2. Curva de Ringbom**

A faixa de linearidade do método foi determinada pela curva de Ringbom, através da análise espectrofotométrica de soluções de 20 concentrações diferentes, de 800 a 40  $\mu\text{g/mL}$ . A partir da solução de 800  $\mu\text{g/mL}$ , foram realizadas diluições para obtenção das 20 concentrações utilizadas no ensaio, com auxílio de micropipeta. A Tabela 4 ilustra como foram conduzidas as diluições.

Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada solução de comprimido em microplaca de 96 poços, juntamente a 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto férrico 0,5 %, em triplicata. Portanto, as concentrações analisadas foram de 400 a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 4.** Preparo das soluções de ENRO-Comp para construção da curva de Ringbom

Pontos	Volume da solução de ENRO-comp 800 µg/mL (mL)	Concentração (µg/mL)
1	-	800
2	0,95	760
3	0,90	720
4	0,85	680
5	0,80	640
6	0,75	600
7	0,70	560
8	0,65	520
9	0,60	480
10	0,55	440
11	0,50	400
12	0,45	360
13	0,40	320
14	0,35	280
15	0,30	240
16	0,25	200
17	0,20	160
18	0,15	120
19	0,10	80
20	0,05	40

#### 6.1.4.3. Linearidade

A linearidade do método foi obtida através de três curvas analíticas, analisando as absorvâncias obtidas nas leituras de soluções de enrofloxacino SQR de 6 concentrações. A partir de uma solução de 400 µg/mL, foram feitas diluições para obtenção de soluções de 360, 320, 280, 240 e 200 µg/mL. 100 µL de cada solução foram transferidos para microplaca, juntamente com 100 µL de solução de cloreto férrico 0,5%. Portanto, foram analisadas soluções de 200, 180, 160, 140, 120 e 100 µg/mL de enrofloxacino SQR.

Os resultados obtidos foram utilizados na obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

#### **6.1.4.4. Precisão**

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo percentual (DPR) das absorvâncias obtidas na análise das amostras, submetida a ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias e interanalistas). Foram transferidos 100 µL de solução de enrofloxacino comprimido de 280 µg/mL para microplaca de 96 poços, juntamente a 100 µL de solução de cloreto férrico 0,5%. Portanto, a concentração da solução de enrofloxacino analisada foi de 140 µg/mL. A microplaca foi submetida à análise espectrofotométrica imediatamente após ser preparada.

##### **6.1.4.4.1. Repetibilidade**

###### **6.1.4.4.1.1. Intradia**

A solução de enrofloxacino comprimido de 140 µg/mL foi analisada através do desvio padrão relativo dos valores de 12 absorvâncias. Assim, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

##### **6.1.4.4.2. Precisão intermediária**

###### **6.1.4.4.2.1. Interdias**

Soluções de enrofloxacino comprimido 140 µg/mL foram preparadas em dois dias diferentes e submetidas à análise espectrofotométrica em triplicata, sob as mesmas condições experimentais, pelo mesmo analista. A avaliação foi feita através do desvio padrão relativo entre as médias de absorvâncias obtidas nos dois dias.

###### **6.1.4.4.2.2. Interanalistas**

Dois analistas prepararam e conduziram o ensaio sob as mesmas condições experimentais, em triplicata, utilizando soluções de enrofloxacino comprimido 140 µg/mL. A avaliação foi feita através do desvio padrão relativo entre as médias das absorvâncias obtidas por cada analista.

#### **6.1.4.5. Exatidão**

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de solução SQR foram adicionadas à amostra (solução de enrofloxacino comprimido). As amostras foram preparadas segundo a Tabela 5, em balões volumétricos âmbar de 5 mL, completados com água purificada, em triplicata.

Foram transferidos 100 µL de cada solução descrita na Tabela 5 em microplaca de 96 poços, juntamente a 100 µL de solução de cloreto férrico 0,5%, para posterior análise espectrofotométrica.

**Tabela 5.** Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região visível

	<b>Amostra 400 µg/mL (mL)</b>	<b>Enrofloxacino padrão 400 µg/mL (mL)</b>	<b>Concentração final (µg/mL)*</b>
Amostra	2,5	-	100
R1	2,5	0,7	128
R2	2,5	1,5	160
R3	2,5	2,3	192
Padrão	-	2,5	100

\*Concentração obtida no poço da microplaca

A porcentagem de enrofloxacino recuperada foi calculada conforme a Equação 1:

$$\%R = \left[ \frac{(Cr - Ca)}{Cp} \right] \times 100 \quad (1)$$

Em que:

Cr = concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

Ca = concentração encontrada da amostra (µg/mL)

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

#### 6.1.4.6. Robustez

A robustez do método foi determinada através pela comparação dos resultados de oito ensaios, obtidos pela variação de comprimentos de onda (430 e 432 nm), marca de microplaca (A e B) e tempo de análise (0 min após pipetagem e 5 min após pipetagem), conforme ilustra a Tabela 6. A microplaca utilizada nas demais análises da validação, considerada “análise inalterada” na Tabela 6, ou microplaca “A” foi cedida pelo laboratório CRAL Artigos para Laboratório LTDA™. A microplaca utilizada na análise alterada, ou microplaca “B”, é da marca Cellstar®.

**Tabela 6.** Variáveis utilizadas na avaliação da robustez do método analítico para análise de enrofloxacino comprimidos por espectrofotometria na região visível

<b>Variável</b>	<b>Análise inalterada</b>	<b>Análise alterada</b>
<b>Comprimento de onda (nm)</b>	430	432
<b>Tempo de análise (min)</b>	0	5
<b>Microplaca</b>	A	B

A Tabela 7 mostra como foram conduzidos os ensaios de robustez, considerando as variáveis explicitadas na Tabela 6.

**Tabela 7.** Ensaios da avaliação de robustez do método analítico para análise de enrofloxacino comprimidos por espectrofotometria na região visível

<b>Ensaios</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Microplaca</b>	<b>Tempo de análise (min)</b>
1	432	B	5
2	432	B	0
3	430	B	5
4	430	B	0
5	432	A	5
6	432	A	0
7	430	A	5
8	430	A	0

Em todos os ensaios foram analisadas soluções de enrofloxacino comprimido de 140 µg/mL.

#### **6.1.4.7. Limites de Detecção e de Quantificação**

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A equação 2 foi utilizada no cálculo.

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$$

(2)

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio do intercepto e a inclinação da curva analítica. O cálculo foi realizado segundo a Equação 3.

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$$

(3)

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

#### **6.1.5. Cálculo do teor de enrofloxacino nos comprimidos**

A concentração de enrofloxacino na amostra foi calculada pela Equação 4 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 5.

$$Ca = Aa \times \frac{Csr}{Asr} \quad (4)$$

$$Ca\% = Ca \times \frac{100}{Ct} \quad (5)$$

Em que:

Ca = Concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

Ca% = Concentração percentual da amostra

Csr = Concentração da substância química de referência ( $\mu\text{g/mL}$ )

Aa = Absorvância da amostra

Asr = Absorvância da substância química de referência

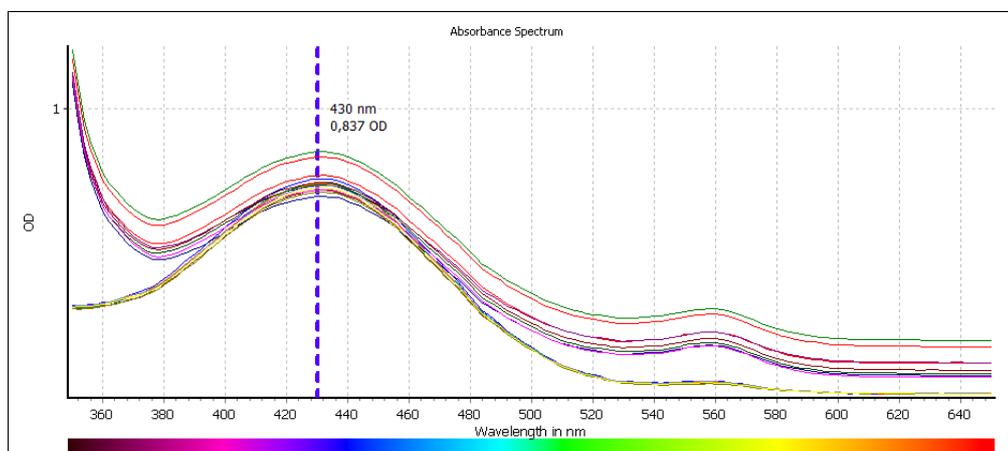
Ct = Concentração teórica de enrofloxacino na amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

## 6.1.6. Resultados

### 6.1.6.1. Seletividade

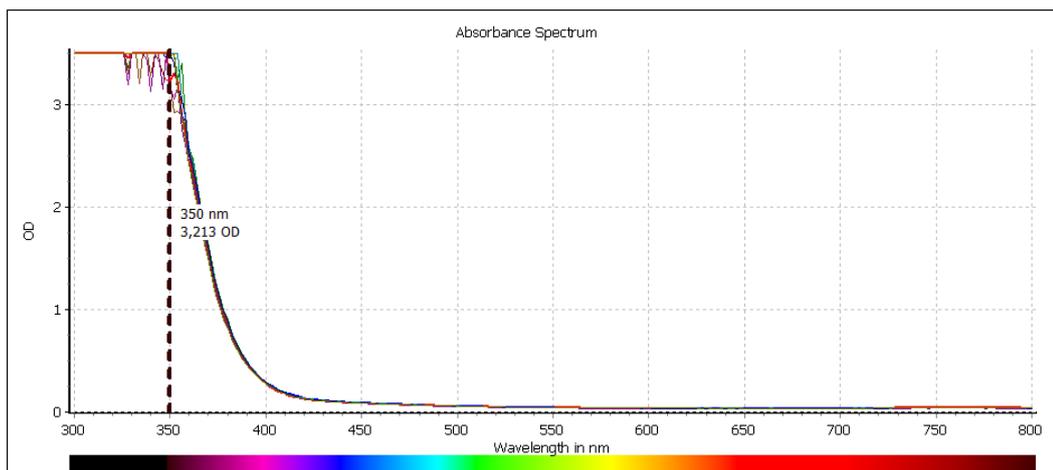
Através da leitura espectrofotométrica das soluções de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  foi possível obter o espectro ilustrado pela Figura 6, onde observa-se que o enrofloxacino apresenta maior absorvância em 430 nm.

**Figura 6.** Varredura de comprimentos de onda obtidos na análise espectrofotométrica de soluções de ENRO-Comp de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ .



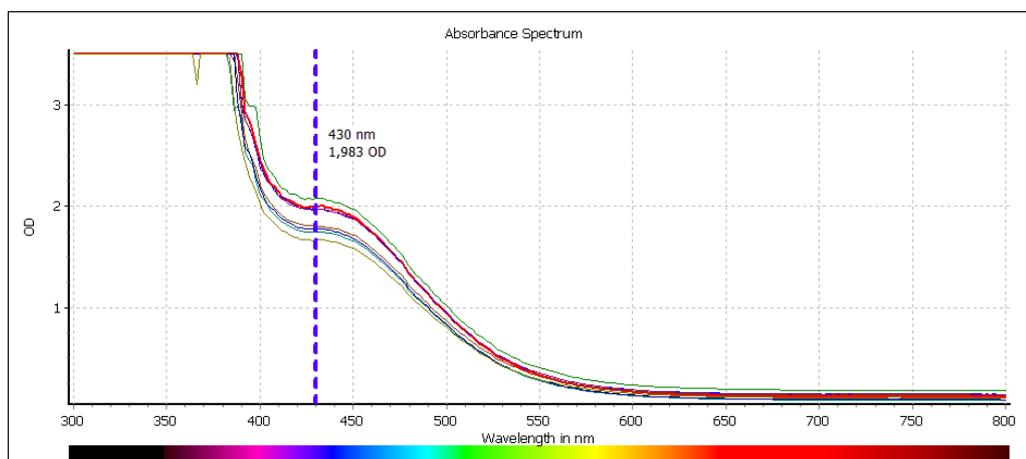
A varredura de comprimentos de onda obtida através da leitura espectrofotométrica da solução de cloreto férrico 0,5% está apresentada na Figura 7, na qual não há presença de pico em 430 nm. Portanto, é possível concluir que o cloreto férrico não interferiria na análise espectrofotométrica de enrofloxacino.

**Figura 7.** Varredura de comprimentos de onda obtidos na análise espectrofotométrica de solução de cloreto férrico 0,5%.



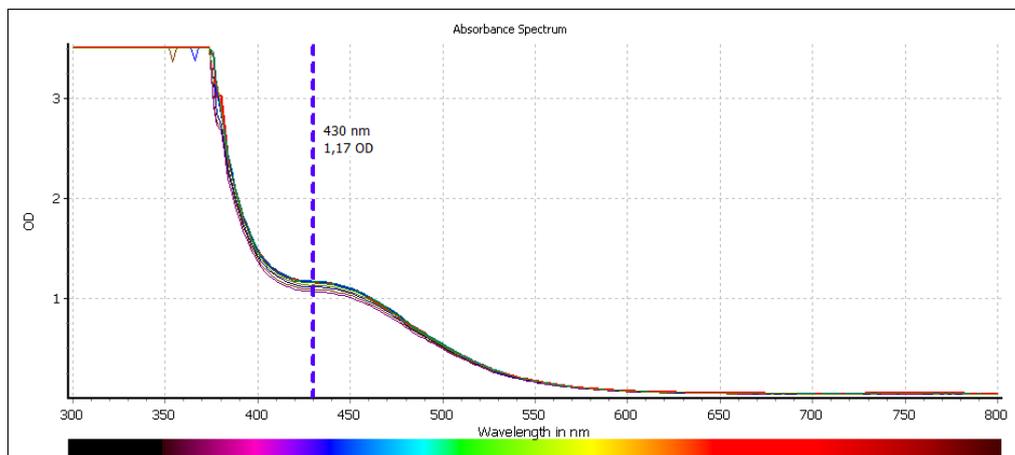
A figura 8 ilustra a varredura dos comprimentos de onda obtidos na análise da complexação de solução de enrofloxacino comprimido 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com solução de cloreto férrico 0,5%.

**Figura 8.** Análise espectrofotométrica de solução de ENRO-Comp 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  complexado com solução de cloreto férrico 0,5%.



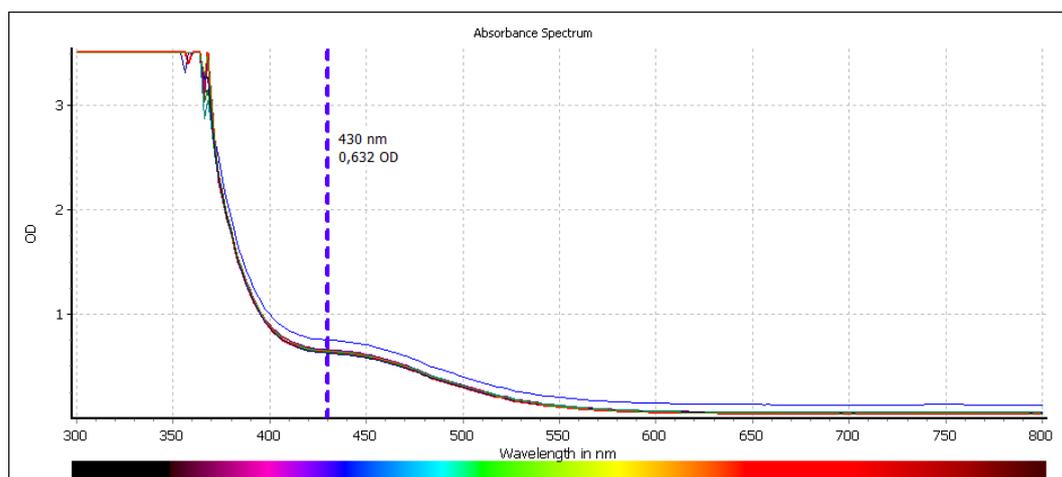
A Figura 9 ilustra a varredura dos comprimentos de onda obtidos na análise da complexação de solução de enrofloxacino comprimido 300  $\mu\text{g/mL}$  com solução de cloreto férrico 0,5%.

**Figura 9.** Análise espectrofotométrica de solução de ENRO-Comp a 300  $\mu\text{g/mL}$  complexado com solução de cloreto férrico 0,5%.



A Figura 10 ilustra a varredura dos comprimentos de onda obtidos na análise da complexação de solução de enrofloxacino comprimido 150  $\mu\text{g/mL}$  com solução de cloreto férrico 0,5%.

**Figura 10.** Análise espectrofotométrica de solução de ENRO-Comp a 150  $\mu\text{g/mL}$  complexado com solução de cloreto férrico 0,5 %.



#### 6.1.6.2. Curva de Ringbom

Os valores de absorvâncias obtidos podem ser visualizados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Absorvâncias da solução de enrofloxacino comprimido através de leitura em espectrofotômetro a 430 nm

Pontos	Concentração inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )*	Absorvância**	100-T%
1	800	400	1,315	95,17
2	760	380	1,258	94,35
3	720	360	1,177	93,37
4	680	340	1,182	93,47
5	640	320	1,126	92,6
6	600	300	1,086	91,82
7	560	280	1,007	90,17
8	520	260	0,969	89,24
9	480	240	0,878	86,75
10	440	220	0,836	85,41
11	400	200	0,764	82,79
12	360	180	0,705	80,28
13	320	160	0,624	76,72
14	280	140	0,562	72,59
15	240	120	0,487	67,45
16	200	100	0,419	61,92
17	160	80	0,332	53,48
18	120	60	0,302	50,18
19	80	40	0,232	41,44
20	40	20	0,166	31,82

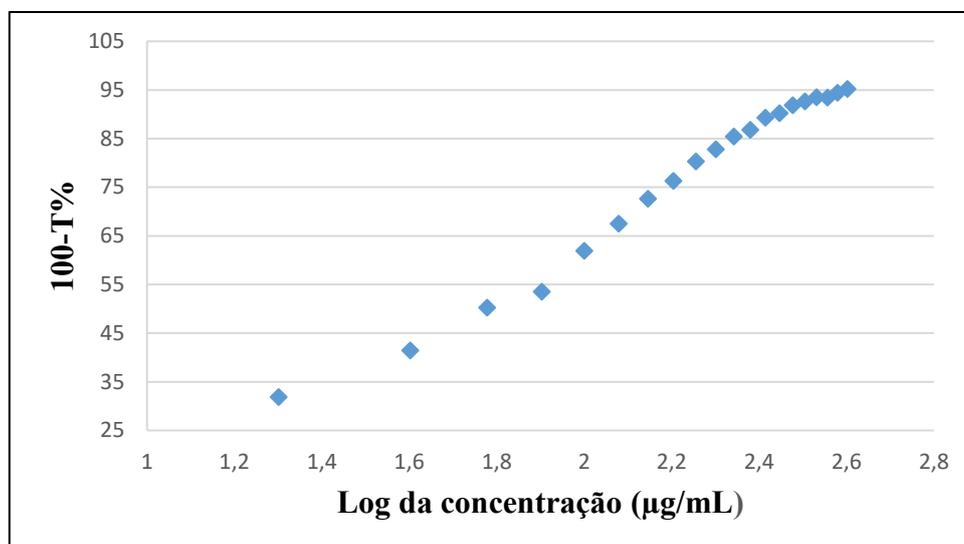
\*Concentração no poço da microplaca

\*\*Média das três absorvâncias obtidas em cada ponto

A curva de Ringbom determinou a faixa linear, e de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 100 a 200  $\mu\text{g/mL}$  mostrou-se linear.

A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de transmitância e de concentração em escala logarítmica (%) *versus* absorvância (100-T%), como mostra a Figura 11.

**Figura 11.** Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para a solução de enrofloxacino comprimido em concentrações de 20 a 400  $\mu\text{g/mL}$ .



#### 6.1.6.3. Linearidade

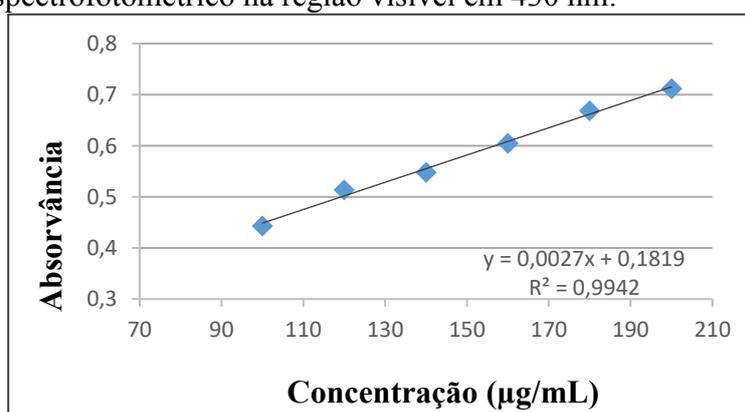
Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de enrofloxacino SQR, para a construção da curva analítica, são mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores de absorvância de enrofloxacino SQR, determinados pelo método espectrofotométrico na região visível em 430 nm para a obtenção da curva analítica

Concentração (µg/mL)	Absorvância	ABS média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
100	0,446	0,443	0,004	0,828
	0,445			
	0,439			
120	0,540	0,514	0,023	4,432
	0,502			
	0,499			
140	0,548	0,548	0,004	0,762
	0,553			
	0,544			
160	0,594	0,605	0,025	4,171
	0,587			
	0,634			
180	0,668	0,669	0,017	2,473
	0,653			
	0,686			
200	0,693	0,712	0,017	2,441
	0,717			
	0,726			

A representação gráfica da curva analítica e coeficiente de regressão do enrofloxacino SQR em concentração de 100 a 200 µg/mL foram construídos com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante a avaliação da linearidade do método, demonstrados na Figura 12.

**Figura 12.** Curva analítica de enrofloxacino SQR em concentração de 100 a 200 µg/mL, pelo método espectrofotométrico na região visível em 430 nm.



A equação da reta, determinada pelo método mínimos quadrados, é:  $y = 0,0027x + 0,1819$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9942$  e coeficiente de correlação  $r = 0,9971$ .

A ANOVA calculada para os valores da curva analítica de enrofloxacino está apresentada na Tabela 10.

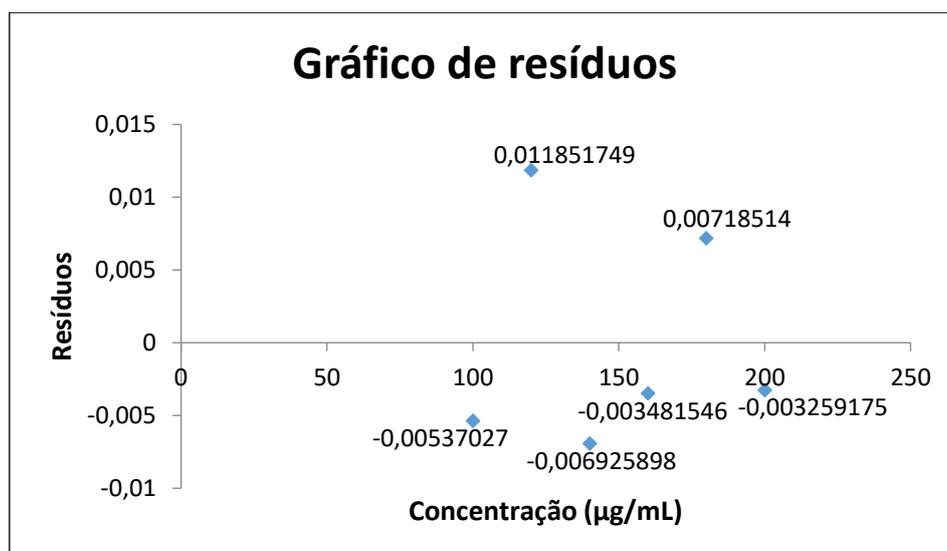
**Tabela 10.** Análise de variância de valores de absorvância determinados da curva analítica de enrofloxacino SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região visível

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F calculado*	F tabelado
Regressão linear	1	0,04978	0,04978	682,74596	0,00001
Resíduo	4	0,00029	0,00007	-	-
Total	5	0,05007	-	-	-

\*Significativo para  $p < 0,05$  %

O gráfico de resíduos referente à regressão linear está representado pela Figura 13.

**Figura 13.** Gráfico de resíduos



Os resultados dos resíduos apresentados no gráfico estão ilustrados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados dos resíduos

<b>Observação</b>	<b>Abs prevista</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	0,71525917	-0,00325917	-0,426744578
2	0,66192586	0,00718514	0,940796299
3	0,60859255	-0,00348155	-0,455861092
4	0,55525923	-0,00692590	-0,906852182
5	0,50192592	0,01185175	1,551825335
6	0,44859260	-0,00537027	-0,703163782

#### 6.1.6.4. Precisão

Os resultados da precisão foram expressos com base nos valores de DPR das absorvâncias obtidas frente às alterações experimentais. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros analisados estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Determinação da precisão do método analítico para análise de enrofloxacino por espectrofotometria na região visível

<b>Repetibilidade</b>		<b>Precisão Intermediária</b>				
<b>Média de 12 Absorvâncias</b>	<b>DPR%</b>	<b>Interdias</b>		<b>Entre-analistas</b>		
		<b>Abs*</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Abs*</b>	<b>DPR (%)</b>	
0,651	0,75	Dia 1	0,656	0,44	Analista 1	0,650
		Dia 2	0,651		Analista 2	0,656

\*Os valores de absorvância apresentados são referentes à média de 6 leituras

DPR: desvio padrão relativo

#### 6.1.6.5. Exatidão

Os resultados do ensaio de recuperação estão descritos na Tabela 13.

**Tabela 13.** Determinação da exatidão do método analítico para análise de enrofloxacino comprimidos por espectrofotometria na região visível

	<b>Enrofloxacino</b>	<b>Enrofloxacino</b>			
	<b>SQR</b>	<b>SQR</b>	<b>Recuperação</b>	<b>DPR**</b>	<b>Recuperação</b>
	<b>adicionado</b>	<b>encontrado*</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>média (%)</b>
	<b>(µg/mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>			
R1	28,00	28,17	100,59	0,25	
R2	60,00	59,71	99,52	2,34	98,51
R3	92,00	87,78	95,41	4,91	

\*Média de três determinações

\*\* Desvio Padrão Relativo dentro de cada nível de recuperação

#### 6.1.6.6. Robustez

A Tabela 14 ilustra as médias de 16 leituras de absorvâncias obtidas em cada ensaio.

**Tabela 14.** Medidas de absorvância obtidas na avaliação da robustez do método espectrofotométrico de quantificação de enrofloxacino

<b>Ensaio</b>	<b>Absorvância*</b>
1	0,582
2	0,575
3	0,584
4	0,577
5	0,615
6	0,605
7	0,620
8	0,605

\*Média dos valores de 16 absorvâncias

A avaliação da robustez foi realizada a partir de análise de variância entre as absorvâncias referentes aos parâmetros microplaca, tempo de análise e comprimento de onda. A ANOVA calculada está apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15.** Análise de variância de valores de absorvância obtidos na determinação de robustez do método espectrofotométrico de quantificação de enrofloxacino

<b>Fonte de variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>
<b>F1</b>	1	0,00597	0,00597	53,7316*	5,3177
<b>F2</b>	1	0,00025	0,00025	2,2335	-
<b>F3</b>	1	0,00002	0,00002	0,1626	-
<b>F1 X F2</b>	1	0,00015	0,00015	1,3512	-
<b>F1 X F3</b>	1	0,00015	0,00015	1,3512	-
<b>F2 X F3</b>	1	0,00016	0,00016	1,4637	-
<b>F1 X F2 X F3</b>	1	0,00011	0,00011	0,9460	-
<b>Tratamento</b>	7	0,00680	0,00097	8,7485	-
<b>Resíduos</b>	8	0,00089	0,00011	-	-
<b>Total</b>	15	0,00769	-	-	-

F1: Marca da microplaca  
 F2: Comprimento de onda  
 F3: Tempo de análise

\*Significativo para  $p < 0,05$  %

#### 6.1.6.7. Limites de Detecção e Quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados para LD e LQ foram 5,31  $\mu\text{g/mL}$  e 16,09  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### 6.1.6.8. Teor

O teor dos comprimidos de enrofloxacino foi calculado a partir de um ensaio de espectrofotometria utilizando soluções de comprimido de 140  $\mu\text{g/mL}$ . O ensaio foi feito em duplicata, cujos resultados estão explícitos na Tabela 16.

**Tabela 16.** Cálculos de teor dos comprimidos de enrofloxacino

	Teor (%)	Teor Médio (%)	DPR (%)
Ensaio 1	103,01	105,31	2,9
Ensaio 2	107,32		

DPR: desvio padrão relativo

### 6.1.7. Discussão

A espectrofotometria UV-Vis é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para determinação e quantificação de substâncias. Baseada na Lei de Lambert-Beer, pode ser empregada para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, na região do ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

O enrofloxacino SQR apresenta-se como pó cristalino de coloração amarelo-claro (USP, 2016). Estudos demonstraram que íons metálicos polivalentes, como o  $\text{Fe}^{3+}$ , possuem fortes interações com fluorquinolonas (URBANIÁK et al., 2007). Ciprofloxacino demonstrou complexação com cloreto férrico, formando solução de coloração laranja e apresentando grande absorvância em 450 nm (KARA et al., 1991), além de complexar com nitrato de ferro, formando solução de coloração amarelo-alaranjada, de grande absorvância em 435 nm (FRATINI; SCHAPOVAL, 1995). Por esta razão, foi investigada a possibilidade da utilização da complexação de cloreto férrico com enrofloxacino para a quantificação do fármaco.

Foram realizados testes de espectrofotometria na região visível de soluções de enrofloxacino comprimido complexado com cloreto férrico, cujas varreduras mostraram maiores absorvâncias em 430 nm.

As variações de peso dos comprimidos de enrofloxacino encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010). Nenhum dos valores extrapolou os limites máximo e mínimo (66,89 mg e 54,73 mg, respectivamente) e a variação foi menor do que 10 % (Tabela 4), em conformidade com a especificação da Farmacopeia Brasileira (2010) para comprimidos de até 80 mg.

Na determinação da seletividade do método, concluiu-se que o cloreto férrico não interfere na leitura espectrofotométrica do enrofloxacino, por não apresentar picos de absorvância na região de 430 nm. Analisando as Figuras 8, 9 e 10, é possível afirmar que a complexação do enrofloxacino com o cloreto férrico faz aumentar sua absorvância em

430 nm, se comparar com a varredura demonstrada na Figura 6. É possível verificar que, conforme as concentrações das soluções de ENRO-Comp aumentam, os valores de absorvância obtidos em suas leituras espectrofotométricas também aumentam.

A linearidade indica a capacidade do método de relacionar proporcionalmente a concentração do analito na amostra com os resultados obtidos, dentro de um intervalo específico. Para comprovar a linearidade de um método, deve-se utilizar no mínimo 5 concentrações diferentes de SQR e realizá-lo, no mínimo, em triplicata (BRASIL, 2017). O método se apresentou linear no intervalo de 100 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , com equação da reta  $y = 0,0027x + 0,1819$  (Figura 12). O coeficiente de determinação ( $r$ ) obtido foi de 0,9942, o que mostra a adequada linearidade do método. A linearidade foi verificada através da ANOVA (Tabela 10), mostrando valor de F calculado muito maior do que o F tabelado. Ou seja, a variância da regressão é estatisticamente diferente da variância dos resíduos, comprovando que é possível prever o valor de absorvância a partir da concentração de enrofloxacino. Pelo gráfico de resíduos (Figura 13) é possível verificar que os valores de resíduo tendem a zero no intervalo da linearidade.

Na determinação da precisão do método, foram obtidos valores de DPR de 0,75% para intradia, 0,44% para interdia e 0,56% para interanalista (Tabela 12), ou seja, todos os valores de DPR são muito baixos e comprovam a precisão do método.

No teste de exatidão, a recuperação média foi de 98,51 % (Tabela 13), dentro da faixa de 98 – 102 %, especificada por HORWITZ (1982). Frente a estes resultados, o método pode ser considerado exato.

O valor calculado para os limites de detecção e quantificação foi de 5,31  $\mu\text{g/mL}$  e 16,09  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, mostrando a sensibilidade do método para identificar e quantificar enrofloxacino na amostra. Estes valores são inferiores à faixa de linearidade estabelecida no desenvolvimento do método.

A robustez do método foi determinada a partir de três parâmetros (Tabelas 6 e 7), que foram avaliados separadamente e em conjunto. A influência dos parâmetros analisados foi avaliada por ANOVA (Tabela 15), onde foi possível concluir que apenas o fator marca da microplaca (F1) é significativo, por ser o único fator a apresentar valor de F maior que o F crítico. Todos os outros fatores mostraram-se não significativos, mesmo quando avaliados juntos. A partir destes dados é possível afirmar que a marca da microplaca interfere nos resultados de robustez do método e, desta forma, deve ser padronizada antes da condução das análises espectrofotométricas. HELD (2009)

desenvolveu um estudo que evidencia a diferença de resultados de absorvância entre tipos de microplacas diferentes. É possível que os resultados de absorvância discrepantes entre as análises das microplacas seja devido à maior espessura da microplaca B em relação à microplaca A.

O teor médio encontrado foi de 105,31%. A Farmacopeia Americana (USP, 2016) determina que o teor médio de enrofloxacino em matéria-prima seja de 98,5 a 101,5%. Não há outras especificações para teor do fármaco em comprimidos.

O método proposto está de acordo com os requisitos recomendados para validação de métodos analíticos, sendo possível ser utilizado para quantificação de enrofloxacino em comprimidos.

Estão disponíveis na literatura diversos procedimentos analíticos de quantificação de enrofloxacino, sendo em sua grande maioria cromatográficos. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de métodos inovadores, que utilizem pouco material e reagentes e que, consequentemente, produzam menos danos ao meio ambiente e ao analista. O método desenvolvido e validado neste trabalho foi miniaturizado e utilizou solventes não-tóxicos e materiais recicláveis e, portanto, condiz com as atuais exigências de preservação do meio ambiente, atendendo aos princípios da Química Verde. A miniaturização do método, realizado em microplacas, garante diminuição do uso dos compostos e consequentemente diminuição do descarte de resíduos ao meio ambiente. Além de utilizar pouca quantidade de reagentes, é um método rápido e de fácil execução.

## **7. CONCLUSÃO**

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um novo método analítico para análise quantitativa de enrofloxacino em comprimidos por espectrofotometria na região visível, podendo ser utilizado nas análises de rotina do controle de qualidade de enrofloxacino comprimidos palatáveis. Como reagente, foi utilizada solução de cloreto férrico 0,5 % em água. As soluções de comprimido utilizadas no método também foram feitas em água, solvente ecologicamente adequado ao meio ambiente, de baixo custo, de fácil obtenção e rápido. Medicamentos contendo enrofloxacino são amplamente utilizados na medicina veterinária e produzidos por diversas indústrias farmacêuticas, o que aumenta a necessidade do desenvolvimento de novos métodos analíticos e da otimização dos procedimentos analíticos atuais.

## 8. REFERÊNCIAS

ALÓS, J-I. Quinolonas. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 27, n. 5, p. 290-297, 2009.

ANASTAS, P.T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, 1999.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2007. Disponível em <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt)>.

APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. **American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation**, 1999.

BABAAHMADY, E.; KHOSRAVI, A. Toxicology of baytril (enrofloxacin). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 2042-2045, 2011.

BARRÓN, D.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; CANO, J.; BARBOSA, J. Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 759, p. 73-39, 2001.

BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an UV-derivate spectrophotometric method for determination of glimepiride in tablets. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 2, p. 292-299, 2011. ISSN 0103-5053.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Critérios para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, 2017.

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

CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin hydrochloride in ophthalmic solution. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 74-79, 2012.

CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of UV spectrophotometric method for orbifloxacin assay dissolution studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 50, n. 3, p. 457-465, 2014.

CAZEDEY, E.C.L.; BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. A first-derivative spectrophotometric method for the determination of ciprofloxacin hydrochloride in ophthalmic solution. **Physical Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 116-122, 2012.

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

CORRÊA, J.C.R.; SERRAM C.H.R.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of first derivate spectrophotometric method for quantification of darunavir in tablets. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 6, p. 722-730, 2014.

CHOI, J.; MAMUN, M.I.R.; EL-ATY, A.M.A; PARK, J.; SHIN, E.; PARK, J.Y.; CHO, S.; SHIN, S.C.; LEE, K.B.; SHIM, J. Development of a single-step precipitation cleanup method for the determination of enrofloxacin, ciprofloxacin, and danofloxacin in porcine plasma. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1878-1883, 2011.

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

EL-DIDAMONY, A.M.; ABOELSOAD, M.O. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determinations of veterinary drug enrofloxacin in pharmaceutical formulation. **Optics and Spectroscopy**, v. 117, n. 4, p. 670-678, 2014.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 373-377, 2001.

ENSAFI, A.A.; KHAYAMIAN, T.; TAEI, M. Determination of ultra trace amount of enrofloxacin by adsorptive cathodic stripping voltammetry using copper(II) as an intermediate. **Talanta**, v. 78, p. 942-948, 2009.

ENSAFI, A.A.; TAEI, M.; KHAYAMIAN, T.; HASANPOUR, F. Simultaneous voltammetric determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in urine and plasma using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode by least-squares support vector machines. **Analytical Sciences**, v. 26, p. 803-808, 2010.

EVAGGELOPOULOU, E.N.; SAMANIDOU, V.F. HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L.) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC. **Food Chemistry**, v. 136, p. 479-484, 2013.

FARIAS, L.A.; FÁVARO, D.I.T. Vinte anos de Química Verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, p. 1089-1093, 2011.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. I

FIORENTINO, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of UV-spectrophotometric method for determination of flucloxacillin sodium in capsules. *Current Pharmaceutical Analysis*, 8, n. 1, p. 101-106, 2012. ISSN 1875-676X.

FRATINI, L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometry using iron(III)nitrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.127, p. 279-282, 1996.

GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometric determination of lomefloxacin tablets. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, Buenos Aires, v. 24, n. 2, p. 406-408, 2005. ISSN 0326-2383.

GONZÁLEZ, C.; MORENO, L.; SMALL, J.; JONES, D.G.; BRUNI, S.F.S. A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of

enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. **Analytica Chimica Acta**, v. 560, p. 227-234, 2006.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mac Grawhill, 2006, p. 883-888.

*Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009).

Health Products Regulatory Authority, 2017. Disponível em <<http://www.hpra.ie>>

HELD, P. The importance of using the appropriate microplate for absorbance measurements in the UltraViolet region of the spectrum. **BioTek Instruments**, 2009. Disponível em <<http://www.biotek.com>>

HERNÁNDEZ, M.; AGUILAR, C.; BORRULL, F.; CALULL, M. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 772, p. 163-172, 2002.

HORSTKÖTTER, C.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J.; BLASCHKE, G. Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3078-3083, 2002.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67-76, 1982.

*International Conference on Harmonisation* (ICH), 2005.

IDOWU, O.R.; PEGGINS, J.O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 143-153, 2004.

JAKUBOWSKI, P.; JAROSZEWSKI, J.J.; GRABOWSKI, T.; MARKIEWICZ, W.; MASLANKA, T. Determination of enrofloxacin in chicken plasma by high performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 60, n. 5-6, p. 563-572, 2010.

KARA, M.; HASINOFF, B.B.; MCKAY, D.W.; CAMPBELL, N.R.C. Clinical and chemical interactions between iron preparations and ciprofloxacin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 257-261, 1991.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by ultraviolet spectrophotometric method. **World Research Journal of Pharmaceutical Research**, v.1, p. 21-24, 2013.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Analytical methods need optimization to get innovative and continuous processes for future pharmaceuticals. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, 5, n. 6, p. 240-244, 2016.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quantification of rifaximin in tablets by spectrophotometric method eco-friendly in ultraviolet region. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-9, 2016. ISSN 2090-908X (Online) DOI 10.1155/6168.

KOGAWA, A.C.; SALGADO H.R.N. Spectrophotometry in infra red region: a new, low cost and green way to analyze tablets of rifazimin. **Current Pharmaceutical Analysis**, 2017.

KREBBER, R.; HOFFEND, F.; RUTTMANN, F. Simple and rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in edible tissues by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC-MS/MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 208-213, 2009.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, p. 177-180, 2007.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C. "Green Chemistry" – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

LIZONDO, M.; PONS, M.; MONTSERRAT, G.; ESTELRICH, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 1845-1849, 1996.

LOPES, C.C.G.O.; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of bioassay, UV-spectrophotometry and high performance liquid chromatographic determination of gatifloxacin in tablets. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1831-1835, 2008. ISSN 0100-4042.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in tablets. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 136-7, 1999. ISSN 0305-7453.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in pharmaceutical formulations using bromothymol blue. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 3, p. 501-504, 2001.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometric determination of ceftazidime preparations using neocuproin as a complexing agent. **Analytical Letters**, v. 41, n. 12, p. 2143-2152, 2008.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Rapid and selective UV spectrophotometric method for the analysis of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, 92, n. 3, p. 820-823, 2009.

MOSTAFA, S.; EL-SADEK, M.; ALLA, E.A. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and pefloxacin through charge transfer complex formation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 133-142, 2002.

MOSTAFA, S.; EL-SADEK, M.; ALLA, E.A. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p. 173-180, 2002.

NAVALÓN, A.; BLANC, R.; REYES, L.; NAVAS, N.; VÍLCHEZ, J.L. Determination of the antibacterial enrofloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 454, p. 83-91, 2002.

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

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of cefazolin sodium in pharmaceutical dosage forms by UV-spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, 3, n. 1, p. 11-20, 2013.

PIÑERO, M.; GARRIDO-DELGADO, R.; BAUZA, R.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Easy sample treatment for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in raw bovine milk by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2978-2986, 2012.

PIÑERO, M.; FUENMAYOR, M.; ARCE, L.; BAUZA, R.; VALCÁRCEL, M. A simple sample treatment for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in raw goat milk. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 533-637, 2013.

PRADO, A.G.S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

RAJENDRAPRASAD, N.; BASAVIAIAH, K. Development and validation of new spectrophotometric methods to determine enrofloxacin in pharmaceuticals. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 82, n.3, p. 513-519, 2015.

REBOUÇAS, C.T. Camila Tavares. Validação de métodos analíticos para quantificação de enrofloxacino em comprimidos palatáveis, 2014.

REZAEI, B.; MOKHTARI, A. Flow-injection chemiluminescence determination of enrofloxacin using the  $\text{Ru(phen)}_3^{2+}$ -Ce(IV) system and central composite design for the optimization of chemical variables. **Luminescence**, v. 23, p. 357-364, 2008.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SALEM, H. Spectrofluorimetric, atomic absorption spectrometric and spectrophotometric determination of some fluoroquinolones. **American Journal of Applied Sciences**, v. 2, p. 719-729, 2005.

SALGADO, H.R.N.; OLIVEIRA, C.L.C.G. Development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of gatifloxacin in tablets. **Die Pharmazie**, v.60, n. 4, p. 263-264, 2005.

SHTYKOV, S.N.; SMIRNOVA, T.D.; BYLINKIN, Y.G.; KALASHNIKOVA, N.V.; ZHEMERICHKIN, D.A. Determination of Ciprofloxacin and Enrofloxacin by the Sensitized Fluorescence of Europium in the Presence of the Second Ligand and Micelles of Anionic Surfactants. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 136-140, 2007.

SILVA, L.M.; ALMEIDA, A.E.; SALGADO, H.R.N. Thermal analysis and validation of a UV and visible spectrophotometric methods for the determination of ne antibiotic tigecycline in pharmaceutical product. **Advances in Analytical Chemistry**, 2, n. 1, p. 10-15, 2012.

SPAGNOL, C.M.; OLIVEIRA, T.S.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Validation of caffeic acid in emulsion by UV-spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 16-22, 2015.

SOUZA, M.J.; BITTENCOURT, C.F.; MORSCH, L.M. LC determination of enrofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p. 1195-1199, 2002.

SUNDERLAND, J.; LOVERING, A.M.; TOBIN, C.M.; MACGOWAN, A.P.; ROE, J.M.; DELSOL, A.A. A reverse-phase HPLC assay for simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig faeces. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 390-393, 2003.

TERRADO-CAMPOS, D.; TAYEB-CHERIF, K.; PERIS-VICENTE, J.; CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J. Determination of oxolinic acid, danofloxacin, ciprofloxacin, and enrofloxacin in porcine and bovine meat by micellar liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1277-1284, 2017.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. A green approach for the determination of daptomicyn in pharmaceutical formulation by UV spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 811-821, 2015.

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

URBANIAK, B.; MRESTANI, Y.; KOKOT, Z.J.; NEUBERT, R.H.H. Investigation of interaction of fluoroquinolones with aluminum, iron and magnesium ions using capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, v. 65, p. 489-492, 2007.

U.S. Pharmacopeia National Formulary, 39. ed., Rockville, 2016, v. 2.

VIEIRA, D.C.M.; SALGADO, H.R.N. Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical products. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 508-511, 2011.

WANG, L.; WU, X.; XIE, Z. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end-column amperometric detection. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1143-1148, 2005.

WATANABE, H.; SATAKE, A.; KIDO, Y.; TSUJI, A. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. **Analyst**, v. 127, p. 98-103, 2002.

YAN, H.; TIAN, M.; ROW, K.H. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk using molecularly imprinted solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3015-3020, 2008.

ZENG, Z.; DONG, A.; YANG, G.; CHEN, Z.; HUANG, X. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 821, p. 202-209, 2005.