UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Métodos espectrofotométrico, RP-UPLC e microbiológico
para determinação de linezolida em formas farmacêuticas

Alessandro Morais Saviano

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Métodos espectrofotométrico, RP-UPLC e microbiológico
para determinação de linezolid em formas farmacêuticas

Alessandro Morais Saviano

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Saviano, Alessandro Moraes
S267m Métodos espectrofotométrico, RP-UPLC e microbiológico para
determinação de linezolida em formas farmacêuticas / Alessandro
Moraes Saviano. -- São Paulo, 2015.
154p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Lourenço, Felipe Rebello

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Antibióticos 3. Cromatografia
líquida de alta eficiência 4. Espectrofotometria 5. Planejamento de
experimentos ótimos I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello, orientador.

615.19015 CDD

Alessandro Morais Saviano

Métodos espectrofotométrico, RP-UPLC e microbiológico
para determinação de linezolida em formas farmacêuticas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

Agradeço a Deus a proteção e a orientação que iluminou o meu caminho,
dando-me a oportunidade para conseguir chegar
a este aprendizado através do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Nelson (em memória) e a minha mãe Núbia por todo o exemplo de amor, compreensão, confiança, paciência e humildade que através dos vossos ensinamentos e exemplos me fizeram crescer como pessoa e que possibilitaram mais esta conquista na minha vida.

Ao meu irmão Nelson e a minha cunhada Maria Cristina pela força e companheirismo que representaram para eu conseguir realizar mais este objetivo.

Ao grande amigo e professor Felipe Rebello Lourenço por primeiramente ter acreditado em mim e me ter dado a oportunidade de receber a sua orientação, auxiliando-me sempre com os seus conhecimentos de forma paciente e humilde para a realização deste trabalho.

A professora Irene Satiko Kikuchi e ao professor Maurício Yonamine por vossos conselhos sábios, que me fizeram refletir na minha vida pessoal e profissional nesta nova carreira que inicio os meus futuros passos.

A professora Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, a professora Telma Mary Kaneko e a professora Regina Lúcia de Moraes Moreau pelo exemplo na área do ensino farmacêutico, fazendo crescer e acreditar cada vez mais no futuro da nossa profissão.

Ao amigo José Sobrinho, pela amizade, conselhos e ajuda nos ensaios realizados neste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Fabiane, Rafael, Wesley, Pedro, Fabiana, Marcos, Agnieszka, Carmem, Jéssica e Dora pela amizade e apoio.

Aos amigos do Confar, Daniela, Rogério, Cleide, Diana, Marcus e Gisele, que sempre se mostraram prestativos no auxílio dos ensaios que precisei realizar.

Aos professores, funcionários e amigos que de alguma forma acreditaram e contribuíram para que esta obra fosse realizada. Muito Obrigado!!!

RESUMO

SAVIANO, A. M. **Métodos espectrofotométrico, RP-UPLC e microbiológico para determinação de linezolida em formas farmacêuticas.** 2015. 154f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A linezolida é um antibiótico oxazolidinona efetivo contra bactérias patogênicas gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a glicopeptídeos (GISA) e enterococci resistente a vancomicina (VRE). As oxazolidinonas inibem a translação bacteriana na fase de iniciação da síntese de proteínas, enquanto que a síntese de RNA e DNA não são afetadas. Diversos métodos por cromatografia líquida de alta-eficiência (HPLC) têm sido relatados para a determinação da concentração de linezolida em plasma humano, soro e urina. Entretanto, um número pequeno de métodos estão disponíveis para a determinação de linezolida em formulações farmacêuticas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos espectrofotométrico, de cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UPLC), doseamento microbiológico em placas e doseamento microbiológico rápido em microplacas com leitura cinética para a determinação de linezolida em soluções injetáveis e comprimidos. Adicionalmente, foram identificadas e quantificadas as principais fontes de incerteza relacionadas aos métodos. O desenvolvimento dos métodos utilizou uma abordagem racional, empregando-se planejamento de experimentos (análise fatorial e metodologia de superfície resposta) para otimização das condições analíticas. As fontes de incertezas foram identificadas empregando-se diagrama de Ishikawa e quantificadas conforme procedimento da Eurachem/Citac. Os métodos desenvolvidos apresentaram especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequadas, conforme os critérios estabelecidos pelo ICH e ANVISA. A análise estatística demonstrou equivalência entre os resultados providos por cada um dos métodos, sendo intercambiáveis entre si. Portanto, os métodos podem ser empregados no controle de qualidade de rotina na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Linezolida, cromatografia líquida de alta-eficiência, espectrofotometria, doseamento microbiológico, planejamento de experimentos, incerteza de medição.

ABSTRACT

SAVIANO, A. M. **Spectrophotometric, RP-UPLC and microbiological methods for determination of linezolid in pharmaceutical preparations.** 2015. 154f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Linezolid is an oxazolidinone antibiotic effective against gram-positive pathogenic bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). Oxazolidinones inhibit bacterial translation at the initiation phase of protein synthesis, while RNA and DNA synthesis are not affected. Several high performance liquid chromatographic (HPLC) methods have been reported to determine the concentration of linezolid in human plasma, serum and urine. However, a few number of methods are available to determine the concentration of linezolid in pharmaceutical dosage forms. The aim of the present work was to develop and validate a spectrophotometric method, a reverse-phase ultra-high performance liquid chromatographic method, microbiological assay and microbiological rapid assay in microplates using kinetic reading for the determination of linezolid in injections and tablets dosage forms. In addition, the most important sources of uncertainty were identified and quantified for each method. A rational approach was used in the development of these methods, using design of experiments (factorial design and response surface methodology) for optimization of analytical conditions. The sources of uncertainties were identified using Ishikawa diagram and quantified as described in Eurachem/Citac procedure. The developed methods were specific/selective, linear, precise, accurate and robust, as required by ICH and ANVISA guidelines. Statistical analysis showed equivalence among the results provided by each method, being interchangeable. Thus, the methods may be employed in routine quality control analysis by pharmaceutical industry.

Keywords: Linezolid, high performance liquid chromatography, spectrophotometry, microbiological assay, design of experiments, measurement uncertainty.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xv

INTRODUÇÃO	3
REVISÃO DA LITERATURA	5
1. Métodos de análise	9
OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	10
Caracterização da substância química de trabalho	13
1. Espectrometria no infravermelho	13
2. Ressonância magnética nuclear	15
3. Calorimetria exploratória diferencial	19
4. Conclusões	21

PARTE I – Desenvolvimento racional de método microbiológico por difusão em ágar para determinação de linezolid em preparações farmacêuticas

Resumo	25
1. Introdução	26
2. Materiais e métodos	27
2.1 Equipamentos	27
2.2 Reagentes	28
2.3 Desenvolvimento e otimização	28
2.4 Validação do método	30
2.5 Doseamento microbiológico	31
3. Resultados e discussão	32
3.1 Desenvolvimento e otimização	32
3.2 Validação	37
4. Conclusões	40

PARTE II–Desenvolvimento, validação e avaliação da incerteza na determinação da linezolid por espectrofotometria no UV

Resumo	45
1. Introdução	46
2. Materiais e métodos	47

2.1 Equipamentos	47
2.2 Reagentes	48
3. Desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico	48
3.1 Desenvolvimento e otimização do método	48
3.2 Validação do método	49
3.3 Método espectrofotométrico para determinação da linezolida	52
4. Incerteza de medição do método espectrofotométrico	53
4.1 Método espectrofotométrico	53
4.2 Identificando as fontes de incertezas	53
4.3 Quantificando os componentes de incertezas	54
4.4 Incertezas combinada e expandida	59
5. Conclusões	61

PARTE III–Desenvolvimento, validação e avaliação da incerteza na determinação de linezolida por RP-UPLC

Resumo	65
1. Introdução	66
2. Materiais e métodos	67
2.1 Equipamentos	67
2.2 Reagentes	68
3. Desenvolvimento e validação do método de RP-UPLC	68
3.1 Teste de caracterização	68
3.2 Desenvolvimento do método cromatográfico	68
3.3 Método RP-UPLC para determinação da linezolida	69
3.4 Validação do método	71
3.5 Estudo de degradação forçada	71
3.6 Identificando as fontes de incertezas	73
4. Resultados e discussão	74
4.1 Desenvolvimento e validação do método	74
4.2 Degradação Térmico-alcálica	80
4.3 Degradação Térmico-ácida	82
4.4 Quantificando os componentes de incerteza	84
5. Conclusões	90

PARTE IV–Desenvolvimento, otimização e validação de ensaio em microplaca para determinação da potência de linezolida e sua incerteza de medição.

Resumo	95
1. Introdução	96
2. Materiais e métodos	99
2.1 Equipamentos	99
2.2 Reagentes	100
2.3 Desenvolvimento e otimização método	101
2.4 Variação dos componentes do meio	102
2.5 Variação do inóculo e da concentração do TTC	104
2.6 Validação do método	108
2.7 Doseamento microbiológico rápido em microplaca	109
2.8 Medição da incerteza	112
3. Resultados e discussão	113
3.1 Desenvolvimento e otimização	113
3.2 Validação	120
3.3 Medição da Incerteza	123
4. Conclusões	124

PARTE V – Análise das amostras de preparações farmacêuticas contendo linezolida e comparação dos métodos

Análise das amostras de preparações farmacêuticas	129
1. Métodos gerais aplicados as formas farmacêuticas	129
2. Espectrofotométrico em UV	132
3. Cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UHPLC)	133
4. Doseamento microbiológico de difusão em ágar	134
5. Doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética	136
6. Análise comparativa entre os métodos	138
7. Conclusões	142

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 145

ANEXOS 155

Informações para os Membros das Bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado

Currículo Lattes

Ficha do Aluno

Lista de Figuras

- Figura 1.** Relação estrutura-atividade dos grupos farmacofóricos presentes na molécula da linezolida. _____ 5
- Figura 2.** Esquema da inibição da translação bacteriana na fase de iniciação da síntese de proteínas bacterianas pelas oxazolidinonas (Adaptado de KAISER et al., 2007). ____ 6
- Figura 3.** Principais metabólitos gerados pela vias de oxidação enzimática e não enzimática da linezolida (Adaptado de KAISER et al., 2007). _____ 7
- Figura 4.** Esquema da síntese da molécula de linezolida (Adaptado de KAISER et al., 2007). _____ 8
- Figura 5.** Espectro de infravermelho da linezolida em pastilha de KBr. _____ 14
- Figura 6.** Espectro de RMN de ^1H da linezolida em DMSO- d_6 em 300 MHz. _____ 17
- Figura 7.** Espectro de RMN de ^{13}C da linezolida em DMSO d_6 em 75 MHz. _____ 18
- Figura 8.** Curva DSC da linezolida obtida em atmosfera de N_2 de 50 mL/minuto e aquecimento de $2^\circ\text{C}/\text{minuto}$ de 140 a 190°C . _____ 21
- Figura 9.** Planejamento fatorial para a determinação do micro-organismo, concentração do seu inóculo, meio de cultura e volume da camada inoculada, para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 29
- Figura 10.** Planejamento de superfície resposta para a determinação da concentração do inóculo e volume da camada inoculada na otimização do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 30
- Figura 11.** Esquema de distribuição das soluções padrão e amostras simuladas de linezolida ($X = \text{A, B ou C}$) em delineamento 3×3 , sobre a camada superficial inoculada no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 32
- Figura 12.** Influência dos principais parâmetros que mais influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 33
- Figura 13.** Principais parâmetros e como influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 34

Figura 14. Interação entre os principais parâmetros e como influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.	34
Figura 15. Gráfico que relaciona o diâmetro do halo de inibição de crescimento com a concentração das soluções-testes e o volume da camada superficial inoculada nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.	36
Figura 16. Gráfico que relaciona o diâmetro do halo de inibição de crescimento com a concentração das soluções-testes e a concentração do inóculo nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.	36
Figura 17. Curvas resposta do padrão e da amostra simulada que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento, no doseamento microbiológico por difusão em ágar.	39
Figura 18. Espectro de varredura da amostra de linezolida em água ultrapurificada no intervalo de comprimento de onda de 200 a 400nm.	49
Figura 19. Curva resposta do padrão que relaciona diferentes concentrações de linezolida com as absorbâncias obtidas em 254 nm.	50
Figura 20. Diagrama de causa e efeito para determinação de linezolida por espectrofotometria em UV.	54
Figura 21. Contribuição da incerteza para determinação de linezolida por espectrofotometria em UV.	59
Figura 22. Distribuição de frequência do simulador Monte Carlo para determinação de linezolida pelo método de espectrofotometria em UV.	60
Figura 23. Estrutura química da linezolida.	70
Figura 24. Diagrama de causa e efeito para determinação de linezolida pelo método de RP-UPLC.	73
Figura 25. Mostrando o padrão de linezolida e seu respectivo produto de degradação na fase móvel de composição água, acetonitrila e TFA (90:10:1).	74

Figura 26. Mostra a interação entre a variação composição da fase móvel acetonitrila/água e a proporção de TFA utilizada, em relação ao tempo de retenção da linezolida na técnica de RP-UPLC. _____75

Figura 27. Mostra a interação entre a variação composição da fase móvel acetonitrila/água e a proporção de TFA utilizada, em relação ao número de pratos teóricos dos produtos de degradação da linezolida na técnica de RP-UPLC. _____76

Figura 28. Cromatogramas das amostras submetidas às condições de estresse: placebo (A), amostra controle (B), ácida (C), alcalina (D), térmica (E), oxidação (F) e fotolítica (G). _____77

Figura 29. Curva de calibração padrão (Área x Concentração em $\mu\text{g/mL}$ de linezolida) do método de RP-UPLC para a determinação de linezolida. _____78

Figura 30. Amostra de linezolida, submetida a diferentes condições do ensaio conjugado de degradação térmico-alcalino. _____81

Figura 31. Amostra de linezolida, submetida a diferentes condições do ensaio conjugado de degradação térmico-ácido. _____83

Figura 32. Contribuições da incerteza para determinação de linezolida por UPLC. ____87

Figura 33. Distribuição de frequência do simulador Monte Carlo para determinação de linezolida pelo método UPLC. _____88

Figura 34. Esquema da redução sofrida pelo cloreto de trifeniltetrazólio através das enzimas dehidrogenases presentes em células microbianas viáveis e a formação do formazan (Adaptado de Al-Araji et al., 2015). _____97

Figura 35. Esquema do quadrado latino adotado na distribuição dos diferentes meios de cultura no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética. _____103

Figura 36. Esquema do quadrado latino adotado na distribuição das soluções padrão e amostras simuladas de linezolida em delineamento 3 X 3, no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética. _____107

Figura 37. Esquema do quadrado latino adotado na distribuição das soluções padrão e amostras simuladas de linezolida em delineamento 3 X 3, no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética. _____111

Figura 38. Gráfico de Pareto para os efeitos do extrato de levedura, dextrose, peptona, extrato de carne e cloreto de sódio no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação. _____115

Figura 39. Principais efeitos do extrato do extrato de levedura, dextrose, peptona, extrato de carne e cloreto de sódio no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação. _____115

Figura 40. Diagrama de contorno do crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação usando meio de cultura contendo diferentes quantidades do extrato de levedura (até 1,5 g/L) e dextrose (de até 1,0 g/L), e quantidades fixas de peptona (5,0 g/L), extrato de carne (1,5 g/L) e cloreto de sódio (1,5 g/L). _____116

Figure 41. Diagrama de contorno para dose baixa de linezolida (1,0 µg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) usando meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para pH 7,0 ± 0,1 após 6 horas de incubação. _____118

Figure 42. Diagrama de contorno para dose média de linezolida (2,0 µg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) usando meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para pH 7,0 ± 0,1 após 6 horas de incubação. _____118

Figure 43. Diagrama de contorno para dose alta de linezolida (4,0 µg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) usando meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para pH 7,0 ± 0,1 após 6 horas de incubação. _____119

Figura 44. Planejamento espacial para o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca em relação a proporção do inóculo e a concentração do TTC. A região branca corresponde à proporção do inóculo e a concentração do TTC que possibilita um melhor resultado para a absorbância das amostras. A curva contínua corresponde ao menor valor da absorbância, enquanto que a curva tracejada corresponde ao maior valor da absorbância para cada amostra e parâmetro observado no diagrama. _____120

Figura 45. Curvas de dose resposta do padrão de referência e da amostra simulada de linezolida obtidas usando as condições experimentais otimizadas para o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca. _____121

Figura 46. Variação do peso dos comprimidos revestidos do Zyvox®._____130

Figura 47. Áreas obtidas do padrão de referência e das amostras de comprimidos e solução injetável no método RP-UPLC._____133

Lista de Tabelas

Tabela 1. Bandas de absorção da molécula de linezolida no espectro de infravermelho.	15
Tabela 2. Deslocamentos químicos dos ^1H da molécula de linezolida em DMSO- d_6 no espectro de RMN em 300 MHz.	17
Tabela 3. Deslocamentos químicos dos ^{13}C da molécula de linezolida em DMSO- d_6 no espectro de RMN em 150 MHz.	19
Tabela 4. Mostra o diâmetro dos halos medidos dos ensaios e os encontrados teoricamente utilizando a equação obtida pelo software Minitab® versão 17.	35
Tabela 5. Análise de variância dos dados obtidos nos ensaios do antibiótico linezolida no doseamento microbiológico por difusão em ágar, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%).	38
Tabela 6. Mostra os valores encontrados de potência do antibiótico linezolida no doseamento microbiológico por difusão e ágar.	40
Tabela 7. Mostra os valores encontrados de absorbância das amostras de linezolida nos ensaios efetuados pelo método espectrofotométrico UV.	51
Tabela 8. Componentes da incerteza na determinação de linezolida por espectrofotometria em UV.	55
Tabela 9. Valores intermediários, incertezas do padrão e suas incertezas do desvio relativo.	57
Tabela 10. Planilha de cálculo de incerteza.	58
Tabela 11. Diferentes composições da fase móvel do ensaio de UPLC.	69
Tabela 12. Determinação de linezolida em amostras submetidas nas condições de estresse (ácida, alcalina, oxidativa, térmica e fotolítica).	78
Tabela 13. Resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) no método de RP-UPLC para determinação da linezolida.	78
Tabela 14. Resultados da exatidão do método de RP-UPLC para determinação da linezolida.	79

Tabela 15. Resultados da estabilidade das soluções das amostras de linezolida após a estocagem por 24 horas em refrigerador (2 a 8 °C) ou em temperatura ambiente (20 a 25 °C).	79
Tabela 16. Resultados da robustez do método de RP-UPLC para determinação da linezolida.	80
Tabela 17. Resultados do conteúdo de linezolida em soluções injetáveis obtidas pelos métodos de RP-UPLC e espectrofotometria em UV.	80
Tabela 18. Ensaio de degradação conjugado térmico-alcálico do método RP-UPLC.	82
Tabela 19. Ensaio de degradação conjugado térmico-ácido do método RP-UPLC.	83
Tabela 20. Componentes da incerteza na determinação de linezolida por RP-UPLC.	84
Tabela 21. Valores intermediários, suas incertezas padrão e suas incertezas padrão relativas.	86
Tabela 22. Planilha de cálculo de incerteza.	89
Tabela 23. Planejamento fatorial adotado para estudar a influência da composição do meio de cultura no crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) após 6 horas de incubação.	104
Tabela 24. Esquema de composição central (CCD) adotado para otimizar as condições experimentais doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética usando <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) e Meio de cultura antibiótico nº 3, com pH = 7,0 ± 0,1 e 6 horas de incubação.	108
Tabela 25. Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC) da linezolida contra vários microrganismos usando o meio de cultura antibiótico nº 3.	114
Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) do esquema do quadrado latino para a variabilidade de resposta microbiológica do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%).	122
Tabela 27. Sumário dos resultados de validação do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca para determinar a potência relativa da linezolida usando <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) com inóculo de 10% no meio de cultura	

antibiótico nº 3 com pH 7.0 ± 0.1 , após 6 horas de incubação, adicionando a solução aquosa de TTC 0.5%._____123

Tabela 28. Absorbâncias e teor obtidos do padrão de referência e das amostras de comprimidos e solução injetável no método de espectrofotométrico de UV em 254 nm.

_____132

Tabela 29. Áreas dos picos cromatográficos e teor obtidos do padrão de referência e das amostras de comprimidos e solução injetável no método RP-UPLC._____134

Tabela 30. Médias dos halos e potência obtidas do padrão de referência e das amostras de comprimidos no método de doseamento microbiológico de difusão em ágar._____135

Tabela 31. Médias dos halos e potência obtidas do padrão de referência e das amostras de solução injetável no método de doseamento microbiológico de difusão em ágar._____136

Tabela 32. Médias das absorbâncias e potências obtidas do padrão de referência e das amostras de comprimidos no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética em 630 nm. _____137

Tabela 33. Médias das absorbâncias e potências obtidas do padrão de referência e das amostras da solução injetável no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética em 630 nm. _____138

Tabela 34. Dosagem encontrada nas formas farmacêuticas de linezolida pelos métodos físico-químicos de espectrofotometria em UV e cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UPLC) baseadas no teor médio encontrado nos ensaios._____139

Tabela 35. Dosagem encontrada nas formas farmacêuticas de linezolida pelos métodos microbiológicos de doseamento de difusão em ágar e doseamento rápido em microplaca com leitura cinética baseadas na potência média encontrada nos ensaios._____139

Tabela 36. Comparação entre todos os métodos físico-químicos e microbiológicos em função da razão das respostas médias considerando três réplicas e o p-valor._____140

Tabela 37. Principais parâmetros encontrados para a validação dos métodos para a determinação da linezolida em comprimidos e solução injetável._____141

INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

INTRODUÇÃO

O uso clínico dos antibióticos é um assunto de grande importância na atualidade, devido ao surgimento de micro-organismos com cepas cada vez mais resistentes, sendo necessário sempre o desenvolvimento de novos fármacos para o combate dessas infecções. Através dos testes realizados por um laboratório de controle de qualidade físico-químico e microbiológico são comprovados se esses produtos apresentam qualidade, segurança e eficácia necessária para o seu terapêutico.

A linezolida é uma nova classe de antibióticos sintéticos pertencente à classe das oxazolidinonas, que apresenta como grande trunfo o seu mecanismo de ação que age inibindo a translação bacteriana na fase de iniciação da síntese de proteínas, enquanto que as sínteses de RNA e DNA não são afetadas (SHINABARGER et al., 1997, CHAMBERS, 2006, KAISER et al., 2007).

A proposta deste trabalho foi desenvolver e validar os métodos microbiológico de difusão em ágar, espectrofotométrico em UV-visível, cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (RP-UPLC) e doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética para a determinação da linezolida em suas preparações farmacêuticas. Além disso, foi realizado um estudo complementar tanto no método espectrofotométrico em UV-visível como o de RP-UPLC para identificar as principais fontes de incertezas na determinação da linezolida, quantificando o desvio padrão de cada fonte de incerteza, e calculando as incertezas combinada e expandida para a quantificação do fármaco na forma injetável.

No método microbiológico utilizou-se planejamento fatorial e de superfície resposta (MSR) e foram determinados os seguintes parâmetros: a utilização do micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e seu inóculo a 1 %, medidos no intervalo de 20 a 25 % de transmitância em 580 nm, o meio de cultura escolhido foi o ágar caseína de soja em sistema de bicamada, sendo 20 mL de camada basal e 5 mL de camada superficial inoculada. Os resultados de MSR apresentaram coeficientes de regressão adequados (r^2 de 0,891 e 0,884 para o ajuste e previsão, respectivamente), permitindo previsão do tamanho dos halos em função dos parâmetros estudados. O método desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação da potência de linezolida em preparações farmacêuticas.

No método espectrofotométrico UV-visível, empregou-se água ultrapurificada como solvente e as absorbâncias determinadas em 254 nm, região de pico máximo de absorção da linezolida. Foi determinado o limite de detecção em 0,4 µg/mL e o limite de quantificação em 1,3 µg/mL e o método demonstrou-se simples, rápido e reprodutivo nos

ensaios de rotina para a quantificação da linezolida no controle de qualidade de medicamentos.

No método RP-UPLC, utilizou-se coluna cromatográfica C18 com 50 mm de comprimento e diâmetro de partícula interna de 1,9 μm , fase móvel composta de água, acetonitrila e TFA (na respectiva proporção 90:10:1), e as seguintes condições cromatográficas: fluxo: 0,5 mL/minuto, volume de injeção: 10 μL , comprimento de onda: 254 nm. Estas condições permitiram separação rápida e eficiente da linezolida e de seus produtos de degradação, em tempos de retenção bastante curtos. Nas condições de estresse a linezolida foi degradada após a exposição à luz, ao meio alcalino e a oxidação.

O método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foi desenvolvido e validado, através da utilização de um planejamento fatorial e de um planejamento de compósito central, e de acordo com a otimização dos resultados, a abrangência do *design space* foi estabelecida para as doses baixa (1,0 $\mu\text{g/mL}$), média (2,0 $\mu\text{g/mL}$) e alta (4,0 $\mu\text{g/mL}$) de linezolida com a utilização do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em um inóculo a 10 %, medidos com uma transmitância de 35 ± 2 % em 580 nm, em meio de cultura antibiótico nº 3 com pH = $7,0 \pm 0,1$, incubação da microplaca por 6 horas com agitação de 500 rpm e temperatura de $37,0 \pm 1$ °C, adição de 50 μL da solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % e leitura da sua absorbância em 630 nm. O método desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação da potência de linezolida em preparações farmacêuticas, mostrou-se rápido e econômico, pois analisa de uma única vez um grande número de amostras com um baixo consumo do meio de cultura.

REVISÃO DA LITERATURA

Em 1996 o laboratório farmacêutico Pharmacia & Upjohn (atualmente Pfizer) sintetizou a linezolida, como um antibiótico inovador pertencente à classe das oxazolidinonas, que são compostos heterocíclicos com cinco membros, constituídos de um átomo de nitrogênio, um átomo de oxigênio e um grupo carbonila em sua estrutura principal (KAISER et al., 2007). A Agência sanitária americana (FDA) no ano de 2000 aprovou o uso e sua comercialização da linezolida ((s)-N-[[3-(3-fluor-4-(4-morfolinil)fenil]-2-oxo-5-oxazolidinil]metil] acetamida) na terapêutica para o combate das infecções causadas por bactérias patogênicas gram positivas resistentes a outros tipos de antibióticos, como contra o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a glicopeptídeos (GISA), enterococci resistente a vancomicina (VRE) e pneumococci resistente a penicilina. (RYBAK et al., 2000; WILSON et al., 2003, WUNDERINK et al., 2003, BOZDOGAN et al., 2004, KAISER et al., 2007). Além do amplo espectro de atividade contra as bactérias gram positivas, a linezolida também apresenta uma atividade limitada contra as bactérias gram negativas (BOZDOGAN et al., 2004). A relação estrutura-atividade dos grupos farmacofóricos presentes na molécula da linezolida são apresentados na **Figura 1** (KAISER et al., 2007).

Figura 1. Relação estrutura-atividade dos grupos farmacofóricos presentes na molécula da linezolida (Adaptado de KAISER et al., 2007).

As oxazolidinonas têm um mecanismo de ação diferente dos outros antibióticos que combatem nas fases mais avançadas do ciclo bacteriano, pois as oxazolidinonas

inibem a translação bacteriana na fase de iniciação da síntese de proteínas bacterianas, enquanto que a síntese de RNA e DNA não são afetadas (SHINABARGER et al., 1997, CHAMBERS, 2006, KAISER et al., 2007). Esquema da ação oxazolidinonas nas células bacterianas é mostrado na **Figura 2**. (KAISER et al., 2007).

As oxazolidinonas inibem a síntese de proteínas através de sua ligação ao local P da subunidade 50S do ribossomo, distorcendo assim, o local de ligação do tRNA^{fMet} e o sítio de interface com a sub-unidade 30S, impedindo com isso a formação do complexo de iniciação 70S, que é responsável pela síntese de proteínas no ciclo bacteriano. (SHINABARGER et al., 1997, CHAMBERS, 2006, KAISER et al., 2007).

Enquanto que outros antibióticos agem na inibição da fase final da tradução bacteriana, as oxazolidinonas agem nas fases iniciais da síntese de proteínas, temos, portanto a menor probabilidade das bactérias desenvolverem a resistência cruzada, que é a resistência a diferentes classes de antibióticos (KAISER et al., 2007).

Figura 2. Esquema da inibição da translação bacteriana na fase de iniciação da síntese de proteínas bacterianas pelas oxazolidinonas (Adaptado de KAISER et al., 2007).

A linezolida é comercializada no Brasil pela Pfizer Farmacêutica com o marca comercial de Zyvox® apresentando-se em duas formas farmacêuticas, que é a de comprimidos revestidos e a solução injetável para infusão.

A linezolida é bem absorvida após a administração oral no qual após cerca de 2 horas de sua ingestão as concentrações plasmáticas máximas são atingidas com uma

biodisponibilidade que se aproxima a 100 %. Por este motivo, as doses para preparações orais e intravenosas são iguais a 600 mg/dose. A linezolida é metabolizada pela via de oxidação não enzimática produzindo a hidroxietil glicina (metabólito mais abundante) e pela via de oxidação enzimática produzindo o ácido aminoacetoxiacético. (CHAMBERS, 2006, KAISER et al., 2007). A linezolida é excretada na urina, na forma do metabólito hidroxietil glicina (aproximadamente 40 %), como linezolida inalterada (cerca de 30 a 35 %) e na forma do metabólito do ácido aminoacetoxiacético (cerca de 10 %) conforme mostrado na **Figura 3** (KAISER et al., 2007).

Figura 3. Principais metabólitos gerados pela vias de oxidação enzimática e não enzimática da linezolida (Adaptado de KAISER et al., 2007).

Um grande obstáculo para o uso da linezolida no tratamento das infecções mais resistentes nos hospitais públicos está no alto custo para a aquisição do medicamento, que é grande parte devido ao custo da síntese deste princípio ativo em escala industrial, pois o mesmo é realizado em 9 etapas, com o uso de reagentes muito caros como o butirato de glicidila, butil lítio, cloreto de mesila e paládio, além das condições especiais das reações de hidrogenação e litiação, conforme mostrado na **Figura 4** (KAISER et al., 2007).

Figura 4. Esquema da síntese da molécula de linezolida (Adaptado de KAISER et al., 2007).

A linezolida é indicada para o tratamento de infecções complicadas na pele e a pneumonia nosocomial ambas causadas pelo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), a bacteremia associada à enterococci resistente a vancomicina (VRE) ou associada pneumonia adquirida causada por *Staphylococcus pneumoniae* resistente a penicilina, também a linezolida é indicada no tratamento de infecções nos ossos e artrite séptica no quadril (HOWDEN et al., 2004, BOZDOGAN et al., 2004).

Em estudos comparativos randomizados, as taxas de cura com linezolida foram semelhantes (em alguns casos superiores) às obtidas com vancomicina no tratamento da pneumonia hospitalar causada por *Staphylococcus aureus* tanto resistente quanto sensível a meticilina (RUBINSTEIN et al., 2001, WUNDERINK et al., 2003).

A linezolida tem apresentado resultados promissores tanto in vitro como in vivo, no combate ao *Mycobacterium tuberculosis* responsável pela tuberculose (KAISER et al., 2007).

A linezolida deve ser reservada como agente alternativo para o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes a múltiplos fármacos. O uso indiscriminado e excessivo do fármaco poderá acelerar a seleção de cepas resistentes, levando à redução do espectro de ação deste antibiótico (CHAMBERS, 2006).

1. Métodos de análise

Em 2001, Ehrlich e colaboradores (EHRlich et al., 2001) descreveram método para quantificação de linezolida em amostras de soro e urina por cromatografia líquida de alta eficiência. Li e colaboradores (LI et al., 2004) desenvolveram método simples e rápido para a determinação de linezolida em amostras de plasma humano. O método proposto empregou coluna de fase reversa (octadecilsilano), fase móvel composta por mistura de acetonitrila e ácido acético e detecção por ultravioleta a 253 nm. Método similar para análise de linezolida foi proposto por Boak e colaboradores (BOAK et al., 2006).

Devido à natureza quiral da linezolida, Narayana e colaboradores (NARAYANA et al., 2003) desenvolveram dois métodos de HPLC quiral para separação dos dois enantiômeros, usando uma coluna Chiralpak AD de base de amilose como fase estacionária. Foi realizado este ensaio sobre o granel e comprimidos deste medicamento, no qual um dos métodos usava como fase móvel uma mistura de hexano, 2- propanol e TFA (ácido trifluoro acético) e outro método usava uma mistura de hexano, etanol e TFA.

Um método por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) foi proposto para a determinação de baixos níveis de linezolida na presença de produtos de degradação e substâncias relacionadas (AGRAWAL et al., 2003). O método emprega placa de sílica-gel e fase móvel composta por uma mistura de partes iguais de tolueno e acetona. A densitometria foi determinada em 254 nm. Lopes e Salgado (LOPES et al., 2009) descreveram método para avaliação da estabilidade de linezolida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os mesmos autores descreveram método microbiológico para análise de linezolida (LOPES et al., 2010).

Em 2011, um método de RP-HPLC foi desenvolvido e validado de acordo com as recomendações do ICH (ICH, 2003) para a determinação e avaliação da estabilidade da linezolida em comprimidos por Mohapatra e colaboradores (MOHAPATRA et al., 2011), usando como fase estacionária uma coluna C-18 e como fase móvel uma mistura de água e metanol (50:50) com detecção UV à 254 nm. Este método foi seletivo para a linezolida na presença dos produtos de degradação e os excipientes encontrados na formulação dos comprimidos não interferiram na seletividade do método.

Tiware e Bonde (TIWARE et al., 2012) utilizaram os métodos LC, LC-MS/TOF e MSn (Multistage Mass Spectrometric) para separar, identificar e caracterizar todos os três produtos de degradação obtidos de amostras puras de linezolida, geradas sobre várias condições de estresse, segundo recomendações do ICH (ICH, 2003). Os três produtos de degradação foram encontrados e separados pelo método HPLC, utilizando uma coluna C-18, e como fase móvel diferentes proporções da mistura de metanol e dihidrogeno fosfato de potássio (tampão), com a variação do pH deste, através da adição de ácido fosfórico e detectados à 251 nm. O padrão de fragmentação da linezolida foi estabelecido com o uso do MSn e do MS/TOF com ionização por electrospray positiva (ESI). Na análise das amostras no LC-MS/TOF foi utilizado o mesmo gradiente utilizado no HPLC, porém o tampão fosfato foi trocado pelo acetato de amônio de mesma concentração e pH. O caminho completo de degradação da linezolida e o mecanismo de formação dos produtos de degradação foram estabelecidos através desse estudo.

OBJETIVO/JUSTIFICATIVA

Diversos métodos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido relatados para a determinação de linezolida em meio de cultura, plasma humano, soro e urina. Entretanto, existem poucos métodos disponíveis para a determinação de linezolida em formas farmacêuticas. Desta forma, justifica-se a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos que possam ser adotados no controle de qualidade de linezolida em formulações farmacêuticas.

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar métodos espectrofotométrico, de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (RP-UPLC), doseamento microbiológico em placas e doseamento microbiológico rápido em microplacas com leitura cinética para a determinação de linezolida em soluções injetáveis e comprimidos.

CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO

CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO

A substância química adquirida da Sigma-Aldrich foi caracterizada quanto sua identidade, teor e perfil de impurezas, para ser adotada como substância química de trabalho (SQT) (BRASIL, 2010). Foram realizados ensaios de espectrometria no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono-13, e calorimetria exploratória diferencial (SKOOG et al., 2002; USP, 2012; BP, 2008; FB, 2010).

1. Espectrometria no infravermelho

As moléculas quando absorvem radiação na região do infravermelho vibracional (4000 a 400 cm^{-1}) são excitadas para atingir um estado de maior energia, e esta absorção é um processo quantizado, ou seja, uma molécula absorve apenas frequências (energias) selecionadas de radiação do infravermelho. A absorção no infravermelho corresponde a alterações de energia que abrange as frequências vibracionais de estiramento e deformação das ligações da maioria das moléculas covalentes, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais naturais das ligações das moléculas. O espectro de infravermelho é característico de uma molécula como um todo, pois certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. Com isso, estudando e consultando as tabelas de infravermelho é possível identificar uma substância supostamente desconhecida, comparando-se com um espectro padrão de infravermelho da substância. Pelo fato de o espectro de infravermelho fornecer informações sobre a presença de grupos funcionais na molécula, o mesmo pode ser usado aliado a outras técnicas, como a ressonância magnética nuclear, para fazer a determinação estrutural da molécula (SILVERSTEIN et al., 2007, PAIVA et al., 2011).

Um espectro de infravermelho determina posições e intensidades relativas de todas as absorções ou picos na região do infravermelho, e através da consulta à tabelas de correlação do infravermelho, é possível conhecer as frequências em que vários grupos funcionais absorvem e com isso, conseguimos extrair importantes informações estruturais da molécula (PAIVA et al., 2011).

Utilizando a técnica da pastilha (disco prensado), cerca de $1,0\text{ mg}$ da amostra sólida de linezolida (Sigma-Aldrich, lote: 020M4707V e pureza $99,5\%$) foi misturada por moagem com cerca de 100 mg de brometo de potássio seco e pulverizado e depois foi prensada sobre alta pressão (10.000 a 15.000 libras) de modo a formar uma pastilha de brometo de potássio (KBr) que inclui o fármaco em sua matriz. Como o brometo de

potássio é iônico, o mesmo transmite na maior parte da região do infravermelho, e o espectro não conterá bandas interferentes até 400 cm^{-1} . Os espectros resultantes exibem bandas em 3450 e 1640 cm^{-1} devidas à umidade do ar quando a técnica do disco prensado é utilizado (PAIVA et al., 2011, SILVERSTEIN et al., 2007, SKOOG et al., 2002).

A pastilha transparente foi analisada no espectrômetro de infravermelho (Jasco, FT/IR 6300 A), obtendo-se o seguinte espectro mostrado na **Figura 5**.

Figura 5. Espectro de infravermelho da linezolida em pastilha de KBr.

Através da análise das posições e intensidades relativas das absorções das bandas ou picos na região do infravermelho, podemos relacionar com os principais grupos funcionais presentes na molécula de linezolida, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Bandas de absorção da molécula de linezolida no espectro de infravermelho

Banda	Banda em cm^{-1}	Movimento vibracional
A	3358	Estiramento N-H
B	2981	Estiramento $=\text{C-H}_{\text{sp}^2}$ aromático
C	2882	Estiramento C-H sp^3 alifático
D	1746	Estiramento C=O (éster)
E	1671	Estiramento C=O (amida)
F	1533	Estiramento C=C aromático
F'	1443	Estiramento C=C aromático
G	1408	Estiramento C-N
H	1325	Estiramento C-F
I	1235	Estiramento C-O
J	1118	Dobramento $=\text{C-H}$ aromático

1. Ressonância magnética nuclear

Na espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), uma amostra sob condições apropriadas em um campo magnético pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf) em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula, que como têm carga, e em alguns casos a carga gira em torno do eixo nuclear e gera um dipolo magnético ao longo do eixo. O momento angular da carga em movimento é descrito com número de spin I , que quando é igual a $\frac{1}{2}$ possibilita obter o espectro de vários núcleos como o ^1H e ^{13}C , utilizados respectivamente na RMN do ^1H e do ^{13}C (SILVERSTEIN et al., 2007).

Na RMN do ^1H o núcleo com spin $\frac{1}{2}$ tem dois níveis de energia identificados como α ($\frac{1}{2}$) e β ($-\frac{1}{2}$) e de acordo com a distribuição de Boltzmann há um pequeno excesso da população dos hidrogênios no estado de energia mais baixa ($N_\alpha > N_\beta$). Quando colocamos determinada quantidade de energia na forma de radiofrequência (MHz), induzimos a transição entre os níveis de energia para um determinado valor de um campo magnético estacionário, com isso o sistema entra em ressonância e a energia absorvida pelo ^1H , que passa do estado de energia mais baixa (N_α) para o mais alto (N_β), resultando o espectro de RMN. A amostra é colocada em um campo magnético e irradiada com um pulso de energia de radiofrequência de alta potência que excita simultaneamente todos os núcleos da amostra, que imediatamente após o pulso, os núcleos excitados começam a voltar ao seu estado fundamental e a irradiar energia, no qual um detector coleta a energia emitida, que é a soma de todos os núcleos durante o tempo de emissão. Com a excitação simultânea de todos os núcleos e coletando-se os sinais (^1H), alcançamos uma alta sensibilidade com esta técnica (SILVERSTEIN et al., 2007).

No espectro de RMN do ^1H as intensidades dos picos são proporcionais ao número de hidrogênios envolvidos, assim podemos saber sua quantidade medindo-se a área dos picos. A contagem dos hidrogênios a partir da integração é extremamente útil para determinar ou confirmar fórmulas moleculares, detectar picos sobrepostos, determinar a pureza de amostras e efetuar análises quantitativas. As posições dos picos, que são os deslocamentos químicos são medidos em ppm a partir de um pico de um composto de referência, o tetrametil-silano (TMS) (SILVERSTEIN et al., 2007).

Os hidrogênios de uma molécula são blindados fracamente pelas nuvens eletrônicas que os cercam, no qual sua densidade varia com o ambiente químico, ou seja, a vizinhança do átomo no qual o hidrogênio está ligado, dando origem a diferenças em deslocamento químico. Portanto, hidrogênios em ambientes químicos diferentes têm deslocamentos químicos diferentes e quando os hidrogênios estão no mesmo ambiente, seu deslocamento químico é o mesmo. Essa capacidade de discriminar melhor as absorções individuais é o que caracteriza a espectrometria de RMN de alta resolução (SILVERSTEIN et al., 2007).

Na RMN do ^1H ocorre o fenômeno conhecido como acoplamento de spin, ou seja, o acoplamento indireto dos spins dos hidrogênios através dos elétrons de ligação, no qual o número de picos é determinado pelo número de hidrogênios vizinhos acoplados. O hidrogênio ligado a grupo “enxerga” os outros hidrogênios ligados a outro grupo que é seu vizinho, gerando o número de picos igual ao número de hidrogênios enxergados mais um, expressos através da regra $(n + 1)$ com isso temos a multiplicidade do sinal, gerando singletos, dupletos, tripletos ou multipletos (SILVERSTEIN et al., 2007).

A espectrometria de RMN do ^{13}C , devido ao fato do núcleo do ^{12}C não ser magneticamente ativo, o núcleo do ^{13}C é utilizada, porém como sua abundância natural é de apenas 1,1 % do ^{12}C , sua sensibilidade é bastante inferior quando comparado ao RMN do ^1H , necessitando de um volume maior de amostra e maior tempo de irradiação. Nos espectros de ^{13}C com desacoplamento de ^1H , os picos são singletos, e se distribuem em uma faixa (em ppm) mais ampla em comparação com a dos hidrogênios. Outro aspecto importante é que a intensidade dos picos de ^{13}C não se correlaciona com o número de átomos de carbono como acontece com os ^1H (SILVERSTEIN et al., 2007).

Uma amostra de 20,0 mg de linezolida (Sigma-Aldrich, lote: 020M4707V e pureza 99,5 %) foi pesada em balança analítica (Shimadzu, AUY220) e dissolvida em 0,5 mL de dimetil-sulfóxido- d_6 (DMSO) em um tubo de vidro de 5 mm de diâmetro, e colocada em um equipamento de RMN (Bruker, DPX-300) com frequência de 300 MHz, para obter o espectro de RMN do ^1H conforme mostrado na **Figura 6**.

Figura 6. Espectro de RMN de ^1H da linezolida em DMSO-d_6 em 300 MHz.

Conhecendo a fórmula estrutural e molecular da linezolida ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$), sabemos que a mesma apresenta 20 hidrogênios, e com análise dos valores da integração e os deslocamentos químicos dos hidrogênios em ppm em relação ao TMS, podemos relacionar com os agrupamentos presentes na molécula de linezolida, conforme é mostrada na **Tabela 2**. O deslocamento químico do solvente dimetil-sulfóxido- d_6 (DMSO) é de 2,50 ppm.

Tabela 2. Deslocamentos químicos dos ^1H da molécula de linezolida em DMSO-d_6 no espectro de RMN em 300 MHz.

Pico	Deslocamento químico (ppm)	Número de H	Multiplicidade
A	8,20	1	terceto
B	7,45	1	duplete
C	7,16	1	duplete
D	7,05	1	duplete
E	4,70	1	multiplete
F	4,07	2	terceto
G	3,73	4	terceto
H	3,40	2	terceto
I	2,96	4	terceto
J	1,83	3	singlete

A mesma amostra de linezolida dissolvida em dimetil-sulfóxido- d_6 (DMSO) colocada no equipamento de RMN (Bruker, DPX-300) trabalhando com frequência de 75 MHz, para obter o espectro de RMN do ^{13}C conforme mostrado na **Figura 7**.

Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C da linezolida em DMSO d_6 em 75 MHz.

Através da análise dos deslocamentos químicos dos ^{13}C em ppm, podemos relacionar com os agrupamentos presentes na molécula de linezolida, conforme é mostrada na **Tabela 3**. O espectro mostra o deslocamento de 14 tipos de carbono na molécula de linezolida, pois há 2 pares de carbonos equivalentes no agrupamento morfilina. O deslocamento químico do solvente dimetil-sulfóxido- d_6 (DMSO) é de 39,54 ppm.

Tabela 3. Deslocamentos químicos dos ^{13}C da molécula de linezolida em DMSO- d_6 no espectro de RMN em 150 MHz.

Pico	Deslocamento químico (ppm)
A	169,9
B	156,1
C	154
D	135,5
E	133,3
F	119,2
G	114
H	106,4
I	71,5
J	66,1
K	50,6
L	47,3
M	41,4
N	22,4

2. Calorimetria exploratória diferencial

A Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma importante ferramenta no estudo da caracterização, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos, pois esta técnica é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Através da análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) podemos fazer a caracterização de um fármaco, determinar seu ponto de fusão e seu grau de pureza, a sua compatibilidade com os excipientes da formulação, fazer a identificação de seu polimorfismo, ensaios de estabilidade e sua cinética de decomposição térmica (OLIVEIRA et al., 2011, RODRIGUES et al., 2005).

Utilizando a técnica DSC podemos avaliar a pureza de um fármaco através da visualização da curva DSC, verificando a presença dos eventos térmicos característicos do fármaco analisado, e também podemos fazer uma determinação quantitativa utilizando a equação de van'tHoff, no qual se pode determinar a pureza a partir do pico de fusão do fármaco. Quando utilizamos a equação de van'tHoff para determinar a pureza de um fármaco, sabemos que quanto maior a concentração de impurezas presentes em uma amostra, menor será o seu ponto de fusão e mais larga será a sua faixa de fusão. Através da equação de van'tHoff, podemos determinar a fração molar de impureza (X_1) e o ponto de fusão teórico do analito puro (T_0), com isso obtemos a pureza absoluta do fármaco ao final do processo térmico (OLIVEIRA et al., 2011).

$$T_s = T_0 - \frac{RT_0^2 X_1}{\Delta H_F} \times \frac{1}{F}$$

Temos a seguinte notação da equação de van'tHoff: T_s = temperatura da amostra (K); T_0 = temperatura de fusão teórica do analito puro (K); R = constante universal dos gases (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹); X_1 = fração molar da impureza; ΔH_F = calor de fusão do componente principal puro (J mol⁻¹) e F = fração da amostra que fundiu em T_s .

Inicialmente, foram realizadas análises preliminares termogravimétrica (TGA) e de calorimetria diferencial exploratória (DSC) para estabelecer as condições para a determinação da pureza. Para tal, foi realizado ensaio de DSC com massa de 2,01 mg de linezolida (Sigma-Aldrich, lote: 020M4707V e pureza 99,5 %) pesada em balança analítica (Shimadzu, AUY220) e transferida para cadinho de alumínio parcialmente fechado e colocado no equipamento de DSC (Exstar, 7020) previamente calibrado com padrão índio (PF 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J g}^{-1}$), sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás de 50 mL/minuto e razão de aquecimento de 10 °C /minuto de 25 a 140 °C, e de 2°C/minuto de 140 a 190 °C.

A linezolida foi caracterizada termicamente pelo ensaio de DSC, neste a curva em 178,19 °C representa o processo de fusão do fármaco um processo endotérmico, demonstrado na **Figura 8**.

Figura 8. Curva DSC da linezolida obtida em atmosfera de N₂ de 50 mL/minuto e aquecimento de 2°C/minuto de 140 a 190 °C.

Através da análise da curva de DSC e a utilização da equação de van'tHoff, foi determinada a pureza da linezolida em 99,95 %.

4. Conclusões

Considerando-se os resultados obtidos nos ensaios de espectrofotometria no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN-¹H), ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN-¹³C) e de calorimetria diferencial exploratória (DSC), pode concluir que a substância química adquirida da Sigma-Aldrich foi caracterizada quanto sua identidade (positivo para linezolida), teor (pureza de aproximadamente 99,95 %) e perfil de impurezas (impurezas orgânicas, inorgânicas e umidade inferior a 0,1 %), e pode ser adotada como substância química de trabalho (SQT) no contexto da realização deste trabalho.

**PARTE I - Desenvolvimento racional
de método microbiológico por difusão
em ágar para determinação de
linezolida em preparações
farmacêuticas**

PARTE I - Desenvolvimento racional de método microbiológico por difusão em ágar para determinação de linezolida em preparações farmacêuticas

RESUMO

O método microbiológico de difusão em ágar baseia-se em dois fenômenos: na difusão do antibiótico e no crescimento microbiano. O crescimento ocorre respeitando a área em que houve difusão do antibiótico, resultando nos halos de inibição de crescimento. Os tamanhos dos halos são proporcionais à concentração de antibiótico, o que permite estimar a potência do antibiótico em comparação com uma substância química de referência. O objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver, otimizar e validar um método para o doseamento microbiológico de linezolida em preparações farmacêuticas. Utilizou-se planejamento fatorial e de superfície resposta (MSR) para a escolha do micro-organismo teste, meio de cultura, volume da camada superficial, inóculo e concentrações de linezolida. Os resultados de MSR apresentaram coeficientes de regressão adequados (r^2 de 0,891 e 0,884 para o ajuste e previsão, respectivamente), permitindo previsão do tamanho dos halos em função dos parâmetros estudados. Foram determinados os seguintes parâmetros: a utilização do micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e seu inóculo a 1 %, medidos no intervalo de 20 a 25 % de transmitância, o meio de cultura escolhido foi o ágar caseína de soja em sistema de bicamada, sendo 20 mL de camada basal e 5 mL de camada superficial inoculada. Foram utilizadas as concentrações das soluções de linezolida (padrão e amostra simulada) utilizadas nos ensaios nas doses baixas, médias e altas como 8, 16 e 32 µg/mL respectivamente, diluídas em tampão fosfato com pH 6,0. As placas foram incubadas por um período de 18 a 24 horas em estufa microbiológica a 37 ± 1 °C, após este período, efetuou-se a leitura dos diâmetros dos halos de inibição em cada placa. O doseamento microbiológico foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear (linear na faixa de 8 a 32 µg/mL, com r^2 de 0,999 e 0,998 para amostra e padrão, respectivamente), precisão (DPR de repetibilidade de 0,8 % e DPR de precisão intermediária de 1,8 %) e exatidão (exatidão média de 100,3 %). O método desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação da potência de linezolida em preparações farmacêuticas e pode ser utilizado por laboratórios na rotina de controle de qualidade.

1. INTRODUÇÃO

Um medicamento para ser utilizado deve ter três características intrínsecas: qualidade, segurança e eficácia terapêutica. Neste contexto, para se garantir que o medicamento possua as características citadas anteriormente, se fazem necessárias análises de carácter físico-químico e microbiológico através do laboratório de Controle de qualidade. Tal preocupação é ainda maior no caso de antibióticos, por se tratar de classe terapêutica amplamente utilizada no tratamento de doenças infecciosas. O uso indiscriminado e, algumas vezes irracional, contribui para o surgimento de cepas resistentes, o que pode levar a redução ou perda da atividade antimicrobiana.

A atividade ou potência de um antibiótico pode ser demonstrada através do seu efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, revelando sua redução, que não é demonstrada por métodos químicos (PINTO et al., 2010). No método de doseamento microbiológico por difusão em ágar, o tamanho do diâmetro do halo de inibição de crescimento é proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico. Deve-se ser empregada razão idêntica entre as doses padrão e amostra utilizadas no ensaio. Neste método, o micro-organismo é usado como revelador, e devido a sua variabilidade como reagente biológico, se faz necessário o uso de substâncias químicas de referência e delineamentos experimentais para se obter as potências relativas e análise quanto a validade dos resultados. (PINTO et al., 2010)

O ensaio microbiológico para a determinação da potência dos antibióticos é indicado para preparações cujo teor não pode ser determinado pelos métodos físico-químicos ou quando há necessidade de se verificar a atividade antimicrobiana do produto farmacêutico (PINTO et al., 2010). No método de doseamento por difusão em ágar, utiliza-se um meio de cultura solidificado em placas, que pode ser em sistema de monocamada ou bicamada, inoculada com um micro-organismo sensível a substância teste. A substância teste é aplicada na superfície da placa em área restrita e a mesma começa a se difundir. Após o período de incubação das placas, pode-se visualizar e medir a formação de halos de inibição de crescimento onde a substância se difundiu (PINTO et al., 2010).

Vários fatores são importantes para a otimização dos ensaios de doseamento microbiológico, como o micro-organismo utilizado que deve ser sensível a substância teste, a concentração do seu inóculo, a composição do meio de cultura utilizado, que deve propiciar os nutrientes necessários para o crescimento microbiano sem interferir na difusão, a espessura da camada inoculada, pH do meio, temperatura e tempo de incubação e o delineamento experimental empregado nos ensaios (PINTO et al., 2010).

O objetivo deste trabalho é desenvolver, aperfeiçoar e validar um método de doseamento microbiológico por difusão em ágar e determinar a potência relativa da linezolida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) foi utilizada para pesar o padrão de referência da linezolida. Pipetas volumétricas (5 mL e 10 mL), balões volumétricos (10 mL, 20 mL e 50 mL) (Pyrobras, Vidrolabor, Poliglass e Laborglass) e micropipeta automática (100 a 1000 µL) (Surepette) foram utilizados para fazer as soluções padrões e amostras simuladas nas concentrações baixa, média e alta da linezolida utilizada nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Os meios de cultura foram pesados em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H) e após serem diluídos com água destilada, foram esterilizados por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) por equipamento de autoclave (Luferco, 39211).

A solução tampão pH 6,0 foi preparada dissolvendo-se 8,0 g de fosfato de potássio monobásico e 2,0 g de fosfato de potássio dibásico em 1000 mL de água destilada. O pH foi determinado em medidor de pH (Gehaka PG1800) e, quando necessário, foi ajustado entre 5,9 e 6,1. Em seguida, esterilizou-se por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) por equipamento de autoclave (Luferco, 39211).

Pipetas estéreis graduadas (5 mL e 25 mL) (Falcon) foram utilizadas para fazer a camada superficial inoculada e camada basal respectivamente nos ensaios de doseamento microbiológicos.

Um espectrofotômetro (Unicam, Helios Epsilon) trabalhando no comprimento de onda de 580 nm, foi utilizado para medir a transmitância do inóculo entre 20 % a 25%.

Os meios de cultura (ágar caseína de soja e antibiótico 1) foram mantidos em equipamento de banho com circulação (Marconi) em temperatura de 50 °C até os mesmos serem inoculados com o micro-organismo de escolha para a formação da camada superficial na placa de Petri (90 X15 mm esterilizada por raio gama).

Os cilindros de aço inoxidável de diâmetro externo de 8 mm ± 0,1 mm, diâmetro interno de 6 mm ± 0,1 mm e comprimento de 10 mm ± 0,1 mm foram mantidos aquecidos a uma temperatura de 70 °C por um período de 1 a 4 horas, em estufa de secagem e esterilização (Fanem, 315-SE) antes da sua utilização nas placas inoculadas.

Uma micropipeta automática (20 a 200 µL) (Surepette) foi utilizada para transferência das diferentes soluções de padrão e amostra para os respectivos cilindros

de inox da placa inoculada com o micro-organismo de escolha. As placas foram incubadas em estufa de cultura (Fanem, 002 CD) por um período de 18 a 24 horas. Os halos de inibição formados foram medidos com o auxílio de um leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

2.2 Reagentes

O padrão de referência da linezolid (lote: 020M4707V e pureza 99,5 %) foi adquirido da Sigma-Aldrich. As cepas dos micro-organismos *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizados como reagentes biológicos foram adquiridos do Instituto Adolfo Lutz.

Os meios de cultura ágar caseína de soja (digesto pancreático de caseína 15,0 g/L, digesto papaínico de soja 5,0 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L e ágar 15,0 g/L) e meio antibiótico nº 1 (extrato de carne 1,5 g/L, extrato de levedura 3,0 g/L, digesto pancreático de caseína 4,0 g/L, peptona 6,0 g/L, dextrose 1,0 g/L e ágar 15 g/L) foram adquiridos da BD/Difco.

A dextrose utilizada para fazer a solução placebo, o cloreto de sódio para preparar a solução fisiológica 0,9 %, o fosfato de potássio monobásico e o fosfato de potássio dibásico utilizados para preparar a solução tampão fosfato pH 6,0, foram adquiridos da Inlab.

2.3 Desenvolvimento e otimização

Para o desenvolvimento e otimização do método foram realizados empregando-se planejamento fatorial e de superfície resposta, planejados com o auxílio do software Minitab® versão 17. Os resultados obtidos foram utilizados na otimização das condições do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Planejamento fatorial: Trabalhou-se com 4 variáveis para o desenvolvimento do método, a determinação do micro-organismo (*Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)), a concentração do seu inóculo (1 e 2 %), o meio de cultura utilizado para os ensaios (ágar de caseína de soja e antibiótico nº 1), o volume da camada inoculada (4 e 5 mL), conforme apresentado na **Figura 9**. Utilizou-se a princípio, concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL das soluções padrões e amostras (baixa, média e alta) nos ensaios balanceados com 3 doses (3 x 3).

Figura 9. Planejamento fatorial para a determinação do micro-organismo, concentração do seu inóculo, meio de cultura e volume da camada inoculada, para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Planejamento de superfície resposta: Para a determinação do inóculo (1 ou 2 %) e do volume da camada inoculada superficial (4 ou 5 mL) foram realizados ensaios com a média deste valores, ou seja, inóculo a 1,5 % e volume da camada inoculada de 4,5 mL frente as diferentes concentrações das soluções de linezolid dos padrões e amostras, conforme apresentado na **Figura 10**.

Figura 10. Planejamento de superfície resposta para a determinação da concentração do inóculo e do volume da camada inoculada na otimização do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

2.4 Validação do método

O método otimizado foi validado quanto à especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

A linearidade foi avaliada pela análise de três curvas padrão, obtidas em dias diferentes. Avaliaram-se os coeficientes de correlação, significância da regressão, ajuste ao modelo linear e paralelismo entre as curvas de padrão e amostra.

A precisão foi determinada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada pela análise de 9 amostras independentes no mesmo dia. Para precisão intermediária, foram analisadas 9 amostras independentes em dias diferentes.

A exatidão foi verificada através da quantidade de linezolida recuperada em amostras simuladas, preparadas pela mistura de quantidades conhecidas de placebo e SQT.

A robustez do método foi verificada durante a etapa de desenvolvimento e otimização. Foram estudados o micro-organismo teste, meio de cultura, proporção de inóculo e volume de meio superficial.

2.5 Doseamento microbiológico

Foram pesados $25,0 \pm 1,0$ mg do padrão de referência de linezolida e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL com solução tampão estéril pH $6,0 \pm 0,1$ para se obter a solução química de trabalho (SQT) com concentração de 500 µg/mL. Uma alíquota de 3200 µL foi retirada da SQT e transferida para um balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com solução tampão e obteve-se concentração de 32 µg/mL (P3). Transferiu-se 10 mL da solução P3 para balão de 20 mL, obtendo-se concentração de 16 µg/mL (P2). Transferiu-se 5 mL da solução P2 para balão de 10 mL, obtendo concentração de 8 µg/mL (P1).

Para a avaliação das amostras simuladas utilizadas nos ensaios foram preparadas três réplicas (A3, A2 e A1). Para isso, transferiram-se alíquotas de 3200 µL da solução SQT e 800 µL de solução placebo (preparada pela dissolução de 2,5 g de dextrose em 50 mL de água destilada) para balão volumétrico de 50 mL. Completaram-se os volumes com solução tampão e obteve-se concentração de 32 µg/mL (A3, B3 e C3). Transferiu-se 10 mL das soluções A3, B3 e C3 para balão de 20 mL, obtendo-se concentração de 16 µg/mL (A2, B2, e C2). Transferiram-se 5 mL das soluções A2, B2 e C2 para balão de 10 mL, obtendo concentração de 8 µg/mL (A1, B1 e C1).

Foram realizados ensaios de delineamento 3x3 com seis placas. O meio de cultura ágar caseína de soja de volume de 600 mL foi fundido e esfriado até aproximadamente 45 °C em banho-maria. Com o auxílio de pipeta estéril de 25 mL, transferiu-se uniformemente 20 mL do meio de cultura em cada placa, formando-se a mesma camada basal para as placas.

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341). Esta suspensão foi diluída até se obter transmitância de 20 a 25 % em 580 nm. Uma porção de 100 mL de meio de cultura foi inoculada com 1 mL da suspensão microbiana e homogeneizada. Alíquotas de 5 mL do meio inoculado foram transferidas para as placas de Petri para a preparação da camada superficial.

Após a solidificação da camada superficial, distribuíram-se sobre a mesma os cilindros de inox. Transferiram-se alíquotas de 200 µL das soluções do padrão (P1, P2 e P3) e das amostras simuladas (A1, A2 e A3; B1, B2 e B3; e C1, C2 e C3), em seu respectivo cilindro de inox, conforme apresentado na **Figura 11**.

As placas foram colocadas em estufa microbiológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de incubação das placas, procedeu-se à medição da zona de inibição de crescimento em cada uma das placas, utilizando um leitor de halos.

Figura 11. Esquema de distribuição das soluções padrão e amostras simuladas de linezolida (X = A, B ou C) em delineamento 3 X 3, sobre a camada superficial inoculada no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento e otimização

Sabemos que o tamanho do halo de inibição de crescimento é proporcional ao logaritmo da concentração das soluções teste e as mesmas devem estar em progressão geométrica (PINTO et al., 2010). Entretanto, outros valores podem influenciar no tamanho dos halos. Desta forma, através da análise estatística de planejamento com base nos resultados obtidos nos ensaios preliminares empregando-se software Minitab® versão 17 verificou que os parâmetros micro-organismo utilizado e as concentrações de linezolida

das amostras são os que mais influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento, conforme apresentado na **Figura 12**.

Figura 12. Influência dos principais parâmetros que mais interferem no tamanho do halo de inibição de crescimento no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

No doseamento microbiológico por difusão em ágar, conforme a **Figuras 13 e 14**, os parâmetros que contribuíram para a formação de um maior halo de inibição de crescimento foram: o micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), que demonstrou ser mais sensível à linezolida; quanto o meio de cultura não houve diferença significativa entre os halos obtidos empregando-se ágar caseína de soja e antibiótico 1; um menor volume da camada superficial inoculada (4 mL), pois a solução do antibiótico se difunde por uma extensão maior; utilizando-se menor concentração do inóculo (1 %) devido a menor população microbiana a ser inibida pelo antibiótico.

Figura 13. Principais parâmetros e suas influências no tamanho do halo de inibição de crescimento aplicando o método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Figura 14. Interação entre os principais parâmetros e como influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento utilizando o método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Portanto, foi definida a utilização do micro-organismo (*Kocuria rhizophila* (ATCC 9341)), além da utilização do meio ágar caseína de soja, por apresentar um crescimento mais denso do micro-organismo, e assim obter um halo mais nítido e definido durante a sua medição.

Através do uso do software Minitab® versão 17 foi possível determinar a relação entre a variação do tamanho do diâmetro do halo de inibição com a concentração da

amostra, a concentração do inóculo e o volume da camada superficial inoculada. A partir disso, foi estabelecida uma equação relacionando essas três últimas variáveis para obter o tamanho do halo de inibição para um ensaio de doseamento microbiológico de delineamento 3 x 3, utilizando o *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) em meio de cultura ágar caseína de soja, conforme a equação mostrada abaixo.

$$\text{Halo} = 159,92 - 69,97(\text{Vol.}) + 5,88(\text{Inóc.}) + 19,63 \log(\text{Conc.}) + 7,48(\text{Vol.}^2) - 2,89(\text{Inóc.}^2) - 2,59 [\log (\text{Conc.})]^2$$

Sendo o volume da camada inoculada igual a 5 mL e a concentração do inóculo 1%, podemos simplificar a equação para:

$$\text{Halo} = 0,06 + 19,63 \log(\text{Conc.}) - 2,59 [\log (\text{Conc.})]^2$$

Utilizando essa equação, podemos determinar teoricamente os valores do tamanho de halos obtidos, quando se varia a concentração das soluções-teste da linezolida, conforme podemos observar na **Tabela 4**.

Tabela 4. Diâmetro dos halos medidos nos ensaios e os encontrados teoricamente utilizando a equação obtida pelo software Minitab® versão 17.

	P1 (8µg/mL)	P2 (16µg/mL)	P3 (32µg/mL)	A1 (8µg/mL)	A2 (16µg/mL)	A3 (32µg/mL)
Halo medido (mm)*	15,5	20,4	24,4	15,9	20,3	24,2
Halo teórico (mm)	15,7	19,9	23,7	15,7	19,9	23,7
Erro padrão (%)	1,3	2,5	3,0	1,3	2,0	2,1

Legenda: *Média dos halos de 6 determinações.

Com a escolha do micro-organismo (*Kocuria rhizophila* (ATCC 9341)) e do meio de cultura (ágar caseína de soja), utilizando um menor volume da camada superficial inoculada, e uma maior concentração das soluções-testes obtemos a formação de um halo de inibição de crescimento maior nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar, conforme **Figura 15**. Quando relacionamos uma menor concentração do inóculo com maiores concentrações das soluções testes, obtemos um maior halo de inibição de crescimento, conforme pode ser observado na **Figura 16**.

Figura 15. Gráfico que relaciona o diâmetro do halo de inibição de crescimento com a concentração das soluções-testes e o volume da camada superficial inoculada nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Figura 16. Gráfico que relaciona o diâmetro do halo de inibição de crescimento com a concentração das soluções-testes e a concentração do inóculo nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

O inóculo do micro-organismo foi determinado a 1 %, pois forma-se um halo de inibição de maior diâmetro em relação ao inóculo de 2 %, ambos medidos em uma transmitância entre 20 e 25 %.

O tamanho da camada inoculada foi determinado em 5 mL, pois apresentou menor variabilidade em relação ao tamanho dos halos, que se deve, provavelmente, a uma menor variação da espessura e a maior uniformidade da camada inoculada nas

placas de Petri. Além disso, foram realizados ensaios com o rodízio das posições das soluções tanto do padrão como da amostra (**Figura 11**), que permite segregar o erro associado à falta de uniformidade da camada inoculada.

Para as concentrações, devido ao fato das mesmas apresentarem valores altos e, conseqüentemente, halos bastante grandes, foram realizados ensaios complementares trabalhando-se com séries de concentrações variadas (5, 10 e 20 µg/mL; 4, 8 e 16 µg/mL; 8, 16 e 32 µg/mL; e 10, 20 e 40 µg/mL). Determinou-se então que para a validação do método as concentrações de 8, 16 e 32 µg/mL poderiam ser utilizadas para os ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Desta forma, as condições analíticas otimizadas foram: micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), inóculo 1 %, meio de cultura ágar caseína de soja, volume 5 mL da camada superficial inoculada e concentração das soluções-teste na faixa de 8 a 32 µg/mL.

3.2 Validação

Um método é validado, quando se pode comprovar que o mesmo é adequado a uma finalidade pretendida, como uma determinação qualitativa, semi-quantitativa e ou quantitativa de fármacos, ou outras substâncias presentes em produtos farmacêuticos. Portanto a validação deve determinar através de estudos experimentais, que o método atenda as suas aplicações, conferindo que seus resultados sejam confiáveis (BRASIL, 2003).

O doseamento microbiológico foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (BRASIL, 2003).

A especificidade/seletividade é a capacidade de um método de medir um determinado composto na presença de outros componentes, como outros excipientes da formulação, impurezas ou produtos de degradação (BRASIL, 2003). A especificidade/seletividade foi avaliada através de um ensaio, utilizando-se 5 concentrações diferentes do padrão de linezolid (na faixa de 8 a 32 µg/mL) e uma amostra placebo. Foi observada a formação do halo de inibição de crescimento (resultado positivo) nas soluções do padrão, e a não formação do halo de inibição de crescimento (resultado negativo) na amostra placebo.

A linearidade de um método analítico demonstra que os resultados obtidos são proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2003). Para se determinar a linearidade foram utilizados três concentrações diferentes do padrão e da amostra simulada, que estavam nas concentrações baixa (8

µg/mL), média (16 µg/mL) e alta (32 µg/mL) em diluições de progressão geométrica na razão 2:1, em um delineamento 3 x 3, utilizando 6 placas de Petri em 3 réplicas. Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos foram de 0,999 e 0,998 para amostra e padrão, respectivamente. Além disso, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,220 e 0,783 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,287), conforme **Tabela 5**.

Tabela 5. Análise de variância dos dados obtidos nos ensaios do antibiótico linezolidina no doseamento microbiológico por difusão em ágar, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95 %).

Fonte	G.L.	SQ	QM	F calculado	F crítico	p-valor
Preparações	1	0,004	0,004	0,01	4,183	-
Regressão	1	447,207	447,207	974,868	4,183	0,000
Paralelismo	1	0,54	0,54	1,177	4,183	0,287
Quadrático	1	0,72	0,72	1,57	4,183	0,220
Diferença dos quadráticos	1	0,036	0,036	0,078	4,183	0,783
Tratamentos	5	448,507	89,701	195,54	2,545	-
Blocos	1	32,49	32,49	70,825	4,183	-
Erro	29	13,303	0,459	-	-	-
Total	35	494,3	-	-	-	-

Foram construídas curvas resposta do padrão e da amostra simulada relacionando o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento. Ambas as curvas possuem a mesma inclinação, portanto há paralelismo entre elas, caracterizando a validade do ensaio microbiológico, conforme **Figura 17**.

A precisão é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos nos ensaios, utilizando uma mesma amostra. A mesma foi avaliada em dois níveis: (a) repetibilidade, onde foram analisadas amostras independentes preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e/ou testadas em um mesmo equipamento; e (b) precisão intermediária onde foram analisadas amostras independentes preparadas em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou testadas em equipamentos diferentes. Em ambos os casos, a precisão foi avaliada pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2003). A repetibilidade encontrada foi de 0,8 % e a precisão intermediária foi de 1,8 % nos ensaios efetuados por doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Figura 17. Curvas resposta do padrão e da amostra simulada que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento, no doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Foi determinada a potência do antibiótico, utilizando-se das equações abaixo (PINTO et al., 2010):

$$E = \frac{[(P3 + A3) - (P1 + A1)]}{4}$$

$$F = \frac{[(A3 + A2 + A1) - (P3 + P2 + P1)]}{3}$$

$$M = \frac{F}{E} \log R$$

$$Pot = 10^M \cdot 100\%$$

Onde, E é a diferença na resposta entre as doses altas e baixa do padrão e da amostra. F é a diferença na resposta entre as doses altas, médias e baixa do padrão e da amostra. R é a razão entre as doses, no caso 2. A potência é determinada pelo antilogaritmo de M.

A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). A exatidão foi avaliada pela análise de amostras nas quais a quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura de componentes do medicamento (placebo contaminado). A exatidão foi de 100,3 %, que corresponde à média da potência dos seis ensaios efetuados, conforme **Tabela 6**.

Tabela 6. Mostra os valores encontrados de potência do antibiótico linezolida no doseamento microbiológico por difusão e ágar.

	A1*	A2*	A3*	P1*	P2*	P3*	Potência %
Ensaio 1	15,6	20,0	23,8	14,9	20,1	24,2	100,90
Ensaio 2	15,3	20,2	23,8	15,0	20,3	23,9	99,60
Ensaio 3	13,9	18,3	21,8	13,8	18,1	22,3	99,50
Ensaio 4	16,9	21,5	25,5	16,4	21,4	25,5	103,10
Ensaio 5	16,8	20,8	25,2	16,8	21,1	25,6	96,90
Ensaio 6	16,9	21,0	25,3	16,3	21,2	25,3	101,80

Legenda: *Média dos halos de 6 placas.

Desta forma, o doseamento microbiológico de linezolida foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão.

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método de doseamento microbiológico em placas foi realizado empregando planejamento fatorial e de superfície resposta, devido ao elevado número de variáveis que se desejava avaliar, como a determinação do micro-organismo (*Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)), a concentração do seu inóculo (1,0 a 2,0 %), o meio de cultura utilizado para os ensaios (meio de caseína de soja ou antibiótico nº 1), a espessura da camada superficial inoculada (4,0 a 5,0 mL), as concentrações das soluções padrões e das amostras simuladas (4 a 100 µg/mL) nos ensaios balanceados com três doses (3 x 3).

Através de análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios do software Minitab® versão 17, conseguimos verificar que os parâmetros micro-organismo utilizado e a concentrações das amostras são as que mais influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento. Com base nos resultados do planejamento fatorial e de superfície resposta, as condições analíticas otimizadas foram: micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), inóculo 1 %, meio de cultura ágar caseína de soja, volume 5 mL da camada superficial inoculada e concentração das soluções-teste na faixa de 8 a 32 µg/mL.

O método desenvolvido e otimizado foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear com os coeficientes de correlação (r^2) de 0,999 e 0,998 para amostra e padrão respectivamente, precisão através da

repetibilidade encontrada de 0,8 % e a precisão intermediária de 1,8 %, e exatidão de 100,3 %.

Portanto, o doseamento microbiológico por difusão em ágar pode ser empregado no controle de qualidade de medicamentos, inclusive genéricos e similares, garantindo a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos contendo linezolida.

**PARTE II–Desenvolvimento, validação
e avaliação da incerteza na
determinação da linezolida por
espectrofotometria no UV**

PARTE II—Desenvolvimento, validação e avaliação da incerteza na determinação da linezolida por espectrofotometria no UV

RESUMO

O método espectrométrico em UV-visível baseia-se na absorção da energia radiante por uma substância, que está dissolvida em um sistema solvente, e através da medida de sua absorção (Absorbância) em equipamento espectrofotométrico calibrado podemos determinar a concentração dessa solução, utilizando uma curva de calibração construída com concentrações conhecidas da substância de referência. O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver e validar um método espectrofotométrico para a determinação de linezolida em preparações farmacêuticas, identificar as principais fontes de incertezas, quantificar o desvio padrão de cada uma delas, além de calcular a associação e o emprego das incertezas para a determinação do fármaco na forma injetável. Utilizando como solvente água ultra purificada, foi realizada uma varredura no comprimento de onda de 200 nm a 400 nm, determinando-se em 254 nm o pico máximo de absorção da linezolida. O método desenvolvido e otimizado foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear com o coeficiente de correlação (r^2) obtido foi de 0,999. Adicionalmente, a regressão foi significativa (p-valor = 0,000) e não houve a falta de ajuste ao modelo linear (p-valor = 1,000), a precisão através da repetibilidade encontrada de 2,12 % e a precisão intermediária de 1,69 %, e exatidão de 99,05 %. O limite de detecção foi determinado em 0,4 µg/mL e o limite de quantificação foi determinado em 1,3 µg/mL. O método espectrométrico por UV para a determinação da linezolida mostrou-se simples, rápido e reprodutivo quando aplicado aos ensaios de rotina para a quantificação deste fármaco no controle de qualidade de medicamentos. Na estimativa de incerteza a contribuição da precisão, linearidade e peso do padrão de referência da linezolida são as mais significantes, contribuindo com aproximadamente 77 % da toda incerteza. As incertezas resultantes da absorbância (amostra e padrão), dos balões volumétricos e das pipetas volumétricas não têm influência significativa sobre a incerteza total.

1. INTRODUÇÃO

Medidas de absorção de radiação na região do ultravioleta e visível (de comprimento de onda entre 190 nm e 800 nm) têm uma ampla aplicação na determinação quantitativa de uma grande variedade de espécies inorgânicas e orgânicas. A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância (T) ou absorbância (A) de soluções de concentrações (c) que serão analisadas, contidas em uma célula transparente, com determinada espessura (caminho óptico) em (b) cm, representada matematicamente pela equação conhecida como lei de Lambert-Beer (SKOOG et al., 2002, PAIVA et al., 2011).

$$A = -\log T = \frac{\log P_o}{P} = \epsilon bc$$

Sendo P_o a intensidade de luz incidindo na cela da amostra e P a intensidade da luz saindo da cela, e ϵ a absorvidade molar, que é uma propriedade da molécula. Através desta equação podemos observar que a concentração de um analito absorvente está relacionada linearmente à sua absorbância.

A absorção de radiação ultravioleta resulta da excitação de elétrons de ligação, portanto, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações entre as moléculas, resultando em uma técnica valiosa para identificar os grupos funcionais e quando combinada com os detalhes fornecidos por espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN) podem ajudar na identificação de um composto ((SKOOG et al., 2002, PAIVA et al., 2011).

Mesmo não oferecendo uma identificação não ambígua de um composto orgânico, um espectro de UV, pode detectar a presença de grupos funcionais que são cromóforos, como uma banda de absorção por volta de 260 nm, por exemplo, pode ser a evidência de um anel aromático (SKOOG et al., 2002, PAIVA et al., 2011). O uso da técnica pode ser aplicado para a identificação e quantificação da linezolida, pois a mesma apresenta na sua fórmula estrutural um anel aromático, e um pico de absorção em 254 nm em água ultra purificada.

As variáveis comuns, que podem influenciar o espectro de absorção de uma substância, incluem a natureza do solvente, o pH da solução, a temperatura, as concentrações de eletrólitos e a presença de substâncias interferentes (SKOOG et al., 2002).

Linezolida é um antibiótico pertencente à classe das oxazolidinonas usado para o tratamento de sérias infecções causadas por bactérias Gram positivas, incluindo *enterococci* resistentes a vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente a

metilina (MRSA) (CHAMBERS 2006, BUTLER et al., 2011). Os métodos reportados na literatura para a determinação de linezolida incluem espectrofotometria em UV, HPLC usando detecção em UV e fluorescência, eletroforese capilar, TLC seguida de análise densiométrica e ensaios microbiológicos (LOPES et al., 2010, BORNER et al., 2001, MOHAPATRA et al., 2011, BEBAWY 2003, LOPES et al., 2009, BEBAWY 2003).

Resultados analíticos representam uma parte muito importante no programa de controle de qualidade. Decisões de aceitação ou rejeição de um produto farmacêutico são baseadas nos resultados analíticos. Neste contexto, a estimação da incerteza é uma ferramenta muito útil para avaliar a qualidade da medição analítica e a conformidade (ou não conformidade) do produto farmacêutico. A incerteza é um parâmetro que quando associado com o resultado de uma medição, caracteriza a dispersão de valores que podem ser fundamentalmente atribuídos para um resultado. Os passos envolvidos na estimação da medição de incertezas são: (a) especificar a medição, (b) identificar as fontes de incertezas, (c) quantificar os componentes de incertezas e (d) calcular a associação de incertezas (EURACHEM/CITAC GUIDE 2012, ICH 1996, ABNT, NBR ISO/IEC 17025 2005).

A incerteza nos resultados pode surgir de muitas possíveis fontes, incluindo a amostragem, o efeito da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas de massa e equipamento volumétrico, incertezas de equipamento espectrofotométrico e cromatográfico, incertezas na resposta biológica e microbiológica, pureza dos reagentes e substâncias químicas de referências, validação do método e variabilidade randômica (ANGLOV et al., 2003, LEITO et al., 2002, LOURENÇO et al., 2005, LOURENÇO 2012, LOURENÇO et al., 2004, LOURENÇO et al., 2012, LOURENÇO et al., 2007, NIEMI et al., 2001, SOOVÄLI et al., 2006, LOURENÇO 2013, OKAMOTO et al., 2013, HSU 2010).

O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver e validar o método espectrofotométrico para a determinação de linezolida em preparações farmacêuticas. Além disso, este trabalho visa identificar as principais fontes de incerteza, quantificar o desvio padrão de cada uma delas, e calcular as incertezas combinada e expandida para a determinação do fármaco na forma injetável.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Balanças analíticas (Shimadzu, AUY220 e/ou Mettler Toledo, AG204) foram utilizadas para pesagem do padrão de referência da linezolida. Pipetas volumétricas (5

mL), balões volumétricos (10 e 50 mL) (Pyrobras, Vidrolabor, Poliglass e Laborglass) e micropipeta automática (100 a 1000 µL) (Surepette) foram utilizados para preparar as soluções padrões nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 e de 12 µg/mL, e das amostras simuladas em três réplicas de 8, 10 e 12 µg/mL da linezolida utilizadas nos ensaios de espectrometria por UV.

Para a avaliação das incertezas, foram utilizadas balanças analíticas (Shimadzu, AUY220 e/ou Mettler Toledo, AG204) para pesagem do padrão de referência da linezolida. Balões volumétricos (50, 100 e 200 mL) e pipetas (1 e 5 mL) (Brand ou Laborglass) foram usadas na preparação de padrões e amostras.

Um espectrofotômetro UV (Thermo Scientific, Evolution 201) utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, trabalhando no comprimento de onda de 254 nm, foi utilizado para medir a absorbância das soluções de linezolida em água ultrapurificada.

2.2 Reagentes

O padrão de referência da linezolida (lote: 020M4707V e pureza 99,5 %) foi adquirido da Sigma-Aldrich, e a solução injetável de linezolida (2 mg/mL) foi obtida da Pfizer. A dextrose utilizada para fazer a solução placebo foi adquirida da Inlab.

3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

3.1 Desenvolvimento e otimização do método

No desenvolvimento e otimização do método espectrofotométrico é importante a escolha do solvente, considerar os seus possíveis efeitos sobre a substância analisada, pois as posições de máximo de absorção são influenciadas por sua natureza, além de evitar que o mesmo não absorva radiação ultravioleta na mesma região que a substância que se deseja determinar (SKOOG et al., 2002, PAIVA et al., 2011). A água ultra purificada foi escolhida como solvente no método de espectrofotometria ultravioleta, pois a mesma tem uma transparência mínima aproximada de 190 nm, não sofrendo absorção em comprimentos de onda maiores.

As medidas espectrofotométricas de absorbâncias são feitas em um comprimento de onda determinado que correspondente a um pico de absorção da substância, onde a variação na absorbância por unidade de concentração é a maior possível, tendo assim a

máxima sensibilidade neste ponto (SKOOG et al., 2002). Foi realizada uma varredura no intervalo de comprimento de onda de 200 a 400nm no espectrofotômetro, com uma solução de linezolida de concentração de 10 µg/mL em água ultra purificada, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm, em temperatura ambiente controlada (entre 20 e 25 °C), no qual foi verificada a maior absorção da substância em 254 nm, conforme apresentado na **Figura 18**. O comprimento de onda obtido foi utilizado na otimização das condições do método espectrofotométrico por UV.

Figura 18. Espectro de varredura do padrão de linezolida em água ultrapurificada no intervalo de comprimento de onda de 200 a 400nm.

3.2 Validação do método

Um método é validado quando se pode comprovar que o mesmo é adequado a uma finalidade pretendida, como uma determinação qualitativa, semi-quantitativa e ou quantitativa de fármacos, ou outras substâncias presentes em produtos farmacêuticos. Portanto a validação deve determinar através de estudos experimentais, que o método atenda as suas aplicações, conferindo que seus resultados sejam confiáveis (BRASIL, 2003). O método otimizado foi validado quanto à especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limite de detecção e o limite de quantificação.

A especificidade/seletividade é a capacidade de um método de medir um determinado composto na presença de outros componentes, como os excipientes da formulação, impurezas ou produtos de degradação (BRASIL, 2003). A especificidade/seletividade foi avaliada através da comparação dos espectros obtidos na região entre 200 e 400 nm para as soluções padrão, amostra e placebo. O método foi considerado específico/seletivo, pois não houve absorção da solução placebo no comprimento de onda utilizado para a determinação da linezolida (254 nm).

A linearidade foi avaliada pela análise de quatro curvas padrão nas concentrações de 1 a 12 µg/mL, obtidas em dias diferentes. Avaliaram-se os coeficientes de correlação, significância da regressão e ajuste ao modelo linear. A linearidade de um método analítico demonstra que os resultados obtidos são proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Para se determinar a linearidade foram utilizadas nove concentrações diferentes de soluções padrão (1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 µg/mL). O coeficiente de correlação (r^2) obtido foi de 0,999. Adicionalmente, a regressão foi significativa (p-valor = 0,000) e indicando haver ajuste ao modelo linear (p-valor = 1,000). Foi construída uma curva resposta do padrão que relaciona as concentrações destas soluções (µg/mL) com as absorbâncias obtidas, caracterizando a validade do método de espectrofotometria em UV, conforme **Figura 19**.

Figura 19. Curva resposta do padrão que relaciona diferentes concentrações de linezolida com as absorbâncias obtidas em 254 nm.

A precisão foi determinada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise de 9 amostras simuladas (em três níveis: 80, 100 e 120% em relação à concentração de 10 µg/mL) independentes no mesmo dia. Para precisão intermediária, foram analisadas 9 amostras simuladas (em três níveis: 80, 100 e 120% em relação à concentração de 10 µg/mL) independentes em dias diferentes. A precisão é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos nos ensaios, utilizando uma mesma amostra. A mesma foi avaliada em dois níveis: (a) repetibilidade, onde foram analisadas amostras independentes preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e/ou testadas no mesmo equipamento; e (b) precisão intermediária onde foram analisadas amostras independentes preparadas em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou testadas em equipamentos diferentes. Em ambos os casos, a precisão foi avaliada pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2003). A repetibilidade encontrada foi de 2,12 % e a precisão intermediária foi de 1,69 % nos ensaios efetuados pelo método espectrofotométrico UV.

A exatidão foi verificada através da quantidade de linezolida recuperada em amostras simuladas (em três níveis: 80, 100 e 120 % em relação à concentração de 10 µg/mL), preparadas pela mistura de quantidades conhecidas de placebo e SQT. A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). A exatidão foi avaliada pela análise de amostras nas quais a quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura de componentes do medicamento (placebo contaminado). A exatidão foi de 99,05 %, que corresponde à média dos quatro ensaios efetuados, conforme **Tabela 7**.

Tabela 7. Mostra os valores encontrados de absorbância das amostras de linezolida nos ensaios efetuados pelo método espectrofotométrico UV.

Amostra	Concentração	Quantidade recuperada (µg/mL)			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
A	8 µg/mL	7,88	7,33	7,46	7,79
B		7,95	7,35	7,51	7,71
C		7,90	7,35	7,71	7,77
A	10 µg/mL	9,93	9,43	9,85	9,78
B		9,80	9,41	9,62	9,61
C		10,08	9,46	9,94	9,69
A	12 µg/mL	11,83	11,83	12,14	11,75
B		11,73	11,76	11,86	11,62
C		11,87	11,89	11,91	11,67

Foi determinado o limite de detecção e o limite de quantificação da linezolida no método espectrofotométrico de UV. Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das seguintes equações:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Sendo LD o limite de detecção, DPa o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, obtido de no mínimo de 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Sendo LQ o limite de quantificação, DPa o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, obtido de no mínimo de 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

O limite de detecção em um método pode ser definido como a menor quantidade do analito de interesse presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições estabelecidas (BRASIL, 2003). O limite de quantificação em um método pode ser definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Os limites de detecção e quantificação determinados foram de 0,4 e 1,3 µg/mL, respectivamente.

Desta forma, o método de espectrofotometria em UV da linezolida foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.3 Método espectrofotométrico para determinação da linezolida

Foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg do padrão de referência de linezolida e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL e diluído com água ultrapurificada para se obter solução estoque de SQT, com concentração de 200 µg/mL. A partir dessa solução foram realizadas diluições de forma a se obter concentrações finais de 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 µg/mL, empregando-se água ultrapurificada como diluente.

As amostras simuladas (8, 10 e 12 µg/mL) utilizadas nos ensaios de precisão e exatidão foram preparadas em três réplicas. Para isso, transferiram-se diferentes alíquotas da solução estoque de SQT e 500 µL de solução estoque de placebo (preparada pela dissolução de 250 mg de dextrose em 50 mL de água ultrapurificada) para balão volumétrico de 10 mL. Foi diluída também uma alíquota de 500 µL da solução estoque de placebo em balão de 10 mL para ser utilizada nos ensaios de especificidade/seletividade (Solução placebo).

As soluções padrões, amostras simuladas de linezolida e a solução placebo, tiveram suas absorvâncias determinadas em espectrofotômetro UV com comprimento de onda ajustado para 254nm.

4. INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

4.1 Método espectrofotométrico

Uma quantidade precisa de 10,0 mg do padrão de referência da linezolida foi pesado, e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com água ultra purificada. Uma alíquota de 5 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e diluída com água ultra purificada. Os valores da absorvância das soluções do padrão e da amostra foram medidas em espectrofotômetro ajustado em 254 nm, usando água ultra purificada como branco. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente controlada (entre 20 e 25°C). A quantidade (%) da linezolida na solução injetável (2 mg/mL) foi calculada como descrito a seguir:

$$\% = \left(\frac{Au}{As} \right) \times \left(\frac{Cs}{Cu} \right) \times 100$$

Onde *Au* é a absorvância da solução da amostra, *As* é a absorvância da solução padrão, *Cs* é a concentração da solução padrão e *Cu* é a concentração da solução da amostra.

4.2 Identificando as fontes de incertezas

O diagrama de causa-efeito das fontes de incerteza é mostrado na **Figura 20**. As fontes de incerteza consideradas mais importante foram associadas com a preparação do padrão, a preparação da amostra, absorvâncias do padrão e da amostra e o método de validação (LOURENÇO et al., 2005).

Figura 20. Diagrama de causa e efeito para determinação de linezolida por espectrofotometria em UV.

A fontes de incertezas da preparação do padrão incluem a peso do padrão de referência da linezolida, a pureza do padrão de referência da linezolida, os balões volumétricos (50 e 100 mL) e pipetas (5 mL) usadas na preparação do padrão. As fontes de incerteza na preparação da amostra incluem o balão volumétrico (200 mL) e pipeta (1 mL) usadas na preparação da amostra. A incerteza associada das absorbâncias das soluções de padrão e da amostra foram estimadas baseadas na calibração do espectrofotômetro UV. Considerando-se a validação do método, três tipos de fontes de incerteza foram considerados nesse estudo: linearidade, precisão e exatidão.

O procedimento para estimar a incerteza do método espectrofotométrico UV para a determinação da linezolida foi validado pela realização de simulações de Monte Carlo.

4.3. Quantificando os componentes de incertezas

Os componentes da incerteza na determinação de linezolida pelo espectrofotômetro UV estão listadas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Componentes da incerteza na determinação de linezolida por espectrofotometria em UV.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	Valor nominal	Incerteza estimada	Incerteza padrão
Preparação do padrão	Peso do padrão de referência	10,1 mg	0,1 mg	0,05 mg
	Pureza do padrão de referência	0,995	0,005 ^a	0,0029
	Balão volumétrico de 100 mL	100,0 mL	0,2 mL	0,1 mL
	Pipeta volumétrica de 5mL	5,00 mL	0,02 mL	0,01 mL
	Balão volumétrico de 50 mL	50,0 mL	0,1 mL	0,05 mL
Preparação da amostra	Pipeta volumétrica de 1mL	1,000 mL	0,004 mL	0,002 mL
	Balão volumétrico de 200 mL	200,0 mL	0,4 mL	0,2 mL
Absorbâncias	Solução do padrão	0,554	0,001 ^a	0,0006
	Solução da amostra	0,517	0,001 ^a	0,0006
Validação do método	Linearidade	1,0000	0,0062	0,0062
	Exatidão	0,9985	0,0026	0,0026
	Precisão	1,0000	0,0060	0,0060

^aDistribuição retangular

Uma quantidade de 10,1 mg do padrão de referência da linezolida foi pesado em uma balança analítica. A incerteza na pesagem foi de 0,1 mg, com um fator de abrangência de 2, de acordo com o certificado de calibração da balança.

A pureza do padrão de referência da linezolida como mostrado no certificado foi de 99,5%, que é 0,995 em valor absoluto. A incerteza é 0,005 com a distribuição retangular.

A incerteza dos balões volumétricos e pipetas foram obtidos dos certificados de calibração, com um fator de abrangência de 2. As incertezas estão listadas na **Tabela 8**.

A equação da incerteza da preparação do padrão é mostrada a seguir:

$$u(s) = Cs \times \sqrt{\left(\frac{uws}{ws}\right)^2 + \left(\frac{uPot}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u100vf}{100}\right)^2 + \left(\frac{u5vp}{5}\right)^2 + \left(\frac{u50vf}{50}\right)^2}$$

Onde uws é a incerteza do peso do padrão de referência, ws é o peso do padrão de referência, $uPot$ é a incerteza associada com a potência do padrão de referência, Pot é a potência do padrão de referência, $u100vf$ e $u50vf$ são as incertezas dos balões volumétricos de 100 mL e 50 mL, respectivamente e $u5vp$ é a incerteza da pipeta volumétrica de 5 mL.

As fontes de incerteza da preparação da amostra incluem a pipeta volumétrica de 1 mL e balão volumétrico de 200 mL obtidos dos certificados de calibração listados na **Tabela 8**.

A equação da incerteza da preparação da amostra é mostrada a seguir:

$$u(u) = C_u \times \sqrt{\left(\frac{u1vp}{1}\right)^2 + \left(\frac{u200vf}{200}\right)^2}$$

Onde $u1vp$ é a incerteza da pipeta volumétrica de 1 mL, e $u200vf$ é a incerteza do balão volumétrico de 200 mL.

As incertezas associadas com as absorvâncias das soluções do padrão e da amostra foram estimadas baseadas na especificação técnica do espectrofotômetro UV. A incerteza é 0,01, com uma distribuição retangular, como listada na **Tabela 8**.

A equação da incerteza das absorvâncias das soluções do padrão e da amostra é mostrada a seguir:

$$u(a) = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{uAu}{Au}\right)^2 + \left(\frac{uAs}{As}\right)^2}$$

Onde Au e As são as absorvâncias das soluções da amostra e do padrão, respectivamente, e uAu e uAs são as incertezas das absorvâncias das soluções da amostra e do padrão, respectivamente.

A incerteza da linearidade foi obtida baseada no erro residual da análise de regressão linear. De acordo com os resultados do método de validação, a equação linear foi $Y = 0,0534X + 0,0174$, com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9989 e um erro residual (s) de 0,0033. A incerteza padrão associada com a linearidade foi 0,0062, como listada na **Tabela 8**. Adicionalmente, a regressão foi significativa (p -valor = 0,000) e não houve a falta de ajuste ao modelo linear (p -valor = 1,000).

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: (a) repetibilidade e (b) precisão intermediária. De acordo com os resultados do método de validação, a precisão do método espectrofotométrico UV para determinação da linezolida foi encontrada para ser 0,60%. A incerteza da precisão foi 0,0060, como listada na **Tabela 8**.

De acordo com os resultados de validação a exatidão do método foi calculada em 99,85 %. A incerteza da exatidão foi assumida para ser o desvio padrão do teste de exatidão (0,26% ou 0,0026), como listada na **Tabela 8**.

A equação da incerteza do método de validação é apresentada a seguir:

$$u(v) = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{uLin^2 + uRep^2 + uPr^2 + \left(\frac{uAcc}{Acc}\right)^2}$$

Onde Acc é a exatidão do método, $uLin$ é a incerteza da linearidade, $uRep$ é a incerteza da repetibilidade, uPr é a incerteza da precisão intermediária e $uAcc$ é a incerteza da exatidão.

Tabela 9. Valores intermediários, incertezas do padrão e suas incertezas do desvio relativo.

Descrição	Valor intermediário	Incerteza do padrão	Incerteza do desvio relativo
Absorbância da solução da amostra (<i>A_u</i>)	0,517	0,00058	0,00112
Absorbância da solução do padrão (<i>A_s</i>)	0,554	0,00058	0,00104
Concentração da solução do padrão (<i>C_s</i>)	0,01005	0,00006	0,00624
Concentração da solução da amostra (<i>C_u</i>)	0,01000	0,00002	0,00224
Validação do método	1,0015	0,0091	0,0090

Tabela 10. Planilha de cálculo de incerteza.

		<i>Ws</i>	<i>Pot</i>	<i>100vf</i>	<i>5vp</i>	<i>50vf</i>	<i>1vp</i>	<i>200vf</i>	<i>As</i>	<i>Au</i>	<i>Lin</i>	<i>Acc</i>	<i>Pr</i>
Valor		10,10	99,50	100,0	5,00	50,00	1,000	200,0	0,5540	0,5170	1,0000	0,9985	1,0000
Incerteza		0,05	0,29	0,1	0,01	0,05	0,002	0,2	0,0006	0,0006	0,0062	0,0026	0,0060
<i>ws</i>	10,10	10,15	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
<i>Pot</i>	99,50	99,50	99,79	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50
<i>100vf</i>	100,0	100,0	100,0	100,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>5vp</i>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,01	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
<i>50vf</i>	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,05	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
<i>1vp</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,002	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>200vf</i>	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,2	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
<i>As</i>	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5546	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540
<i>Au</i>	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5176	0,5170	0,5170	0,5170
<i>Lin</i>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0062	1,0000	1,0000
<i>Acc</i>	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	1,0011	0,9985
<i>Pr</i>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0060
%	93,92	94,39	94,20	93,83	94,11	93,83	93,74	94,02	93,83	94,03	94,51	93,68	94,49
u		0,46	0,27	-0,09	0,19	-0,09	-0,19	0,09	-0,10	0,10	0,58	-0,25	0,56
u ²	1,13	0,22	0,07	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,34	0,06	0,32
u = 1,06 %		K = 2,00					U = 2,12 %						

Figura 21. Contribuição da incerteza para determinação de linezolida por espectrofotometria em UV.

4.4 Incertezas combinada e expandida

Os valores intermediários, suas incertezas padrão e incertezas relativas padrão estão resumidas na **Tabela 9**. Usando esses valores, a quantidade (%) da linezolida na solução injetável (2 mg/mL) foi calculada como descrita na equação (1).

A incerteza combinada é calculada como mostrada a seguir:

$$u(\%) = \% \times \sqrt{\left(\frac{uAu}{Au}\right)^2 + \left(\frac{uAs}{As}\right)^2 + \left(\frac{uCs}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{uCw}{Cu}\right)^2 + u(v)^2}$$

Onde $u(\%)$ é a incerteza combinada, uAu é a incerteza da absorbância da solução da amostra, Au é a absorbância da solução da amostra, uAs é a incerteza da absorbância da solução padrão, As é a absorbância da solução padrão, uCs é a incerteza da concentração da solução padrão, Cs é a concentração da solução padrão, uCw é a incerteza da concentração da solução da amostra, Cu é a concentração da solução da amostra, e $u(v)$ é a incerteza do método de validação.

Alternativamente, a incerteza combinada pode ser calculada usando o método da planilha de cálculo de incerteza, como mostrado na **Tabela 10**.

A contribuição dos diferentes parâmetros está demonstrada na **Figura 21**. A contribuição da precisão, linearidade e peso do padrão de referência da linezolida são os mais significantes, contribuindo com cerca de 77 % de toda a incerteza. A contribuição associada com o peso do padrão de referência da linezolida pode ser reduzida aumentando-se o peso (por exemplo, 25mg) do padrão de referência da linezolida usada na preparação da solução padrão. A incerteza nas absorbâncias (amostra e padrão), balões volumétricos e pipetas volumétricas não tem influência significativa sobre a incerteza total.

A incerteza expandida (U) foi obtida multiplicando-se a incerteza combinada padrão ($u(\%)$) com o fator de abrangência igual a 2.

De acordo com os resultados da simulação de Monte Carlo (**Figura 22**), o procedimento para estimação da medição de incerteza para o método espectrofotométrico UV pode ser considerado apropriado. O resultado final e sua incerteza estimada pelo procedimento Eurachem encontrado foi $93,92 \pm 2,12 \%$ e o intervalo de 95 % de confiança obtido pela simulação de Monte Carlo foi $93,92 \pm 2,06 \%$.

Figura 22. Distribuição de frequência da simulação de Monte Carlo para determinação de linezolida pelo método de espectrofotometria em UV.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método espectrofotométrico de UV foi realizado utilizando uma solução de linezolida de 10 µg/mL em água ultra pura como solvente, cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e fazendo uma varredura no comprimento de onda de 200 a 400 nm, e assim determinado em 254 nm a maior absorção da linezolida.

O método desenvolvido e otimizado foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear com o coeficiente de correlação (r^2) obtido foi de 0,999. Adicionalmente, a regressão foi significativa (p-valor = 0,000) e não houve a falta de ajuste ao modelo linear (p-valor = 1,000). A precisão foi determinada através da repetibilidade encontrada de 2,12 % e da precisão intermediária de 1,69 %. A exatidão foi equivalente a 99,05 %. O limite de detecção foi determinado em 0,4 µg/mL e o limite de quantificação foi determinado em 1,3 µg/mL.

Portanto, o método espectrométrico por UV para a determinação da linezolida pode ser utilizado no controle de qualidade de medicamentos, apresentando como vantagens, o fato de ser um método simples, rápido e reprodutivo nos ensaios de rotina para a quantificação deste fármaco.

A incerteza expandida estimada do método espectrofotométrico para a determinação da linezolida foi adequada para os objetivos do seu uso. Se considerarmos que a limite de especificação da linezolida injetável é de 90 % á 110 %, é possível concluir que a incerteza ocupa cerca de 20 % de todo alcance da especificação, que é razoável para o escopo do método. Considerando que houve concordância entre o procedimento da Eurachem e a simulação de Monte Carlo, podemos concluir que o procedimento descrito nesse trabalho pode ser empregado para a determinação de linezolida pelo método de espectrofotometria UV.

**PARTE III–Desenvolvimento,
validação e avaliação da incerteza na
determinação da linezolida por RP-
UPLC**

PARTE III– Desenvolvimento, validação e avaliação da incerteza na determinação da linezolida por RP-UPLC

RESUMO

O método de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (RP-UPLC) se baseia na separação físico-química dos componentes de uma amostra, que estão distribuídos entre a fase móvel líquida e a fase estacionária da coluna. Sua maior ou menor afinidade por uma dessas fases irá ocasionar diferentes tempos de retenção dessas substâncias, o que permite sua separação, identificação e determinar sua concentração. Na técnica RP-UPLC, o uso de uma coluna cromatográfica C18 com 50 mm de comprimento e diâmetro de partícula de 1,9 μm permitiu separação rápida e eficiente da linezolida e seus produtos de degradação. O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver e validar um método RP-UPLC para a determinação de linezolida em preparações farmacêuticas, identificar as principais fontes de incertezas, quantificar o desvio padrão de cada uma delas, além de calcular a associação e o emprego das incertezas para a determinação do fármaco na forma injetável. Utilizando uma fase móvel composta de água, acetonitrila e TFA (na respectiva proporção 90:10:1), e as seguintes condições cromatográficas: Fluxo: 0,5 mL/minuto, volume de injeção: 10 μL , comprimento de onda: 254 nm; o método foi validado pela avaliação da especificidade, linearidade/limite linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. O procedimento Eurachem foi usado na estimação da medição e avaliado pelas simulações de Monte Carlo. Nas condições de estresse a linezolida foi degradada após a exposição à luz, ao meio alcalino e a oxidação. O método RP-UPLC foi linear (na faixa de 8,0 a 12 $\mu\text{g/mL}$, com $r^2 = 0,9985$), mostrou boa precisão (repetibilidade de 0,89 % e precisão intermediária de 0,66 %), exatidão de 98,62 % e robustez. A contribuição da exatidão, precisão, linearidade, área do pico da solução do padrão e peso do padrão de referência da linezolida são os mais significantes, contribuindo com cerca de 86 % da incerteza total. As outras fontes de incerteza têm pequena influência sobre a incerteza total. A incerteza estimada pelo procedimento Eurachem foi de $95,13 \pm 2,51$ % enquanto pelas simulações de Monte Carlo foi de $95,14 \pm 2,46$ %. O procedimento para estimação da medição de incerteza para o método RP-UPLC pode ser considerado apropriado para sua aplicação.

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida seja de alta eficiência (HPLC) como a de ultra eficiência (UPLC) são métodos físico-químicos de separação onde os componentes a serem separados em uma amostra, estão distribuídos entre a fase móvel líquida e a fase estacionária representada pela coluna cromatográfica. Para tanto, um dos requisitos para se utilizar a cromatografia líquida é que a amostra seja solúvel na fase móvel, e que também ocorra sua interação com a fase estacionária, pois os analitos ou componentes que tem maior afinidade pela fase estacionária levam mais tempo para migrarem através da coluna, e com isso terão maiores tempo de retenção. Da mesma forma, composição da fase móvel tem importância, uma vez que influi na ordem de eluição das substâncias presentes em uma amostra, devido à maior ou menor afinidade destas substâncias com a fase móvel. Os analitos, então já separados, chegam ao detector, que produz um sinal eletrônico, e por meio do processamento do mesmo obtemos o pico cromatográfico. O pico cromatográfico pode ser interpretado de modo qualitativo, na identificação do componente através do seu tempo de retenção, e quantitativo, pois a altura ou área do pico é proporcional a sua concentração. (CIOLA, 1998, SKOOG et al., 2002).

Métodos de cromatografia líquida são amplamente empregados para a determinação de antibióticos, pois eles são seletivos, reprodutivos e robustos. Eles podem ser empregados como métodos indicadores de estabilidade, uma vez que eles permitem a determinação de um antibiótico na presença de seus produtos de degradação.

Na técnica cromatográfica, quanto menor o tamanho da partícula interna que reveste a coluna cromatográfica, maior o número de pratos teóricos, ou seja, é mais eficiente a separação das substâncias que eluem próximas. (CIOLA, 1998, SKOOG et al., 2002). O método de RP-UPLC tem como vantagens o uso de colunas curtas, com partículas de pequeno diâmetro, que resulta em aumento da eficiência da separação, além de possibilitar uma separação com um menor tempo de retenção, que proporcional maior rapidez na análise das amostras. Além disso, temos pouca quantidade de amostra utilizada e baixo consumo de reagentes utilizados na fase móvel.

Resultados analíticos representam uma parte muito importante no programa do controle de qualidade. Decisões de aceitação ou rejeição de um produto farmacêutico são baseadas nos resultados analíticos. Neste contexto, a estimativa da incerteza é uma ferramenta muito útil para avaliar a qualidade da medição analítica e a

conformidade (ou não conformidade) do produto farmacêutico e a avaliação da equivalência farmacêutica.

As incertezas nos resultados podem surgir de muitas possíveis fontes, incluindo a amostragem, o efeito da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas de massa e equipamento volumétrico, incertezas de equipamento espectrofotométrico e cromatográfico, incertezas na resposta biológica e microbiológica, pureza dos reagentes e substâncias químicas de referências, validação do método e variabilidade randômica (ANGLOV et al., 2003, LEITO et al., 2002, LOURENÇO et al., 2005, LOURENÇO 2012, LOURENÇO et al., 2004, LOURENÇO et al., 2012, LOURENÇO et al., 2007, NIEMI et al., 2001, SOOVÄLI et al., 2006, LOURENÇO 2013, OKAMOTO et al., 2013, HSU 2010).

O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (RP-UPLC) indicando a estabilidade para a determinação de linezolida em preparações farmacêuticas e estimar a medição da incerteza.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Accela, Thermo Corporation) equipado com bomba quaternária, autoamostrador, detector de arranjo de diodo (DAD), e coluna cromatográfica Hypersil Gold C18 de fase reversa (Thermo Corporation) com 50 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano com tamanho da partícula de 1,9 µm e número de série 0806248X7. Balanças analíticas (Mettler Toledo AG204 e Shimadzu, AUY220) foram usadas para pesagem do padrão de linezolida. Balões volumétricos (10 mL, 50 mL, 100 mL e 200 mL) (Pyrobras, Vidrolabor, Poliglass e Laborglass) e pipetas volumétricas (1 mL e 5 mL) (Brand e Laborglass) foram usados na preparação do padrão e amostras. Seringas estéreis de 5 mL BD Plastipak® e unidades filtrantes Sartorius RC 0,45 µm foram usadas para a filtração das alíquotas das amostras transferidas aos vials (Vial Thermo Scientific). Ultrapurificador de água Millipore Milli Q Gradient foi usado para o fornecimento de água ultrapurificada. Provetas de 100 mL e 500 mL (Nalgon) foram usadas para medir os volumes de acetonitrila e água da fase móvel. Equipamento de ultrassom e vácuo (Ultrasonik NDI

104 H) foi utilizado para desgaseificar a fase móvel e medidor de pH Gehaka PG1800 para medir o seu pH. Micropipeta automática (100 a 1000 µL) (Surepette) foi utilizada para transferir alíquotas de soluções ácidas e térmicas nos testes conjugados. Câmara de luz UV, refrigerador Eletrolab, Estufa Nova Ética foram usados nos ensaios de degradação.

2.2 Reagentes

O padrão de referência da linezolida (lote: 020M4707V e pureza 99,5 %) foi adquirido da Sigma-Aldrich, e a solução injetável de linezolida Zyvox® (2 mg/mL) foi obtida da Pfizer. Acetonitrila grau HPLC e o ácido trifluoracético (TFA) foram adquiridos por Carlo Erba e Merck respectivamente.

3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE RP-UPLC

3.1 Testes de caracterização

Vários testes foram realizados em ordem para caracterizar a amostra de Zyvox®, incluindo a identificação por espectrofotometria em UV (Thermo, Evolution 201 Spectrophotometer), medição do pH (Gehaka PG1800), determinação do volume, medida do material particulado (Particle Measurement System, APSS 2000), teste de esterilidade e teste de endotoxina bacteriana. Todos os testes foram realizados de acordo com a farmacopeia americana e a brasileira (USP, 2012; ANVISA, 2010).

3.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

Para determinação da fase móvel a ser utilizada nos ensaios de RP-UPLC, foram realizados ensaios variando a composição de cada um de seus principais componentes e avaliado o efeito que o mesmo iria causar nos seguintes parâmetros cromatográficos: tempo de retenção, área do pico, número de pratos teóricos, assimetria, pureza do pico e resolução. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software Minitab® versão 17.

Foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg do padrão de linezolida em balança analítica e dissolvida com água ultrapurificada em um balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a concentração final da solução química de trabalho (SQT) de 1000 µg/mL.

Transferiu-se uma alíquota de 1000 µL da SQT de 1000 µg/mL utilizando uma micropipeta para um balão volumétrico de 100 mL. Foram feitas duas réplicas, identificadas como A (amostra padrão) e B (amostra submetida à degradação alcalina). A amostra padrão A foi diluída com água ultrapurificada, obtendo-se a concentração final 10 µg/mL. Na amostra B, com auxílio de uma micropipeta foi adicionado 1000 µL de NaOH 0,1N e, em seguida, deixou-se em repouso em temperatura ambiente. Após 2 horas, foi adicionado com auxílio de uma micropipeta, 1000 µL de HCl 0,1N, homogeneizando-se para neutralizar a solução, e diluída com água ultrapurificada obtendo-se a concentração final 10 µg/mL. Alíquotas das amostras A e B foram filtradas usando uma seringa acoplada com uma unidade filtrante de 0,45 µm para um vial, e então foi realizada em triplicata a corrida cromatográfica de cada amostra em cada uma das cinco fases móveis diferentes. As condições cromatográficas foram: Fluxo: 0,5 mL/minuto, volume de injeção: 10 µL, comprimento de onda: 254 nm.

As fases móveis foram feitas no mesmo dia, identificadas conforme a variação em porcentagem da composição dos componentes utilizados: água, acetonitrila e ácido trifluoracético (TFA), conforme mostrado na **Tabela 11**.

Tabela 11. Diferentes composições da fase móvel do ensaio de UPLC.

Fase Móvel	Água (%)	Acetonitrila (%)	TFA (%)
I	85	15	0,5
II	85	15	1,5
III	90	10	1
IV	95	5	0,5
V	95	5	1,5

3.3 Método RP-UPLC para determinação da linezolida

Foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg do padrão de referência de linezolida em balança analítica e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com água ultrapurificada para se obter solução estoque de SQT, com concentração de 100 µg/mL.

A partir da solução estoque de SQT, foram realizadas diluições de forma a se obter concentrações finais de 8, 9, 10, 11 e 12 µg/mL, empregando-se água ultrapurificada como diluente.

As amostras simuladas 10 µg/mL utilizadas nos ensaios de precisão foram preparadas em seis réplicas. Para isso, transferiu-se alíquotas de 5 mL da solução estoque de SQT e 5 mL de solução estoque de placebo para balão volumétrico de 50 mL.

As amostras simuladas (8, 10 e 12 µg/mL) utilizadas nos ensaios de exatidão foram preparadas em triplicata. Para isso, transferiram-se diferentes alíquotas da solução estoque de SQT e 5 mL de solução estoque de placebo para balão volumétrico de 50 mL. Foi diluída também uma alíquota da solução estoque de placebo em um balão de 50 mL para ser utilizada nos ensaios de especificidade/seletividade (Solução placebo).

Alíquotas da solução injetável de linezolida (Zyvox®) foram diluídas em água ultrapurificada para obter a concentração de 10 µg/mL de linezolida, usadas nos ensaios para a determinação de incerteza do método. Todas as soluções foram mantidas protegidas da luz.

A fase móvel composta de água, acetonitrila e TFA (ácido trifluoracético) na proporção de 90:10:1, foi preparada transferindo 450 mL de água ultra purificada para um balão de 1000 mL com auxílio de uma proveta graduada. Adicionou-se 50 mL de acetonitrila com auxílio de uma proveta graduada e 5 mL de TFA com auxílio de uma pipeta e depois a fase móvel foi filtrada a vácuo.

As soluções padrões, amostras simuladas de linezolida e a solução placebo foram filtradas usando uma seringa acoplada com uma unidade filtrante, descartando um pouco para saturar o filtro, transferido cerca de 2 mL de cada solução para um vial identificado. Foi realizada a corrida cromatográfica de cada solução (três réplicas de cada), que tiveram picos e áreas cromatográficas determinadas em equipamento de UPLC (Thermo Scientific Accela Autosampler) com detector de arranjo de díodos (DAD).

As condições cromatográficas foram: Fluxo: 0,5 mL/minuto, volume de injeção: 10 µL, comprimento de onda: 254 nm e coluna cromatográfica utilizada: C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm). O tempo de injeção foi de 6 minutos.

Figura 23. Estrutura química da linezolida

3.4 Validação do método

O método de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (RP-UPLC) foi validado pela avaliação dos parâmetros de especificidade, linearidade, faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e estabilidade das soluções (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

A especificidade foi avaliada pela análise de amostras submetidas às condições de degradação forçadas (ácida, alcalina, oxidativa, térmica e fotolítica). As purezas dos picos também foram avaliadas na especificidade. Soluções contendo 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0 µg /mL de linezolida foram analisadas para avaliar a linearidade e a faixa linear.

A precisão foi determinada em dois níveis: a repetibilidade, onde seis independentes amostras foram preparadas e analisadas no mesmo dia e o desvio padrão relativo foi calculado, e a precisão intermediária onde seis amostras foram preparadas e analisadas em diferentes dias e o desvio padrão relativo foi calculado.

A exatidão foi avaliada com a adição no placebo de quantidades conhecidas da linezolida. O placebo foi preparado pela mistura de quantidades apropriadas de dextrose, citrato de sódio, ácido cítrico e água purificada. A estabilidade das soluções foi determinada através da análise das soluções das amostras imediatamente após as preparações, após 24 horas de estocagem de 2 a 8 °C ou 24 horas de estocagem de 20 a 25 °C.

A robustez do método foi verificada pelas injeções das soluções do padrão de referência e da amostra com mudanças efetuadas nas condições do fluxo, temperatura da coluna e volume de injeção.

Os resultados obtidos com o método UPLC foram comparados com o anteriormente método de espectrofotometria em UV já validado. Estes resultados foram estatisticamente comparados em ordem para avaliar a equivalência entre os métodos de UPLC e UV.

3.5 Estudo de degradação forçada

O teste de estabilidade foi realizado usando condições de degradação forçadas como a ácida, alcalina, oxidativa, térmica e fotolítica. A degradação ácida e alcalina foi realizada com a adição de 5 mL de 0,1 N de HCl ou 0,1 N de NaOH para uma alíquota da solução da amostra injetável de linezolida. Após uma hora as soluções foram neutralizadas e diluídas para a concentração final de 10,0 µg/mL de linezolida. A

degradação oxidativa foi realizada pela adição de 5 mL de H_2O_2 a 3 % para uma alíquota da solução da amostra injetável de linezolida. A degradação térmica foi realizada submetendo uma alíquota da solução da amostra injetável de linezolida em calor seco de 70 °C. A degradação fotoquímica foi realizada submetendo uma alíquota de da solução da amostra injetável de linezolida em uma fonte de luz ultravioleta de 254 nm. Após uma hora, estas soluções foram diluídas para a concentração final de 10,0 µg/mL de linezolida.

Foram realizados testes conjugados para se verificar a degradação da linezolida utilizando diferentes concentrações da base alcalina ou ácida juntamente com diferentes temperaturas e tempos para a reação de degradação, para avaliar se a modificação de alguns parâmetros pode favorecer a estabilidade da forma linezolida ou incentivar a degradação da mesma.

Foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg do padrão de linezolida em balança analítica e dissolvida com água ultrapurificada em um balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a concentração final da solução química de trabalho (SQT) de 1000 µg/mL.

Transferiu-se uma alíquota de 100 µL da SQT de 1000 µg/mL utilizando uma micropipeta em um balão volumétrico de 10 mL.

No ensaio térmico-alcálico, com auxílio de uma micropipeta foi adicionado alíquotas de 100 µL das soluções de NaOH 0,01N, 0,1N e 1N nos respectivos balões conforme o ensaio e colocados em sua respectiva temperatura 5 °C (refrigerador), 37 °C (banho aquecido) ou 70 °C (estufa). O balão T_0 que representa o controle foi diluído com água ultrapurificada, sem a adição da solução de NaOH. Após determinado período de tempo (30 min, 60 min e 90 min), foi adicionado com auxílio de uma micropipeta, 100 µL de HCl 0,01N, 0,1N e 1N nos respectivos balões conforme o valor alcálico adicionado antes para se neutralizar cada uma das soluções e por fim essas soluções foram diluídas com água ultrapurificada para obter a concentração final 10 µg/mL

No ensaio térmico-ácido, com auxílio de uma micropipeta foi adicionado alíquotas de 100 µL das soluções de HCl 0,01N, 0,1N e 1N nos respectivos balões conforme o ensaio e colocados em sua respectiva temperatura 5 °C (refrigerador), 37 °C (banho aquecido) ou 70 °C (estufa). O balão T_0 que representa o controle foi diluído com água ultrapurificada, sem a adição da solução de HCl. Após determinado período de tempo (30 min, 60 min e 90 min), foi adicionado com auxílio de uma micropipeta, 100 µL de NaOH 0,01N, 0,1N e 1N nos respectivos balões conforme o valor ácido adicionado antes para neutralizar cada uma das soluções e por fim as soluções foram diluídas com água ultrapurificada para obter a concentração final 10 µg/mL

Uma alíquota de cada amostra, após o seu tempo de reação foi filtrada usando uma seringa acoplada com uma unidade filtrante de 0,45 μm para um vial, e então foi realizada em triplicata a corrida cromatográfica na fase móvel de composição água, acetonitrila e TFA, na proporção 90:10:1. As condições cromatográficas foram: Fluxo: 0,5 mL/minuto, volume de injeção: 10 μL , comprimento de onda: 254 nm.

3.6 Identificando as fontes de incertezas

O diagrama causa e efeito das fontes de incerteza é mostrado na **Figura 24**. As fontes de incerteza consideradas mais importante foram associadas com a preparação do padrão, a preparação da amostra, área dos picos das soluções do padrão e da amostra e o método de validação.

Figura 24. Diagrama de causa e efeito para determinação de linezolida pelo método de RP-UPLC.

A fontes de incertezas da preparação do padrão incluem a peso do padrão de referência da linezolida, a pureza do padrão de referência da linezolida, os balões volumétricos (50 e 100 mL) e pipetas volumétricas (5 mL) usadas na preparação do padrão. As fontes de incerteza na preparação da amostra incluem o balão volumétrico (200 mL) e pipeta volumétrica (1 mL) usadas na preparação da amostra. A incerteza associada com a área dos picos das soluções do padrão e da amostra foi estimada

baseada no desvio padrão de três injeções. Três tipos de fontes de incerteza foram considerados na validação do método: a linearidade, a precisão e a exatidão.

O procedimento para estimar a incerteza do método UPLC para a determinação da linezolida foi validado pela realização de simulações de Monte Carlo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e validação do método

Os resultados dos testes de caracterização indicaram que a linezolida estava presente na amostra de Zyvox®, o pH encontrado foi de 4,2 e a amostra estava de acordo com o teste de material particulado, determinação de volume, teste de esterilidade e o teste de endotoxina.

Foi verificado que a fase móvel III de composição água, acetonitrila e TFA (na respectiva proporção 90:10:1) apresentou o menor tempo de retenção para o padrão de linezolida e uma excelente separação do seu respectivo produto de degradação conforme **Figura 25**.

Figura 25. Mostrando o padrão de linezolida e seu respectivo produto de degradação na fase móvel de composição água, acetonitrila e TFA (90:10:1).

De acordo com as análises obtidas com o software Minitab® versão 17, quando aumenta a proporção da fase móvel entre a acetonitrila e a água, diminui o tempo de retenção da linezolida e seus respectivos produtos de degradação, devido a uma maior afinidade pela fase móvel do que a fase estacionária da coluna. Quando

aumenta a proporção de TFA, aumenta o tempo de retenção da linezolida, devido uma diminuição do pH do meio, e consequentemente, um deslocamento do equilíbrio químico para a forma não ionizada do fármaco, que tem mais afinidade pela fase apolar da coluna estacionária. Na **Figura 26**, é mostrado como os componentes da fase móvel (proporção de acetonitrila/água e concentração de TFA) afetam o tempo de retenção do fármaco.

Também foi observado um aumento do número de pratos teóricos, evidenciando uma separação mais eficiente quando aumenta a proporção da fase móvel entre a acetonitrila/água e aumenta a proporção de TFA, como mostrado na **Figura 27**.

Figura 26. Mostra a interação entre a variação composição da fase móvel acetonitrila/ água e a proporção de TFA utilizada, em relação ao tempo de retenção da linezolida na técnica de RP-UPLC.

Figura 27. Mostra a interação entre a variação composição da fase móvel acetonitrila/ água e a proporção de TFA utilizada, em relação ao número de pratos teóricos dos produtos de degradação da linezolida na técnica de RP-UPLC.

Segundo o software Minitab® versão 17, a proporção da fase móvel água, acetonitrila e TFA na proporção de 90:10:1 apresentou uma separação otimizada, com um tempo de retenção relativamente curto tanto para a linezolida (cerca de 1,5 minutos), quanto ao seus produtos de degradação, além da eficiência na separação através do número de pratos teóricos, e parâmetros como área, assimetria, pureza dos picos e a resolução entre os picos.

Os cromatogramas das amostras submetidas às condições de estresse são mostrados na **Figura 28**. De acordo com os resultados, a linezolida foi degradada após a exposição à luz, resultando em uma solução amarelada. A linezolida submetida à degradação alcalina mostrou uma significativa degradação com picos de tempos de retenção relativos de cerca de 0,6. Os resultados da amostra submetida à degradação oxidativa mostrou picos com tempos de retenção relativos de cerca de 0,2. Amostras submetidas às condições de estresse ácida ou térmica não mostraram degradação significativa (**Tabela 12**). Produtos de degradação podem ser formados devido à hidrólise do grupo amido e ou à clivagem da ligação 1-5 (**ver Figura 23**). Entretanto, estudos complementares devem ser realizados em ordem para identificar os produtos de degradação. O método UPLC mostrou boa especificidade.

O método de UPLC foi linear na faixa entre 8,0 e 12,0 µg/mL de linezolida. A curva de calibração do padrão (**Figura 29**) mostrou coeficiente de regressão (r^2) de

0,9985 e equação linear de $y = 181,423x + 52,261$. De acordo com a análise residual (p -valor = 0,375), os resultados mostraram ajuste satisfatório para o modelo de regressão linear.

A **Tabela 13** apresenta os resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método de UPLC. A repetibilidade encontrada foi de 0,89 % e a precisão intermediária de 0,66 %. Resultados estatísticos indicam uma diferença não significativa do desvio padrão relativo para ambos os dias (p -valor de 0,658).

O método de UPLC foi exato, mostrando exatidão entre 98,07 % e 99,03 % (**Tabela 14**). De acordo com o teste estatístico, a exatidão do método mostrou que estava entre 97 e 103 % (teste *t-Student* duplo unilateral com p -valor = 0,010).

Figura 28. Cromatogramas das amostras submetidas às condições de estresse: placebo (A), amostra controle (B), ácida (C), alcalina (D), térmica (E), oxidação (F) e fotolítica (G).

Tabela 12. Determinação de linezolida em amostras submetidas nas condições de estresse (ácida, alcalina, oxidativa, térmica e fotolítica).

Degradação	Pico de degradação	Pureza do pico	Pratos teóricos	Assimetria	Resolução
Ácida	Sim (TRR 0,6 e 0,7)	0,990	3461	1,7	5,5
Alcalina	Sim (TRR 0,6)	1,000	3571	1,7	7,5
Oxidativa	Sim (TRR 0,2)	0,987	3488	1,7	5,0
Fotolítica	Sim (TRR 0,4 e 0,5)	0,960	2571	0,9	8,3
Térmica	Sim (TRR 0,6)	0,990	3558	1,7	7,7
Controle	Não	0,991	3532	1,7	0,0

TRR = tempo de retenção relativo

Tempo de retenção da linezolida é cerca de 1,5 minutos.

Figura 29. Curva de calibração padrão (Área x Concentração em µg/mL de linezolida) do método de RP-UPLC para a determinação de linezolida.

Tabela 13. Resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) no método de RP-UPLC para determinação da linezolida.

Réplicas	1º dia (Repetibilidade) %	2º dia (Precisão intermediária) %
1	94,03	93,87
2	93,09	94,36
3	94,83	93,74
4	95,02	94,36
5	94,38	93,98
6	93,09	93,84

Os resultados indicam que as soluções das amostras foram estáveis se estocadas em refrigerador (2 a 8 °C) ou temperatura ambiente (20 a 25 °C), como mostrado na **Tabela 15**. Resultados estatísticos não mostraram diferença significativa entre as soluções das amostras analisadas imediatamente após a preparação e depois de 24 horas estocadas entre 2 a 8 °C (p-valor = 0,708) e entre soluções das amostras analisadas imediatamente após a preparação e depois de 24 horas estocadas entre 20 a 25 °C (p-valor = 0,747).

Tabela 14. Resultados da exatidão do método de RP-UPLC para determinação da linezolida.

Concentração (µg/mL)	Recuperação*	Exatidão* (%)
8,0	7,90	98,74
10,0	9,81	98,07
12,0	11,88	99,03

*Média de três independentes determinações

Tabela 15. Resultados da estabilidade das soluções das amostras de linezolida após a estocagem por 24 horas em refrigerador (2 a 8 °C) ou em temperatura ambiente (20 a 25 °C).

Condições	Imediatamente após a preparação (%)	Após a estocagem por 24 horas (%)
Refrigeração	94,03	94,02
	93,09	93,68
	94,83	93,51
Temperatura ambiente	95,02	93,09
	94,38	93,57
	93,09	94,68

O método de RP-UPLC para determinação de linezolida foi robusto, não mostrando diferença significativa entre os resultados obtidos pela injeção das soluções do padrão de referência e da amostra com mudanças deliberadas nas condições de fluxo, temperatura da coluna e volume de injeção (**Tabela 16**).

Os resultados do conteúdo de linezolida em solução injetável obtidas pelos métodos de RP-UPLC e espectrofotometria em UV estão apresentados na **Tabela 17**. De acordo com o teste estatístico, os resultados do RP-UPLC e da espectrofotometria em UV foram equivalentes (teste *t-Student* duplo unilateral com p-valor = 0,000, considerando $\Delta = 1\%$).

Tabela 16. Resultados da robustez do método de RP-UPLC para determinação da linezolida.

Condições	Resultados (%) (DPR (%))*
Controle (0,50 mL/min; 25 °C; 10 µL)	89,78 (1,49)
Fluxo baixo (0,25 mL/min; 25 °C; 10 µL)	90,52 (0,13)
Fluxo alto (0,75 mL/min; 25 °C; 10 µL)	90,57 (0,23)
Temperatura baixa (0,50 mL/min; 20 °C; 10 µL)	90,48 (0,27)
Temperatura alta (0,50 mL/min; 30 °C; 10 µL)	90,33 (0,63)
Volume baixo (0,50 mL/min; 25 °C; 5 µL)	90,70 (0,26)
Volume alto (0,50 mL/min; 25 °C; 15 µL)	90,62 (0,05)

DPR = Desvio padrão relativo

*Média de três determinações independentes

Tabela 17. Resultados do conteúdo de linezolida em soluções injetáveis obtidas pelos métodos de RP-UPLC e espectrofotometria em UV.

Amostra	Método UV (%)	Método UPLC (%)
A	93,62	94,03
B	93,80	93,09
C	93,62	94,83
D	92,68	95,02
E	92,68	94,38
F	93,62	93,09

4.2 Degradação Térmico-alcalina

Como podemos observar na **Figura 30**, com a utilização da solução de concentração de 0,01N de NaOH, a mesma só provocou a degradação da linezolida, quando foi combinada com uma temperatura de 70 °C, o que não se observou nas soluções de 0,01 N quando sobre refrigeração de 5 °C, que garantiu uma maior estabilidade do produto, evitando a sua degradação. Quando a solução de concentração 1 N foi combinada com uma temperatura de 5 °C, devido a alta alcalinidade que foi exposta a linezolida, a mesma foi degradada aparecendo um pico do produto de degradação B. Semelhantemente, quando aumentamos a temperatura para 70 °C ocorre a formação de um segundo produto de degradação C, e degradação da linezolida quase que completamente.

Figura 30. Amostra de linezolida, submetida a diferentes condições do ensaio conjugado de degradação térmico-alcálico.

Portanto um aumento de temperatura, irá aumentar a ação da solução de NaOH, na degradação da linezolida, e, conseqüentemente, ocasionando a formação de seus principais produtos de degradação, identificados como produtos B e C, como mostrado na **Tabela 18**.

Tabela 18. Ensaio de degradação conjugado térmico-alcálico do método RP-UPLC.

Concentração	Tempo (min.)	Temperatura	Área da Linezolida%	Área do prod. degrad. B %*	Área do prod. degrad. C %**
Controle	0	Ambiente	100,0	ND	ND
0,01N	30	5°C	101,5	ND	ND
0,01N	90	5°C	101,7	ND	ND
0,01N	30	70°C	97,7	3,7	ND
0,01N	90	70°C	91,2	10,3	ND
0,1N	60	37°C	59,3	37,9	ND
1N	30	5°C	77,5	23,5	ND
1N	90	5°C	53,9	42,4	ND
1N	30	70°C	1,9	76,3	15,3
1N	90	70°C	0,5	61,2	44,2

ND = não detectado / *porcentagem de produto de degradação B calculada considerando-se uma absorvidade relativa de 1,80 / **porcentagem de produto de degradação C calculada considerando-se uma absorvidade relativa de 1,07.

4.3 Degradação Térmico-ácida

Como podemos observar na **Figura 31**, somente com a utilização de soluções de concentração elevada (1 N de HCl) combinada com temperaturas altas (70 °C) houve uma mínima degradação da linezolida, o que não se observou nas outras soluções ácidas diluídas e em temperaturas baixas. Quando a solução de concentração 1 N foi combinada com uma temperatura de 5 °C, mesmo com a alta acidez que foi exposta a linezolida, a mesma não foi degradada.

Portanto, mesmo um aumento de temperatura, irá pouco contribuir com a solução concentrada de HCl, na degradação da linezolida, e, conseqüentemente, na formação de seus principais produtos de degradação, identificados como produtos D e E, como mostrado na **Tabela 19**.

Figura 31. Amostra de linezolida, submetida a diferentes condições do ensaio conjugado de degradação térmico-ácido.

Tabela 19. Ensaio de degradação conjugado térmico-ácido do método RP-UPLC.

Concentração	Tempo (min.)	Temperatura	Área da Linezolida%	Área do prod. degrad. D %*	Área do prod. degrad. E %*
Controle	0	Ambiente	100,0	-	-
0,01N	30	5°C	102,0	-	-
0,01N	90	5°C	102,5	-	-
0,01N	30	70°C	102,4	-	-
0,01N	90	70°C	102,0	-	-
0,1N	60	37°C	103,0	-	-
1N	30	5°C	101,6	-	-
1N	90	5°C	102,9	-	-
1N	30	70°C	97,0	3,2	-
1N	90	70°C	92,0	-	9,6

ND = não detectado / *porcentagem de produtos de degradação D e E calculadas considerando-se uma absorvidade relativa de 1,00.

4.4 Quantificando os componentes de incerteza.

Os componentes de incerteza para a determinação de linezolida pelo método RP-UPLC são listados na **Tabela 20**.

Uma quantidade de 10,1 mg do padrão de referência da linezolida foi pesado em uma balança analítica. A incerteza na pesagem foi 0,1 mg, com um fator de abrangência de 2, segundo o certificado de calibração da balança.

A pureza do padrão de referência como mostrado no certificado é 99 %, isto é, 0,995 em valor absoluto. A incerteza é de 0,005, com distribuição retangular.

A incerteza dos balões volumétricos e pipetas volumétricas foram obtidas pelos certificados de calibração, com um fator de abrangência de 2.

Tabela 20. Componentes da incerteza na determinação de linezolida por RP-UPLC.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	Valor nominal	Incerteza estimada	Incerteza padrão
Preparação do padrão	Peso do padrão de referência	10,1 mg	0,1 mg	0,05 mg
	Pureza do padrão de referência	0,995	0,005 ^a	0,0029
	Balão volumétrico de 100 mL	100,0 mL	0,2 mL	0,1 mL
	Pipeta volumétrica de 5 mL	5,00 mL	0,02 mL	0,01 mL
	Balão volumétrico de 50 mL	50,0 mL	0,1 mL	0,05 mL
Preparação da amostra	Pipeta volumétrica de 1 mL	1,000 mL	0,004 mL	0,002 mL
	Balão volumétrico de 200 mL	200,0 mL	0,4 mL	0,2 mL
Área do pico	Solução do padrão	1.826.426	9055	9055
	Solução da amostra	1.705.013	1235	1235
Validação do método	Linearidade	1,0000	0,0069	0,0069
	Exatidão	0,9862	0,0036	0,0036
	Precisão	1,0000	0,0066	0,0066

^aDistribuição retangular

A equação de incerteza para a preparação do padrão de referência é mostrado como a seguir:

A equação da incerteza da preparação do padrão é mostrada a seguir:

$$u(s) = Cs \times \sqrt{\left(\frac{uws}{ws}\right)^2 + \left(\frac{uPot}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u100vf}{100}\right)^2 + \left(\frac{u5vp}{5}\right)^2 + \left(\frac{u50vf}{50}\right)^2}$$

Onde Cs é a concentração do padrão de referência da linezolida, *uws* é a incerteza do peso do padrão de referência, *ws* é o peso do padrão de referência, *uPot* é a incerteza associada com a potência do padrão de referência, *Pot* é a potência do padrão de referência, *u100vf* e *u50vf* é a incerteza dos balões volumétricos de 100 mL e 50 mL, respectivamente e *u5vp* é a incerteza da pipeta volumétrica de 5 mL.

As fontes de incerteza da preparação da amostra incluem a pipeta volumétrica de 1 mL e balão volumétrico de 200 mL obtidos dos certificados de calibração.

A equação da incerteza da preparação da amostra é mostrada a seguir:

$$u(u) = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u1vp}{1}\right)^2 + \left(\frac{u200vf}{200}\right)^2}$$

Onde Cu é a concentração da solução da amostra de linezolida, $u1vp$ é a incerteza da pipeta volumétrica de 1 mL, e $u200vf$ é a incerteza do balão volumétrico de 200 mL.

As incertezas associadas com a área dos picos das soluções do padrão e da amostra foram estimadas baseadas no desvio padrão de três injeções de cada solução, como listada na **Tabela 20**.

A equação da incerteza da área dos picos das soluções do padrão e da amostra é mostrada a seguir:

$$u(u) = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{uAu}{Au}\right)^2 + \left(\frac{uAs}{As}\right)^2}$$

Onde Au e As são as áreas dos picos das soluções da amostra e do padrão, respectivamente, e uAu e uAs são os desvios padrão da área dos picos de três injeções das soluções da amostra e do padrão, respectivamente.

A incerteza da linearidade foi estimada baseada no erro residual da análise de regressão linear. De acordo com os resultados do método de validação, a equação linear foi $y = 181,423x + 52,261$, com um coeficiente de regressão (r^2) de 0,9985 e um erro residual (s) de 12,515. A incerteza padrão associada com a linearidade foi 0,0069, como listada na **Tabela 20**.

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: (a) repetibilidade e (b) precisão intermediária. De acordo com os resultados do método de validação, a precisão do método RP-UPLC para determinação da linezolida foi de 0,66 %. A incerteza da precisão foi 0,0066, como listada na **Tabela 20**.

De acordo com os resultados do método de validação a exatidão do método foi de 98,62 %. A incerteza da exatidão foi assumida para ser o desvio padrão do teste de exatidão (0,36 % ou 0,0036), como listada na **Tabela 20**.

A equação da incerteza do método de validação é apresentada a seguir:

$$u(v) = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{uLin^2 + uPr^2 + \left(\frac{uAcc}{Acc}\right)^2}$$

Onde Acc é a exatidão do método, u_{Lin} é a incerteza da linearidade, u_{Pr} é a incerteza da precisão e u_{Acc} é a incerteza da exatidão.

Os valores intermediários, suas incertezas padrão e suas incertezas relativas padrão estão resumidas na **Tabela 21**. Usando esses valores, a quantidade (%) da linezolida na solução injetável (2 mg/mL) foi calculada como descrita abaixo:

$$\% = \left(\frac{Au}{As} \right) \times \left(\frac{Cs}{Cu} \right) \times 100$$

Onde Au e As são as áreas dos picos das soluções da amostra e do padrão respectivamente, Cs é a concentração da solução padrão e Cu é a concentração da solução da amostra.

Tabela 21. Valores intermediários, suas incertezas padrão e suas incertezas padrão relativas.

Descrição	Valor intermediário	Incerteza do padrão	Incerteza relativa padrão
Área do pico da solução da amostra (Au)	1.705.013	1235	0,001
Área do pico da solução do padrão (As)	1.826.426	9055	0,005
Concentração da solução do padrão (Cs)	0,01005	0,00006	0,006
Concentração da solução da amostra (Cu)	0,01000	0,00002	0,002
Validação do método	1,0140	0,0104	0,010

A incerteza combinada é calculada como mostrada a seguir:

$$u(\%) = \% \times \sqrt{\left(\frac{uAu}{Au} \right)^2 + \left(\frac{uAs}{As} \right)^2 + \left(\frac{uCs}{Cs} \right)^2 + \left(\frac{uCw}{Cu} \right)^2 + u(v)^2}$$

Onde $u(\%)$ é a incerteza combinada, uAu é o desvio padrão da área dos picos da solução da amostra, Au é média da área dos picos da solução da amostra, uAs é o desvio padrão da área dos picos da solução padrão, As é média da área dos picos da solução padrão, uCs é a incerteza da concentração da solução padrão, Cs é a concentração da solução padrão, uCw é a incerteza da concentração da solução da amostra, Cu é a concentração da solução da amostra, e $u(v)$ é a incerteza do método de validação.

Alternativamente, a incerteza combinada pode ser calculada usando o método da planilha de cálculo de incerteza, como mostrado na **Tabela 22**.

A contribuição de diferentes parâmetros é mostrada na **Figura 32**. A contribuição da exatidão, precisão, linearidade, área do pico da solução do padrão e peso do padrão de referência da linezolida são os mais significantes, contribuindo com cerca de 86 % da incerteza total. A contribuição associada com o peso do padrão de

referência da linezolida pode ser reduzida se um peso maior (por exemplo, 25mg) do padrão de referência da linezolida for usado na preparação da solução padrão. As outras fontes de incerteza têm pequena influência sobre a incerteza total.

A incerteza expandida (U) foi obtida multiplicando a incerteza combinada padrão (u (%)) com o fator de abrangência igual a 2.

De acordo com os resultados da simulação de Monte Carlo (**Figura 33**), o procedimento para estimação da medição de incerteza para o método UPLC pode ser considerado apropriado. O resultado final em seu intervalo de confiança de 95 % estimada pelo procedimento Eurachem encontrado foi de $95,13 \pm 2,51$ % enquanto pela simulação de Monte Carlo foi de $95,14 \pm 2,46$ %.

Figura 32. Contribuições da incerteza para determinação de linezolida por UPLC.

Figura 33. Distribuição de frequência da simulação de Monte Carlo para determinação de linezolida pelo método UPLC.

Tabela 22. Planilha de cálculo de incerteza.

		<i>Ws</i>	<i>Pot</i>	<i>100vf</i>	<i>5vp</i>	<i>50vf</i>	<i>1vp</i>	<i>200vf</i>	<i>As</i>	<i>Au</i>	<i>Lin</i>	<i>Acc</i>	<i>Pr</i>
	Valor	10,10	99,50	100,0	5,00	50,00	1,000	200,0	1.826.426	1.705.013	1,0000	0,9862	1,0000
	Incerteza	0,05	0,29	0,1	0,01	0,05	0,002	0,2	9055	1235	0,0069	0,0036	0,0066
<i>ws</i>	10,10	10,15	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
<i>Pot</i>	99,50	99,50	99,79	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50	99,50
<i>100vf</i>	100,0	100,0	100,0	100,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>5vp</i>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,01	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
<i>50vf</i>	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,05	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
<i>1vp</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,002	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>200vf</i>	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,2	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
<i>As</i>	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.835.481	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426
<i>Au</i>	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.706.248	1.705.013	1.705.013	1.705.013
<i>Lin</i>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0069	1,0000	1,0000
<i>Acc</i>	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9898	0,9862
<i>Pr</i>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0066
%	95,13	95,60	95,40	95,03	95,32	95,03	94,94	95,22	94,66	95,20	95,78	94,78	95,76
u		0,47	0,28	-0,10	0,19	-0,10	-0,19	0,10	-0,47	0,07	0,66	-0,35	0,63
u ²	1,57	0,22	0,08	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,22	0,00	0,43	0,12	0,40
u = 1,25 %		K = 2,00					U = 2,51 %						

4. CONCLUSÕES

No desenvolvimento do método de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (RP-UPLC) foi usada uma coluna cromatográfica C18 com 50 mm de comprimento, 1,0 mm de diâmetro e tamanho da partícula de 1,9 μ m, trabalhando nas seguintes as condições cromatográficas: Fluxo: 0,5mL/minuto, volume de injeção: 10 μ L e comprimento de onda: 254 nm. O tempo de retenção da linezolida encontrado foi cerca de 1,5 minutos e tempo total de corrida cromatográfica de 6 minutos.

Para determinação da fase móvel utilizada no ensaio de RP-UPLC, foram feitos ensaios variando a composição de cada um de seus principais componentes e segundo a análise estatística realizada empregando-se o software Minitab® versão 17, a proporção da fase móvel água, acetonitrila e TFA na proporção de 90:10:1 apresentou uma separação otimizada, com um tempo de retenção relativamente curto tanto para a linezolida, quanto aos seus produtos de degradação. Além disso, a eficiência na separação foi avaliada por meio do número de pratos teóricos, e parâmetros como área, assimetria, pureza dos picos e a resolução entre os picos foram adequados.

O método desenvolvido e otimizado foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, sendo que as amostras de linezolida submetidas condições de estresse alcalina e oxidativa mostraram significativa degradação com picos de tempos de retenção relativos de cerca de 0,6 e 0,2 respectivamente. Já as amostras submetidas às condições de estresse ácida e térmica não apresentaram degradação significativa.

Foram realizados testes conjugados (térmico-alcalino e térmico-ácido) para se verificar a degradação da linezolida utilizando diferentes concentrações da base alcalina ou ácida, juntamente com diferentes temperaturas e tempos para a reação de degradação, no qual foi observado que um aumento de temperatura irá aumentar a ação da solução de NaOH na degradação da linezolida, levando a formação dos produtos de degradação B e C. Este fenômeno não foi observado no teste térmico-ácido, ou seja, um aumento de temperatura não resultou em aumento da degradação da linezolida, mesmo nas concentrações mais altas de HCl. Entretanto, o aumento da concentração de HCl resultou em leve degradação da linezolida, levando a formação dos produtos de degradação D e E.

Após a otimização das condições cromatográficas, o método demonstrou-se seletivo, linear, preciso e exato. Além disso, o método de RP-UPLC para determinação de linezolida foi robusto, não mostrando diferença significativa entre os resultados obtidos

pela injeção das soluções do padrão de referência e da amostra com mudanças efetuadas nas condições de fluxo, temperatura da coluna e volume de injeção

O método RP-UPLC pode ser uma alternativa no controle de qualidade nas formas farmacêuticas contendo linezolida, uma vez que não há um método oficial descrito, apresenta como vantagens o fato de ser rápido, robusto, utilizar fase móvel composto com baixa concentração de solventes orgânicos (aproximadamente 90 % da fase móvel é composta por água) e ser reprodutivo nos ensaios de rotina para a identificação e quantificação deste fármaco e de seus produtos de degradação. Por outro lado, sua limitação reside no alto custo da aquisição do equipamento, da coluna cromatográfica e de consumíveis de forma geral.

A medida de incerteza encontrada foi razoável para o propósito do método. Considerando a conformidade entre o procedimento Eurachem e a simulação de Monte Carlo, ambos os métodos podem ser empregados na estimação da incerteza de medição para a determinação de linezolida pelo método RP-UPLC.

**PARTE IV–Desenvolvimento,
otimização e validação de ensaio em
microplaca para determinação da
potência de linezolid e sua incerteza
de medição**

PARTE IV–Desenvolvimento, otimização e validação de ensaio em microplaca para determinação da potência de linezolida e sua incerteza de medição

RESUMO

No método microbiológico por turbidimetria ou colorimetria o meio de cultura é líquido, portanto não há os efeitos da difusão do antibiótico, pois o mesmo é adicionado a uma suspensão de um micro-organismo sensível, e após o período de incubação o mesmo é submetido à leitura em equipamento apropriado. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, aperfeiçoar e validar um método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética para determinar a potência relativa da linezolida e além disso, foi também descrito um procedimento para estimar a medição de incerteza desse método baseado na variabilidade da resposta microbiológica. A influência da composição do meio de cultura foi estudada usando um planejamento fatorial e um planejamento de compósito central foi adotado para estudar a influência das proporções do inóculo do micro-organismo e das soluções aquosas de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) no crescimento microbiano. Como parte do desenvolvimento e otimização do ensaio microbiológico, foi estabelecido o *design space* em relação à inibição do crescimento das doses baixa, média e alta de linezolida, e aos controles positivo e negativo, a inclinação, a interceptação, e a linearidade do padrão e das amostras nas curvas de dose resposta. De acordo com a otimização dos resultados, a abrangência do *design space* foi estabelecida usando os seguintes parâmetros: as soluções do padrão de referência e amostras simuladas da linezolida nas doses baixa (1,0 µg/mL), média (2,0 µg/mL) e alta (4,0 µg/mL), a utilização do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em um inóculo a 10% medidos com uma transmitância de 35 ± 2 % em 580 nm, o meio de cultura antibiótico nº 3 com pH = $7,0 \pm 0,1$, incubação da microplaca por 6 horas com agitação de 500 rpm e temperatura de $37,0 \pm 0,1$ °C, adição de 50 µL da solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % e leitura da absorbância em 630 nm. O método foi linear ($r^2 = 0,992$), específico, preciso com repetibilidade de 2,3 % e a precisão intermediária de 4,3 %, exato com média de recuperação de 101,4 % e robusto. A medição da incerteza geral foi satisfatória considerando a alta variabilidade inerente à resposta microbiológica. O método desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação da potência de linezolida em preparações farmacêuticas e pode ser utilizado por laboratórios na rotina do controle de qualidade.

1. INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos são frequentemente usados como conservantes nos alimentos, nos medicamentos e produtos industriais, em hospitais para a desinfecção de superfícies, de instrumentos e tecidos e no tratamento de doenças infecciosas. O uso clínico dos agentes antimicrobianos é um assunto de grande importância devido ao surgimento de cepas resistentes. O sucesso de uma terapia antimicrobiana é relatado devido à atividade biológica do agente antimicrobiano usado. Uma redução da atividade antimicrobiana pode revelar leves alterações que não demonstradas através dos métodos químicos (CHAMBERS et al., 2006, GUIMARÃES et al., 2010, BUTLER et al., 2011).

Ensaio microbiológicos para determinar a potência relativa dos antibióticos são importantes ferramentas para se avaliar a eficácia terapêutica, bem como determinar a sua equivalência farmacêutica (ZULUAGA et al., 2009, AGUDELO et al., 2012, VESGA et al., 2012).

Além do ensaio microbiológico de difusão em ágar para se determinar a potência dos antibióticos, há também o ensaio turbidimétrico ou colorimétrico onde o meio de cultura é líquido, portanto não há os efeitos da difusão do antibiótico, pois o mesmo é adicionado a uma suspensão de um micro-organismo sensível, e após o período de incubação o mesmo é submetido à leitura em equipamento apropriado. Porém alguns aspectos importantes com esse ensaio devem ser tomados, como a agitação durante o período de incubação de modo que a suspensão microbiana que está em crescimento, não fique depositada no fundo do tubo. Além disso, é importante a temperatura, o pH do meio e o tempo de incubação. Nesses testes faz-se necessário a inclusão dos controles positivo e negativo, que são incubados nas mesmas condições das amostras testadas (PINTO et al., 2010). Os ensaios microbiológicos são amplamente usados na avaliação da atividade antimicrobiana de várias classes de antibióticos e agentes antimicrobianos (PAZUR, 1999, DANG et al., 2010, LOURENÇO et al., 2011, DAFALE et al., 2012, TÓTOLI et al., 2013, DAFALE et al., 2013, GHISLENI et al., 2014, PEDROSO et al., 2014).

Nas recentes décadas um grande esforço foi feito para desenvolver um método rápido e confiável para o ensaio microbiológico. Os sais de tetrazólio, resazurina e outros indicadores de oxi-redução foram usados para esse propósito, porque eles são metabolizados somente por células viáveis. Em outras palavras, a resposta medida (por exemplo, a mudança de cor) é proporcional com o crescimento microbiano e

consequentemente com a atividade antimicrobiana (BARLETT, et al., 1976, OHARA et al., 1993, OHARA et al., 1995, YAMAMOTO et al., 1996, SMITH et al., 1998, PROCTOR et al., 2001, GABRIELSON et al., 2003, SARKER et al., 2007, XIAO et al., 2007, LIU et al., 2007, KLANCNIK et al., 2010, FRANCISCO et al., 2014).

O cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) é uma substância incolor solúvel em água e quando é reduzido pelas enzimas dehidrogenases de células metabolicamente ativas adquire a coloração avermelhada devido à formação do precipitado formazan (trifenilformazan ou TPF). Esta reação é irreversível e pode ser quantificada usando um espectrofotômetro, pois a intensidade da coloração depende da atividade enzimática das células bacterianas viáveis, por isso os sais de tetrazólio são conhecidos como marcadores de vitalidade (AL-ARAJI et al., 2015). A **Figura 34** mostra a abertura do anel heterocíclico do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e a formação do formazan com sua cadeia característica de átomos $-N=N-C=N-NH-$ (AL-ARAJI et al., 2015).

Figura 34. Esquema da redução sofrida pelo cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) através das enzimas dehidrogenases presentes em células microbianas viáveis e a formação do formazan (Adaptado de AL-ARAJI et al., 2015).

Nos ensaios de doseamento microbiológico em microplacas com leitura cinética para a determinação da linezolida foi utilizado uma microplaca com 96 poços onde foram colocadas as diferentes concentrações do antibiótico, o meio inoculado com uma suspensão de micro-organismo sensível ao antibiótico, por um determinado período de incubação, com agitação e temperatura constante e após este período foi adicionada a solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). É importante observar que embora o uso do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) possa inibir o crescimento microbiano, devido a sua toxicidade em altas concentrações, o mesmo quando é adicionado ao final do teste

não influi nas respostas obtidas (absorbância) e, portanto não invalida os testes (OHARA et al., 1993, FRANCISCO et al., 2014), pois é utilizado apenas para revelar o crescimento de forma mais rápida.

Tradicionalmente, o desenvolvimento de métodos analíticos tem envolvido a influência de um fator por vez nos resultados experimentais. Essa aproximação pode ser tediosa e lenta, e em adição a isso, não inclui a interação entre os efeitos e as variáveis estudadas. O planejamento fatorial e a metodologia de superfície resposta (RSM) podem ser útil na otimização das condições analíticas e na delimitação de um *design space* que estabelece os melhores resultados da resposta experimental (HANRAHAN et al., 2006, SRINUBABU et al., 2007, BEZERRA et al., 2008). Apesar desses benefícios, o planejamento fatorial e a metodologia de superfície resposta (RSM) têm sido pouco usados no desenvolvimento dos ensaios microbiológicos (SAVIANO et al., 2014, FRANCISCO et al., 2014). O planejamento fatorial e a metodologia de superfície resposta (RSM) são os componentes chaves da abordagem da Qualidade por *Design* (QbD), pois eles dão informações que permitem entender o processo e controlá-lo usando uma abordagem científica robusta e um gerenciamento de risco da qualidade. Em outras palavras o planejamento fatorial e a metodologia de superfície resposta (RSM) permitem entender como a variação das condições experimentais pode afetar os resultados analíticos. Então as condições experimentais do *design space* podem ser determinadas para garantir a reprodutibilidade do método e estabelecer os resultados analíticos confiáveis (ICH, 2009).

Embora os métodos analíticos desenvolvidos usem o conceito da Qualidade por *Design* (QbD) que estabelece resultados confiáveis, um resultado analítico não está completo a menos que haja uma medida de incerteza associada a este resultado. A estimação da medição da incerteza requer a uma avaliação de todas as possíveis as fontes de incerteza para poder identificar as mais significativas que podem ser usadas para estimar a incerteza combinada (ISO GUM, 2008, EUROCHEM/CITAC, 2012). Essa abordagem pode ser útil porque quase toda a incerteza combinada pode ser controlada por uma fonte maior de incerteza (ISO GUM, 2008, EUROCHEM/CITAC, 2012). As incertezas podem surgir de muitas fontes como na amostragem, nas interferências dos efeitos da matriz, nos aparatos de volume e massa, nas respostas biológicas e microbiológicas, na pureza dos reagentes e substâncias químicas de referência, nas condições ambientais, na validação do método e na variabilidade aleatória (NIEMI et al., 2001, BRÜGGEMANN et al., 2002, CHUI et al., 2002, LEITO et al., 2002, ANGLOV et al., 2003, WUNDERLI, 2003, LOURENÇO et al., 2004, LOURENÇO et al., 2005, SOOVÄLI et

al., 2006, LOURENÇO et al., 2007, HSU, 2010, LOURENÇO, 2012, LOURENÇO et al., 2012, WEITZEL, 2012).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver aperfeiçoar e validar um método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética e determinar a potência relativa da linezolida. Como parte do desenvolvimento e otimização do ensaio microbiológico, foi estabelecido a região de *design space* em relação à inibição do crescimento das doses baixa, média e alta de linezolida, e aos controles positivo e negativo, a inclinação, a interceptação, e a linearidade do padrão e das amostras nas curvas de dose resposta. Adicionalmente, foi também descrito um procedimento para estimar a medição de incerteza para o de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) foi utilizada para pesar o padrão de referência da linezolida. Pipetas volumétricas de 2 mL, 4 mL e 5 mL (Uniglas e Plena-Lab), balões volumétricos de 10 mL, 20 mL, 50 mL e 100 mL (Plena-Lab, Vidrolabor, e Laborglas) foram utilizados para fazer as soluções padrões e amostras simuladas nas concentrações baixa, média e alta da linezolida utilizada nos ensaios de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética.

Os componentes do meio de cultura foram pesados em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H). Os meios de cultura após serem diluídos com água destilada, em frasco tipo Schott de 250 mL (Duran e Laborglas) tiveram seu pH ajustado com o medidor de pH (Gehaka PG1800) e foram esterilizados por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) por equipamento de autoclave (Luferco, 39211).

Tubos de ensaios com tampas, estéreis e não pirogênicos de 5 mL e 14 mL (BD Falcon®), pipetas graduadas estéreis e não pirogênicas de 5 mL, 10 mL e 25 mL (BD Falcon®), micropipeta automática de 100 a 1000 µL (Surepette) e ponteiras estéreis e não pirogênicas (Vista Tip®) foram utilizados para fazer as suspensões do inóculo.

Micropipeta automática de 20 a 200 µL (Surepette) e ponteiras estéreis e não pirogênicas (Vista Tip®) foram utilizadas para transferir as alíquotas das diferentes soluções de padrões e amostras simuladas, bem como as suspensões inoculadas com os

micro-organismos de escolha, nas microplacas com 96 poços estéreis e não pirogênicas (BD Falcon®).

Um espectrofotômetro (Unicam, Helios Epsilon) trabalhando no comprimento de onda de 580 nm, foi utilizado para medir a transmitância do inóculo em $35 \pm 2 \%$.

As microplacas foram mantidos em um agitador e incubador de microplaca (Bioshake iQ) em temperatura de $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e agitação de 500 rpm por um período de 6 horas e tiveram suas absorbâncias medidas no leitor de microplaca (Celer Polares).

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) da suspensão com a transmitância acertada do micro-organismo de escolha, foram pesados meios de cultura (ágar caseína de soja) em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H) e após serem diluídos com água destilada em frasco tipo Schott de 250 mL (Duran e Laborglas), foram esterilizados por vapor úmido (121°C , $1,1 \text{ kgf/cm}^2$ por 15 minutos) por equipamento de autoclave (Luferco, 39211). Placas de Petri de 90 X15 mm esterilizada por raio gama (Inlab) foram inoculadas com o micro-organismo de escolha e incubadas em estufa de cultura (Fanem, 002 CD) por um período de 48 horas e o número de colônias em cada diluição foi contado com o auxílio do contador de colônia (Phoenix CP 600).

2.3 Reagentes

O padrão de referência da linezolida (lote: 020M4707V e pureza 99,5 %) foi adquirido da Sigma-Aldrich. A solução injetável de linezolida 2mg/mL (Zyvox®) utilizada para a medição da incerteza foi adquirida do laboratório Pfizer.

As cepas dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), utilizados como reagentes biológicos foram adquiridos do Instituto Adolfo Lutz.

Os meios de cultura foram preparados com os seguintes componentes: peptona, extrato de levedura e extrato de carne adquiridos da BD Bacto® e o cloreto de sódio, dextrose, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico adquiridos da Inlab.

O cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para preparar a solução aquosa reagente utilizada no ensaio da microplaca foi adquirido pela Inlab.

A dextrose utilizada para fazer a solução placebo e o cloreto de sódio para preparar a solução fisiológica 0,9 % foram adquiridos da Inlab.

2.3 Desenvolvimento e otimização método

O desenvolvimento do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética começou com alguns testes preliminares para se estabelecer as condições iniciais experimentais. A concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida (MBC) da linezolida foram estabelecidas utilizando três diferentes micro-organismos, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), usando o meio de cultura antibiótico N° 3 com pH ajustado para $4,5 \pm 0,1$ (peptona 5,0 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, cloreto de sódio 2,5 g/L, dextrose 1,0 g/L, e fosfato de potássio monobásico 13,6 g/L) e pH de $7,0 \pm 0,1$ (peptona 5,0 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, cloreto de sódio 2,5 g/L, dextrose 1,0 g/L, fosfato de potássio monobásico 1,32 g/L e fosfato dibásico de potássio 3,68 g/L).

Primeiramente foi feita uma solução do padrão de referência da linezolida de 100 µg/mL do qual, para o ensaio do MIC, no qual alíquotas de 20 µL de diluições seqüenciais de 100 a 0,05 µg/mL desse padrão foram colocadas em cada micropoço. Foram transferidos 180 µL do respectivo meio inoculado com a suspensão microbiana de transmitância de 35 ± 2 % em 580 nm, sendo então a microplaca incubada na temperatura de 37 ± 1 °C com agitação de 500 rpm por cerca de 24 horas. Foram feitos também os controle positivo (meios inoculados com a suspensão microbiana) e negativo (com meios estéreis). Antes de colocar a solução aquosa do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % foram retiradas alíquotas de 20 µL de cada micropoço e colocado em outra microplaca no seu respectivo lugar e completadas com 180 µL do respectivo meio estéril para determinação do MBC. A nova microplaca foi também incubada nas mesmas condições do MIC e, ao final, foi adicionada a solução aquosa do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 %.

Tanto o MIC como o MBC foram determinados visualmente através da mínima concentração que não apresentou o crescimento microbiano, no caso a coloração final incolor no micropoço. Baseados nos resultados do MIC e do MBC foi escolhido para o desenvolvimento do método, o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e o meio de cultura antibiótico N° 3 com pH de $7,0 \pm 0,1$, pois a solução incolor de TTC é reduzida para o formazan em pH próximo a 7,0 (OHARA et al., 1993), enquanto que em pH $4,5 \pm 0,1$ o mesmo não sofreu sua redução.

2. 4 Variação dos componentes do meio

Com o auxílio do software Minitab® versão 17 foi feito um planejamento fatorial para estudar a influência dos componentes do meio de cultura antibiótico N° 3 com pH ajustado para $7,0 \pm 0,1$ (peptona 5,0 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, cloreto de sódio 2,5 g/L, dextrose 1,0 g/L, fosfato de potássio monobásico 1,32 g/L e fosfato dibásico de potássio 3,68 g/L) no crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Nos ensaios foram realizados variando a composição do meio desde um meio completo e rico (com todos os componentes) até meios com a ausência de até três componentes, conforme mostrado na **Tabela 23**.

No planejamento fatorial trabalhou variando com a presença ou ausência dos seguintes componentes: de peptona, do extrato de levedura, do extrato de carne, do cloreto de sódio e da dextrose. Somente as quantidades do fosfato de potássio monobásico e do fosfato dibásico de potássio foram mantidas constantes para manter ajustado o pH em $7,0 \pm 0,1$.

Na primeira série do ensaio (dos meios de cultura 01 a 08) foram feitas soluções individuais da peptona, do cloreto de sódio e da dextrose. Os outros componentes do meio antibiótico n° 3 que são o extrato de levedura, o extrato de carne, o fosfato de potássio monobásico e o fosfato dibásico de potássio foram colocados juntos formando uma única solução.

Na segunda série do ensaio (dos meios de cultura 09 a 16) foram feitas soluções individuais da peptona, da dextrose, do extrato de levedura e do extrato de carne. Os outros componentes do meio antibiótico n° 3 que são o cloreto de sódio, o fosfato de potássio monobásico e o fosfato dibásico de potássio foram colocados juntos formando uma única solução.

Todas as soluções foram esterilizadas por vapor úmido ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,1\text{ kgf/cm}^2$ por 15 minutos) por equipamento de autoclave.

Os meios da primeira e da segunda série de ensaio foram feitos misturando-se alíquotas das soluções de acordo com a quantidade final de cada componente, para um tubo de ensaio estéril e acrescentando diferentes volumes de água esterilizada quando necessário. Os meios de cultura foram inoculados então com uma suspensão microbiana de crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em meio de cultura antibiótico 3 estéril com pH $7,0 \pm 0,1$, com a transmitância de $35 \pm 2\%$ em 580 nm, homogeneizando-se de modo obter a suspensão com inóculo de 10 %.

Com auxílio de uma micropipeta foi colocado 200 µL de cada suspensão em seu respectivo poço, conforme o esquema do quadrado latino mostrado na **Figura 35**, e foi realizada a leitura da absorbância inicial no comprimento de onda de 630 nm com o leitor de microplacas. A microplaca foi então incubada por um período de 6 horas, em temperatura de 37 ± 1 °C com agitação de 500 rpm. Após este período foi adicionado 50 µL da solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % e a microplaca foi colocada novamente sob as mesmas condições de incubação por um período de 15 minutos, sendo então realizada novamente a leitura no comprimento de onda de 630 nm. Através da diferença entre as absorções finais e iniciais foi calculada a absorbância resultante em cada um dos poços na microplaca, no qual os resultados foram analisados estatisticamente usando o software Minitab® versão 17, para estabelecer a melhor composição do meio de cultura que promove o melhor crescimento microbiano.

Figura 35. Esquema do quadrado latino adotado na distribuição dos diferentes meios de cultura no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética.

1	2	3	4	5	6	7	8				
2	3	4	5	6	7	8	1				
3	4	5	6	7	8	1	2				
4	5	6	7	8	1	2	3				
5	6	7	8	1	2	3	4				
6	7	8	1	2	3	4	5				
7	8	1	2	3	4	5	6				
8	1	2	3	4	5	6	7				

Tabela 23. Planejamento fatorial adotado para estudar a influência da composição do meio de cultura no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação.

Meio de cultura	Peptona (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Extrato de carne (g/L)	Dextrose (g/L)	Cloreto de sódio (g/L)
01	5,0	1,5	1,5	1,0	2,5
02	5,0	1,5	1,5	0,0	2,5
03	5,0	1,5	1,5	1,0	0,0
04	5,0	1,5	1,5	0,0	0,0
05	0,0	1,5	1,5	1,0	2,5
06	0,0	1,5	1,5	0,0	2,5
07	0,0	1,5	1,5	1,0	0,0
08	0,0	1,5	1,5	0,0	0,0
09	5,0	1,5	1,5	1,0	2,5
10	5,0	1,5	0,0	1,0	2,5
11	5,0	0,0	1,5	0,0	2,5
12	5,0	0,0	0,0	0,0	2,5
13	0,0	1,5	1,5	0,0	2,5
14	0,0	1,5	0,0	0,0	2,5
15	0,0	0,0	1,5	1,0	2,5
16	0,0	0,0	0,0	1,0	2,5

Todos os meios de cultura contém fosfato de potássio monobásico 1,32 g/L e fosfato dibásico de potássio 3,68 g/L e pH ajustado para $7,0 \pm 0,1$.

2.5 Variação do inóculo e da concentração do TTC

Um ensaio de linearidade contendo concentrações de linezolid entre 1,0 e 4,0 µg/mL foi realizado para otimizar as condições experimentais através da variação do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em meio de cultura antibiótico 3 estéril com pH $7,0 \pm 0,1$, e da concentração do reagente colorimétrico de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) utilizado para medir a absorbância no final do ensaio.

Foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg do padrão de referência de linezolid em balança analítica e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com água esterilizada para se obter a solução estoque de concentração de 100 µg/mL.

Transferiu-se 5 mL da solução estoque de concentração de 100 µg/mL com auxílio de uma pipeta volumétrica para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água esterilizada e obteve-se a solução química de trabalho (SQT) de concentração de 10 µg/mL.

A partir da SQT de concentração de 10 µg/mL foram realizadas diluições com água esterilizada de forma a se obter concentrações finais dos padrões de referência baixa P1 (1 µg/mL), média P2 (2 µg/mL) e alta P3 (4 µg/mL).

Para as amostras simuladas, primeiramente foi pesado 0,25 g de dextrose e dissolvida com água esterilizada em um balão volumétrico de 100 mL para se obter a solução estoque do placebo. Transferiu-se 5 mL da solução estoque do placebo com auxílio de uma pipeta volumétrica para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água esterilizada e obteve-se a solução química de trabalho do placebo (SQTplac).

A partir da SQT de concentração de 10 µg/mL e da solução do placebo (SQTplac) foram transferidas alíquotas iguais destas duas soluções, para cada solução da amostra simulada com a mesma concentração e realizadas diluições com água esterilizada de forma a se obter concentrações finais das amostras simuladas baixa A1 (1 µg/mL), média A2 (2 µg/mL) e alta A3 (4 µg/mL).

Nos ensaios utilizando o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foi realizado com um delineamento 3 X 3 em 36 poços, e através do esquema do quadrado latino cada placa foi dividida em 2 blocos, onde as posições dos padrões P1 (1 µg/mL), P2 (2 µg/mL) e P3 (4 µg/mL) e das amostras A1 (1 µg/mL), A2 (2 µg/mL) e A3 (4 µg/mL) se intercalam entre os blocos, além disso para comprovar a validade do ensaio foram feitos o controle positivos (CP) e negativos (CN), conforme mostrado na **Figura 36**.

Com auxílio de uma micropipeta foram transferidas alíquotas de 20 µL de cada solução do padrão e da amostra simulada para seu respectivo poço, e nos poços referentes ao controle negativo (CN) e ao controle positivo (CP) foram transferidas alíquotas de 20 µL de água esterilizada.

A suspensão microbiana de crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em meio de cultura antibiótico 3 estéril com pH $7,0 \pm 0,1$, foi ajustada quando necessária com solução fisiológica 0,9 % estéril até se obter a

transmitância de 35 ± 2 % em 580 nm (aproximadamente 10^6 a 10^7 UFC/mL). Foi retirada uma alíquota desta suspensão de acordo com a proporção do inóculo do usada no ensaio (de 7 a 13 %) e transferida para um tubo contendo o meio antibiótico nº 3 estéril, homogeneizando-se de modo obter a suspensão com inóculo na proporção de interesse conforme o ensaio realizado mostrado na **Tabela 24**.

Alíquotas de 180 µL da suspensão com o inóculo ajustado na proporção de interesse foram transferidas para os poços que continham as soluções dos padrões (P1, P2 e P3), das amostras simuladas (A1, A2 e A3) e dos controles positivos (CP) na microplaca. No caso dos controles negativos (CN) foram transferidas para os poços 180 µL do meio antibiótico nº 3 estéril com pH ajustado para $7,0 \pm 0,1$.

A microplaca foi colocada no leitor de microplaca e foi registrada as absorbâncias iniciais em cada um dos poços no comprimento de onda de 630 nm, sendo então colocada no agitador e incubador de microplaca para incubar na temperatura de 37 ± 1 °C, com 500 rpm de agitação por um período de 6 horas.

Após este período foram adicionados alíquotas com 50 µL de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) nas concentrações entre 0,1 a 0,9 % (peso/volume) de acordo com o ensaio realizado para cada micropoço, como mostrado na **Tabela 24**. A microplaca foi novamente colocada sobre incubação por mais 15 minutos, a temperatura de 37 ± 1 °C, com 500 rpm de agitação. Após este período, com a mudança da coloração incolor do TTC e sua conseqüente transformação para o formazan de coloração avermelhada pelas células microbianas viáveis foi medida a absorbância final das amostras no comprimento de onda de 630 nm. Através da diferença entre as absorções finais e iniciais foi calculada a absorbância resultante em cada um dos poços na microplaca.

As condições experimentais que foram otimizadas usando um planejamento de composição central que incluiu 13 ensaios usando diferentes concentrações da solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e diferentes proporções da suspensão do inóculo do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), como mostrados na **Tabela 24**. Nesse planejamento, foram analisados quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais, e um ponto central (cinco determinações independentes). Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software Minitab® versão 17.

Figura 36. Esquema do quadrado latino adotado na distribuição das soluções padrão e amostras simuladas de linezolida em delineamento 3 X 3, no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética.

CN	CN	CN	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CN	CN	CN
P1	P2	P3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	P1	P2	P3
P2	P3	A1	A2	A3	P1	A2	A3	P1	P2	P3	A1
P3	A1	A2	A3	P1	P2	A3	P1	P2	P3	A1	A2
A1	A2	A3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	A1	A2	A3
A2	A3	P1	P2	P3	A1	P2	P3	A1	A2	A3	P1
A3	P1	P2	P3	A1	A2	P3	A1	A2	A3	P1	P2
CP	CP	CP	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CP	CP	CP

Tabela 24. Esquema de composição central (CCD) adotado para otimizar as condições experimentais doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e Meio de cultura antibiótico nº 3, com pH = $7,0 \pm 0,1$ e 6 horas de incubação.

Ensaio	Concentração de TTC (%)	Proporção do inóculo (%)	Ponto do design
01	0,2	8	Fatorial
02	0,2	12	Fatorial
03	0,8	8	Fatorial
04	0,8	12	Fatorial
05	0,1	10	Axial
06	0,9	10	Axial
07	0,5	7	Axial
08	0,5	13	Axial
09	0,5	10	Central
10	0,5	10	Central
11	0,5	10	Central
12	0,5	10	Central
13	0,5	10	Central

2.6 Validação do método

O método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética para determinar a potência relativa da linezolida foi validado pela avaliação da linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2003).

A linearidade das concentrações de linezolida entre 1,0 e 4,0 µg/mL foi avaliada pela análise de seis curvas padrão, obtidas em dias diferentes. Avaliaram-se os coeficientes de correlação, significância da regressão, ajuste ao modelo linear e

paralelismo entre as curvas do padrão e da amostra. Foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,95 para a linearidade.

A especificidade foi avaliada comparando a absorbância devido ao crescimento microbiano nas soluções contendo o padrão de referência e amostras simuladas da linezolida com amostras placebo (dextrose). Na preparação placebo não inibiu o crescimento microbiano.

Precisão foi determinada em dois níveis: a repetibilidade, na qual foram analisadas seis independentes amostras simuladas de linezolida em um período curto de ensaio, no mesmo dia, e a precisão intermediária onde foram analisadas 18 independentes amostras simuladas de linezolida em três diferentes dias. O desvio padrão relativo para a repetibilidade e a precisão intermediária não podem ser maior que 5 %.

Exatidão foi determinada pela média de recuperação das 18 preparações de amostras simuladas adicionadas com quantidades conhecidas de linezolida em três diferentes níveis (6 preparações em cada nível). Foram consideradas que o ensaio foi exato se a média de recuperação está entre 95 a 105 % para a quantidade de padrão adicionado.

Robustez foi verificada durante o desenvolvimento e otimização do método, considerando a influência da composição do meio de cultura, a proporção do inóculo e do reagente cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) na resposta do ensaio.

2.7 Doseamento microbiológico rápido em microplaca

Foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg do padrão de referência de linezolida em balança analítica e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com água esterilizada para se obter a solução estoque de concentração de 100 µg/mL.

Transferiu-se 5 mL da solução estoque de concentração de 100 µg/mL com auxílio de uma pipeta volumétrica para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água esterilizada e obteve-se a solução química de trabalho (SQT) de concentração de 10 µg/mL.

A partir da SQT de concentração de 10 µg/mL foram realizadas diluições com água esterilizada de forma a se obter concentrações finais dos padrões de referência baixa P1 (1 µg/mL), média P2 (2 µg/mL) e alta P3 (4 µg/mL).

Para as amostras simuladas, primeiramente foi pesado 0,25 g de dextrose e dissolvida com água esterilizada em um balão volumétrico de 100 mL para se obter a

solução estoque do placebo. Transferiu-se 5 mL da solução estoque do placebo com auxílio de uma pipeta volumétrica para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água esterilizada e obteve-se a solução química de trabalho do placebo (SQTplac).

A partir da SQT de concentração de 10 µg/mL e da solução do placebo (SQTplac) foram transferidas alíquotas iguais destas duas soluções, para cada solução da amostra simulada com a mesma concentração e realizadas diluições com água esterilizada de forma a se obter concentrações finais das amostras simuladas baixas A1 e B1 (1 µg/mL), médias A2 e B2 (2 µg/mL) e altas A3 e B3 (4 µg/mL).

Nos ensaios utilizando o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foi realizado com um delineamento 3 X 3 em 36 poços, onde cada placa foi dividida em 2 blocos, representando no primeiro bloco os resultados dos padrões P1 (1 µg/mL), P2 (2 µg/mL) e P3 (4 µg/mL) e das amostras A1 (1 µg/mL), A2 (2 µg/mL) e A3 (4 µg/mL) e no segundo bloco os resultados dos padrões P1 (1 µg/mL), P2 (2 µg/mL) e P3 (4 µg/mL) e das amostras B1 (1 µg/mL), B2 (2 µg/mL) e B3 (4 µg/mL) e além disso para comprovar a validade do ensaio foram feitos o controle positivos (CP) e negativos (CN), conforme mostrado no esquema do quadrado latino da **Figura 37**.

Com auxílio de uma micropipeta foram transferidas alíquotas de 20 µL de cada solução do padrão e da amostra simulada para seu respectivo poço, e nos poços referentes ao controle negativo (CN) e ao controle positivo (CP) foram transferidas alíquotas de 20 µL de água esterilizada.

A suspensão microbiana de crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em meio de cultura antibiótico 3 estéril com pH $7,0 \pm 0,1$, foi ajustada quando necessária com solução fisiológica 0,9 % estéril até se obter a transmitância de 35 ± 2 % em 580 nm. Foi retirada uma alíquota desta suspensão e transferida para um tubo contendo o meio antibiótico nº 3 estéril, homogeneizando-se de modo obter a suspensão com inóculo de 10 %.

Alíquotas de 180 µL suspensão com inóculo de 10 % foram transferidas para os poços que continham as soluções dos padrões (P1, P2 e P3), das amostras simuladas (A1, A2, A3, B1, B2 e B3) e dos controles positivos (CP) na microplaca. No caso dos controles negativos (CN) foram transferidas para os poços 180 µL do meio antibiótico nº 3 estéril com pH ajustado para $7,0 \pm 0,1$.

A microplaca foi colocada no leitor de microplaca e foi registrada as absorbâncias iniciais em cada um dos poços no comprimento de onda de 630 nm, sendo então colocada no agitador e incubador de microplaca para incubar na temperatura de 37 ± 1

°C, com 500 rpm de agitação por um período de 6 horas. Após este período foi adicionado 50 µL da solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % e colocado sobre incubação por mais 15 minutos, a temperatura de 37 ± 1 °C, com 500 rpm de agitação. Após este período, com a mudança da coloração incolor do TTC e sua conseqüente transformação para o formazan de coloração avermelhada pelas células microbianas viáveis foi medida a absorbância final das amostras no comprimento de onda de 630 nm. Através da diferença entre as absorções finais e iniciais foi calculada a absorbância resultante em cada um dos poços na microplaca.

Figura 37. Esquema do quadrado latino adotado na distribuição das soluções padrão e amostras simuladas de linezolida em delineamento 3 X 3, no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética.

CN	CN	CN	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CN	CN	CN
P1	P2	P3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	P1	P2	P3
P2	P3	A1	A2	A3	P1	B2	B3	P1	P2	P3	B1
P3	A1	A2	A3	P1	P2	B3	P1	P2	P3	B1	B2
A1	A2	A3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	B1	B2	B3
A2	A3	P1	P2	P3	A1	P2	P3	B1	B2	B3	P1
A3	P1	P2	P3	A1	A2	P3	B1	B2	B3	P1	P2
CP	CP	CP	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CP	CP	CP

2.8 Medição da incerteza

A estimação da medição da incerteza envolve quatro etapas: definir a medição; identificar as fontes de incerteza; quantificar as incertezas e converter-las num desvio padrão e por fim estimar a incerteza combinada e expandida.

A potência do antibiótico no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foi determinada utilizando-se das equações abaixo (PINTO et al., 2010):

$$E = \frac{[(P1 + A1) - (P3 + A3)]}{4}$$

$$F = \frac{[(A3 + A2 + A1) - (P3 + P2 + P1)]}{3}$$

$$M = \frac{F}{R} \log R$$

$$Pot = 10^M \cdot 100\%$$

Onde, E é a diferença na resposta (absorbância resultante) entre as doses baixas e altas do padrão e da amostra. F é a diferença na resposta (absorbância resultante) entre as doses altas, médias e baixa do padrão e da amostra. R é a razão entre as doses, no caso 2. A potência é determinada pelo antilogaritmo de M.

Uma investigação preliminar indica que muitas fontes de incerteza podem ser consideradas, como a massa e aparatos volumétricos, condições de incubação/ ambiente, e a resposta da variabilidade microbiológica. Baseado na experiência de outros trabalhos publicados na literatura científica foi considerado que a resposta da variabilidade microbiológica é a mais significativa fonte de incerteza (SAVIANO et al., 2014, DAFALE et al., 2012, LOURENÇO 2012, LOURENÇO 2013). Como consequência, foi adotado o esquema de quadrado latino para reduzir a resposta da variabilidade microbiológica devido à posição das linhas e colunas conforme foi mostrado na **Figura 36**.

As incertezas da massa e de aparatos volumétricos foram obtidas do certificado de calibração. As incertezas expandidas foram divididas por um fator apropriado de abrangência (k), considerando o nível de confiança das incertezas expressas nos certificados de calibração. As incertezas associadas com a resposta da variabilidade

microbiológica foram adotadas como o erro residual do esquema do quadrado latino da análise de variância (ANOVA).

As incertezas combinadas e expandidas foram estimadas de acordo como o procedimento do Eurochem (EURACHEM/CITAC, 2012). As incertezas da resposta da variabilidade microbiológica foram estimadas com um intervalo de confiança de 95 % como descrito na equação abaixo:

$$95\%IC_{\text{pot}} = 10^{\left[M \pm 2 \times \sqrt{\left(\frac{s^2}{36} \right) \times \left(\frac{4 \times \log 2}{[A_1 - A_3 + P_1 - P_3]} \right)^2} \right]}$$

Onde M é a potência relativa na escala logarítmica, s^2 é o erro residual do esquema do quadrado latino (ANOVA), A_1 e A_3 são as absorbâncias obtidas das doses baixas e altas das amostras de solução injetável do Zyvox® e P_1 e P_3 são as absorbâncias obtidas das doses baixas e altas das amostras de solução do padrão de referência da linezolida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento e otimização

Os resultados do MIC e MBC são mostrados na **Tabela 25**. Todos os micro-organismos foram suscetíveis a linezolida. Como a formação do formazan é muito rápida devido ao contato do reagente colorimétrico com a suspensão bacteriana, a sua intensidade da coloração é dependente apenas da velocidade desta redução do TTC pelos micro-organismos (OHARA et al., 1993). Portanto foi escolhido o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 como o micro-organismo teste para o desenvolvimento do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética, devido aos melhores resultados obtidos, a simplicidade de uso, e uma alternativa nova para este tipo de ensaio.

Tabela 25. Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC) da linezolida contra vários microrganismos usando o meio de cultura antibiótico nº 3.

Micro-organismo	Concentração mínima inibitória (MIC)	Concentração mínima bactericida (MBC)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6358)	0,6 – 0,8 µg/mL	2,5 – 3,2 µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	1,0 – 1,3 µg/mL	3,0 – 5,0 µg/mL
<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	0,2 – 0,6 µg/mL	0,8 – 2,5 µg/mL

Carga microbiana usada na determinação do MIC e do MBC cerca de 10^5 - 10^6 UFC/mL

A composição do meio de cultura foi otimizado para promover um intenso crescimento microbiano. Após o período de incubação da microplaca por 6 horas e a adição do reagente colorimétrico, houve a mudança da coloração incolor do TTC e sua consequente transformação para o formazan de coloração avermelhada pelas células microbianas viáveis, ou seja, os meios que propiciaram maior crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), tiveram os seus valores de absorbância resultante maiores que os meios onde houve um menor crescimento desse micro-organismo.

De acordo com os resultados obtidos, o extrato de levedura e a dextrose foram os dois componentes que apresentaram maior influência no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), como mostrado na **Figura 38**. O crescimento microbiano foi melhorado usando o meio de cultura com extrato de levedura e dextrose nas concentrações de até 1,5 g/L e 1,0 g/L, respectivamente como demonstrado na **Figura 39**. Peptona e o extrato de carne também melhoraram o crescimento microbiano nas concentrações de até 5,0 g/L e 1,5 g/L, respectivamente como demonstrado na **Figura 39**. Porém o crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foi levemente reduzido usando um meio de cultura com a concentração de cloreto de sódio de até 2,5 g/L como demonstrado na **Figura 39**. Entretanto, esta influência não foi estatisticamente significativa, como mostrado na **Figura 38**. Isso pode ser explicado devido ao aumento de osmolaridade do meio de cultura contendo o cloreto de sódio.

Figura 38. Gráfico de Pareto para os efeitos do extrato de levedura, dextrose, peptona, extrato de carne e cloreto de sódio no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação.

Figura 39. Principais efeitos do extrato do extrato de levedura, dextrose, peptona, extrato de carne e cloreto de sódio no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação.

Baseado no planejamento fatorial usado no estudo da influência da composição do meio de cultura no crescimento microbiano foi estabelecido um gráfico de contorno do crescimento microbiano a respeito da quantidade de extrato de levedura e dextrose no meio de cultura, como demonstrado na **Figura 40**. De acordo com os resultados obtidos, uma redução na quantidade de dextrose (por exemplo, de 1,0 g/L para 0,7 g/L) pode ser compensada com um aumento da quantidade de extrato de levedura (por exemplo, de 1,2 g/L para 1,5 g/L) para promover uma intensidade similar de crescimento microbiano. Da mesma forma, uma redução na quantidade de extrato de levedura (por exemplo, de 1,5 g/L para 1,2 g/L) pode ser compensada com um aumento da quantidade de dextrose (por exemplo, de 0,7 g/L para 1,0 g/L) para promover uma intensidade similar de crescimento microbiano.

Figura 40. Diagrama de contorno do crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) após 6 horas de incubação usando meio de cultura contendo diferentes quantidades do extrato de levedura (até 1,5 g/L) e dextrose (de até 1,0 g/L), e quantidades fixas de peptona (5,0 g/L), extrato de carne (1,5 g/L) e cloreto de sódio (1,5 g/L).

O método de doseamento microbiológico rápido em microplaca é baseado na inibição do crescimento microbiano causado pela linezolid, que é medida pela intensidade de coloração avermelhada formada devido à redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para formazan. Essa redução ocorre somente em células

microbianas viáveis, então a intensidade de coloração avermelhada é proporcional ao crescimento microbiano. Considerando esse princípio, é importante estudar como as proporções do inóculo do micro-organismo e as concentrações de TTC afetarão a resposta, que é a intensidade de coloração avermelhada medida no comprimento de onda de 630 nm no leitor de microplaca. Para estudar essas influências foi utilizado um planejamento de composição central. Gráficos de contorno para a influência da proporção do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e a concentração do TTC foram construídos para baixa (**Figura 41**), média (**Figura 42**) e alta (**Figura 43**) doses de linezolida baseadas nos resultados de absorvâncias usados no meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para $7,0 \pm 0,1$, após 6 horas de incubação, a agitação de 500 rpm e temperatura de 37 ± 1 °C. Além do mais, foi avaliado os resultados de absorvância para o crescimento microbiano (ou perda do crescimento microbiano) para os controles positivos e negativos.

Usando uma abordagem de otimização multivariada, foi estabelecido uma região de *design space* para método de doseamento microbiológico rápido em microplaca em relação à proporção do inóculo do micro-organismo e a concentração do TTC, de acordo com a **Figura 44**. De acordo com os resultados obtidos, a região marcada em branco corresponde à combinação de proporção do inóculo e concentração do TTC que possibilita um melhor crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) para as doses baixa (absorvância medida entre 0,65 e 0,95), média (absorvância medida entre 0,35 e 0,65) e alta (absorvância medida entre 0,05 e 0,35) de linezolida. Foi considerado na otimização das respostas para o controle positivo (absorvância medida entre 0,80 e 1,20) e para o controle negativo (absorvância medida entre -0,25 e 0,05), a inclinação da curva de dose resposta (inclinação entre -1,2 e -0,6), intercepção da curva de dose resposta (intercepção entre 0,5 e 0,9) e coeficiente de correlação da curva de dose resposta (coeficiente de correlação entre 0,9 e 1,0).

Figure 41. Diagrama de contorno para dose baixa de linezolida (1,0 µg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) usando meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para pH 7,0 ± 0,1 após 6 horas de incubação.

Figure 42. Diagrama de contorno para dose média de linezolida (2,0 µg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) usando meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para pH 7,0 ± 0,1 após 6 horas de incubação.

Figure 43. Diagrama de contorno para dose alta de linezolida (4,0 µg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) usando meio de cultura antibiótico nº 3 com pH ajustado para pH 7,0 ± 0,1 após 6 horas de incubação.

Figura 44. Planejamento espacial para o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca em relação a proporção do inóculo e a concentração do TTC. A região branca corresponde à proporção do inóculo e a concentração do TTC que possibilita um melhor resultado para a absorbância das amostras. A curva contínua corresponde ao menor valor da absorbância, enquanto que a curva tracejada corresponde ao maior valor da absorbância para cada amostra e parâmetro observado no diagrama.

3.3 Validação

Um método é validado, quando se pode comprovar que o mesmo é adequado a uma finalidade pretendida, como uma determinação qualitativa, semi-quantitativa e ou quantitativa de fármacos, ou outras substâncias presentes em produtos farmacêuticos. Portanto a validação deve determinar através de estudos experimentais, que o método atenda as suas aplicações, conferindo que seus resultados sejam confiáveis (BRASIL, 2003).

O doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foi validado quanto aos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade/faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (BRASIL, 2003).

A especificidade/seletividade é a capacidade de um método de medir um determinado composto na presença de outros componentes, como outros excipientes da

formulação, impurezas ou produtos de degradação (BRASIL, 2003). A especificidade/seletividade foi avaliada através de um ensaio, utilizando-se soluções com concentrações diferentes do padrão de referência e amostras simuladas da linezolida (na faixa de 1 a 4 µg/mL) e amostras placebo (dextrose). Nos poços contendo as amostras placebo as mesmas não inibiram o crescimento microbiano, obtendo-se absorbâncias altas semelhantes aos controles positivos.

A linearidade de um método analítico demonstra que os resultados obtidos são proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Para se determinar a linearidade foram utilizados três concentrações diferentes do padrão e da amostra simulada, que estavam nas concentrações baixa (1 µg/mL), média (2 µg/mL) e alta (4 µg/mL) em um delineamento 3 x 3, utilizando 36 poços em cada um dos dois blocos de ensaios de uma microplaca.

Foram construídas curvas dose resposta do padrão e da amostra simulada de linezolida que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com a sua absorbância, conforme **Figura 45**. A curva de dose resposta para os padrões de referência e amostras simuladas, foi obtida com regressão significativa (p-valor = 0,000), não significativa perda de paralelismo (p-valor = 0,523), não significativa perda de linearidade (p-valor = 0,584) e não significativa desvio do quadrático (p-valor = 0,906), conforme mostrado na **Tabela 26**.

Figura 45. Curvas de dose resposta do padrão de referência e da amostra simulada de linezolida obtidas usando as condições experimentais otimizadas para o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca.

Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) do esquema do quadrado latino para a variabilidade de resposta microbiológica do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%).

Fonte	G.L.	SQ	QM	F	p-valor
Preparações	1	0,015	0,015	1,00	0,329
Regressão	1	2,433	2,433	161,81	0,000
Paralelismo	1	0,006	0,006	0,42	0,523
Linearidade	1	0,005	0,005	0,31	0,584
Quadrático	1	0,000	0,000	0,01	0,906
Treatmentos	5	2,459	0,492	32,71	0,000
Linhas	5	0,171	0,034	2,28	0,086
Colunas	5	0,104	0,021	1,38	0,273
Erro residual	20	0,301	0,015		
Total	35	3,035			

G.L. = graus de liberdade; **SQ** = soma dos quadrados; **QM** = quadrado médio; e **F** = F-calculado

A precisão é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos nos ensaios, utilizando uma mesma amostra. A precisão foi avaliada em dois níveis: (a) repetibilidade, onde foram analisadas amostras independentes preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e/ou analisadas no mesmo equipamento; e (b) precisão intermediária onde foram analisadas amostras independentes preparadas em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou analisadas em equipamentos diferentes. Em ambos os casos, a precisão foi avaliada pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2003). A repetibilidade encontrada foi de 2,3 % e a precisão intermediária foi de 4,3 % nos ensaios efetuados de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética.

A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). A exatidão foi avaliada pela análise de amostras nas quais a quantidade conhecida do

fármaco foi adicionada a uma mistura de componentes do medicamento (placebo contaminado). A exatidão foi de 101,4 %, que corresponde à média da potência dos seis ensaios efetuados.

Um sumário dos resultados de validação do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca para determinar a potência relativa da linezolida é apresentado na **Tabela 27**. O ensaio de microplaca foi linear (de 1,0 para 4,0 µg/mL), específico, preciso e exato. De acordo com os resultados do desenvolvimento e validação, o método foi robusto dentro do *design space* estabelecido.

Tabela 27. Sumário dos resultados de validação do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca para determinar a potência relativa da linezolida usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) com inóculo de 10 % no meio de cultura antibiótico nº 3 com pH 7.0 ± 0.1, após 6 horas de incubação, adicionando a solução aquosa de TTC 0,5 %.

Parâmetros de validação	Critério	Resultados
Linearidade (de 1,0 para 10,0 µg/mL)	$r^2 \geq 0,95$	$r^2 = 0,992$
Especificidade	Não interfere	Não interfere
Precisão		
- Repetibilidade	$DPR \leq 5,0 \%$	$DPR = 2,3 \%$
- Precisão intermediária	$DPR \leq 5,0 \%$	$DPR = 4,3 \%$
Exatidão	95 a 105 %	101,4 %

DPR = Desvio padrão relativo

3.4 Medição da Incerteza

Após a validação do método, foi estimada a medida de incerteza associada com a potência relativa do método de doseamento microbiológico rápido em microplaca. A medição da incerteza estimada deve incluir um estudo detalhado de todas as fontes de incerteza. Entretanto, é importante evitar um desproporcional esforço nessa estimativa. De acordo com os resultados obtidos, a variabilidade de resposta microbiológica contribui

com quase toda a incerteza geral (cerca de 96 %). Por outro lado, incertezas associadas com as amostras da solução injetável do Zyvox® e do padrão de referência da linezolida foram virtualmente insignificantes, sendo 1,5 % e 2,5 % de toda a incerteza geral, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com outros resultados obtidos por outros ensaios microbiológicos (SAVIANO et al., 2014, DAFALE et al., 2012, LOURENÇO 2012, LOURENÇO 2013).

Usando o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca, a potência relativa e a medição da incerteza encontrada foram de $91,8 \pm 8,2$ %. A medição da incerteza foi comparável com as obtidas usando o método de doseamento por difusão em ágar para a linezolida (3,1 %), apramicina (6,9 a 7,1 %), cefazolina (6,2 a 6,7 %), caspofungina (1,7 %) e vancomicina (4,3 %) (SAVIANO et al., 2014, GHISLENI et al. 2014, LOURENÇO 2012, LOURENÇO 2013, LOURENÇO et al., 2007). Em adição a incerteza associada com o método de doseamento microbiológico rápido em microplaca foi levemente maior que aqueles obtidos usando o método RP-UPLC (2,5 %) (SAVIANO et al., 2015) e o método de espectrofotometria em UV (2,1 %) (SAVIANO et al., 2013) que é razoável considerando a aumento da variabilidade inerente à resposta microbiológica.

4. CONCLUSÕES

O método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foi desenvolvido e validado, através da utilização de um planejamento fatorial onde foi estudada a influência da composição do meio de cultura e de um planejamento da composição central que analisou a influência das diferentes proporções do inóculo do micro-organismo e das soluções aquosa do cloreto de trifeniltetrazólio no crescimento microbiano.

Através de análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios do software Minitab® versão 17, foi verificado que o extrato de levedura e a dextrose foram os mais importantes componentes para o crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) no meio antibiótico nº 3 com $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$. Além disso, de acordo com a otimização dos resultados a abrangência do *design space* foi estabelecida utilizando o inóculo com suspensão de 10 % do micro-organismo, a incubação da microplaca por 6 horas com agitação de 500 rpm e na temperatura de 37 ± 1 °C, a adição de 50 µL da solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 % e leitura da absorbância em 630 nm.

O método de microplaca foi linear (de 1,0 para 4,0 µg/mL) com $r^2 = 0,992$ específico, preciso com repetibilidade de 2,3 % e a precisão intermediária de 4,3 %, e exato com média de recuperação de 101,4 %. De acordo com os resultados do desenvolvimento e validação, o ensaio de microplaca foi robusto dentro da área estabelecida do *design space* do experimento.

A medição de incerteza geral foi razoável considerando a alta variabilidade inerente à resposta microbiológica. Além do mais, a incerteza final foi comparável com todas obtidas com os outros ensaios microbiológicos, bem como com os outros métodos químicos.

Portanto, o doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética que apresenta com vantagens, a sua automação, permitindo a análise de um grande número de amostras de forma rápida, além do baixo consumo do meio de cultura, pode ser empregado no controle de qualidade de medicamentos, garantindo qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos contendo linezolida.

**PARTE V – Análise das amostras de
preparações farmacêuticas contendo
linezolida e comparação dos métodos**

ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

As amostras de linezolida nas formas farmacêuticas disponíveis usadas na terapêutica são produzidas pela Pfizer com o nome comercial de Zyvox® em comprimidos revestidos de 600 mg (excipientes: amido de milho, celulose microcristalina, hiprolose, amidoglicolato de sódio, estearato de magnésio, Opadry® branco, cera de carnaúba e Opaco de *red* (impressão)) e em solução injetável para infusão de 600 mg (2mg/mL) (excipientes: citrato de sódio diidratado, ácido cítrico anidro, glicose monoidratada, água para injetáveis, e hidróxido de sódio ou ácido clorídrico para ajuste de pH) foram analisadas pelos quatro métodos propostos (espectrofotométrico em Ultravioleta (UV), cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UPLC), doseamento microbiológico de difusão em ágar e doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética) e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, a fim de comparar o desempenho de cada método, e para verificar a possível equivalência entre eles, possibilitando mais de um método de escolha para a determinação deste fármaco em um laboratório de controle de qualidade.

Os comprimidos revestidos de 600 mg de lote C111396 e solução injetável para infusão de 600 mg (2 mg/mL) de lote Z04 foram utilizados nos ensaios dos quatro métodos anteriormente propostos, juntamente com o padrão de referência da linezolida (lote: 020M4707V e pureza 99,5 %).

1. Métodos gerais aplicados às formas farmacêuticas

Nos comprimidos revestidos do Zyvox® foram realizados alguns testes preliminares para a determinação do peso médio, da dureza, da friabilidade, e da desintegração.

Para a determinação do peso médio, foram pesados 20 comprimidos revestidos do Zyvox® em balança analítica, na qual foi obtido um peso médio de 866,9 mg com um desvio padrão relativo de 1,01 %, peso mínimo de 850,9 mg e peso máximo de 884,8 mg, conforme mostrado na **Figura 46**. De acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, os comprimidos com peso médio superior a 250 mg, é permitido uma variação no peso de até $\pm 5,0$ %, portanto os comprimidos do Zyvox® estão dentro dos seus limites de especificação inferior e superior.

O teste de dureza foi feito em 10 comprimidos revestidos do Zyvox®, no qual se obteve uma dureza média de 111,91 newtons (N). Segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, o teste de dureza é apenas informativo.

No teste de friabilidade, foram pesados inicialmente 10 comprimidos revestidos do Zyvox® em balança analítica, e depois foram colocados no friabilômetro com uma velocidade de rotação de 25 rpm por 4 minutos. Conforme a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, ao final do teste não pode ter nenhum comprimido quebrado, lascado, rachado ou partido e a diferença entre o peso inicial menos o peso final não pode ser maior que 1,5 %. A porcentagem de friabilidade obtida no teste foi de 0,01 % e também não apresentou nenhum comprimido quebrado, lascado, rachado ou partido no final do teste.

No teste de desintegração foram utilizados 6 comprimidos revestidos do Zyvox® no qual foram colocados no desintegrador que utiliza água como solvente em uma temperatura de 37 ± 1 °C, no qual foi verificado que todos os comprimidos se desintegraram num período inferior a 30 minutos. Conforme a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, o limite do tempo de desintegração para os comprimidos revestidos com filme é de no máximo 30 minutos.

Figura 46. Variação do peso dos comprimidos revestidos do Zyvox®.

Nas soluções injetáveis para infusão de 600 mg (2mg/mL) do Zyvox® foram realizados alguns testes preliminares para a determinação do volume médio, do pH, além dos testes de endotoxina bacteriana e esterilidade.

O volume declarado da bolsa de uma solução injetável do Zyvox® é de 300 mL. O volume médio, feito com 2 bolsas de solução injetável do Zyvox® foi de 325 mL conforme a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, o excesso mínimo de volume recomendado é de 2 % para permitir a retirada e administração do valor declarado.

O pH médio, feito com 2 bolsas de solução injetável do Zyvox® foi de 4,2, dentro da especificação do produto que é do pH = $4,5 \pm 0,3$.

O teste de esterilidade foi feito com 2 bolsas de solução injetável do Zyvox®, através do método indireto, no qual após a filtração pela membrana de filtração de 0,45 µm a mesma foi cortada e colocada a metade em um tubo contendo o meio estéril de tioglicolato que foi incubado por 14 dias a uma temperatura entre 30 e 35 °C para a determinação de bactérias aeróbias e anaeróbias, a outra metade foi colocada em um tubo contendo o meio estéril de caseína de soja que foi incubado por 14 dias a uma temperatura entre 20 e 25 °C para a determinação de bactérias aeróbias, fungos e leveduras. Foram também feitos os controles positivo (inoculado com uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)) e negativo dos meios. Após 14 dias foi observado que o controle positivo apresentou turbidez, o que representou o crescimento microbiano, enquanto que os meios que continham a amostra da solução injetável e o controle negativo, estavam límpidos, o que indica que o mesmo passou no teste de esterilidade, conforme o preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição.

No teste de endotoxina, utilizou-se uma bolsa da solução injetável para infusão de 600 mg (2mg/mL) do Zyvox®, no qual um determinado volume foi retirado e ajustado o pH entre 6,0 e 7,5 com solução apirogênica e estéril de 0,1M de HCl ou NaOH e após isso foi retirada uma alíquota dessa solução que foi colocada em um tubo estéril e apirogênico e misturada na mesma proporção com outra alíquota de endotoxina utilizada no teste. Em outro tudo estéril e apirogênico fez-se o mesmo procedimento, diferindo apenas quanto a adição de água apirogênico ao invés de endotoxina. Retirou-se uma pequena alíquota de cada solução de 100 µL e colocou em outro tubo estéril e apirogênico acrescentando a mesma quantidade do reagente LAL. Além disso, foram feitos o controle positivo com 100 µL de endotoxina adicionado de 100 µL do reagente LAL e o controle negativo com 100 µL de água apirogênica adicionado de 100 µL do reagente LAL. Os tubos foram incubados por 1 hora com a temperatura de 37 °C. Os mesmos foram vertidos em 180°, porém só notou-se a gelidificação nos tubos que continham a endotoxina, conforme o preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição.

2. Espectrofotométrico em UV

No ensaio para a análise das formas farmacêuticas de linezolida pelo método espectrofotométrico em UV foram realizadas diluições no padrão de referência e nas amostras de comprimidos e solução injetável de linezolida (ambas em triplicata) para obter a concentração de 10 µg/mL, de modo fazer a determinação do teor dos mesmos, através da seguinte equação apresentada abaixo:

$$\text{Teor} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Concentração da amostra}} \times 100$$

As absorbâncias das soluções do padrão e das amostras foram obtidas no comprimento de onda de 254 nm, utilizando água ultrapurificada como solvente, conforme as condições do método anteriormente desenvolvido e validado, como mostrado na **Tabela 28**.

Tabela 28. Absorbâncias e teor obtidos do padrão de referência e das amostras de comprimidos e solução injetável no método de espectrofotométrico de UV em 254 nm.

	Absorbância	Concentração (ug/mL)	Teor (%)
Padrão	0,499	9,800	-
Comprimido A	0,489	10,022	95,83
Comprimido B	0,487	10,022	95,43
Comprimido C	0,492	10,022	96,41
Solução Injetável A	0,524	10,000	102,91
Solução Injetável B	0,524	10,000	102,91
Solução Injetável C	0,521	10,000	102,32

De acordo com os resultados foi obtido para os comprimidos revestidos um teor médio de 95,9 % com um desvio padrão relativo de 0,5 %, e para a solução injetável foi obtido 102,7 % e 0,3 % respectivamente.

3. Cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UPLC)

No ensaio para a análise das formas farmacêuticas de linezolida pelo método RP-UPLC foram realizadas diluições no padrão de referência e nas amostras de comprimidos e solução injetável de linezolida (ambas em triplicata) para obter a concentração de 10 µg/mL, de modo fazer a determinação do teor dos mesmos, conforme equação apresentada abaixo:

$$\text{Teor} = \frac{\text{Área do pico da amostra}}{\text{Área do pico do padrão}} \times \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Concentração da amostra}} \times 100$$

As áreas dos picos cromatográficos das soluções do padrão e das amostras foram obtidas utilizando como fase móvel água, acetonitrila e TFA (90:10:1) e conforme as seguintes condições cromatográficas: fluxo: 0,5 mL/minuto, volume de injeção: 10 µL, comprimento de onda: 254 nm e coluna cromatográfica: C18 (50 mm x 2,1mm x 1,7 µm) do método anteriormente desenvolvido e validado, como mostrado na **Tabela 29**.

Nos cromatogramas obtidos pelo método, pode se verificar que as amostras dos comprimidos e solução injetável apresentaram semelhantes em relação ao padrão de referência da linezolida, e os diferentes excipientes que fazem parte de cada uma dessas formulações não alteram a área do pico, nem tão pouco o tempo de retenção dessas amostras, conforme mostrado na **Figura 47**.

Figura 47. Áreas obtidas do padrão de referência e das amostras de comprimidos e solução injetável no método RP-UPLC.

Tabela 29. Áreas dos picos cromatográficos e teor obtidos do padrão de referência e das amostras de comprimidos e solução injetável no método RP-UPLC.

	Área	Concentração (ug/mL)	Teor (%)
Padrão	1530803	9,800	-
Comprimido A	1485998	10,022	94,92
Comprimido B	1489564	10,022	95,15
Comprimido C	1478927	10,022	94,47
Solução Injetável A	1553626	10,000	99,46
Solução Injetável B	1590665	10,000	101,83
Solução Injetável C	1586656	10,000	101,58

De acordo com os resultados foi obtido para os comprimidos revestidos um teor médio de 94,8 % com um desvio padrão relativo de 0,4 %, e para a solução injetável foi obtido 101,0 % e 1,3 % respectivamente.

4. Doseamento microbiológico de difusão em ágar

No ensaio para a análise das formas farmacêuticas de linezolida pelo método doseamento microbiológico de difusão em ágar foram realizadas diluições no padrão de referência para as seguintes concentrações de 8 µg/mL, 16 µg/mL, e 32 µg/mL, e nas amostras de comprimidos e solução injetável de linezolida foram diluídas para obter a concentração de 16 µg/mL, de modo calcular a potência dessas formas farmacêuticas em um delineamento 3 x 1, utilizando o micro-organismo *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) inoculado a 1 %, em meio de ágar caseína de soja, em sistema de bicamada com 20 mL de camada basal e 5 mL de camada inoculada, por um período de 21 horas e temperatura de 37 ± 1 °C de incubação conforme as condições do método anteriormente desenvolvido e validado.

Para fazer a determinação da potência dos mesmos, foram utilizadas as seguintes equações apresentadas abaixo (LOURENÇO, 2006):

$$E = \frac{(P3 - P1)}{2}$$

$$F = A - P2$$

$$I = \log R$$

$$b = \frac{E}{I}$$

$$M = \frac{F}{b}$$

$$Pot = 10^M \cdot 100\%$$

Onde, E é a diferença na resposta entre as doses altas e baixas do padrão. F é a diferença na resposta entre as doses médias do padrão e da amostra. R é a razão entre as doses, no caso 2. A potência é determinada pelo antilogaritmo de M.

As potências das amostras dos comprimidos e solução injetável obtidas, são mostradas nas **Tabela 30** e **Tabela 31**.

Tabela 30. Médias dos halos e potência obtidas do padrão de referência e das amostras de comprimidos no método de doseamento microbiológico de difusão em ágar.

	Halo (cm)	Concentração (ug/mL)	Potência (%)
Padrão (8 µg/mL)	10,7	7,840	-
Padrão (16 µg/mL)	15,5	15,680	-
Padrão (32 µg/mL)	20,2	31,360	-
Comprimido A	15,4	15,934	98,6
Comprimido B	15,1	15,934	94,3
Comprimido C	15,1	15,934	94,3

Tabela 31. Médias dos halos e potência obtidas do padrão de referência e das amostras de solução injetável no método de doseamento microbiológico de difusão em ágar.

	Halo (cm)	Concentração (ug/mL)	Potência (%)
Padrão (8 µg/mL)	10,6	7,840	-
Padrão (16 µg/mL)	15,3	15,680	-
Padrão (32 µg/mL)	19,3	31,360	-
Solução Injetável A	15,3	16,000	100,0
Solução Injetável B	15,2	16,000	98,4
Solução Injetável C	15,0	16,000	95,3

De acordo com os resultados foi obtido para os comprimidos revestidos uma potência média de 95,7 % com um desvio padrão relativo de 2,5 %, e para a solução injetável foi obtido 97,9 % e 2,4 % respectivamente.

5. Doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética

No ensaio para a análise das formas farmacêuticas de linezolida pelo método doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética foram realizadas diluições no padrão de referência para as seguintes concentrações de 1 µg/mL, 2 µg/mL, e 4 µg/mL, e nas amostras de comprimidos e solução injetável de linezolida foram diluídas para obter a concentração de 2 µg/mL, de modo calcular a potência dessas formas farmacêuticas, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) inoculado a 10 %, em microplaca contendo caldo de meio de antibiótico 3 estéril, por um período de 6 horas, temperatura de incubação 37 ± 1 °C, com agitação de 500 rpm, adicionando após este período o reagente cloreto de trifeniltetrazólio a 0,5 %, agitando por 15 minutos, e medição da absorbância no comprimento de onda de 630 nm, conforme as condições do método anteriormente desenvolvido e validado.

Para fazer a determinação da potência no método de microplaca, foi primeiramente feita a diferença entre a absorbância final e a absorbância inicial das amostras e padrões e a seguir foram utilizadas as seguintes equações apresentadas abaixo (LOURENÇO, 2006):

$$E = \frac{(P1 - P3)}{2}$$

$$F = A - P2$$

$$I = \log R$$

$$b = \frac{E}{I}$$

$$M = \frac{F}{b}$$

$$Pot = 10^M \cdot 100\%$$

Onde, E é a diferença na resposta entre as doses baixas e altas do padrão. F é a diferença na resposta entre as doses médias do padrão e da amostra. R é a razão entre as doses, no caso 2. A potência é determinada pelo antilogaritmo de M.

As potências das amostras dos comprimidos e soluções injetáveis obtidas, são mostradas nas **Tabela 32** e **Tabela 33**.

Tabela 32. Médias das absorvâncias e potências obtidas do padrão de referência e das amostras de comprimidos no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética em 630 nm.

	Absorvância	Concentração (ug/mL)	Potência (%)
Padrão (1 µg/mL)	0,215	0,980	-
Padrão (2 µg/mL)	0,473	1,960	-
Padrão (4 µg/mL)	0,649	3,920	-
Comprimido A	0,498	2,007	108,5
Comprimido B	0,488	2,007	105,1
Comprimido C	0,450	2,007	93,1

Tabela 33. Médias das absorbâncias e potências obtidas do padrão de referência e das amostras da solução injetável no método de doseamento microbiológico rápido em microplaca com leitura cinética em 630 nm.

	Absorbância	Concentração (ug/mL)	Potência (%)
Padrão (1 µg/mL)	0,613	0,980	-
Padrão (2 µg/mL)	0,488	1,960	-
Padrão (4 µg/mL)	0,197	3,920	-
Solução Injetável A	0,471	2,000	94,1
Solução Injetável B	0,483	2,000	98,4
Solução Injetável C	0,499	2,000	104,1

De acordo com os resultados foi obtido para os comprimidos revestidos uma potência média de 102,2 % com um desvio padrão relativo de 7,9 %, e para a solução injetável foi obtido 98,9 % e 5,0 % respectivamente.

6. Análise comparativa entre os métodos

Com os ensaios realizados para a determinação da dosagem de linezolida presente nos comprimidos revestidos e soluções injetáveis para infusão através dos métodos físico-químicos e microbiológicos, foi verificado que os métodos microbiológicos apresentaram maior desvio padrão relativo em seus resultados, devido a uma maior variabilidade biológica aderente a esses métodos, porém todas as formas farmacêuticas apresentaram-se dentro das suas especificações, tendo, portanto, a segurança necessária para seu uso na terapêutica na qual são destinadas. Na **Tabela 34** e **Tabela 35** são mostrados os valores encontrados a determinação da dosagem de linezolida nas formas farmacêuticas.

Tabela 34. Dosagem encontrada nas formas farmacêuticas de linezolida pelos métodos físico-químicos de espectrofotometria em UV e cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UPLC) baseadas no teor médio encontrado nos ensaios.

Método	Comprimido 600mg			Solução Injetável 2 mg/mL		
	Teor (%)	DPR (%)	Dosagem (mg/comp.)	Teor (%)	DPR (%)	Dosagem (mg/mL)
Espectrofotometria UV	95,9	0,5	575,4	102,7	0,3	2,054
RP-UPLC	94,8	0,4	568,8	101,0	1,3	2,020

*DPR = Desvio padrão relativo

Tabela 35. Dosagem encontrada nas formas farmacêuticas de linezolida pelos métodos microbiológicos de doseamento de difusão em ágar e doseamento rápido em microplaca com leitura cinética baseadas na potência média encontrada nos ensaios.

Método	Comprimido 600mg			Solução Injetável 2 mg/mL		
	Potência (%)	DPR (%)	Dosagem (mg/comp.)	Potência (%)	DPR (%)	Dosagem (mg/comp.)
Doseamento de difusão em ágar	95,7	2,5	574,2	97,9	2,4	1,958
Doseamento rápido em microplaca	102,2	7,9	613,2	98,9	5,0	1,978

*DPR = Desvio padrão relativo

Através dos resultados obtidos, foi feita uma comparação entre os métodos utilizados entre si, de modo que pode se verificar que todos são equivalentes para a determinação da linezolida na apresentação em comprimidos revestidos ou na forma de solução injetável, considerando um p-valor de 0,0500, como pode ser demonstrado na **Tabela 36**.

Tabela 36. Comparação entre todos os métodos físico-químicos e microbiológicos em função da razão das respostas médias considerando três réplicas e o p-valor.

Método	Espectrofotometria em UV	RP-UPLC	Doseamento de difusão em ágar	Doseamento rápido em microplaca
	Razão (p-valor)	Razão (p-valor)	Razão (p-valor)	Razão (p-valor)
Espectrofotometria em UV	-	101,4 % (0,0000)	102,6 % (0,0002)	98,8 % (0,0000)
RP-UPLC	98,6 % (0,0000)	-	101,1 % (0,0000)	97,4 % (0,0002)
Doseamento de difusão em ágar	97,5 % (0,0002)	98,9 % (0,0000)	-	96,3 % (0,0007)
Doseamento rápido em microplaca	101,3 % (0,0000)	102,7 % (0,0002)	103,9 % (0,0009)	-

Na **Tabela 37** é mostrado as principais parâmetros encontrados para a validação dos métodos para a determinação da linezolida.

Tabela 37. Principais parâmetros encontrados para a validação dos métodos para a determinação da linezolida em comprimidos e solução injetável.

Parâmetros	Espectrofotometria em UV	RP-UPLC	Doseamento de difusão em ágar	Doseamento rápido em microplaca
Preparo da técnica	Muito simples	Simple	Trabalhoso	Trabalhoso
Tempo de análise	Rápido, tempo da leitura da amostra	Rápido, tempo da corrida da amostra	Demorado (Pré-incubação, ensaio e incubação)	Intermediário (Pré-incubação, ensaio e incubação)
Custo	Baixo	Alto	Muito baixo	Baixo
Fator medido	Absorbância	Área do pico cromatográfico	Diâmetro no Halo de inibição	Absorbância
Faixa de validação	1 a 12 µg/mL	8 a 12 µg/mL	8 a 32 µg/mL	1 a 4 µg/mL
Parâmetros importantes	Comprimento de onda: 254 nm; Solvente: Água ultrapurificada.	Fase móvel: Água, Acetonitrila e TFA (90:10:1); Fluxo: 0,5 ml/min.; Volume de injeção: 10 µL; Comprimento de onda: 254 nm; Coluna cromatográfica: C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm).	Micro-organismo: <i>Kocuria rhizophila</i> , inoculado a 1 %; Meio de cultura: Agar caseína de soja; Delineamento: (3x3), sistema de bicamada com 20 mL de camada basal e 5 mL de camada inoculada; Incubação: 18 a 24 horas e temperatura de 37 ± 1 °C.	Micro-organismo: <i>Staphylococcus aureus</i> , inoculado a 10%; Meio de cultura: Caldo de meio de antibiótico 3; Delineamento: (3x3) em microplaca; Incubação: período de 6 horas, temperatura de 37 ± 1 °C, e agitação de 500 rpm; Adição do reagente cloreto de trifeniltetrazólio (0,5%); Comprimento de onda de 630 nm.

7. CONCLUSÕES

Os métodos desenvolvidos e validados utilizados para a determinação de linezolida para as formas farmacêuticas de comprimidos revestidos e solução injetável para infusão mostraram-se eficientes a esse propósito e, além disso, apresentaram-se equivalentes quanto aos resultados obtidos nessas formulações, podendo, portanto serem empregados separados ou conjuntamente, assegurando assim maior segurança nas decisões de aceitação ou rejeição de um lote contendo este princípio ativo.

Os métodos físico-químicos representados pela espectrofotometria em UV e a cromatografia líquida de ultra-eficiência em fase reversa (RP-UPLC) são métodos rápidos, de preparo simples e com o menor DPR encontrado. No método de espectrofotometria em UV temos um custo baixo, agregado ao equipamento e também a utilização de água ultrapurificada como solvente, ao contrário do método de RP-UPLC onde temos um alto custo do equipamento, da coluna e dos solventes com grau de pureza nível HPLC, porém como grande diferencial deste método reside que o mesmo é o único que pode ser usado para a identificação e quantificação dos principais produtos de degradação da linezolida gerados sob as condições de estresse alcalina, ácida, oxidativa, térmica e fotolítica.

Os métodos microbiológicos são usados para determinar potência ou atividade biológica de um antibiótico, que não pode ser determinada pelos métodos físico-químicos. Os métodos microbiológicos utilizados do doseamento de difusão em ágar e do doseamento rápido em microplaca são de custo baixo. No caso do doseamento de difusão em ágar temos a utilização de placas estéreis, meio de cultura estéril e estufa bacteriológica, sem a necessidade de qualquer outro equipamento adicional, e no caso da microplaca como há a possibilidade de analisar até dois ensaios de delineamento de 3 x 3 de uma única vez, possibilitando assim como vantagem a leitura rápida e automatizada dos resultados. Cabe como foi ressaltado, que os métodos microbiológicos, são mais trabalhosos na preparação, pois requer a incubação prévia do micro-organismo, ajuste do inóculo e por fim há o período de incubação, no qual reside mais uma vantagem da microplaca que após o período de 6 horas apresenta seus resultados, ante ao período de 18 a 24 horas de incubação do doseamento de difusão em ágar.

Portanto cada método tem sua particularidade própria, possuindo características mais ou menos favoráveis conforme as necessidades e condições de cada laboratório que irá utilizá-lo como ferramenta de análise no seu controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, ABNT, São Paulo, 2005.

AGRAWAL H., MAHADIK K.R., PARADKAR A.R., KAUL N. Stability indicating HPTLC determination of linezolid as bulk drug and in pharmaceutical dosage forms. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 29, n. 10, p. 1119-1126, 2003.

AGUDELO, M., VESGA, O. Therapeutic equivalence requires pharmaceutical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic identities: true bioequivalence of a generic product of intravenous metronidazole. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, p. 2659-2665, 2012.

AL-ARAJI, Y.H., SHNEINE, J.K., AHMED, A.A. Chemistry of formazan. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, vol. 5(1), pg. 41-76, 2015.

ANGLOV, T., BYRIALSEN, K., CARSTENSEN, J.K., CHRISTENSEN, F., CHRISTENSEN, S., MADSEN, B.S., SORENSEN, E., SORENSEN, J.N., TOFTEGÅRD, K., WINTHER, H., HEYDORN, K. Uncertainty budget for final assay of a pharmaceutical product based on RP-HPLC. **Accreditation and Quality Assurance**, v.8, n. 5, p. 225-230, 2003.

BARLETT, R. C., MAZENS, M., GREENFILED, B. Acceleration of tetrazolium reduction by bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.3, p. 327-329, 1976.

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

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

BEZERRA, M. A., SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., VILLAR, L. S., ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76, p.956–977, 2008.

BOAK L.M., LI J., NATION R.L., RAYNER C.R. High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma. **Biomedical chromatography**, v. 20, p. 782-786, 2006.

BORNER, K., BORNER, E., LODE, H. Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.18, n. 3, p. 253-258, 2001.

BOZDOGAN, B., APPELBAUM, P.C. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.23 p.113-119, 2004.

BRASIL, Resolução RDC no. 31 de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo

BRASIL, Resolução RE no. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos".

BRITISH PHARMACOPEIA, London: Her Majesty's Stationery Office, 2008.

BRÜGGEMANN, L., WENNRICH, R. Evaluation of measurement uncertainty for analytical procedures using a linear calibration function. **Accred. Qual. Assur.**, v. 7, p.269-273, 2002.

BUTLER, M.S., COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. **Journal of Antibiotics**, v.64, n. 6, p. 413-425, 2011.

CHAMBERS H.F. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. In: BRUTON L.L., LAZO, J.S., PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, cap. 46, p. 1055-1081, 2006.

CHUI, Q. S. H., ANTONOFF, H. N., OLIVIERA, J. C. Utilização de índices r e R obtidos de programas interlaboratoriais para o controle de precisão de método analítico: determinação de água por Karl Fischer. **Quim. Nova**, v. 25, p.657-659, 2002.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 3ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

DAFALE, N. A., AGARWAL, P. K., SEMWAL, U. P., SINGH, G. N. Development and validation of microbial bioassay for the quantification of potency of the antibiotic cefuroxime axetil. **Anal. Methods**, v.5, p.690–698, 2013.

DAFALE, N. A., SEMWAL, U. P., AGARWAL, P. K., SHARMA, P., SINGH, G. N. Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. **Anal. Methods**, v.4, p. 2490–2498, 2012.

DANG, P. K., DEGAND, G., DANYI, S., PIERRET, G., DELAHAUT, P., TOH, V. D., MAGHUIN-ROGISTER, G., SCIPPO, M. L. Validation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in shrimp tissue. **Anal. Chim.Acta**, v.672, p. 30-39, 2010.

DOQ-CGCRE-008 - Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). 3 ed., Rio de Janeiro, 2010.

EHRlich M., TRITTLER R., DASCHNER F.D., KUMMERER K. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications**, v. 755, p. 373, 2001.

EURACHEM/CITAC GUIDE, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, third ed., Eurachem/Citac, London, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1, 2010.

FRANCISCO, F. L., SAVIANO, A. M., PINTO, T. J. A., LOURENÇO, F. R. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. **J. Microbiol. Methods**, v.103, p.104-111, 2014.

GABRIELSON, J., KÜHN, I., COLQUE-NAVARRO, P., HART, M., IVERSEN, A., MCKENZIE, D., MÖLBY, R. Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals. **Anal. Chim.Acta**, v.485, p.121-130, 2003 .

GHISLENI, D. D. M., OKAMOTO, R. T., AMARAL, C. M. O., LOURENÇO, F. R., PINTO, T. J. A. New microbiological assay for determination of caspofungin in the presence of its

degradation products and its measurement uncertainty. **J. AOAC Int.**, v.97, p.908-912, 2014.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v.33, p.667-679, 2010.

HANRAHAN, G., LU, K. Application of factorial designs and response methodology in modern experimental design and optimization. **Crit.Rev.Anal.Chem.**, v.36, p.141–151, 2006.

HARRIS, D.C. **Química analítica quantitativa**. Volume I. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HOWDEN B.P., WARD P.B., CHALES P.G., KORMAN T.M., FULLER A., DU CROS P., GRABSCH E.A., ROBERTS S.A., ROBSON J., READ K., BAK N., JONHSON P.D., MORRIS A.J., MAYALL B.C., GRAYSON M.L. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. **Clinical Infection Diseases**, v.32, p. S81-S03, 2004.

HSU, K.-H., CHEN, C. The effect of calibration equations on the uncertainty of UV-Vis spectrophotometric measurements. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v.43, n.10, p. 1525-1531, 2010.

ICH Guideline Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, Geneva, 2003.

ICH, Stability Testing of New Drug Substances and Products (Q1AR2), ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH: Geneva, 2003.

ICH. Guidance for industry Q8(R2): Pharmaceutical development, Geneva, 2009.

ICH. Validation of Analytical Procedures, in: Proceedings of the International Conference of Harmonization (ICH), Commission of the European Communities, London, 1996.

ISO GUM. Guide to the Expression of Uncertainty Measurement, Joint Committee for Guides in Metrology (Working Group 1), France, 2008.

KAISER, C.R., CUNICO, W., PINHEIRO, A.C., OLIVEIRA, A. G., PERALTA, M.A., SOUZA, M.V.N. Oxazolidinonas: uma nova classe de compostos no combate à tuberculose. **Rev. Bras. Farm.**, v.88(2), pg. 83 -88, 2007.

KLANCNIK, A., PISKERNIK, S., JERSEK, B., MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **J. Microbiol. Methods**, v.81, p.121-126, 2010.

LEITO, I., STRAUSS, L., KOORT, E., PIHL, V. Estimation of uncertainty in routine pH measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, n. 6, p. 242-249, 2002.

LI J., RAYNER C.R., DIXSON S., NATION R.L. Simple method for the assay of linezolid in brain heart infusion broth by high-performance liquid chromatography. **Biomedical chromatography**, v. 18, p. 1-5, 2004.

LIU, M., SEIDEL, V., KATERERE, D. R., GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v.42, p.325-329, 2007.

LOPES C.C.G.O., SALGADO H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 918-922, 2010.

LOPES C.C.G.O., SALGADO H.R.N. Development of a validated stability-indicating LC assay and stress degradation studies of linezolid in tablets. **Chromatographia**, v. 69, n. 2, p. 129-135, 2009.

LOURENÇO F.R., PINTO, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

LOURENÇO F.R., PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 559-566, 2009.

LOURENÇO, F. R. , AZEVEDO, J.C. , AMARAL, C.M.O. , KANEKO, T. M. Estimativa da incerteza de medição em contagem microbiana pelo método de semeadura em profundidade a partir dos resultados de validação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/ **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 181-183, 2004.

LOURENÇO, F. R. Simple Estimation of Uncertainty in the Quantification of Cefazolin by HPLC and Bioassay. **Journal of Chromatography & Separation Techniques**, v. 3, p. 1-3, 2012.

LOURENÇO, F. R., BARBOSA, E. A., PINTO, T. J. A. Microbiological assay for apramycin soluble powder, **Lat. Am. J. Pharm.**, v.30, p. 554–557, 2011.

LOURENÇO, F.R. **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em agar – proposta de delineamento experimental.** São Paulo, 2006, 218p. (Dissertação para obtenção do grau de Mestre – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

LOURENÇO, F.R. Uncertainty measurement of microbiological assay for apramycin soluble powder. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.32, n.5, p. 640-645, 2013.

LOURENÇO, F.R., DE SOUZA BOTELHO, T., DE PINTO, T.J.A. How pH, temperature, and time of incubation affect false-positive responses and uncertainty of the LAL gel-clot test. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.66, n.6, p. 542-546, 2012.

LOURENÇO, F.R., KANEKO, T.M., ANDREOLI PINTO, T.D.J. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/ **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.4, p. 437-443, 2005.

LOURENÇO, F.R., KANEKO, T.M., DE JESUS ANDREOLI PINTO, T. Evaluating measurement uncertainty in the microbiological assay of vancomycin from methodology validation data. **Journal of AOAC International**, v.90, n.5, p. 1383-1386, 2007.

MOHAPATRA S., ANNAPUMA M.M., KUMAR B.V.V.R., ANWAR M., WARSI M.H., AKHTER S. Validated stability indicating RP-HPLC method for the estimation of linezolid in a pharmaceutical dosage form. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.34, p. 2185–2195, 2011.

NARAYANA C.L., SURESH T., RAO S.M., DUBEY P.K., BABU J.M. A validated chiral HPLC method for the enantiomeric separation of Linezolid on amylose based stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 21-28, 2003.

NIEMI, R.M., NIEMELÄ, S.I. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, n.8, p. 372-375, 2001.

OHARA, M.T., SAITO, T. Aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio no teste limite microbiano em medicamentos e cosméticos. Técnica de “pour plate”. **Revista Farm. Bioquím.** Univ. de São Paulo. v. 29, n.2, p. 73-80, 1993.

OHARA, M.T., SAITO, T. Application of Triphenyltetrazolium Chloride in Microbial Limit Test of Pharmaceuticals and Cosmetics. **Journal of AOAC International**. v. 78, n. 6, 1995.

OKAMOTO, R.T., TRAPLE, M.A.L., LOURENÇO, F.R. Uncertainty in the quantification of metronidazole in injectable solution and its application in the assessment of pharmaceutical equivalence. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.9, n.4, p. 355-362, 2013.

PAIVA, D.L., KRIZ, G.S., LAMPMAN, G.M., VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia** - Tradução da 4ª Edição Norte-americana. Cengage Learning, 2011.

PAZUR, J. H. Electrophoresis and isoelectrofocusing coupled with agar diffusion for the characterization of antibodies and enzymes. **Anal. Chim.Acta**, v.383, p.127-136, 1999.

PEDROSO, T. M., SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological assay by turbidimetry to determine the potency of cefazolin sodium in the lyophilized powder form. **Anal. Methods**, v.6, p.1391-1396, 2014.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Dosagem microbiológica de antibióticos e fatores de crescimento. In: PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, cap.12, p. 631-693, 2010.

PROCTOR, L. M., SOUZA, A. C. Method for enumeration of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC)-active cells and cell-specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments. **J. Microbiol. Methods**, v.43, p.213-222, 2001.

RAJU T. S., KUTTY O. V., GANESH, V., SWAMY P. Y. A validated stability-indicating LC method for the separation of enantiomer and potential impurities of linezolid using polar organic mode. **Journal Pharmaceutical. Analytical.**, v.2, p.272-278, 2012.

RUBINSTEIN E., CAMMARATA S., OLIPHANT T., WUNDERINK R. Linezolid (PNU-100766) versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study. **Clinical Infection Diseases**, v. 32, p. 402-412, 2001.

RYBAK M.J., HERSHBERGER E., MOLDOVAN T., GRUCZ R. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin-intermediate and resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 1062-1066, 2000.

SARKER, S. D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v.42, p.321-324, 2007.

SAVIANO, A. M., LOURENÇO, F. R. Uncertainty evaluation for determining linezolid in injectable solution by UV spectrophotometry. **Measurement**, v.46, p.3924-3928, 2013.

SAVIANO, A. M., FRANCISCO, F. L., LOURENÇO, F. R. Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty. **Talanta**, v.127, p.225-229, 2014.

SAVIANO, A. M., MADRUGA, R. O. G., LOURENÇO, F. R. Measurement uncertainty of a UPLC stability indicating method for determination of linezolid in dosage forms. **Measurement**, v.59, p.1-8, 2015.

SHINABARGER D.L., MAROTTI K.R., MURRAY R.W., LIN A.H., MELCHIOR E.P., SWANEY S.M., DUNYAK D.S., DEMYAN W.F., BUYSSE J.M. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2132-2136, 1997.

SKOOG, D.A., HOLLER F.J., NIEMAN T.A. **Princípios da Análise Instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMITH, S. D., WHEELER, M. A., WEISS, R. M. Detection of urinary tract infections by reduction of nitrobluetetrazolium. **Kidney Int.**, v.54, p.1331-1336, 1998.

SOOVÄLI, L., RÕÕM, E.-I., KÜTT, A., KALJURAND, I., LEITO, I. Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, v.11, n.5, p. 246-255, 2006.

SRINUBABU,G., RAJU, C. A. I., SARATH, N., KUMAR, P. K., RAO, J. V. L. N. S. Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using an experimental design. **Talanta**, v.71, p.1424–1429, 2007.

TIWARI R.N., BONDE C.G. LC, LC-MS/TOF, and MSn studies for the separation, identification, and characterization of degradation products of linezolid. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.35, pg. 188-203, 2012.

TÓTOLI, E. G., SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution,Anal. **Methods**, v.5, p.5923–5928, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The National Formulary Official Monographs, USP 35, NF 30, Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2012

VESGA, O., AGUDELO, M., SALAZAR, B. E., RODRIGUEZ, C. A., ZULUAGA, A. Generic vancomycin products fail in vivo despite being pharmaceutical equivalents of the innovator,Antimicrob. **Agents Chemother.**, v.54, p.3271-3279, 2012.

WEITZEL, M. L. J. The estimation and use of measurement uncertainty for a drug substance test procedure validated according to USP <1225>. **Accred. Qual. Assur.**, v.17, p.139-146, 2012.

WILSON P., ANDREW J.A., CHARLESWORTH R., WALESBY R., SINGER M., FARREL D.J., ROBBINS M. Linezolid resistance in clinical of Staphylococcus aureus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 186-188, 2003.

WUNDERINK R.G., RELLO J., CAMMARATA, S.K., CROSS-DABRERA R.V., KOLLEF M.H. Analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus nosocomial pneumonia. **Chest**, v. 124, n. 5, p. 1789-1797, 2003.

WUNDERLI, S. Uncertainty and sampling, **Accred. Qual. Assur.**,v.8, p.90, 2003.

XIAO, J. B., CHEN, J. W., REN, F. L., YANG, C. S., XU, M. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by resonance light scattering. **Anal. Chim. Acta**, v.589, p.186-191, 2007;

YAMAMOTO, C. H., PINTO, T. J. A. Rapid determination of neomycin by a microbiological agar diffusion assay using triphenyltetrazolium chloride. **J. AOAC Int.**, v.79, p.434-440, 1996.

ZULUAGA, A. F., AGUDELO, M., RODRIGUEZ, C. A., VESGA, O. Application of microbiological assay to determine pharmaceutical equivalence of generic intravenous antibiotics. **BMC Clin. Pharmacol.**, v.9, 2009.