BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Antibióticos Quinolônicos em Preparações Farmacêuticas

Nájla Mohamad Kassab

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Titular Maria Inês R. M. Santoro

São Paulo
2004

J8122

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010536

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

Kassab, Nájla Mohamad
K19v Validação de métodos analíticos para determinação de antibióticos quinolônicos em preparações farmacêuticas / Nájla Mohamad Kassab. -- São Paulo, 2004.
171p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Medicamento : Controle de qualidade 3. Cromatografia : Análise química : Farmacologia 4. Espectrofotometria : Análise de fármacos I. T. II. Santoro, Maria Inês Rocha Miritello, orientador.

615.19015 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Nájla Mohamad Kassab

Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Antibióticos Quinolônicos em Preparações Farmacêuticas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Maria Inês R. M. Santoro
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, 17 de dezembro de 2004.

"Se o cérebro humano fosse tão simples que pudéssemos entendê-lo, seríamos tão simples que não o entenderíamos".

Lyall Watson, biólogo inglês.

A Deus,

"Por que Dele, por Ele e para Ele
são todas as coisas; glória a Ele eternamente"
(Romanos 12.36)

Aos meus pais pela confiança e crédito na minha pessoa e o apóio nas horas difíceis.

Aos meus quatro irmãos (Mariam, Munira, Youssef e principalmente meu irmão Munir que me acompanhou bem de perto nesta jornada)

À minha querida avó pela sua sabedoria e experiência de vida que fizeram dela um modelo o qual me inspiro.

Ao meu querido esposo Marcos Serrou do Amaral pela compreensão, apoio, incentivo, confiança e colaboração durante a realização deste trabalho.

À professora Maria Inês Rocha Miritello Santoro
pela orientação, incentivo e apoio
profissional e pessoal durante a realização deste trabalho.

Ao professor Jivaldo do Rosário Matos e
sua esposa Dra Lucildes Pita Mercuri. pela valiosa contribuição ,
incentivo e amizade no decorrer deste trabalho.

Ao amigo e professor Dr. Anil Kumar Singh
pela sólida amizade construída ao longo de todos esses anos de convívio,
pelo incentivo, pelo apoio profissional e pessoal.

Pois,

*"Amicizia que cessa non fu mai vera"**

**Amizade que acaba nunca principiou (ditado italiano)*

AGRADECIMENTOS

Aos colegas e amigos da Seção de Farmácia (SEFA) do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU), pelo apoio, incentivo, colaboração e compreensão dispensados desde o início para realização desta Pós-Graduação.

À coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A professora Lílian Rothschild F. de Carvalho do Instituto de Química pela compreensão, confiança e colaboração no empréstimo do cromatógrafo a líquido Shimadzu®, o qual foi essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Instituto de Química (IQ) Gilberto e Magda que me ajudaram na operação do equipamento acima.

Aos colegas do LATIG (IQ) Luís, Cláudia, Nara e Renato.

A Kátia Botelho – Técnica do Laboratório de Química Farmacêutica pela ajuda na interpretação dos espectros no Infravermelho.

Aos professores Érika Rosa Maria Kedor, Jorge Luís S. Martins e João Fernandes Magalhães do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico pelo incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico: Andréia C. Peraro, Andréia M. Taborianski, Elizângela A. Dutra, Fátima C. Franco. Ixis Ivete T. Hidalgo, Pedro L. Garcia, Regina C. Espires, Rosa F. Ignácio Tatiana T. de Fazio e Tatiane Ramos.

Às funcionárias Iria R. da Silva e Regina M. Rojas pelo companheirismo.

Aos bibliotecários Adriana De Almeida Barreiros, Ângelo Antônio e Leila A. Bonadio pelo auxílio bibliográfico.

Aos laboratórios fornecedores de amostras e padrões.

Ao PICDT-CAPES pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **01**

2. REVISÃO DA LITERATURA **05**

2.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS – CONSIDERAÇÕES GERAIS ... **05**

2.1.1. Histórico 05
2.1.2. Definições e características 07
2.1.3. Classificação dos antibióticos antibacterianos 09
2.1.4. Mecanismo de ação 10
2.1.5. Seleção da antibioticoterapia 13
2.1.6. Uso excessivo de antibióticos e a resistência microbiana 15

2.2. QUINOLONAS E FLUOROQUINOLONAS **19**

2.2.1. Metodologia analítica para a determinação de quinolonas 24
2.2.2. Informações gerais sobre as quinolonas selecionadas para o estudo 29

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS – CONSIDERAÇÕES GERAIS **34**

2.3.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) 34
2.3.2. Análise elementar 37
2.3.3. Técnicas termoanalíticas 39
2.3.3.1. Considerações sobre a calorimetria exploratória diferencial (DSC) 40
2.3.3.2. Considerações sobre a termogravimetria termogravimetria/derivada (TG/DTG) 42
2.3.3.3. Aplicações farmacêuticas dos métodos calorimétricos 44
2.3.3.3.1. Determinação de pureza 45
2.3.3.3.2. Análise de umidade 45
2.3.3.3.3. Polimorfismo 46
2.3.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV) 48
2.3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 54
2.3.5.1. Modos de separação 55
2.3.5.2. Cromatografia de modo normal 56
2.3.5.3. Cromatografia no modo reverso 56
2.3.5.4. Cromatografia de compostos ionizáveis 57
2.3.5.5. Cromatografia de troca iônica 58

2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS **61**

3. OBJETIVOS **64**

4. MATERIAL E MÉTODOS **65**

4.1. Material **65**

4.1.1. Reagentes e solventes 65
4.1.2. Substâncias químicas de referência 66
4.1.3. Amostras comerciais 67
4.1.4. Placebos 68
4.1.5. Vidrarias e acessórios 68
4.1.6. Equipamentos 69

4.2. Métodos **70**

4.2.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV). 70
4.2.2. Análise elementar 70
4.2.3. Estudos termoanalíticos 71
4.2.3.1. Termogravimetria
Termogravimetria/derivada(TG/DTG) 71
4.2.3.2. Calorimetria exploratória diferencial 71

4.2.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV) 72
4.2.4.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros analíticos 72
4.2.4.2. Validação do método para análise das amostras comerciais 73
4.2.4.2.1. Preparação das soluções padrão 73
4.2.4.2.2. Construção das curvas de calibração 73
4.2.4.2.3. Linearidade 74
4.2.4.2.4. Preparação das amostras comerciais 74
4.2.4.2.5. Análise das amostras – determinação dos teores percentuais 76
4.2.4.2.6. Teste de interferência dos excipientes – especificidade 76
4.2.4.2.7. Teste de recuperação – Exatidão 77
4.2.4.2.8. Precisão – desvio padrão relativo (DPR) 78
4.2.4.2.9. Determinação dos limites de detecção e de quantificação 79
4.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 80
4.2.5.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros analíticos 80
4.2.5.2. Validação do método para análise das amostras comerciais 81
4.2.5.2.1. Preparação das soluções padrão 81
4.2.5.2.2. Construção das curvas de calibração 81
4.2.5.2.3. Linearidade 81

4.2.5.2.4. Preparação das amostras comerciais..... 82
4.2.5.2.5. Análise das amostras – determinação dos teores percentuais..... 82
4.2.5.2.6. Teste de interferência dos excipientes especificidade..... 82
4.2.5.2.7. Teste de recuperação – Exatidão..... 82
4.2.5.2.8. Precisão – desvio padrão relativo (DPR)..... 83
4.2.5.2.9. Teste de robustez..... 83
4.2.5.2.10. Determinação dos limites de detecção e de quantificação..... 84

5. RESULTADOS..... 85

5.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)..... 85

5.2. Análise elementar..... 89

5.3. Estudos termoanalíticos..... 90

5.3.1. Ciprofloxacino..... 90
5.3.2. Gatifloxacino..... 92
5.3.3. Levofloxacino..... 93
5.3.4. Lomefloxacino..... 94
5.3.5. Norfloxacino..... 95
5.3.6. Pefloxacino..... 97

5.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV).... 98

5.4.1. Validação do método para análise das amostras comerciais.. 98
5.4.1.1. Construção das curvas de calibração e linearidade..... 98
5.4.1.2. Teste de recuperação - Exatidão..... 105
5.4.1.3. Precisão – Desvio padrão relativo (DPR)..... 105
5.4.1.4. Análise das amostras – determinação dos teores percentuais..... 105
5.4.1.5. Teste de interferência dos excipientes – Especificidade..... 108
5.4.1.6. Determinação dos limites de detecção e de quantificação..... 121

5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... 122

5.5.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos..... 122
5.5.1.1. Seleção dos comprimentos de onda..... 122
5.5.2. Aplicação do método proposto: solução padrão e amostra..... 126

5.5.3. Construção das curvas de calibração e linearidade..... 133
5.5.4. Teste de recuperação – Exatidão..... 140
5.5.5. Precisão – Desvio padrão relativo (DPR)..... 140
5.5.6. Análise das amostras – determinação dos teores percentuais..... 140
5.5.7. Determinação dos limites de detecção e de quantificação..... 141

6. DISCUSSÃO..... 144

6.1. Quinolonas – aspectos gerais..... 144

6.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)..... 146

6.3. Análise elementar..... 147

6.4. Estudos termoanalíticos..... 148
6.4.1. Ciprofloxacino..... 149
6.4.2. Gatifloxacino..... 149
6.4.3. Levofloxacino..... 150
6.4.4. Lomefloxacino..... 150
6.4.5. Norfloxacino..... 150
6.4.6. Pefloxacino..... 150
6.5. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV)..... 151

6.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... 154

7. CONCLUSÕES..... 156

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação simplificada de uma bactéria mostrando o sítio de ação dos diferentes tipos de agentes antibióticos....	11
Figura 2	Estrutura química geral das quinolonas.....	19
Figura 3	Diagrama esquemático do analisador elementar de C, H, N, S que usa separação cromatográfica e detecção por condutividade térmica.....	38
Figura 4	Tipos de materiais que podem ser estudados por análise térmica.....	39
Figura 5	Tipos de estudos que podem ser desenvolvidos por análise térmica.....	40
Figura 6	Célula de DST vista do interior.....	41
Figura 7	Esquema representativo de um analisador térmico moderno.....	42
Figura 8	Sistema termogravimétrico moderno.....	43
Figura 9	Espectrofotômetro clássico UV-VIS com seus respectivos componentes.....	53
Figura 10	Esquema básico de um sistema cromatográfico para CLAE	54
Figura 11	Espectro de absorção na região do infravermelho do ciprofloxacino.....	86
Figura 12	Espectro de absorção na região do infravermelho do gatifloxacino.....	86
Figura 13	Espectro de absorção na região do infravermelho do levofloxacino.....	87
Figura 14	Espectro de absorção na região do infravermelho do lomefloxacino.....	87
Figura 15	Espectro de absorção na região do infravermelho do norfloxacino.....	88
Figura 16	Espectro de absorção na região do infravermelho do pefloxacino.....	88
Figura 17 (a-b)	Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de CIP 99,50% e 99,30%.....	91

Figura 17 (c-d)	Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de CIP 98,40% e 94,20%.....	91
Figura 18 (a-b)	Curvas TG/DTG e DSC de GAT (100,60%).....	92
Figura 19 (a-b)	Curvas TG/DTG e DSC de LEV (100,00%).....	93
Figura 20 (a-b)	Curvas TG/DTG e DSC de LOM 99,20% e 100,20%.....	94
Figura 21 (a-b)	Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de NOR 100,10% e 99,30%.....	95
Figura 21c	Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de NOR (99,80%).....	96
Figura 21d	Percentual de perda de água através das curvas TG sobrepostas de NOR (100,10%), de 0 a 48 horas.....	96
Figura 22 (a-b)	Curvas TG/DTG e DSC de PEF (100,60%).....	97
Figura 23a	Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do CIP em 282 nm.....	99
Figura 23b	Curva de calibração de CIP em 282 nm.....	98
Figura 24a	Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do GAT em 293 nm.....	100
Figura 24b	Curva de calibração do GAT em 293 nm.....	100
Figura 25a	Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do LEV em 298 nm.....	101
Figura 25b	Curva de calibração LEV em 298 nm.....	101
Figura 26a	Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do LOM em 289.....	102
Figura 26b	Curva de calibração do LOM em 289 nm.....	102
Figura 27a	Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do NOR em 281 nm.....	103
Figura 27b	Curva de calibração do NOR em 281 nm.....	103
Figura 28a	Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do PEF em 281nm.....	104

Figura 28b Curva de calibração do PEF em 281 nm..... 104

Figura 29a Espectro de absorbância do placebo correspondente ao núcleo dos comprimidos de cloridrato de lomefloxacino do laboratório F, analisado por espectrofotometria no UV..... 109

Figura 29b Espectro de absorbância do placebo correspondente ao revestimento dos comprimidos de cloridrato de lomefloxacino do laboratório F, analisado por espectrofotometria no UV..... 110

Figura 29c Espectro de absorbância do placebo dos comprimidos de cloridrato de lomefloxacino do laboratório G, analisado por espectrofotometria no UV..... 111

Figura 29d Espectro de absorbância de amido analisado por espectrofotometria no UV..... 112

Figura 29e Espectro de absorbância do estearato de magnésio analisado por espectrofotometria no UV..... 113

Figura 29f Espectro de absorbância da etilcelulose analisado por espectrofotometria no UV..... 114

Figura 29g Espectro de absorbância da gelatina analisada por espectrofotometria no UV..... 115

Figura 29h Espectro de absorbância do glicolato de sódio analisado por espectrofotometria no UV..... 116

Figura 29i Espectro de absorbância da hidroxipropilmetilcelulose analisada por espectrofotometria no UV..... 117

Figura 29j Espectro de absorbância do óxido de titânio analisado por espectrofotometria no UV..... 118

Figura 29l Espectro de absorbância do talco analisado por espectrofotometria no UV..... 119

Figura 29m Espectro de absorbância do "placebo-mix" analisado por espectrofotometria no UV..... 120

Figura 30 Espectro de absorção de CIP na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico. 123

Figura 31 Espectro de absorção de GAT na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico. 123

Figura 32 Espectro de absorção de LEV na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico. 124

Figura 33 Espectro de absorção de LOM na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico..... 124

Figura 34 Espectro de absorção de NOR na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3)..... 125

Figura 35 Espectro de absorção de PEF na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico..... 125

Figura 36 Cromatograma do padrão e das amostras de CIP 127

Figura 37 Cromatograma do padrão e da amostra de GAT..... 128

Figura 38 Cromatograma do padrão e das amostras de LEV..... 129

Figura 39 Cromatograma do padrão e das amostras de LOM 130

Figura 40 Cromatograma do padrão e das amostras de NOR..... 131

Figura 41 Cromatograma do padrão e das amostras de PEF..... 132

Figura 42 Curva de calibração do CIP em 279 nm em fase móvel..... 134

Figura 43 Curva de calibração do GAT em 293 em fase móvel..... 135

Figura 44 Curva de calibração do LEV em 295 nm em fase móvel..... 136

Figura 45 Curva de calibração do LOM em 288 nm em fase móvel..... 137

Figura 46 Curva de calibração do NOR em 279 nm em fase móvel..... 138

Figura 47 Curva de calibração do PEF em 279 nm em fase móvel..... 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das quinolonas..... 22

Tabela 2 Métodos analíticos para determinação de ciprofloxacino por CLAE..... 26

Tabela 3 Métodos analíticos para determinação de lomefloxacino por CLAE..... 27

Tabela 4 Métodos analíticos para determinação de norfloxacino por CLAE..... 27

Tabela 5 Métodos analíticos para determinação de pefloxacino por CLAE..... 28

Tabela 6 Relação de fármacos recebidos por laboratórios farmacêuticos para serem empregados como padrões de referência com seus respectivos graus de pureza..... 66

Tabela 7 Relação das amostras de antibióticos quinolônicos empregados nesta pesquisa com suas respectivas apresentações comerciais..... 67

Tabela 8 Peso médio dos comprimidos de antibióticos quinolônicos das amostras comerciais..... 75

Tabela 9 Quantidades adicionadas de soluções de amostras e de padrões para realização do teste de recuperação empregando-se o método espectrofotométrico no UV..... 78

Tabela 10 Quantidades adicionadas de soluções de amostras e de padrões para realização do teste de recuperação empregando-se o método por CLAE..... 83

Tabela 11 Resultados da análise elementar: determinação do teor de CHN e percentagem de água dos padrões de antibióticos quinolônicos..... 89

Tabela 12 Recuperação da solução padrão adicionada às amostras analisadas empregando o método espectrofotométrico proposto..... 106

Tabela 13 Dados estatísticos obtidos nas análises das amostras empregando o método espectrofotométrico proposto..... 107

Tabela 14 Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do CIP, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3..... 134

Tabela 15 Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do GAT, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3..... 135

Tabela 16 Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do LEV, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3..... 136

Tabela 17 Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do LOM, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3..... 137

Tabela 18 Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do NOR, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3..... 138

Tabela 19 Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do PEF, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3..... 139

Tabela 20 Recuperação da solução padrão adicionada às amostras analisadas empregando o método cromatográfico proposto. 142

Tabela 21 Dados estatísticos obtidos nas análises das amostras empregando o método cromatográfico proposto..... 143

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
%R	Percentual de recuperação
ACN	Acetonitrila
AOAC	Association of Official Analytical Chemists International
$C_6H_{13}NaO_3S$	Hexanosulfonato de sódio
CBM	Concentração bactericida mínima
CH_3COOH	Ácido acético
CIP	Ciprofloxacino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	Concentração mínima inibitória
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio Padrão
DP	Desvio padrão
DPm	Desvio Padrão Médio
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
GAT	Gatifloxacino
HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Resolução
LD	Limite de detecção
LEV	Levofloxacino
LOM	Lomefloxacino
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
NOR	Norfloxacino
OMA	Otite Média Aguda
PEF	Pefloxacino

pH	Logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio
pK	Logaritmo negativo da constante de dissociação
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
TG	Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

ABSTRACT

The objective of this research was to develop and validate analytical methods for quantitative determination of fluoroquinolones of second and third generation. A simple and rapid spectrophotometric and chromatographic method was developed and validated for quantitative determination of six quinolone antibiotics in twelve pharmaceutical preparations, amongst them tablets and injection preparations. The fluoroquinolones selected in this research were ciprofloxacin (CIP), gatifloxacin (GAT), levofloxacin (LEV), lomefloxacin (LOM), norfloxacin (NOR) and pefloxacin (PEF). Elemental analysis, thermal analysis (TG/DTG) e DSC and infrared spectrophotometric techniques were used to characterize and qualify raw material and were used as secondary standards. The quinolones were quantitatively determined using direct UV spectrophotometry with methanol as solvent. The liquid chromatographic method was constituted of a LiChrospher® 100 RP-18 column (5μm, 125 x 4 mm) and a mobile phase constituted of water:acetonitrile (80:20 v/v), with 0.3% of triethylamine and pH adjusted to 3.3 with phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL/min and the analyses were performed using UV detector with wavelengths varying from 288 to 295 nm. All analyses were performed at room temperature (24 ± 2 ℃) and were separated within 5 min. The calibration curves were linear for both, spectrophotometric and chromatographic methods with correlation coefficient better than 0.9999. The average recovery values were above 98.0% with relative standard deviation (RSD) < 1.0%. The obtained data indicates accuracy and precision of the proposed methods.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos para a determinação de fluoroquinolonas de 2ª e 3ª gerações. Um método espectrofotométrico e um método cromatográfico, simples e rápido foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa de seis fármacos quinolônico e doze preparações farmacêuticas, entre comprimidos e soluções injetáveis. As fluoroquinolonas estudadas foram ciprofloxacino (CIP), gatifloxacino (GAT), levofloxacino (LEV), lomefloxacino (LOM), norfloxacino (NOR) e pefloxacino (PEF). As técnicas empregadas para a caracterização dos padrões secundários foram a análise elementar, análise térmica (TG/DTG) e DSC e espectroscopia no infravermelho. As quinolonas foram analisadas por espectrofotometria direta no UV empregando metanol como solvente. Na cromatografia líquida, as condições padronizadas foram: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm, 125 x 4 mm), e fase móvel constituída de água:acetonitrila (80:20 v/v), com 0,35% de trietilamina, pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico. A vazão empregada foi de 1,0 mL/min e a análise foi desenvolvida usando detecção UV variando de 288 a 295 nm, em temperatura de 24 ± 2 ℃. todas as quinolonas foram separadas em menos de 5 min. As curvas de calibração foram lineares ($r > 0,9999$.) no intervalo de concentração de 4,0 a 24,0µg/mL. O desvio padrão relativo (DPR) foi < 1,0% e a média de recuperação dos comprimidos foi acima de 98,0%. Os dados obtidos indicam precisão e exatidão dos métodos propostos.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, a humanidade tem sido vítima de pandemias e epidemias como cólera, peste, gripe, febre tifóide, tuberculose e outras doenças infecciosas. Esta história pode ser dividida em dois períodos. A primeira chamada de a "era das trevas" – um mundo sem antibiótico e a segunda "a era da luz" – a descoberta dos antimicrobianos. As doenças infecciosas eram verdadeiros destruidores de impérios, chegando a dizimar grande número de pessoas.

Os antibióticos já salvaram a vida de milhares de pessoas e mudaram a prática da medicina desde a sua introdução entre os anos de 1940 a 1950. Porém, a Organização Mundial da Saúde afirma que ainda hoje as infecções causam 25% das morte em todo o mundo e que 45% destas, ocorrem em países em desenvolvimento.

Acreditava-se que a história das doenças infecciosas estivesse com os dias contados. Porém, um quadro paradoxal foi se formando. Hoje, observa-se a existência de muitas classes de antimicrobianos, inúmeros quadros infecciosos não responsivos a vários antibióticos, populações que não têm acesso a qualquer tipo de agente quimioterápico e o uso desenfreado destes fármacos em situações não justificáveis (OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2000).

As infecções ainda causam pavor na população e afligem a classe médica. O medo dessas doenças faz com que haja um crescente uso de antibióticos, quer seja para fins preventivos ou curativos, tornando, muitas vezes, a terapêutica irracional. Os pacientes sentem-se no direito de receber um "remédio" de cura rápida, e nessa expectativa, às vezes forçam o médico ou pedem que lhes seja prescrito um antibiótico, contribuindo ainda mais para o abuso e o uso irracional, muito embora pareça correto, pois coincide

com a cura daquelas infecções tidas como autolimitantes (WANNMACHER, 2004).

A verdade é que a resistência microbiana tem aumentado progressivamente e a velocidade de surgimento de novos agentes antimicrobianos tem sido inversamente proporcional ao aparecimento de germes multi-resistentes. Antibióticos que outrora apresentavam perfil de sensibilidade para grande maioria de bactérias patogênicas, hoje já nem se encontram mais disponíveis para uso clínico.

Nos Estados Unidos, calcula-se que 50% dos usos são inadequados, correspondendo a tratamento desnecessário de infecções virais do trato respiratório superior, bronquite e faringite. Os resultados confirmaram um uso excessivo de antibióticos bem como uma utilização inadequada dos mesmos, o que contribui para o aumento de cepas bacterianas resistentes (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002).

Definitivamente o uso abusivo e irracional de antibióticos tem levado ao aumento da resistência microbiana, podendo colocar em perda uma "guerra", já ganha anteriormente contra os microrganismos. A grande disponibilidade de antibióticos aliada à propaganda de medicamentos pouco conscienciosa (WANNMACHER, 2004) tem contribuído para esta situação.

As quinolonas ou fluoroquinolonas são agentes quimioterápicos sintéticos, de amplo espectro, agem contra bactérias gram (+), gram (-) e também, contra micobactérias, micoplasmas, rickettsias e contra o protozoário *Plasmodium* spp. As quinolonas são usadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (BURHENNE; LUDWIG; SPITELLER, 1999; ARTESEROS *et al.*, 2002).

Quantidades consideráveis de quinolonas são empregadas em grande escala no campo (avicultura, suinocultura e na criação de gado) tanto para tratamento de infecções, quanto na categoria de promotores do crescimento animal (BURHENNE; LUDWIG; SPITELLER, 1999).

Nos anos 50 pesquisadores descobriram que dosagens sub-clínicas de antibióticos na ração de aves melhoravam sensivelmente o crescimento e a eficácia da produção. Atualmente estas substâncias ainda são utilizadas em razão dos benefícios que apresentam no aumento da eficiência alimentar, na diminuição da mortalidade e na melhoria do bem-estar de aves.

As quinolonas estão entre os antibióticos mais empregados para esta finalidade. Tanto que diversos trabalhos na literatura enfocam análise e monitoramento de resíduos na carne e no leite de consumo humano. Outros estudos (não citados neste trabalho) têm correlacionado o uso excessivo de quinolonas no campo com superinfecção em humanos por germes multi-resistentes, além de infecção por enterobactérias resistentes.

Atualmente já existe a 4ª geração de fluoroquinolonas e, todos os anos novos derivados quinolônicos continuam sendo sintetizados com o intuito de se candidatarem a novos fármacos. As diferenças estruturais entre os antibióticos de mesmo grupo são pequenas, o que dificulta a identificação e a determinação de produtos de degradação, tendo em vista o grande número de fármacos com estruturas similares (BELAL; AL-MAJED; AL-OBAID, 1999).

Considerando os fatos acima expostos, percebeu-se a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos confiáveis para a análise de quinolonas de 2ª e 3ª gerações em formulações farmacêuticas, visando o controle de qualidade dos medicamentos de uso humano comercializados no mercado nacional.

Para tanto, este trabalho delineou sob dois grandes objetivos, o primeiro, na caracterização dos padrões secundários de quinolonas de 2ª e 3ª gerações, através da análise elementar, da espectroscopia na região do infravermelho e das técnicas termoanalíticas, e o segundo objetivo consistiu no desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos.

Dois métodos analíticos quantitativos foram desenvolvidos e validados, um por espectrofotometria na região do ultravioleta e outro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os parâmetros avaliados foram: comprimento de onda, curva de calibração, precisão (desvio padrão relativo - DPR), exatidão (teste de recuperação) e limites de detecção e quantificação. Os resultados obtidos mostraram que os métodos propostos são precisos e exatos e que os mesmos podem ser usados na rotina diária de laboratório de controle de qualidade.

Os comprimentos de onda empregados foram de 281 a 298 nm. Na espectrofotometria na região do UV foi utilizado metanol como solvente e na CLAE o sistema eluente consistiu de água:acetonitrila (80:20), trietilamina 0,3%, pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico .

Sabendo que as quinolonas são antibióticos bastante estáveis à alta temperatura (maior que a temperatura de pasteurização e cozimento), confirmada pela análise térmica – DSC e que o uso agro-veterinário é permitido e, também os riscos de infecção humana por germes resistentes são possíveis , cabe aqui uma indagação a respeito da efetividade dos órgãos competentes em promover o uso racional dos antibióticos, fiscalizar abusos e o monitoramento e controle de resíduos em produtos de origem animal, para que possa haver segurança no consumo, dentro de limites aceitáveis, sem riscos para a saúde pública.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS – CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1.1. Histórico

A antibioticoterapia, em bases empíricas, foi observada há muitos séculos. Os chineses, 2500 anos atrás, já usavam a papa mofada de soja aplicada como tratamento de rotina no antraz, furúnculo, bolhas e infecções superficiais. No entanto, o significado destas observações e o valor do microrganismo como agente curativo ou fonte de produção de medicamentos para o tratamento de infecções sistêmicas passaram despercebidos até o final do século XIX, quando a bacteriologia se desenvolveu como ciência (FONSECA , 1994).

Os primeiros pesquisadores a reconhecerem o potencial clínico de produtos de origem microbiológica foram Pasteur e Joubert em 1877. Eles observaram que o *Bacillus anthracis* crescia rapidamente em urina estéril, mas morriam quando "bactérias comuns do ar" fossem colocadas na urina. No final do século XIX e inicio do século XX várias substâncias demonstraram potencial antimicrobiano em culturas de bactérias e algumas chegaram a ser empregadas clinicamente, mas foram descartadas devido à elevada toxicidade (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; FONSECA, 1994; HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

Discute-se muito se foi a guerra ou a devastação proveniente das doenças infecciosas que teve uma maior influência histórica nas fronteiras geopolíticas. Até a Segunda Guerra Mundial, foi a peste, e não guerra, a responsável pelo maior número de mortes entre os soldados. A derrota de Napoleão Bonaparte na Rússia, não foi somente devido ao inverno russo. Sem dúvida alguma, seu oponente mais mortal foi o tifo, infecção transmitida através de piolhos. A saudável e invencível armada constituída por 655.000

homens ficou reduzida a um lamentável e desmoralizado contingente de 93.000 sobreviventes, que continuaram a transmitir *Rickettsia* para outros pessoas de seus contatos. A epidemia subseqüente matou outros dois milhões, eliminando 250.000 civis só na Alemanha (OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2000).

A era moderna da terapia antimicrobiana iniciou-se com o uso clínico da sulfanilamida em 1936, quando Gerhard Domagk descreveu a atividade da para-sulfamido-crisoidina nas infecções por estreptococos beta-hemolíticos. A partir daí as pesquisas sobre sulfas e derivados desenvolveram-se em ritmo prodigioso, pois pela primeira vez se dispunham de armas efetivas no combate a doenças bacterianas (FONSECA , 1994).

Um pouco antes, em 1929 Alexander Fleming notou, publicando a seguir suas observações, a ação inibitória do *Penicillium notatum* no crescimento de *Staphylococcus aureus*. Sua descoberta não teve aplicação prática imediata, pois ele foi incapaz de isolar a penicilina, a substância responsável pela atividade inibitória, ou de produzi-la com bons rendimentos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996). As comunicações de Fleming não despertaram muito interesse, pois reinava o entusiasmo em relação as sulfonamidas de fácil preparação (FONSECA , 1994).

A Segunda Guerra Mundial acelerou as pesquisas para a descoberta de novos agentes antibacterianos. A chamada "era de ouro" dos antibióticos começou com a produção da penicilina em 1940 quando Florey e Chain isolaram a penicilina, obtendo-se o antibiótico no estado cristalino. Em 1941, ela foi introduzida na prática terapêutica (FONSECA, 1994). Pelo menos, 30% dos pacientes hospitalizados receberam um ou mais protocolos de tratamento com antibióticos e milhões de infecções, potencialmente fatais, foram curadas (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

Entretanto, ao mesmo tempo, estes medicamentos estavam entre os agentes terapêuticos mais mal empregados na prática da clínica médica. Um dos resultados do amplo uso dos antibióticos foi o crescente aumento de resistência dos patógenos, levando assim à necessidade da pesquisa de novos fármacos e ao aumento dos custos da atenção médica (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

2.1.2. Definição e características

A palavra antibiótico é resultante da combinação de duas palavras gregas que tem como significado literalmente "contrário à vida", foi criada por Paul Vuilemin, em 1889. Walksman, na década de 1940, definiu antibiótico como uma substância produzida por microrganismo e que tem a capacidade de inibir o crescimento e até de destruir outros microrganismos. Outra definição mais ampla deve-se a Benedict e Langlykke que, em 1947, conceituaram antibiótico como um composto químico derivado de organismo vivo ou por ele produzido capaz, em concentrações baixas, de inibir processos vitais de microrganismos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Segundo esta definição, as fontes produtoras de antibióticos são os seres vivos em geral (bactérias, fungos, actinomicetos), podendo ser ainda incluídos nessa categoria compostos antimicrobianos produzidos por animais e plantas superiores (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996; JOSHI, 2002).

Segundo Fonseca (1994), antibióticos são substâncias químicas, definidas ou não, produzidas por microrganismos vivos, com a propriedade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos ou, eventualmente, destruí-los. Em certos casos, como os antibióticos antineoplásicos, esta propriedade se estende a outras células além dos microrganismos patogênicos. Um antibiótico deve apresentar as seguintes características: ser produto de metabolismo de seres vivos, antagonizar o crescimento e/ou

a sobrevivência de uma ou mais espécies de microrganismos e ser eficaz em baixas concentrações.

Os antibióticos desempenham papel de grande importância em várias áreas como na química farmacêutica, na agricultura e na indústria alimentícia. Até o momento, já foram estudados aproximadamente 40.000 antibióticos, mas apenas cerca de 80 deles são de uso terapêutico (JOSHI, 2002).

Medicamentos antimicrobianos são classificados em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais. Antibacterianos são divididos em antibióticos, sintetizados por fungos; quimioterápicos, produzidos em laboratório (sintéticos), e os chamados antibióticos híbridos ou semi-sintéticos, que correspondem à mistura dos dois. Entretanto, a denominação de antibióticos prevalece na prática clínica diária, independentemente da origem natural ou sintética (FUCHS, 1998), como no caso das sulfonamidas e quinolonas (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996) e, ainda, o termo antibiótico tornou-se sinônimo de agente antibacteriano (PAGES *et al.*, 1999).

Os antibióticos apresentam diferenças pronunciadas em suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, espectros antibacterianos e mecanismos de ação. O conhecimento dos mecanismos moleculares das bactérias, fungos e da replicação viral, tem facilitado extremamente o desenvolvimento racional de compostos que podem interferir com o ciclo de vida dos microrganismos (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

2.1.3. Classificação dos antibióticos antibacterianos

Diversos esquemas têm sido propostos para classificar e agrupar os agentes antibacterianos. Os principais são: *a)* biossíntese; *b)* espectro de ação e c*)* estrutura química (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; FONSECA, 1994).

A. **Biossíntese:** segundo sua biossíntese os antibióticos podem ser divididos nas seguintes classes: antibióticos derivados de aminoácidos, de carboidratos, de acetato e propionato e antibióticos de biossínteses diversas;

B. **Espectro de atividade:** para fins médicos, esta é uma das melhores maneiras de classificar os antibióticos, pois está diretamente relacionada com à eficácia terapêutica: antibióticos com atividade predominante contra bactérias gram (+), gram (-), antibióticos de amplo (ou largo) espectro e antibióticos com atividade predominante contra micobactérias.

C. **Estrutura química:** baseando-se na estrutura química, muitos autores propuseram classificações químicas para os antibióticos. Entretanto, nenhuma delas é satisfatória, além disso, para o clínico elas não têm muita utilidade. Portanto, por razões didáticas os antibióticos são agrupados nas seguintes classes: penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol e derivados, tetraciclinas, antibióticos polipeptídicos, poliênicos, macrolídeos, aminociclitóis, ansamicinas, antraciclinas, grupo da lincomicina, antibióticos glutarimídicos, poliéteres e antibióticos diversos.

2.1.4. Mecanismo de ação

Um antibiótico ideal exerceria sua ação lesando apenas o microrganismo invasor, sem causar dano ao hospedeiro. Seria, portanto, uma substância dotada de elevado parasitotropismo e baixo, ou nenhum, organotropismo. Em outras palavras, apresentaria toxicidade seletiva em relação ao parasito, sendo inócua para o hospedeiro (FONSECA, 1994). A *Figura 1* mostra os sítios de ação dos principais tipos de antibióticos. A terapia antimicrobiana depende da ação de um fármaco em matar ou impedir o crescimento das bactérias sem prejudicar o hospedeiro de acordo com os mecanismos abaixo (FUCHS, 1998; PAGES *et al.*, 1999; GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2004):

1. Agentes que inibem a síntese de parede celular bacteriana: penicilinas e cefalosporinas, que são estruturalmente similares, e agentes não similares como cicloserina, vancomicina, bacitracina, e ainda, agentes antifúngicos imidazólicos tais como miconazol, cetoconazol e clotrimazol;

2. Agentes que agem diretamente na membrana celular de microrganismos, afetando a permeabilidade e, conseqüentemente a perda de conteúdo intracelular. Dentre estes compostos destacam-se os detergentes, polimixinas e os antifúngicos poliênicos como a nistatina e a anfotericina B que se ligam aos esteróis da parede celular;

3. Compostos que afetam as subunidades ribossômicas 30S ou 50S, causando inibição reversível na síntese de proteínas. São os fármacos chamados de bacteriostáticos, os quais incluem o cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina e clindamicina;

4. Agentes que se ligam à subunidade 30S ribossomal e alteram a síntese de proteínas, que eventualmente levam à morte celular como por exemplo, os aminoglicosídeos;

5. Agentes que afetam o metabolismo do ácido nucléico, como a rifampicina que inibe a RNA polimerase DNA-dependente e as quinolonas que inibem a girase;

6. Antimetabólitos como trimetoprima, sulfonas e sulfonamidas, que bloqueiam etapas específicas e essenciais do metabolismo microbiano.

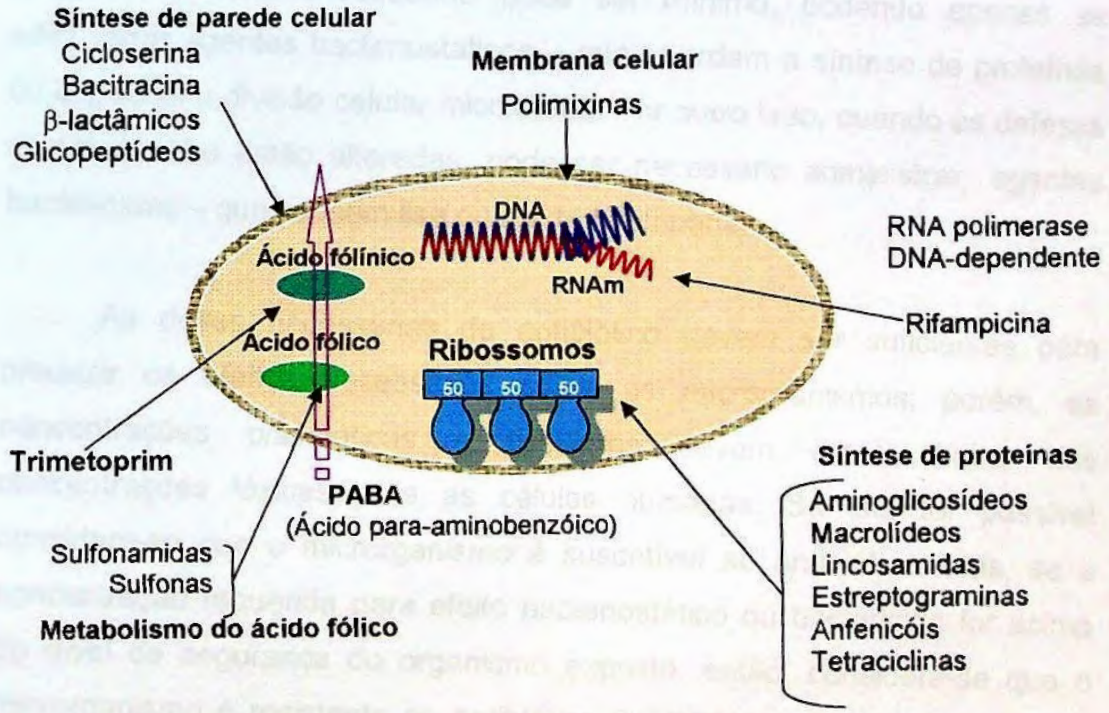


Figura 1 – Representação simplificada de uma bactéria mostrando o sítio de ação dos diferentes tipos de agentes antibióticos (PAGES *et al.*, 1999).

Quando se utilizam antibióticos para tratar uma infecção, numerosos fatores influem sobre um resultado favorável. De forma simplificada pode-se dizer que o êxito da terapêutica depende sobretudo da concentração de

antibiótico que alcance um nível de atividade antibacteriana, no sítio infeccioso, suficiente para inibir o crescimento bacteriano (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

A concentração mínima inibitória (CMI) corresponde a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. Na medida em que a concentração do antibiótico se eleva chega-se a uma concentração que matará a bactéria – concentração bactericida mínima (CBM), que freqüentemente é de 2 a 8 vezes maior de que aquela da CMI (PAGES *et al.*, 1999).

Quando as defesas do hospedeiro estão em máxima atividade, o efeito antibacteriano requerido pode ser mínimo, podendo apenas se administrar agentes bacteriostáticos – que retardam a síntese de proteínas ou impeçam a divisão celular microbiana. Por outro lado, quando as defesas do hospedeiro estão alteradas, pode ser necessário administrar agentes bactericidas – que causam lise ou morte bacteriana.

As doses necessárias de antibiótico devem ser suficientes para produzir os efeitos necessários sobre os microrganismos; porém, as concentrações plasmáticas e tissulares devem estar abaixo das concentrações tóxicas para as células humanas. Se isto for possível considera-se que o microrganismo é suscetível ao antibiótico. Mas, se a concentração requerida para efeito bacteriostático ou bactericida for acima do nível de segurança do organismo exposto, então, considera-se que o microrganismo é resistente ao antibiótico (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

Os antibióticos podem agir em conjunto de maneira sinérgica, antagônica ou indiferente. Ocasionalmente, dois ou mais antibióticos são usados em associações, contra o mesmo patógeno. No laboratório, é possível classificar a relação entre dois ou mais antibióticos, dependendo do

efeito da combinação deles sobre o crescimento bacteriano em comparação com a ação de cada um isoladamente. Na prática, a maioria das combinações é indiferente. A relevância clínica do sinergismo e do antagonismo *in vitro* é geralmente desconhecida. Entretanto, clinicamente foram demonstradas combinações sinérgicas e antagônicas importantes: sinergismo da combinação de penicilina com aminoglicosídeos no tratamento da endocardite enterocócica e o antagonismo entre a associação de penicilina com tetraciclina na terapêutica da meningite bacteriana (PAGES *et al.*, 1999).

A morte bacteriana pelos antibióticos bactericidas pode ser concentração-dependente ou tempo-dependente. Os aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas são antibióticos bactericidas por concentração-dependente, ao passo que outros agentes como, por exemplo, os antibióticos β-lactâmicos, é tempo-dependente, isto é, existe pouca ou nenhuma atividade bactericida com concentrações de antibióticos acima da CBM. Neste caso, a destruição da bactéria depende da manutenção das concentrações de antibióticos acima da CBM pelo máximo possível de intervalo entre as doses a ser administradas (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996; PAGES *et al.*, 1999).

2.1.5. Seleção da antibioticoterapia

Os antibióticos podem ser usados como recursos profiláticos ou terapêuticos. Em ambos os casos, os fatores bacterianos e os fatores ligados ao hospedeiro devem ser levados em consideração. Por isso, a seleção de um antibiótico para uma determinada infecção é um procedimento complexo e requer conhecimento clínico dos fatores farmacológicos e microbiológicos (PAGES *et al.*, 1999).

A terapia antibacteriana só é eficaz nas infecções bacterianas, por isso é importante restringir o uso dos antibióticos àquelas situações em que

as infecções bacterianas são conhecidas ou altamente prováveis. A prática extremamente comum de prescrição de antibióticos para infecções virais é desaconselhável em razão da ineficácia, dos custos, dos efeitos adversos e do risco de indução de resistência bacteriana.

O local da infecção constitui um dos fatores mais importantes do hospedeiro. É fundamental que os antibióticos atinjam o local da infecção em concentrações superiores a CMI. Porém, apenas alguns antibióticos são capazes de atingir o sistema nervoso central em concentrações terapêuticas para o tratamento de meningite ou abscessos cerebrais. Já as infecções urinárias devem ser tratadas com antibióticos que sejam excretados pelos rins na sua forma ativa.

Outros fatores importantes relacionados ao hospedeiro que devem ser ponderados na escolha da antibioticoterapia, incluem a alergia medicamentosa e, as funções hepáticas e renais, uma vez que a maioria dos antibióticos é eliminada através dos rins e fígado; medicações concomitantes, devido às interações medicamentosas, idade – pois em se tratando de recém-nascidos e crianças, alguns antibióticos são contra-indicados, gravidez, condições do sistema imunológico e, finalmente a via de administração (PAGES *et al.*, 1999; RANGE; DALE; RITTER, 2001).

Lamentavelmente, a decisão de se usar um antibiótico freqüentemente é tomada por análise superficial, isto é, sem correlação entre o microrganismo potencialmente infectante e as características farmacológicas do medicamento. Muitas vezes o que se observa é o tratamento empírico com antibióticos combinados ou com um agente de amplo espectro, isto é, aquele capaz de "cobrir" todos os prováveis patógenos.

Quando se indica um agente antimicrobiano, o objetivo é eleger um com atividade seletiva para os microrganismos infectantes mais prováveis,

com a mínima possibilidade de produzir toxicidade ou reação alérgica. A decisão para um tratamento empírico correto requer conhecimento dos microrganismos infectantes e suas sensibilidades aos agentes antimicrobianos (HARDMAN; GILMAN; LIMBIRD, 1996).

2.1.6. Uso excessivo de antibióticos e a resistência microbiana

Os agentes antimicrobianos representam os medicamentos mais importantes empregados na terapêutica, tanto para o controle ou a cura de infecções graves, quanto para a prevenção e tratamento de complicações infecciosas de outras modalidades terapêuticas, como na quimioterapia do câncer e pós-cirurgias. Todavia, existem evidências crescentes de que esses agentes antimicrobianos estão sendo excessivamente prescritos em muitos contextos ambulatoriais em vários países. A aquisição desses medicamentos sem prescrição tem levado ao desenvolvimento de resistência de muitos patógenos causadores de quadros infecciosos potencialmente fatais (PAGES *et al.*, 1999).

Logo que a penicilina foi liberada para uso, uma nota de advertência foi publicada em 1946 por Alexander Fleming: "O mau uso da penicilina como medicamento, por meio de doses demasiadamente pequenas, ao invés de acabar com a infecção, faz com que os micróbios sejam condicionados a resistir ao antibiótico até que uma grande quantidade de microorganismos penicilino-resisistentes seja produzida e passem essa característica a outros descendentes até que surja algum microorganismo capaz de provocar uma pneumonia ou septicemia, as quais não possam mais ser tratadas com penicilina" (MEDISCOVER, 2004).

Há cerca de 20 anos atrás, acreditava-se que as doenças infecciosas seriam apenas lembranças do passado. Depois da descoberta de muitos fármacos entre 1930 e 1970, as pesquisas para novos antimicrobianos deram lugar ao desenvolvimento de novos agentes antivirais, devido à

epidemia de AIDS crescente no início dos anos de 1980. logo se percebeu a necessidade de retomá-las, pois era emergente o desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, por um processo de seleção natural. Hoje a resistência microbiana já está praticamente descartando antibióticos que levaram décadas para serem produzidos (OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2000).

Os microrganismos são capazes de resistir a um antimicrobiano pelos seguintes mecanismos: produção de enzimas específicas que inativam os antibióticos, restrição à absorção dos antimicrobianos, alteração ou eliminação do sítio ativo do fármaco e aumento da produção de um metabólito antagonista do antimicrobiano (FONSECA, 1994).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), infecções causam 25% das mortes em todo o mundo e 45% das ocorridas nos países menos desenvolvidos. Dentre aquelas se salientam a tuberculose, infecções respiratórias agudas, diarréia, malária, doenças sexualmente transmissíveis, infecções adquiridas em hospitais e doenças tropicais (Chagas, leishmaniose, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose e tripanosomíase). O uso de antimicrobianos para estas situações tem magnitude calculada. (WANNMACHER, 2004).

Aproximadamente 20 milhões de prescrições são feitas por ano nos consultórios médicos nos Estados Unidos para infecções respiratórias do trato superior. Os diagnósticos mais comuns são otite média e infecções das vias aéreas superiores (IVRS) inespecíficas, bronquites, faringites e sinusites (MCCAIG; HUGHES, 1995). Há 160 milhões de prescrições escritas de antibióticos (30 prescrições / 100 indivíduos), correspondendo a 25 mil toneladas de antibióticos. Cerca de 50% destina-se a pacientes e 50% são usados em animais, agricultura e aqüicultura (WENZEL; EDMOND, 2000).

O uso excessivo de antibióticos e o erro diagnóstico contribuem com o aumento da resistência microbiana (OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2000; RANGE; DALE; RITTER, 2001; WANNMACHER, 2004). A otite média aguda (OMA) é uma doença infecciosa mais comumente diagnosticada na infância e a indicação mais comum é o emprego de antibióticos. Aproximadamente 30% de todas as prescrições feitas para crianças em consultórios são para OMA (NYQUIST, 1998), o que gera um dispêndio de 15% dos 100 bilhões de dólares gastos anualmente com medicamentos (PHELPS, 1989). Um relato recente indica que uma criança nos Estados Unidos consome, durante os primeiros dois anos de vida, uma quantidade de antibióticos equivalente a 3 meses de tratamento (PARADISE *et al., 1997*). Princípios para o uso racional de antibióticos na OMA já foram publicados (DOWELL *et al.*, 1998).

Em um estudo desenvolvido no Vietnã em 1997, descobriu-se que, para mais de 70% dos pacientes, foi prescrita quantidade inadequada de antimicrobianos para infecções graves, enquanto outros 25% recebiam desnecessariamente antimicrobianos. Na China, investigadores observaram erro na escolha dos antimicrobianos prescritos em 63% dos casos de infecções bacterianas comprovadas, enquanto que em Bangladesh, 50% dos medicamentos dispensados em uma unidade hospitalar eram impróprios (OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2000; WHO, 2004).

A publicidade aliada à falta de informação, freqüentemente faz com o prescritor tenha o desejo de satisfazer o paciente e sofre a pressão exercida pelos fabricantes que induzem ao uso do que é mais novo e mais dispendioso (WANNMACHER, 2004).

Nos EUA, 95% dos médicos inquiridos tinham observado, nos seis meses prévios, uma média de sete pacientes que pediram medicamentos específicos como resultado de publicidade. Dos médicos questionados, 70% admitiram que a pressão por parte do paciente os forçou a prescrever

medicamentos que poderiam ter evitado. Em 1995, um estudo empreendido no Peru, constatou que dois terços dos profissionais de saúde informaram que a sua fonte primária de informação era a propaganda médica. Os pesquisadores concluíram que aquela publicidade pareceu ser a fonte chave de informação, fator esse que promoveu o uso irracional de medicamentos, o que está diretamente relacionado com o desenvolvimento de bactérias multi-resistentes (OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2000).

2.2. QUINOLONAS E FLUOROQUINOLONAS

As quinolonas são antimicrobianos estruturalmente relacionados com o ácido nalidíxico – empregado nas infecções urinárias – que foi disponibilizado para o uso clínico desde a década de 60 (BURHENNE; LUDWIG; SPITELLER, 1999; REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002; ARTESEROS *et al.*, 2002)

Segundo Silva (2002), a primeira quinolona antibacteriana foi identificada por Lesquer e colaboradores, em 1962, entre os produtos obtidos na síntese da cloroquina. Tratava-se de um composto de estrutura 1,8-naftiridina, que recebeu o nome de ácido nalidíxico (Silva, 2002).

A *Figura 2* apresenta a estrutura química geral das quinolonas, composta por um anel hetrerocíclico de oito membros contendo um átomo de nitrogênio na posição 1.

Na metade da década de 80, surgiram as fluoroquinolonas (resultantes da inclusão do flúor na posição 6). Essa modificação aumentou o espectro de ação das quinolonas tanto para patógenos gram (+), quanto para gram (-), ampliando, assim, as indicações clínicas. Posteriormente, a introdução do grupo piperazinil na posição 7 do anel levou a um aumento da atividade contra *Pseudomonas aeruginosas*.

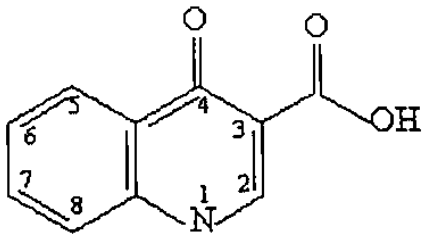


Figura 2 – Estrutura química geral das quinolonas.

Numerosas modificações moleculares foram feitas no núcleo da quinolina, com o intuito de aumentar a atividade antimicrobiana e melhorar o desempenho farmacocinético, ou seja, o prolongamento do tempo de meia-vida, o aumento da solubilidade e da atividade antimicrobiana (BELAL; AL-MAJED; AL-OBAID, 1999; ARTESEROS *et al.*, 2002).

Pode-se dizer que as quinolonas foram desenvolvidas a partir de agentes antibacterianos com limitados espectros de ação dando origem a uma classe de antibióticos com ampla atividade e extensa indicação clínica (SILVA, 2002; LIANG; KAYS; SOWINSKI, 2002). Este fato implica em dizer que muitas modificações estruturais alcançaram um ponto ótimo de atividade terapêutica, entretanto, ainda não foi conseguida a dissociação total dos efeitos adversos (BELAL; AL-MAJED; AL-OBAID, 1999).

Milhares de diferentes estruturas quinolônicas já foram sintetizadas. No entanto, menos de 10 destas substâncias foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e têm utilidade clínica (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002). Nos últimos cinco anos foram aprovadas nos Estados Unidos as quinolonas de 3ª e 4ª gerações (JOSHI, 2002).

As quinolonas são usadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (BURHENNE; LUDWIG; SPITELLER, 1999; ARTESEROS *et al.*, 2002), especialmente na área da reprodução animal. Quantidades consideráveis de quinolonas são empregadas em grande escala no campo (avicultura, suinocultura e na criação de gado) tanto para tratamento de infecções, quanto na categoria de promotores do crescimento animal (BURHENNE; LUDWIG; SPITELLER, 1999).

A atividade bactericida das quinolonas resulta da inibição da tropoisomerase II (DNA girase) e IV, enzimas essenciais à replicação e transcrição do DNA. Apresentam um amplo espectro de atividade que abrange muitos microrganismos gram (+) (inibição da tropoisomerase IV) e

gram (-) (primariamente por inibição da DNA girase) (TAVARES, 2001; ARTESEROS *et al.*, 2002). O ciprofloxacino é o que apresenta maior atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*. O norfloxacino é o que apresenta menor biodisponibilidade sistêmica (concentrações teciduais) sendo, por isso, preferencialmente empregado no tratamento de infecções urinárias. Já o levofloxacino é conhecido como a quinolona ideal para ser empregada nas infecções das vias respiratórias atuando contra patógenos típicos e atípicos (TAVARES, 2001).

O amplo espectro de atividade, a absorção oral, a longa meia-vida (em muitos casos posologia dose única), a boa penetração tissular e a tolerabilidade em geral desses derivados, resultou no extensivo uso clínico das novas fluoroquinolonas, também chamadas genericamente de quinolonas (SILVA, 2002). Por estas razões estes compostos são considerados atualmente como um grupo especial de fármacos (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002; SILVA, 2002).

Com o intuito de classificar as quinolonas do ponto de vista clínico, Walker (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002; SILVA, 2002) propôs um critério baseado na potência e no espectro de atividade antibacteriana, criando quatro gerações de quinolonas (*Tabela 1*).

Tabela 1 – Classificação das quinolonas

Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração
Ácido nalidíxico	Ciprofloxacino	Esparfloxacino	Moxifloxacino
Ácido oxolínico	Enofloxacino	Gatifloxacino	Trovafloxacino
Cinoxacino	Lomefloxacino	Grepafloxacino	
	Norfloxacino	Levofloxacino	
	Ofloxacino		
	Pefloxacino		

Fonte: Modificado de WALTER, R.C. *apud* SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1085;

Como o aparecimento da resistência as quinolonas de 1ª geração (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacino) desenvolveu-se rapidamente, estes compostos foram pouco empregados na clínica. As fluoroquinolonas mais ativas, as de 2ª geração (norfloxacino, ciprofloxacino, enofloxacino, lomefloxacino e ofloxacino), foram lançadas entre 1986 e 1992. Esses fármacos têm sido muito úteis, mas não possuem atividade contra cocos gram (+), inclusive o *Streptococcus pneumuniae* penicilino-resistente e contra anaeróbios.

As fluoroquinolonas de 3ª e 4ª gerações, introduzidas mais recentemente, por volta de 1997, são denominadas de fluoroquinolonas de amplo espectro (levofloxacino, esparfloxacino, gatifloxacino, grepafloxacino, trovafloxacino e moxifloxacino). Essas quinolonas possuem atividades aumentadas contra gram (+) anaeróbios, gram (-) e patógenos atípicos.

As fluoroquinolonas são moléculas com pequenas massas moleculares. Muitos desses compostos são *zwitterions* e apresentam diferentes solubilidades conforme mudanças no pH. Estes agentes são

relativamente estáveis, tanto nas formas farmacêuticas de uso oral quanto na parenteral, até mesmo acima de 30°C. Soluções reconstituídas de soro ou urina permanecem estáveis por várias semanas se protegidas da luz.

A quelação potencial com metais pode levar à redução de atividade. A fotossensibilidade à luz ambiente é o fator de maior impacto na estabilidade desses compostos (BELAL; AL-MAJED; AL-OBAID, 1999). Tomiainen, Tammilehto e Ulvi (1996) estudaram o efeito do pH, do tipo de tampão e da concentração da solução sobre a fotodegração do cloridrato de ciprofloxacino. Exposição prolongada à luz solar ou à luz fluorescente resultou na degradação da solução de norfloxacino (CORDOBA-BORREGO; CORDOBA-DIAZ, M.; CORDOBA-DIAZ, D., 1999).

Embora as fluoroquinolonas estejam aprovadas para diferentes tipos de infecções, raramente devem ser os antibióticos de primeira escolha. A utilização generalizada das quinolonas levou ao aparecimento de uma percentagem significativa de resistências. Hoje em dia, os estafilococos resistentes a meticilina, são virtualmente resistentes às quinolonas, bem como cerca de 20% das espécies de *Pseudomonas aeruginosa*. A resistência cruzada entre as diferentes quinolonas tem sido descrita (TAVARES, 2001). O desafio para o profissional de saúde é usá-las prudentemente, isto é, limitar seu emprego a um contexto clínico particular, que justifique o espectro ampliado desses fármacos, e não em toda e qualquer infecção (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002).

2.2.1. Metodologia analítica para determinação de quinolonas

Muitos métodos para determinação de antibióticos quinolônicos encontram-se disponíveis na literatura. Os métodos mais comumente empregados, em análises quantitativas, são os métodos cromatográficos, radioimunoensaios e ensaios microbiológicos (JOSHI, 2002; SILVEIRA; SCHAPOVAL, 2002). Os métodos espectrofotométricos UV-VIS, a cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) (NOVAKOVIC *et al.*, 2001) e os métodos espectrofluorimétricos, também têm sido descritos para análise de quinolonas em medicamentos e fluidos biológicos. Os ensaios espectrofotométricos, apesar de simples, não são bons indicadores de estabilidade e, portanto, não devem ser empregados para avaliação da estabilidade de antibióticos quinolônicos (CORDOBA-BORREGO; CORDOBA-DIAZ, M.; CORDOBA-DIAZ, D., 1999; THOPPIL, 2000).

Nos compêndios oficiais, o norfloxacino e o lomefloxacino foram descritos no periódico *Analytical Profile of Drugs Substances and Excipients* (MAZUEL, 1991; SANZGIRI; KNAUB; RILEY, 1994) e nas Farmacopéias Americana (UNITED, 2004) e Britânica (BRITISH, 1999), somente o norfloxacino, ciprofloxacino e cloridrato de ciprofloxacino têm monografias analíticas inseridas. A metodologia analítica para norfloxacino recomendada pela Farmacopéia Britânica é a titulação potenciométrica com ácido perclórico em meio não aquoso (BRITISH, 1999). O esparfloxacino foi analisado por este método (MARONA; SCHAPOVAL, 2001). Outros métodos titulométricos também são relatados na literatura para análise de ciprofloxacino (KILIÇ; KOSEOGLU; AKAYT, 1994; ZHANG *et al.*, 1997).

Cloridrato de ciprofloxacino (ZHANG, L.T. *et al.*, 1997; LIU, 1997) e norfloxacino (STANKOV, 1993; AL-RASHOOD, 1994) foram determinados por espectrofotometria UV diferencial e espectrofotometria UV derivada, respectivamente.

A espectrofotometria no visível (BHOWAL, DAS, 1991; FRATINI; SCHAPOVAL, 1996; CHOWDARY; LIU, 1997; RAO, 1997; SODHI; CHAWLA; SANE, 1997; MOSTAFA; EL-SADEK; ALLA, 2002) e a espectrofluorimetria (RIZK *et al.*, 2000; DJURDJEVIC; JELIKIC-STANKOV; STANKOV, 1995; PULGARIN; MOLINA; LOPEZ, 1996; LIZONDO *et al.*, 1997; DRAKOPOULOS; IOANNOU, 1997; PEREZ-RUIZ *et al.*, 1997; MERAS *et al.*, 1998) têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de quinolonas, tanto em formulações farmacêuticas, quanto em amostras biológicas.

A eletroforese capilar compõe outro grupo de técnicas analíticas que pode ser empregada para análise de quinolonas em formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e alimentos (FLURER *et al.*, 1997; SUN; CHEN, 1997; FIERENS; HILLAERT; VAN DEN BOSSCHE, 2000; FURLANETTO *et al.*, 2002).

As medidas calorimétricas vêm sendo extensivamente empregadas na industria farmacêutica para a caracterização de substâncias, fármacos excipientes e formas farmacêuticas (THOMPSON, 2000). A compatibilidade entre excipientes de uma formulação farmacêutica contendo cloridrato de ciprofloxacino foi avaliada Pelas técnicas calorimétrica (FATHY; HASSAN; MOHAMED, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais freqüentemente empregada para a determinação de quinolonas, quer seja em medicamentos, fluidos biológicos, tecidos animais, alimentos ou preparados alimentícios como ração para gado, aves e suínos (BELAL; AL-MAJED; AL-OBAID, 1999). As *Tabelas 2, 3, 4* e *5* apresentam alguns métodos que empregam a CLAE para determinação de ciprofloxacino, lomefloxacino, norfloxacino, e pefloxacino, respectivamente, em formulações farmacêuticas e solução padrão.

Tabela 2 – Métodos analíticos para determinação de ciprofloxacino por CLAE.

MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Ref.
Formulação farmacêutica	LiChrosorb® C18 (5 μm)	MeOH: Tampão fosfato (1:1)	UV 254	*
Formulação farmacêutica	Inertisil ODS 2®	THF: MeCN:tampão 0,005M de $C_6H_{13}NaO_3S$ (2:1:17)	UV 254	**
Formulação farmacêutica	C18 (10 μm)	MeOH: H_2O:CH_3COOH (840:159:1)	UV 254	***
Formulação farmacêutica	250x4 (10 μm) LiChrospher® RP-18	MeCN:H_2O:TEA (80:20:0,6), pH 3,0	UV (n.d.)	+
Solução padrão	250x4 (5 μm) LiChrospher® RP-18	MeCN:Tampão fosfato 25 mM (7:93) pH 3,89/100 mM tetrabutilamônio	UV 288	++
Solução padrão	150x3,9 (4 μm) Nova-Pak® C18	MeCN:Sol.H_3PO_4 (20 mM) 15:85/2,5 mM heptano sulfonato de sódio	UV 278	+++
Solução padrão	80x4,6 (3,65 μm) Zorbax Rx-SIL 18	MeCN:TFA (0,1%) 20:80	UV 277	†
Solução padrão	250x4,6 (5 μm) BDS-Hipersil® C18	MeOH:THF: Tampão fosfato (670mM) (20:0,8:79,2 pH 3,0	UV 275	††
Solução padrão	150x4,6 (5 μm) Nucleosil® C18	MeCN:Tampão citrato(35:65) pH 2,4	UV 280	†††

* Referência (BUDVARI-BARANY *et al.*, 1991), ** Referência (LACROIX; CURRAN; SEARS, 1996), *** Referência (HUSAIN *et al.*, 1995), + Referência (THOPPIL; AMIN, 2000), ++ Referência (BARBOSA; BERGES; SANZ-NEBOT, 1996), +++ Referência (TORNIAINEN; TAMMILEHTO; ULVI, 1996), † Referência (KIRKILAND, K.M.; MCCOMBS; KIRKLAND, J.J, 1994), †† Referência (TIEFENBACHER *et al.*, 1994), ††† Referência (MORLEY; EROLD JR., 1993)

Tabela 3 – Métodos analíticos para determinação de lomefloxacino por CLAE.

MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Ref.
Formulação farmacêutica	Shadex C_{18} (5 μm)	0,025 mM Tampão fosfato: MeCN (90:10)	UV 278 ou 285	*
Formulação farmacêutica	LiChrosorb® C18 (5 μm)	MeOH: Tampão fosfato (1:1)	UV 254	**
Formulação farmacêutica	Spherisorb ® C18 (5 μm)	Ác. cítrico: MeCN (4:1) pH 4,0	UV 258	***

* Referência (ARGEKAR *et al.*, 1996), ** Referência (BUDVARI-BARANY *et al.*, 1991), *** Referência (MORLEY; EROLD JR., 1993)

Tabela 4 – Métodos analíticos para determinação de norfloxacino por CLAE.

MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Ref.
Formulação farmacêutica	LiChrosorb® C18 (5 μm)	MeOH: tampão fosfato (1:1)	UV 254	*
Formulação farmacêutica	LiChrosorb® C8 (10 μm)	Tampão fosfato:MeCN (85:15), pH 3	UV 278	**
Solução padrão	150x4,6 (5 μm) Nucleosil® C18	MeCN:Tampão citrato(35:65) pH 2,4	UV 280	***

* Referência (BUDVARI-BARANY *et al.*, 1991), ** Referência (CORDOBA-BORREGO; CORDOBA-DIAZ, M.; CORDOBA-DIAZ, D., 1999), *** Referência (MORLEY; EROLD JR., 1993)

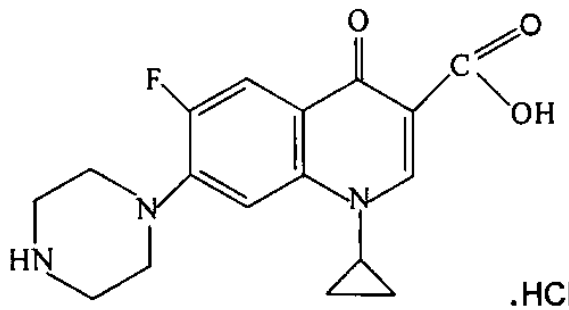
Tabela 5 – Métodos analíticos para determinação de pefloxacino por CLAE.

MATRIZ	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Ref.
Formulação farmacêutica	Shadex C_{18} (5 μm)	0,025Tampão fosfato: MeCN (90:10)	UV 278 ou 285	*
Formulação farmacêutica	LiChrosorb® C18 (5 μm)	MeOH: Tampão fosfato (1:1)	UV 254	**

* Referência (ARGEKAR *et al.*, 1996), ** Referência (BUDVARI-BARANY *et al.*, 1991)

2.2.2. Informações gerais sobre as quinolonas selecionadas para o estudo

✷Cloridrato de ciprofloxacino



.HCl.H_2O

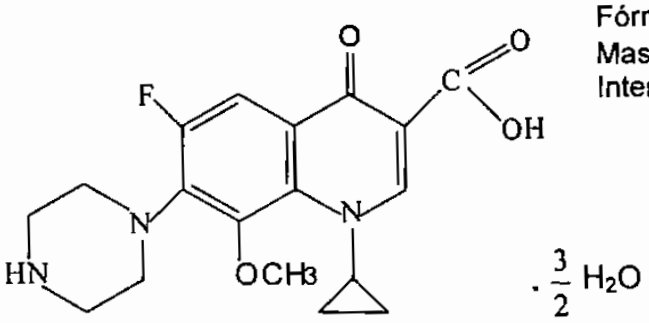
Fórmula Molecular: $C_{17}H_{18}FN_3O_3.HCl.H_2O$
Massa Molecular: 385,82 g/mol
Intervalo de fusão 318 – 320°C
pKa_1 6,0
pKa_2 8,8

Propriedades físico-químicas

O cloridrato de ciprofloxacino apresenta-se sob a forma de pó cristalino amarelo pálido e de caráter anfótero (DOLLERY, 1991). Parcial ou moderadamente solúvel em água, levemente solúvel em metanol e muito pouco solúvel em álcool desidratado. Praticamente insolúvel em acetona, acetonitrila, acetato de etila, hexano e cloreto de metila (MERCK , 1996; MARTINDALE, 1999; BRITISH, 1999).

Cerca de 1,0 grama de cloridrato de ciprofloxacino é solúvel em 25,0 mL de água (DOLLERY, 1991; GENNARO, 1995). O coeficiente de partição octanol/tampão fosfato pH 7,4 é equivalente a 0,6 (DOLLERY, 1991).

✸Gatifloxacino

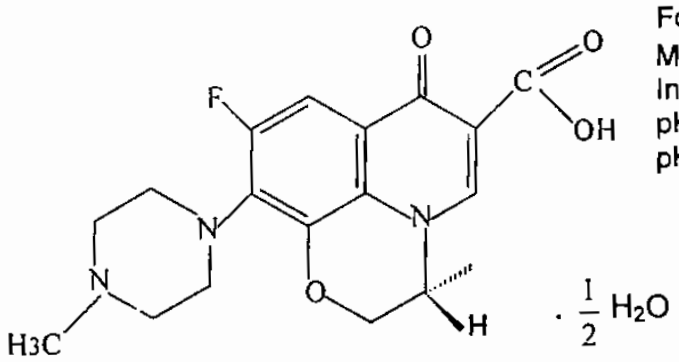


Fórmula Molecular: $C_{19}H_{22}FN_3O_4.3/2H_2O$
Massa Molecular: 384,4 g/mol
Intervalo de fusão: 182 – 185°C

Propriedades físico-químicas

O gatifloxacino se apresenta como um pó cristalino sesquiidratado, branco ou amarelo pálido. Existe como racemato, não apresentando rotação óptica. A solubilidade do composto é dependente do pH. A solubilidade aquosa máxima é de 40,0 a 60,0 mg/mL , que ocorre em pH de 2 a 5 (TEQUIN, 2004; KEMPROTEC LIMITED, 2004).

✸Levofloxacino

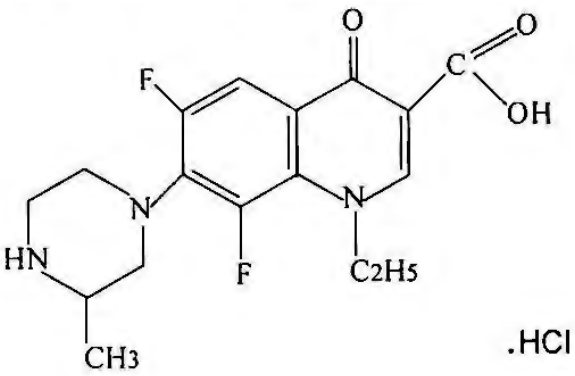


Fórmula Molecular: $C_{18}H_{20}FN_3O_4.1/2\ H_2O$
Massa Molecular: 370,4 g/mol
Intervalo de fusão 225 – 227°C
pKa_1 6,11
pKa_2 8,18

Propriedades físico-químicas

O levofloxacino corresponde ao isômero S-(–) do ofloxacino. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco amarelado, cuja solubilidade aumenta, tanto na fase ácida como alcalina, ou seja, quando pH $\leq pKa_1$ ou pH $\geq pKa_2$ (MERCK, 1996).

Cloridrato de lomefloxacino



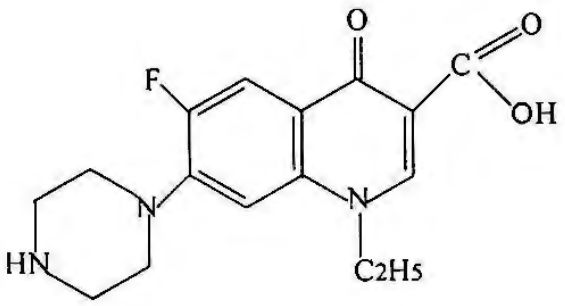
.HCl

Fórmula Molecular: $C_{17}H_{19}F2N_3O_3.HCl$
Massa Molecular: 351,36 g/mol
Intervalo de fusão: 290 – 300°C
pKa_1 5,82; pKa_2 9,30 (espectrofotometria)
pKa_1 5,49; pKa_2 8,78 (potenciometria)

Propriedades físico-químicas

O lomefloxacino apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco sem odor e com sabor amargo. Na forma de cloridrato apresenta ponto de fusão por volta de 295°C com decomposição (GENNARO, 1995; MERCK, 1996). A solubilidade do lomefloxacino foi estudada em função do pH e da temperatura. A 25°C a solubilidade intrínseca é de 1,03 mg/mL de água. A solubilidade aquosa a 25°C, em pH 5, foi de 2,56 mg/mL. Já em pH 7 e pH 9, a solubilidade é de 1,40 $\pm$ 0,03 e 2,46 $\pm$ 0,18 mg/mL, respectivamente (SANZGIRI; KNAUB; RILEY, 1994).

Norfloxacino



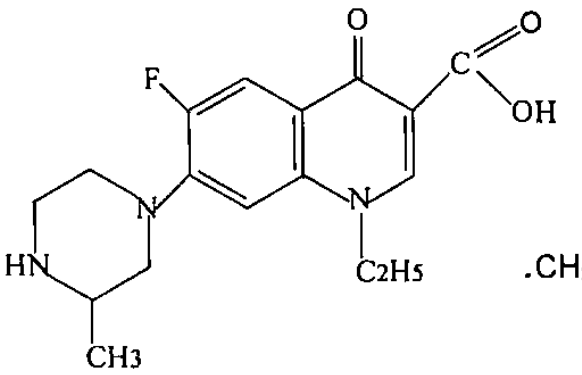
Fórmula Molecular: $C_{16}H_{18}FN_3O_3$
Massa Molecular: 319,34 g/mol
Intervalo de fusão: 227 – 228°C
pKa_1 6,0 – 6,4
pKa_2 7,9 – 8,7

Propriedades físico-químicas

O norfloxacino apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco ou amarelo pálido higroscópico, sensível a luz e com sabor ligeiramente amargo. Muito solúvel em ácido acético e parcialmente solúvel em clorofórmio. Muito pouco solúvel em água, metanol, acetato de etila e praticamente insolúvel em éter (DOLLERY, 1991; MAZUEL, 1991; GENNARO, 1995; MERCK, 1996; MARTINDALE, 1999; BRITISH, 1999).

A solubilidade na água é dependente do pH, e é aumentada em pH < 5 e em pH > 10. Por ser sensível à umidade forma hemiidratos (MERCK, 1996). O coeficiente de partição octanol/tampão fosfato em pH 7,4 é equivalente a 0,46 (DOLLERY, 1991).

❋Mesilato de pefloxacino



Fórmula Molecular: $C_{18}H_{28}FN_3SO_4 \cdot 2H_2O$
Massa Molecular: 465,5 g/mol
Intervalo de fusão: por volta de 300°C

$.CH_3SO_3H.2H_2O$

Propriedades físico-químicas

O pefloxacino é levemente solúvel em água e muito solúvel em soluções alcalinas ou ácidas (MERCK, 1996). Pouco solúvel em álcool, clorofórmio e éter (TAIZHOU RISHENG PHARMACHUTICAL & CHEMICAL, 2004).

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS – ASPÉCTOS GERAIS

2.3.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Usa-se o termo espectroscopia vibracional para descrever as técnicas de espectroscopia de infravermelho e da espectroscopia de Raman. Estes dois tipos de espectroscopia dão o mesmo tipo de informação molecular e um método pode ser usado para complementar o outro (MENDHAM *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de um instrumento IV só aconteceu após 1940. Atualmente, o espectrofotômetro por IV é um dos instrumentos mais comumente empregados na caracterização de moléculas orgânicas. Diferentemente dos gráficos espectrais do UV-VIS, o espectro IV geralmente é representado com a transmitância percentual, em lugar da absorbância no eixo das ordenadas. Da mesma forma é habitual usar a unidade centímetro invertido (cm^{-1}) ou o número de onda para a abscissa em lugar de comprimento de onda. Isso ocorre por causa da proporcionalidade direta entre o número de onda e a energia, bem como a freqüência da radiação; a freqüência pode, por sua vez, estar diretamente relacionada com as freqüências vibracionais moleculares (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004).

A região do IV do espectro eletromagnético pode ser dividida em três partes principais:

a) **Infravermelho próximo**: (região das harmônicas) 0,8 – 2,5 μm (1500 – 4000 cm^{-1});

b) **Infravermelho médio**: (região de vibração – rotação) 2,5 – 50 μm (4000 – 200 cm^{-1});

c) **Infravermelho distante**: (região de rotação) 50 – 1000 μm (1500 – 4000 cm^{-1});

A região mais interessante para fins analíticos está entre 2,5 a 25 μm, isto é, cujos números de onda estão entre os 4000 e 400 cm^{-1}. Os materiais óticos normais como o vidro e o quartzo absorvem fortemente no IV e, por isso, os instrumentos de medida nesta região diferem dos usados na região do espectro eletrônico (UV-VIS). No IV os espectros têm origem nos diferentes modos de vibração e rotação das moléculas. Em comprimentos de onda inferiores a 25 μm, a radiação tem energia suficiente para alterar os níveis de energia vibracional das moléculas e o processo é acompanhado por mudanças nos níveis de energia rotacional.

Os espectros rotacionais puros das moléculas ocorrem na região do IV distante e são usados para a determinação das dimensões das moléculas.

Os espectros de IV podem ser usados para identificar compostos puros ou para a detecção e identificação de impurezas. As principais aplicações referem-se a compostos orgânicos, principalmente porque a água, o solvente mais importante para compostos inorgânicos, absorve fortemente acima de 1,5 μm. Além disso, os compostos inorgânicos têm numerosas bandas largas, enquanto que os compostos orgânicos têm numerosas bandas agudas. De certa forma o espectro de absorção na região do IV pode ser olhado como a impressão digital do composto.

O espectro de uma mistura de compostos é essencialmente a soma dos espectros dos componentes, desde que não ocorra associação, dissociação, polimerização ou formação de compostos. Para detectar impurezas em uma substância, seu espectro pode ser comparado com o espectro da substância pura. As impurezas farão aparecer outras bandas no espectro. O caso mais favorável é quando as impurezas têm grupos

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

característicos que não existam no constituinte principal (MENDHAM *et al.*, 2002).

Extensas tabelas e quadros da freqüência de absorção de grupos característicos para muitos grupamentos funcionais comuns podem ser encontrados em muita literatura. Vários catálogos de espectros de referência foram publicados, dos quais o mais volumoso é o do *Sadtler Research Laboratories*, atualmente com mais de 90.000 espectros.

Embora a espectrometria no UV geralmente é empregada para a determinação qualitativa, atualmente vem sendo empregada em análise quantitativa. Por causa da singularidade de seus espectros, os métodos quantitativos podem não exigir a separação prévia do analisado dos seus excipientes e ser então, quantificado como tal, sem prévia extração (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004).

2.3.2. Análise elementar

A fórmula empírica de um composto pode ser determinada se a composição percentual é conhecida. Vários métodos são utilizados e muitos e baseiam em reações que decompõem o composto conhecido. O método que funciona bem para compostos que queimam em oxigênio é a análise por combustão (KOTZ; TREICHEL, 2002). A análise elementar, também chamada de análise gravimétrica por combustão, é usada para determinar o teor de carbono e hidrogênio de compostos orgânicos queimados em excesso de O_2. Em vez da pesagem de produtos queimados, os instrumentos modernos usam a condutividade térmica, a absorção infravermelha ou a coulometria (com reagentes gerados eletroquimicamente) para medir os produtos.

A *Figura 3* mostra um instrumento analisador que mede C, H, N e S numa única operação. Primeiro a amostra é pesada com precisão e depois é selada numa cápsula de estanho ou prata. O analisador é "varrido" com gás hélio que foi tratado para retirar O_2, H_2O e CO_2. No início da corrida é adicionado um volume de O_2 medido em excesso ao fluxo de hélio. A seguir, a cápsula da amostra é colocada dentro de um cadinho de porcelana onde a cápsula se funde e a amostra é oxidada rapidamente. Os produtos passam pelo catalisador de WO_3 quente para completar a combustão do carbono a CO_2. Na próxima região, o cobre metálico, a 850°C, converte o SO_3 em SO_2 e retira o excesso de O_2. A mistura CO_2, H_2O, N_2 e SO_2 é separada por cromatografia gasosa e cada componente é medido com um detector por condutividade térmica.

Os analisadores elementares usam um catalisador de oxidação para completar a oxidação da amostra e um catalisador de redução para realizar qualquer redução necessária e para remover o O_2 em excesso (HARRIS, 2001).

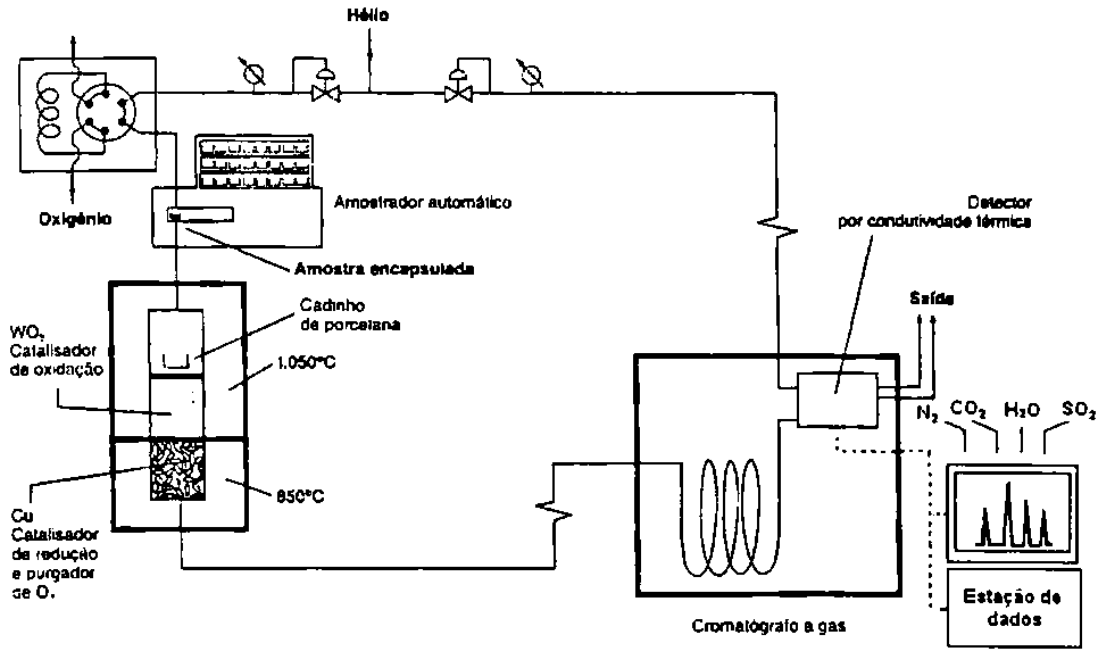


Figura 3 – Diagrama esquemático do analisador elementar de C, H, N, S que usa separação cromatográfica e detecção por condutividade térmica. [Adaptado de Pella, E. *apud* Harris, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. p.696.]

2.3.3. Técnicas termoanalíticas

Análise térmica é um termo usado para descrever um grupo de técnicas analíticas que medem ou monitoram as propriedades físicas e químicas de uma amostra em função da temperatura. A amostra é submetida a um esquema de temperatura que consiste de uma série de segmentos pré-selecionados nos quais é aquecida, ou resfriada, ou mantida a uma temperatura constante (GIRON, 1990; SICHINA, 2001; INSIDE LABORATORY MANANGEMENT, 2002). Em diversos experimentos a atmosfera é igualmente importante. As *Figuras 4* e *5* esquematizam, respectivamente os tipos de materiais e estudos que podem ser desenvolvidos por análise térmica.

Figura 4 – Tipos de materiais que podem ser estudados por análise térmica. [Cortesia MATOS, J.R. LATIG – IQUSP].

Figura 5 – Tipos de estudos que podem ser desenvolvidos por análise térmica. [Cortesia MATOS, J.R. LATIG – IQUSP].

2.3.3.1. Considerações sobre a calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para a realização da DSC, dois fornos são linearmente aquecidos, em um deles coloca-se a amostra em um recipiente e no outro, apenas o recipiente vazio, o qual será a referência e funcionará como uma balança. O calor fornecido para os fornos será o mesmo. Assim, tanto a amostra quanto a referência estão sob a mesma condição de temperatura. Se uma alteração acontece com a amostra, como por exemplo, fusão, a energia fornecida é usada para deflagrar esse evento, então a temperatura na amostra permanece constante ou ocorre apenas um pequeno aumento, gerando, então, uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência. Este método é chamado de DSC de fluxo de calor, onde o instrumento empregado quantifica o calor, fornecido por uma fonte, por meio de um sensor calorífico a partir da diferença de temperatura estabelecida. Essa variação da temperatura é transformada em fluxo de calor, ou na variação temporal de calor.

Em um segundo método, chamado de DSC de compensação de potência, dois aquecedores individuais são usados para monitorar a razão de aquecimento individual dos fornos, que dispõe de um sistema de controle de temperatura. Se qualquer diferença for detectada, o aquecimento individual será corrigido de forma a manter sempre a temperatura constante em ambos os recipientes. Quando um evento endotérmico ou exotérmico ocorre, o instrumento libera uma energia de compensação de modo que as temperaturas se mantenham iguais, isto é, em condições isotérmicas.

Portanto, no primeiro caso a temperatura é mensurada e no segundo é a energia que é quantificada. Cada instrumento fornece informação semelhante, ou seja, fluxo de calor em função da temperatura ou em função do tempo. Para transições de primeira ordem como fusão, cristalização sublimação, ebulição, etc, a integração da curva fornece a energia envolvida na transição. Para transições de segunda ordem, o sinal fornece a mudança de calor específico, por exemplo, temperatura vítrea de polímeros (GIRON, 1990). A *Figura 6* ilustra um equipamento de DSC da Shimadzu® e a *Figura 7* esquematiza um analisador térmico moderno.

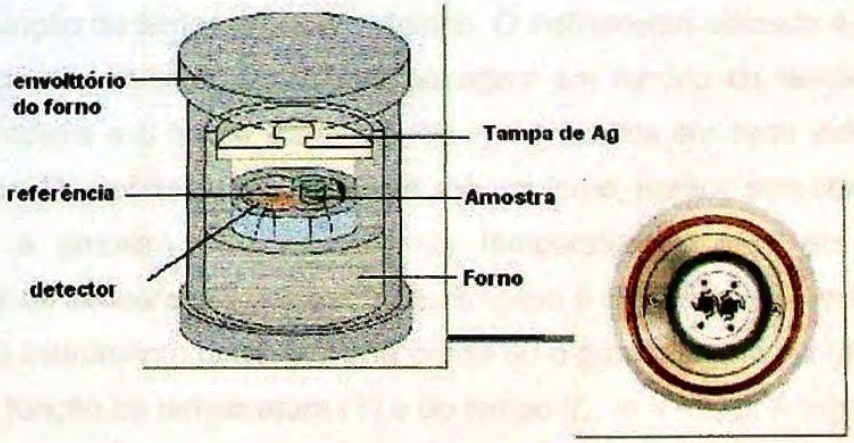


Figura 6 – Célula de DST vista do interior. [Cortesia MATOS, J.R. LATIG – IQUSP].

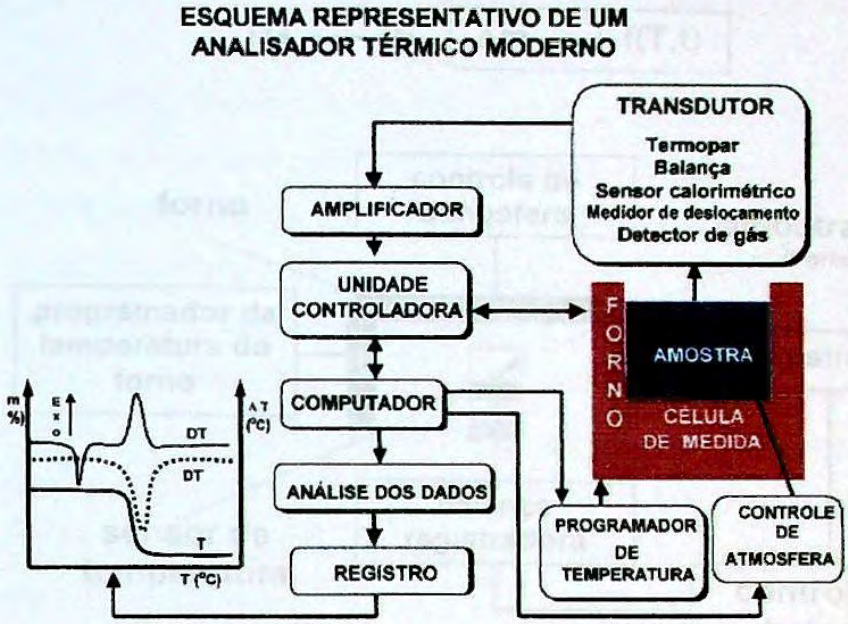


Figura 7 – Esquema representativo de um analisador térmico moderno. [Cortesia MATOS, J.R. LATIG – IQUSP].

2.3.3.2. Considerações sobre a termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG)

Em termogravimetria a alteração na massa da amostra é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo. O instrumento utilizado é uma termobalança que permite a contínua pesagem em função do tempo. O *holder* da amostra e o *holder* da referência estão fixados em cada lado da termobalança. O suporte da amostra está sob um forno, porém, sem contato direto com a amostra e o controle da temperatura é feito por um programador de temperatura. A peça de contrapeso é mantida à temperatura constante. O instrumento pode gravar a perda ou o ganho de massa (m) da amostra em função da temperatura (T) e do tempo (t), $m = f(T, t)$. A *Figura 8* ilustra modelo de um sistema termogravimétrico moderno.

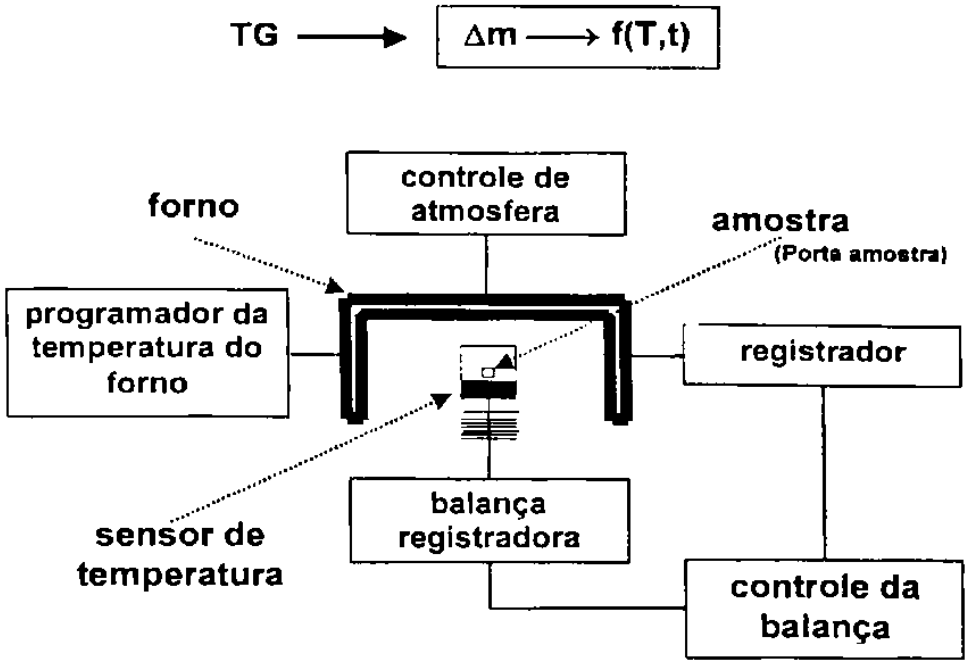


Figura 8 – Sistema termogravimétrico moderno . [Cortesia MATOS, J. R. LATIG – IQUSP].

A DTG (termogravimetria derivada) permite uma melhor distinção das etapas de sobreposição. A DTG possibilita a determinação da temperatura na qual a taxa de alteração da amostra é a máxima. A área sob a curva da DTG é proporcional a esta alteração de massa e a altura do pico é dada pela DTG naquela temperatura fornecendo a proporção de massa alterada. A real vantagem da DTG é a localização precisa do final de um processo de desolvatação, principalmente quando se trata de uma desolvatação seguida por decomposição, empregando-se apenas a curva da DTG (GIRON, 1990).

A medição na TG é realizada em atmosfera definida, geralmente em condições inertes (nitrogênio) ou em ambiente oxidativo (ar ou possivelmente oxigênio). A massa é medida em balança eletrônica altamente sensível. Os efeitos de interferência da flutuação de gás são compensados por correção efetuando-se um branco analítico (CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE, 2004).

2.3.3.3. Aplicações farmacêuticas dos métodos calorimétricos

As medidas calorimétricas vêm sendo extensivamente empregadas na industria farmacêutica para a caracterização de fármacos, excipientes e formulações farmacêuticas. Algumas técnicas foram utilizadas nos últimos anos e, outras mais recentemente têm sido introduzidas conforme a necessidade e a disponibilidade no mercado. Com as novas abordagens do novo milênio, o cientista farmacêutico continuará a buscar os refinamentos e os avanços na quantificação calorimétrica, a fim de acompanhar o desenvolvimento rápido de novos fármacos (THOMPSON, 2000) com a utilização de métodos analíticos modernos visando aplicação em controle de qualidade de medicamentos.

O desenvolvimento e a produção de fármacos requerem que a atenção esteja estritamente voltada para a pureza, qualidade, estabilidade a fim de assegurar que a formulação desempenhe o resultado esperado. Os fármacos e/ou compostos orgânicos podem se apresentar sob diferentes formas estruturais ou morfológicas, o que leva a preocupações no que diz respeito ao processo de produção, estabilidade em longo prazo e bioliberação.

A formulação final de um medicamento pode ser ainda mais complicada quando há presença de mais de um componente ativo, pois estes, podem interagir com os excipientes, com os componentes do revestimento de comprimidos, sofrer ação da umidade e da radiação ultravioleta. Devido aos numerosos problemas envolvidos neste aspecto, torna-se importante ter uma compreensão completa das propriedades dos fármacos. Desta maneira, uma das melhores técnicas analíticas para a caracterização de fármacos e matérias-primas, em escala crescente, têm sido a análise térmica (SICHINA, 2001).

2.3.3.3.1. Determinação de pureza

Um dos testes mais importantes que pode ser executado para fármacos e compostos orgânicos é a avaliação da pureza por DSC. A determinação da pureza absoluta empregando a DSC foi uma técnica aceita desde que se iniciou o desenvolvimento de instrumentos comerciais de DSC nos anos de 1960. O emprego da DSC tem provado que a técnica é rápida, exata e precisa para a avaliação da pureza de diferentes tipos de materiais. A determinação é baseada no fato bem conhecido de que a presença de impurezas, até mesmo em pequenas quantidades, pode alargar a base do pico de fusão e/ou abaixar o ponto de fusão (SICHINA, 2001).

2.3.3.3.2. Análise de umidade

Um importante aspecto associado com muitos fármacos é o conteúdo de água. A umidade na forma de água livre ou hidrato(s), quimicamente ligados, irá afetar as propriedades farmacológicas, incluindo a estabilidade, o tempo de meia vida do fármaco, o efeito de plasticidade sobre a transição vítrea e a taxa de dissolução da forma farmacêutica.

A termogravimetria (TG) fornece meios úteis para a caracterização e quantificação do conteúdo de umidade no medicamento. A técnica quantifica a perda de massa da amostra e a perda de peso em função do tempo. As aplicações da TG para a avaliação da umidade em medicamentos incluem (GIRON, 1990):

- Medida da temperatura de desidratação;
- Estequiometria do hidrato;
- Quantificação de hidrato na matriz da amostra
- Construção de um diagrama da estabilidade do sistema hidrato como uma função da temperatura e da pressão de vapor da água;
- Cinética de hidratação e desidratação;

2.3.3.3.3. Polimofismo

O polimorfismo é definido como a capacidade da molécula orgânica existir em diferentes formas cristalinas, originado uma variedade de conformações e arranjos moleculares. Desde que as diferentes conformações tenham a mesma composição química, elas também apresentam propriedades químicas similares. No entanto, as propriedades físicas tais como, densidade, calor específico, temperatura de fusão etc, podem ser totalmente diferentes (GIRON, 1990)

Muitos fármacos exibem polimorfismo, o que significa que, em função de determinados parâmetros relativos ao processo de síntese e obtenção, as formas cristalinas podem existir em dois ou mais estados. Estes estados apresentam diferentes níveis de estabilidade termodinâmica, sendo que uma forma instável pode diminuir a temperatura do ponto de fusão da forma termodinamicamente estável (SICHINA, 2001).

O comportamento polimórfico de um sólido orgânico pode ter uma importância crucial na industria farmacêutica. As propriedades que variam entre os polimorfos incluem a estabilidade, que está relacionada com a meia vida biológica do fármaco, a forma do cristal, a compressibilidade, a densidade - importância na formulação, e a taxa de dissolução, a qual representa importante fator na biodisponibilidade (SICHINA, 2001).

Alguns polimorfos podem ser inativos e não tóxicos, enquanto que outros, podem apresentar extrema toxicidade. Se um determinado fármaco tem o potencial de se cristalizar em dois ou mais polimorfos, com biodisponibilidades diferentes, a concentração terapêutica ótima dependerá do polimorfo empregado na formulação (GIRON, 1990).

Na investigação do polimorfismo com DSC, os parâmetros de medição são especialmente importantes porque podem influenciar a cinética de transição das diferentes modificações. No caso de sistemas desconhecidos, recomenda-se que a investigação seja primeiramente realizada em razões diferentes de aquecimento e resfriamento (SICHINA, 2001).

2.3.4. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria é qualquer processo que utiliza a luz para medir as concentrações químicas (HARRIS, 2001). As faixas de absorção do ultravioleta e do visível são decorrentes de transições de elétrons na região de 200 a 780 nm. No caso de moléculas orgânicas, as transições de elétrons poderiam se atribuídas a uma transição de elétrons σ, π ou η, a partir do estado basal para o estado excitado. Como o elétron σ está firmemente envolvido na construção de uma ligação única, sua transição exige muito mais energia (usualmente no UV distante) (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004).

Na análise espectrofotométrica usa-se uma fonte de radiação que alcança a região ultravioleta do espectro. Para isso, escolhe-se um comprimento de onda de radiação bem-definidos e com largura de banda de menos de um nanômetro, o que exige um espectrofotômetro, um instrumento mais complicado, e custo relativamente alto.

Um espectrofotômetro ótico é um instrumento que possui um sistema ótico que dispersa a radiação eletromagnética incidente e permite a medida da quantidade de radiação transmitida em determinados comprimentos de onda selecionados na faixa espectral (MENDHAM *et al.*, 2002).

Quando luz monocromática ou policromática atinge um meio homogêneo, parte da luz incidente sofre reflexão, parte é absorvida pelo meio e o resto é transmitido. Se as intensidades da luz forem I_0 para a luz incidente, I_a para a luz absorvida e, I_r para a luz refletida e It para luz transmitida, então, resulta a seguinte equação:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r \,. \qquad (1)$$

No caso da interface ar-vidro, que ocorre quando se usa células de vidro, cerca de 4,0% da luz incidente é refletida. I_r é normalmente eliminada pelo uso de um controle como uma célula de comparação:

$$I_0 = I_a + I_t \tag{2}$$

Costuma-se atribuir a Lambert o estudo da absorção da luz em meios de diferentes espessuras e a Beer o estudo da absorção da luz com diferentes concentrações. Na forma combinada são conhecidas como lei de Lambert-Beer.

a) Lei da Lambert

Segundo Lambert, quando a luz atravessa um meio transparente, a diminuição da intensidade com a espessura do meio é proporcional à intensidade da luz. Isto é equivalente a dizer que a intensidade da luz emitida diminui exponencialmente quando a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente ou que qualquer camada de uma dada espessura absorve a mesma fração da luz que incide sobre ela.

A razão I_t/I_0 é a fração de luz incidente transmitida por um meio de espessura l, e é a chamada transmitância (T). o inverso da transmitância I_0/I_t, é a opacidade. A absorbância (A) do meio, antigamente chamada de densidade ótica (D) ou extinção (E) é dada por:

$$A = \log \frac{I_0}{I_t}. \tag{3}$$

Assim, um meio com absorbância de 1,0 em um determinado comprimento de onda transmite 10,0% da luz incidente neste comprimento de onda.

b) Lei de Beer

Segundo Beer, a intensidade de um feixe de luz monocromático diminui exponencialmente quando a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente. Este resultado pode ser escrito segundo a equação 4:

$$\log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon c l \; ; \qquad (4)$$

onde:

c = concentração em mol/L;

ε = coeficiente de absorção molar ou absortividade molar;

l = caminho ótico em cm.

Esta é a lei fundamental da colorimetria e da espectrofotometria, conhecida como lei de Lambert-Beer ou mais recentemente como lei de Beer (MENDHAM *et al.*, 2002).

c) Desvios da lei de Beer

1) A lei de Beer geralmente é valida para uma faixa de concentração, se a estrutura do íon colorido ou do não-eletrólito colorido em solução não mudar de concentração;

2) Grandes quantidades de eletrólitos podem deslocar a posição do máximo de absorção e, também mudar a absortividade molar;

3) Encontram-se discrepâncias, normalmente, quando o soluto colorido se ioniza, se dissocia ou se associa em solução, porque, neste caso, a natureza da espécie que absorve varia com a concentração;

4) A lei não é válida quando o soluto forma complexos cuja composição depende da concentração;

5) Podem ocorrer discrepâncias quando a luz utilizada não é monocromática;

Alguns dos termos mais amplamente empregados na espectrofotometria são (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004):

a) ***Cromóforo***: parte de uma molécula responsável pela absorção seletiva da radiação em uma determinada amostra;

b) ***Auxocromo***: um grupamento químico que não origina uma faixa de absorção por si mesmo, mas ao ser ligado a um cromóforo altera a posição e ou intensidade do pico;

c) ***Deslocamento batocrômico***: um deslocamento da posição do pico (λ_{max}) para um comprimento de onda mais elevado devido ao efeito de um substituto ou solvente (deslocamento vermelho);

d) ***Deslocamento hipsocrômico***: um deslocamento do λ_{max} para um comprimento de onda menor (deslocamento azul);

e) ***Efeito hipercrômico e hipocrômico***: um aumento e diminuição na absortividade, respectivamente

Um dos principais usos da espectrofotometria no UV e da luz visível (VIS) refere-se a medições quantitativas. Uma concentração desconhecida de um composto conhecido, quando se adapta a lei de Beer , pode ser determinada. As amostras para a absorção UV podem ser examinadas na forma de vapor ou de uma solução. Solventes polares ou apolares podem ser empregados para preparar uma amostra analítica. Um diagrama simplificado de um espectrofotômetro UV/VIS está apresentado na *Figura 9*.

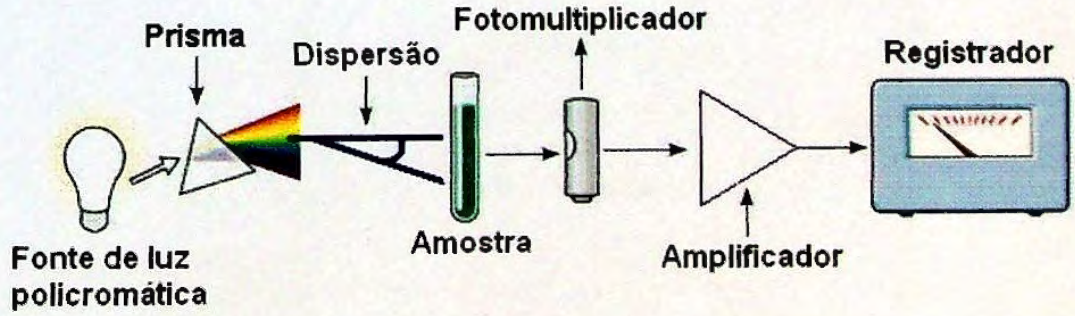


Figura 9 – Espectrofotômetro clássico UV-VIS com seus respectivos componentes. Fonte: adaptação de ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004.

Os avanços na tecnologia levaram ao desenvolvimento e a implementação de detectores de fotodiodo, os quais, quando colocados em grupos lineares intimamente espaçados, oferecem a análise rápida e exata do espectro. A principal vantagem dos detectores de feixe linear é que eles permitem a análise simultânea de todo um espectro no período de alguns segundos. Isso é vantajoso quando se realizam estudos cinéticos envolvendo elementos rapidamente mutáveis (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004).

2.3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na separação diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-se uma técnica extremamente versátil e de grande aplicabilidade. A CLAE surgiu na década de 60 com base nas teorias instrumentais desenvolvidas originalmente para a cromatografia gasosa (CASS; DEGANI, 2001).

Originalmente chamava-se cromatografia líquida de alta pressão. Esta terminologia foi abandonada quando se constatou que o diferencial de comportamento desta para as demais cromatografias líquidas, não era a maior pressão, mas sim o melhor desempenho cromatográfico (AQUINO NETO; NUNES, 2003). Os componentes essenciais de um cromatógrafo a líquido estão ilustrados na *Figura 10.*

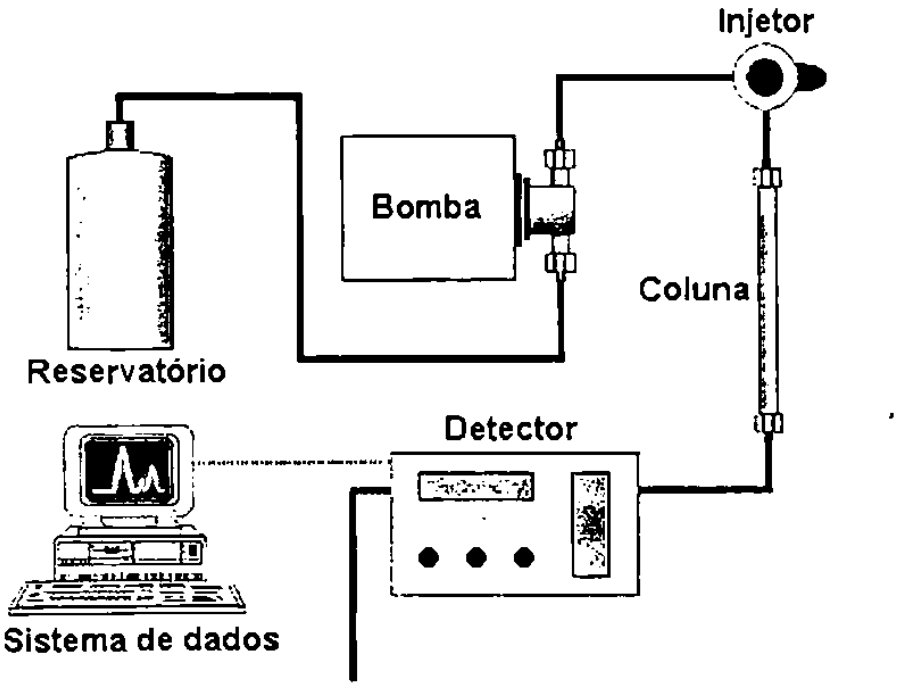


Figura 10 – Esquema básico de um sistema cromatográfico para CLAE.
Fonte: http://www.lcresources.com

A principal diferença entre a cromatografia líquida clássica e a CLAE é a utilização de fases estacionárias com micropartículas (10, 5 ou 3μm) esféricas de preferência. Estas fases, por exemplo, por serem muito menos permeáveis, fazem com que seja necessária a utilização de bombas para a eluição. A utilização destas novas fases estacionárias, associadas ao desenvolvimento da instrumentação, levou esta técnica a um melhor desempenho em termos de resolução, quantificação e detecção em menor tempo de análise (CASS; DEGANI, 2001).

2.3.5.1. Modos de separação

A classificação da cromatografia líquida de acordo com a fase estacionária levou a uma grande variedade de tipos. A primeira grande divisão feita foi a cromatografia de adsorção e cromatografia de partição, referindo-se as fases estacionárias sólida e líquidas, respectivamente.

No caso das fases estacionárias serem líquidas, estas podem estar simplesmente adsorvidas sobre um suporte sólido ou imobilizadas sobre ele. No primeiro caso, a cromatografia é referida como cromatografia de partição. A cromatografia de partição perdeu espaço para a cromatografia de fases quimicamente ligadas, devido a maior estabilidade conferida por estas quando comparadas com as fases adsorvidas. Estas fases com suportes modificados são consideradas à parte por diferirem de outros dois modos em seu mecanismo de separação.

O grande desenvolvimento conseguido a partir das fases líquidas quimicamente ligadas fez com que estas sejam as fases majoritariamente usadas em CLAE analítica (CASS; DEGANI, 2001).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2.3.5.2. Cromatografia no modo normal

Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Os solventes usados são normalmente uma mistura de solventes orgânicos, sem a adição de água. As fases estacionárias são adsorventes orgânicos (sílica, alumina) ou fases polares quimicamente ligadas (ciano, diol, fenil ou amino).

Os dois modelos de retenção: interação-solvente e competição-solvente têm sido usados para descrever o efeito da fase móvel em cromatografia líquida no modo normal.

Embora moléculas iônicas ou ionizáveis possam ser separadas por cromatografia no modo normal, a aplicação majoritária tem sido para moléculas neutras. As moléculas hidrofóbicas (menos polares) são eluidas primeiro, enquanto as moléculas hidrofílicas (mais polares) são retidas (CASS; DEGANI, 2001).

2.3.5.3. Cromatografia no modo reverso

Enquanto na cromatografia em fase normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, no modo reverso a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é mais usada na CLAE, uma vez que permite a separação de uma variedade de solutos e uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais comumente utilizada é a mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol ou tetraidrofurano. Já para a cromatografia no modo normal há uma variedade de solventes disponíveis.

O princípio da retenção em fase reversa é a hidrofobia. A separação em fase reversa se deve principalmente a interação entre a parte não-polar

do soluto e a fase estacionária, isto é, a repulsão desta parte do soluto pela faze aquosa (CASS; DEGANI, 2001).

2.3.5.4. Cromatografia de compostos ionizáveis

Separações cromatográficas de compostos iônicos tendem a ser mais complicadas que a de moléculas neutras. A separação de compostos ionizáveis pode ser conseguida por supressão da ionização ou, então, por completa ionização e separação por pareamento de íons ou por troca iônica. Estas duas últimas opções também se aplicam a íons (CASS; DEGANI, 2001).

Em cromatografia de fase reversa, a retenção diminui para compostos mais hidrofílicos, assim, quando um ácido ou uma base são ionizados, eles se tornam menos hidrofóbicos e, conseqüentemente, a retenção é reduzida. Então, com o aumento do pH a retenção para ácidos diminui e para bases aumenta.

Quando o pH é igual ao pK_a de um composto, este se encontra parcialmente ionizado. Todas as mudanças de retenção ocorrem dentro de uma faixa de $\pm$ 1,5 unidades de pK_a (CASS; DEGANI, 2001) ou 2,00 unidades (CIOLA, 1998). Fora desta faixa, o composto ou está ionizado ou está não ionizado.

Ácidos e bases fortes não podem ser separados por pareamento de íons porque permanecem iônicos na faixa de pH de 2 a 8, ou às vezes maior. Se a forma ativa do fármaco for a não dissociada, então será possível de se analisar por cromatografia em fase reversa. Se ela for iônica, não será possível a não ser que sua carga seja modificada por algum processo. A técnica que permite a eliminação da forma dissociada é chamada de supressão iônica e só pode ser empregada com ácidos ou bases fracas (CIOLA, 1998).

Devido a maior facilidade, a primeira alternativa para separação de moléculas ionizáveis é a supressão da ionização e eluição no modo reverso. A adição de um par iônico deve ser considerada quando a primeira alternativa falhar. É importante ressaltar que dependendo da concentração do contra-íon, há uma contínua transição entre o modo reverso e o par iônico. A cromatografia de par iônico e de fase reversa tem várias propriedades em comum. As fases estacionárias e móveis são as mesmas, diferindo simplesmente na adição do contra-íon. A cromatografia iônica é usualmente a última alternativa a ser examinada para compostos ionizáveis (CASS; DEGANI, 2001).

Numa separação perfeita os compostos são retidos e particionados por um único mecanismo de retenção. Em fases reversas os solutos reagem hidrofobicamente com as cadeias alquílicas do empacotamento. Nas colunas de fase reversa a presença de grupos silanóis residuais pode chegar a 20,0% e com isso pode acarretar fortes interações com o soluto. Como resultado, terá a formação de caudas levando a assimetria dos picos.

Este efeito pode ser eliminado introduzindo, na fase móvel, compostos que competem fortemente com as hidroxilas ácidas dos grupos silanóis. Pequenas concentrações de aminas, por exemplo, trietilamina (TEA) são eficientes. Em casos mais difíceis, pode-se usar hexil ou octil dimetilamina porém, posteriormente são mais difíceis de removê-las, pois formam ligações mais fortes com os silanóis (CIOLA, 1998).

2.3.5.5. Cromatografia de troca iônica

Em geral, entende-se por troca iônica a troca de íons de mesmo sinal entre uma solução e um corpo sólido insolúvel em contato com ela. O sólido (trocador de íons) deve conter seus próprios íons para que a troca se processe com rapidez e na extensão suficiente para interesse tecnológico. O sólido deve apresentar ainda, uma estrutura molecular aberta, permeável, de

modo que os íons e moléculas do solvente possam se mover para dentro e para fora da sua estrutura (NETO, AQUINO; NUNES, 2003).

A cromatografia de troca iônica é o método de escolha para análise de íons inorgânicos e, às vezes, é também o preferido para a análise de pequenos íons orgânicos. A retenção em troca iônica se dá por atração eletrostática entre os íons na fase móvel e os íons de carga oposta na fase estacionária. As fases estacionárias são referidas como resinas trocadoras de íons e são classificadas em aniônicas e catiônicas (fortes e fracas). As aniônicas fortes têm usualmente um íon amônio quaternário imobilizado, enquanto a catiônica tem um ácido sulfônico, sendo ionizados na faixa completa de pH. As resinas aniônicas fracas apresentam aminas imobilizadas, enquanto as catiônicas fracas têm ácidos carboxílicos (CASS; DEGANI, 2001).

O processo de troca iônica consiste basicamente de seis etapas:

1) **Condicionamento prévio:** consiste em deixar a resina encharcada de água de forma a tingir o inchamento máximo, resultando na sua máxima capacidade de troca;

2) **Carga:** consiste em colocar a resina em contato com a solução aquosa contendo os íons a serem trocados;

3) **Eluição:** consiste na remoção dos íons previamente fixados na resina durante a operação de carga, e é um processo de troca de íons;

4) **Lavagem:** consiste na remoção do excesso de reagente da superfície da resina;

5) **Regeneração:** consiste na preparação da resina na forma iônica para o próximo ciclo;

6) **Retrolavagem:** consiste na eliminação de partículas finas de resina produzidas durante os ciclos (carga/eluição).

Uma resina de troca iônica pode ser obtida de duas formas: direta ou indireta. No primeiro caso, o monômero já possui grupos ionizáveis e conseqüentemente é obtida uma resina cuja distribuição dos grupos é mais homogênea. No segundo caso, os grupos ionizáveis são introduzidos após a síntese da matriz polimérica. Esse método é mais empregado devido a baixa disponibilidade de monômeros que podem ser convertidos em resinas de troca iônica.

2.4. Validação de métodos analíticos

As normas de boas práticas de fabricação vigentes exigem que os métodos de testes , utilizados para assegurar a conformidade dos produtos farmacêuticos em relação às especificações estabelecidas, devem atender padrões adequados de exatidão e reprodutibilidade.

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual estudos de laboratório são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas (BRITTAIN, 1998).

De acordo com Farmacopéia Americana (UNITED, 2004), os parâmetros de performance analítica a serem avaliados são precisão, exatidão, seletividade, linearidade e variação, resistência e robustez.

Segundo Swartz (1998), estes termos são conhecidos como parâmetros de performance analítica e algumas vezes como figuras analíticas de mérito. Muitos destes termos são familiares e usados diariamente no laboratório. Entretanto podem significar diferentes coisas para diferentes pessoas. A elaboração das diretrizes da ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONIZATION - Q2A e Q2B – CPMP/ICH/381/95) se originou em reposta a essa situação, na qual dividiu as características da validação de forma um pouco diferente. A ICH considera o sistema de sensibilidade como parte da validação de métodos.

Definições de alguns parâmetros da validação realizada neste trabalho:

- **Precisão**

A precisão de um parâmetro analítico que representa o grau de concordância entre os resultado de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas porções de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) dos resultados obtidos (BRITTAIN, 1998; CASS; DEGANI, 2001; LEITE, 2002).

- **Exatidão**

O teste de recuperação é efetuado para comprovar a exatidão do método proposto. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (BRITTAIN, 1998; CASS; DEGANI, 2001; LEITE, 2002). O procedimento usual consiste em adicionar à amostra quantidades conhecidas da substância padrão em estudo, empregando-se em seguida, o método proposto para análise e verificando-se o percentual recuperado.

- **Linearidade**

A linearidade de um método corresponde ao intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional à concentração da substância analisada, de tal maneira a obedecer à lei de Lambert-Beer (BRITTAIN, 1998; CASS; DEGANI, 2001; LEITE, 2002).

- **Limites**

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade, enquanto que o limite de quantificação

(LQ) representa a mais baixa concentração da substância em exame de forma quantitativa com precisão e exatidão aceitáveis.

Os LD e LQ de um procedimento analítico experimental são determinados através da análise de um certo número de soluções padrão com baixa concentração. Cada solução é analisada repetidas vezes e a média dos desvios padrão entre os resultados obtidos é calculada. O valor encontrado é então dividido pela inclinação da curva de calibração para se obter a estimativa do ruído associado ao método de ensaio. O valor deduzido pelo ruído multiplicado por 3,0 é utilizado para estimar o limite de detecção, enquanto que o limite de quantificação é estimado através do ruído multiplicado por um fator de 10. As soluções analisadas, cujas concentrações apresentarem um DPR $\leq$ 1,0% significa que puderam ser determinadas com precisão e exatidão, indicando o intervalo limite de quantificação, enquanto que àquelas com DPR > 1,0% significa que apresentaram confiabilidade menor na precisão e na exatidão, indicando o intervalo limite de detecção (BRITTAIN, 1998).

- **Robustez**

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. A robustez de um método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição da fase móvel, pH, força iônica, temperatura, etc. e a respectiva determinação de seu efeito (se houver) sobre os resultados a serem obtidos com a metodologia (SWARTZ; KRULL, 1998).

3. OBJETIVOS

Considerando que numerosos derivados contendo a estrutura básica das quinolonas continuam sendo sintetizados e estudados teórica e experimentalmente, visando a obtenção de novos fármacos com maior ou igual ação aos já existentes e com menores efeitos adversos, inúmeros trabalhos empregando a CLAE, para separação e quantificação de antibióticos quinolônicos, têm sido publicados anualmente. Porém, a grande maioria está direcionada para determinações destes compostos em fluidos biológicos (monitoramento terapêutico) ou em alimentos (análise de resíduos de quinolonas em tecido animal quando empregadas como promotores de crescimento).

Assim, este trabalho teve por objetivos:

- Caracterizar os padrões secundários das quinolonas de 2ª e 3ª gerações através dos espectros de absorção na região do infravermelho (IR), pela análise elementar e pelas técnicas termoanalíticas – termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e calorimetria exploratória diferencial;

- Desenvolver e validar métodos analíticos quantitativos por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação quantitativa de quinolonas de 2ª e 3ª gerações, em formulações farmacêuticas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e solventes

Todos os reagentes empregados na pesquisa foram de grau analítico ou de grau HPLC:

- Metanol (MeOH) – Merck ®;
- Acetonitrila (ACN) – Merck ®;
- Trietilamina (TEA) – Sigma®;
- Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) – Merck ®;
- Água purificada através do sistema Millipore®;
- Estearato de magnésio;
- Talco;
- Amido de milho;
- Etilcelulose - N10, STD (Ethocel)®;
- Gelatina em pó;
- Óxido de titânio;
- Glicolato de amido sódico;
- Hidroxipropilmetilcelulose – HPMC E4M (Methocel)®.

4.1.2. Substâncias químicas de referência

Os fármacos empregados como substâncias químicas de referência foram gentilmente cedidos por laboratórios farmacêuticos que, por razões éticas não terão seus nomes mencionados. Os fármacos vieram identificados com as respectivas percentagens de pureza e foram utilizados sem ulterior purificações, conforme ilustrado na *Tabela 6*.

Tabela 6 – Relação de fármacos recebidos por laboratórios farmacêuticos para serem empregados como padrões de referência com seus respectivos graus de pureza.

Fármaco	Pureza (%)
Ciprofloxacino – cloridrato (CIP)	99,50
Ciprofloxacino – cloridrato (CIP)	99,30
Ciprofloxacino – cloridrato (CIP)	98,40
Ciprofloxacino – cloridrato (CIP)	94,20
Gatifloxacino (GAT)	99,60
Levofloxacino (LEV)	100,00
Lomefloxacino – cloridrato (LOM)	99,20
Lomefloxacino – cloridrato (LOM)	100,20
Pefloxacino – mesilato (PEF)	100,60
Norfloxacino (NOR)	101,10
Norfloxacino (NOR)	99,30
Norfloxacino (NOR)	99,80

4.1.3. Amostras comerciais

As amostras de antibióticos empregadas neste trabalho foram cedidas, também, por laboratórios farmacêuticos nacionais e multinacionais de iniciativa privada, conforme pode ser visto na *Tabela 7*.

Tabela 7 – Relação das amostras de antibióticos quinolônicos empregados nesta pesquisa com suas respectivas apresentações comerciais.

Laboratório[a]	Número da amostra	Amostras	Apresentação
A	1	Ciprofloxacino cloridrato	Comprimidos (250 mg)
B	2	Ciprofloxacino cloridrato	Comprimidos (500 mg)
C	3	Ciprofloxacino (base livre)	Frasco-ampola 100 mL (20 mg/mL)
D	4	Gatifloxacino (base livre)	Comprimidos (400 mg)
E	5	Levofloxacino (base livre)	Comprimidos (250 mg)
E	6	Levofloxacino (base livre)	Frasco-ampola 100 mL (5 mg/mL)
F	7	Lomefloxacino cloridrato	Comprimidos (400 mg)
G	8	Lomefloxacino cloridrato	Comprimidos (400 mg)
H	9	Norfloxacino (base livre)	Comprimidos (400 mg)
I	10	Norfloxacino (base livre)	Comprimidos (400 mg)
J	11	Pefloxacino mesilato	Comprimidos (400 mg)
J	12	Pefloxacino mesilato	Ampola 5 mL (80 mg/mL)

[a] Por motivos éticos os laboratórios foram identificados por letras e as amostras por números

4.1.4. Placebos

Somente as amostras enviadas pelos laboratórios F e G foram recebidas com seus respectivos placebos. A composição do placebo enviada pelo laboratório F, correspondente ao núcleo e ao revestimento dos comprimidos era constituída por: lactose monoidratada, carboximetilcelulose cálcica, estearato de magnésio, hidroxipropilcelulose, estearato de polioxil – 40, hidroxipropilmetilcelulose, Opaspray® M1-7111-B, polietilenoglicol 400. Já os excipientes constituintes do placebo da amostra do laboratório G foram: Aerosil®, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, fosfato bicálcico, lactose malha 200 e talco neutro.

Os excipientes amido de milho, estearato de magnésio, etilcelulose, gelatina em pó, glicolato de amido sódico, hidroxipropilmetilcelulose, óxido de titânio e talco neutro foram empregados como placebos das demais amostras.

4.1.5. Vidrarias e acessórios

- Cadinho de alumínio para análise térmica;
- Cadinho de platina para análise térmica;
- Coluna cromatográfica LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) em LichroCART®, medindo 4 mm x 12,5 cm – Merck®;
- Microseringa Hamilton, capacidade 100 µL;
- Sistema de filtração a vácuo para fase móvel;
- Balões volumétricos 10, 25, 50, 100, 200, 250 e 500 mL– Pyrex®;
- Membrana de filtração Millex-HV 0,45 µm, PVDF 13 mm, não estéril – Millipore®;
- Membrana de filtração HVLP 0,45 µm não estéril – Millipore®;
- Cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico;
- Pipetas volumétricas 5,0; 10 e 25 mL– Pyrex®;
- Pipetas graduadas 1,0; 2,0; 5,0 e 10 mL – Pyrex®;

4.1.6. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram os seguintes:

- Espectrofotômetro modelo HP 8453 com "software UV-Visible Chemstation";
- Espectrofotômetro infravermelho – Bomem MB® 100;
- Analisador de CHN – "Elemental Analyser®" modelo 2400 (Perkin Elmer);
- Termobalança modelo TGA-50 (Shimadzu)® com "software Thermal Analysis Workstation TA-60WS";
- Célula calorimétrica DSC-50 (Shimadzu)® acoplada com resfriamento automático (LTC-50), com "software Thermal Analysis Workstation" TA-60WS (IQ-USP);
- Balança analítica – Sartorius®, capacidade 100g, precisão ± 0,0001;
- Lavadora ultra-sônica Unique® modelo USC 1450;
- Medidor de pH Digimed® modelo TE 901;

- **Sistema I (CLAE)**

  →Cromatógrafo a líquido modelo Varian® 5000, com válvula giratória de injeção, modelo 7125, Rheodyne® com "loop" fixo de 20 µl;

  → Detector ultravioleta variável Varian modelo 4000;

  → Integrador Varian® modelo 4400;

- **Sistema II (CLAE)**

  → Cromatógrafo a líquido modelo CL-9A, Shimadzu®, com injetor Rheodyne 7161 e loop de 20 µl, equipado com detector UV/VIS modelo SPP-6A, com sistema controlador SCL-6B, acoplado a um computador com "Chemstation" Shimadzu® Class LC-10 versão 1:62 para integração e tratamento dos cromatogramas;

4.2. Métodos

4.2.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os ensaios por espectroscopia de absorção na região do infravermelho foram realizados apenas com os padrões de maior grau de pureza, sem qualquer tratamento prévio. Os espectros foram obtidos diluindo-se os padrões em pastilhas de brometo de potássio, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400 cm^{-1}, em temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos em transmitância (%). A análise foi desenvolvida na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

4.2.2. Análise elementar

A análise elementar foi realizada com o objetivo de certificar ou confirmar a natureza química dos padrões fornecidos pelos laboratórios cedentes, através dos valores porcentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio. A Central Analítica do IQ-USP realizou esta análise.

4.2.3. Estudos termoanalíticos

Todos os padrões secundários recebidos foram submetidos à avaliação do comportamento térmico pelas técnicas de termogravimetria (TG) termogravimetria derivada (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

4.2.3.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG)

Antes dos ensaios termogravimétricos foi efetuada a calibração da balança termoanalítica com sal de oxalato de cálcio monoidratado ($CaC_2O_4.H_2O$). A TG/DTG foi realizada tanto em atmosfera de nitrogênio (N_2), quanto de ar, para todas as substâncias químicas de referência. Os parâmetros analíticos experimentais foram: cadinho de platina contendo massa de amostra em torno de 4,0 mg, atmosfera dinâmica do gás com vazão de 50,0 mL/min, programação de aquecimento entre 25 a 900°C e razão de aquecimento de 10 °C/min.

4.2.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises por DSC também foram efetuadas com todos os padrões recebidos, conforme as seguintes condições: cadinho de alumínio contendo massa de amostra em torno de 2,0 mg, parcialmente fechado, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50,0 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min e programação de temperatura entre 25 a 500°C. A calibração da célula de DSC foi realizada antes dos experimentos com padrão de índio metálico de alta pureza (99,99%), com temperatura de fusão de 156,6°C e entalpia de fusão igual a 27,71J/g.

4.2.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

4.2.4.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros analíticos

Os parâmetros instrumentais fixados para a análise das quinolonas propostas foram: intervalo de aquisição entre 190 a 1100 nm com apresentação dos espectros no intervalo de 190 a 400 nm, velocidade de leitura de 300 nm/min equivalentes à "varredura" de 1,0 nm a cada 0,2 segundos, intensidade de resposta dada em absorbância com intervalos 0 a 1 (AU) empregando cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

Com a finalidade de desenvolver uma metodologia eficiente para análise de cada solução padrão e suas respectivas amostras, foram realizados alguns testes prévios à padronização, como escolha do solvente, concentração das soluções de trabalho e o comprimento de onda adequado para cada composto. Com base nas propriedades físico-químicas de cada fármaco elegeram-se metanol e acetonitrila como os solventes mais indicados para a solubilização, além da vantagem desses solventes não favorecerem reações de hidrólise ou ionização.

Partindo inicialmente de uma solução a 1,0% (p/v) de cada padrão diluído em metanol, pôde-se determinar, através de sucessivas diluições, a faixa de melhor linearidade.

Assim, após estudos preliminares, foram fixados os seguintes parâmetros:

- Solvente: metanol;
- Tempo de permanência das soluções em ultra-som: 25 minutos;
- Concentração dos padrões e amostras: 2,0 a 9,0 μg/mL;
- Comprimento de onda (λ): 281 a 298 nm.

4.2.4.2. Validação do método para análise das amostras comerciais

4.2.4.2.1. Preparação das soluções padrão

Para a preparação das soluções padrão foram escolhidos, dentre os fármacos com diferentes graus de pureza, aqueles com teores mais próximos de 100%. Pesaram-se exatamente 23,2 mg de cloridrato de ciprofloxacino (CIP), 22,1 mg de cloridrato de lomefloxacino (LOM) e 27,9 mg mesilato de pefloxacino (PEF) equivalentes a 20,0 mg do fármaco na forma de base livre (zwitteriônica). Para os demais padrões não disponíveis na forma de sal ou sal cloridrato, como norfloxacino (NOR), gatifloxacino (GATI) e levofloxacino (LEV), foram pesados exatamente 20,0 mg de cada.

As massas correspondentes de cada padrão foram transferidas, cada qual, para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com metanol e os balões foram mantidos por 25 minutos no ultra-som. Foram obtidas assim as soluções estoque com concentração de 200,0 μg/mL. Uma alíquota de 5,0 mL de cada solução foi retirada e transferida quantitativamente para outros balões de mesma capacidade volumétrica. Novamente, os balões foram completados com metanol até a marca de aferição. A concentração final de cada solução padrão foi de 10,0 μg/mL (solução padrão de trabalho).

4.2.4.2.2. Construção das curvas de calibração

Foram realizadas diluições a partir das soluções de trabalho (10,0 μg/mL) de cada fármaco, obtendo-se assim concentrações que variaram entre 2,0 a 9,0 μg/mL. As curvas de calibração foram construídas com cinco e seis níveis de concentração, que foram projetados ao longo do eixo das abscissas e a média dos resultados obtidos, por análise em triplicata, foram alocadas no eixo das ordenadas. As curvas foram ajustadas

por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (HARRIS, 2001; LEITE, 2002).

4.2.4.2.3. Linearidade

A linearidade do método proposto foi avaliada através das médias das absorbâncias obtidas em respostas às concentrações de padrões empregados na construção das curvas de calibração.

4.2.4.2.4. Preparação das amostras comerciais contendo CIP, GAT, LEV, LOM, NOR e PEF

Comprimidos

Para cada apresentação de amostras de antibióticos quinolônicos foram pesados 20 comprimidos, individualmente, e determinado o peso médio (*Tabela 8*). Em seguida, os comprimidos foram triturados até completa pulverização. Uma massa de pó, equivalente a 100,0 mg de princípio ativo na forma de base livre, foi transferida quantitativamente para balões volumétricos de 100 mL. Os volumes foram completados com metanol e as soluções obtidas foram levadas ao banho de ultra-som por 25 minutos. Decorrido o tempo de sonificação e decantação dos materiais insolúveis, alíquotas de 20 mL de cada solução foram recolhidas e filtradas em membrana Millipore® (0,45 μm) com descarte dos primeiros 5 mL. Duas diluições sucessivas foram realizadas em balões de mesma capacidade volumétrica, com metanol, a partir de alíquotas de 10,0 mL das soluções filtradas. Assim, a solução amostra de trabalho foi obtida na concentração de 10,0 μg/mL.

Tabela 8 – Peso médio dos comprimidos de antibióticos quinolônicos das amostras comerciais.

Número da Amostra	Peso médio (mg)	DPR (%)	Quantidade fármaco declarada (mg)	Quantidade excipiente (mg)
1	389,53	1,48	250	139,53
2	685,23	1,16	500	185,23
4	605,11	1,04	400	201,11
5	315,34	0,72	250	65,34
6	699,12	8,15	400	299,12
7	709,18	15,74	400	309,18
8	897,39	0,49	400	497,39
9	566,87	1,85	400	166,87
10	779,22	2,48	400	379,22

Soluções injetáveis

- Ampolas: um "pool" de três ampolas foi utilizado para a preparação das amostras.

- Frasco-ampola: uma alíquota de 5,0 mL de cada frasco foi utilizada para a preparação da amostra.

O procedimento adotado para a preparação das amostras injetáveis (ampola e frasco/ampola) foi semelhante ao procedimento realizado com as amostras na forma de comprimidos, isto é, foram efetuadas diluições seriadas até a obtenção da solução amostra de trabalho contendo 10,0 μg/mL de cada fármaco. Apenas nestes casos as amostras não foram sonicadas e nem filtradas.

4.2.4.2.5. Análise das amostras – Determinação dos teores porcentuais

O teor de cada amostra foi determinado individualmente. A preparação das amostras foi semelhante ao descrito no item 4.2.4.2.4. Todas as amostras foram analisadas na concentração de 5,0 μg/mL, a partir da diluição 1:1 de cada solução amostra de trabalho. O valor obtido foi calculado através da equação descritiva da curva de calibração com 95% de intervalo de confiança.

4.2.4.2.6. Teste de interferência dos excipientes – Especificidade

Com base na quantidade de excipientes das formulações relatadas na *Tabela 8*, foram pesados 10,0 mg de cada placebo e 10,0 mg de cada excipiente individualmente, os quais foram diluídos em balões volumétricos de 25 mL com metanol. As soluções obtidas (400,0 μg/mL) foram deixadas em banho de ultra-som por 25 minutos e posteriormente todo volume foi centrifugado. Uma alíquota de 10 mL de cada centrifugado foi filtrada em

membrana Millipore® e a partir do filtrado obtido foram preparadas soluções de concentrações de 40,0 e 4,0 µg/mL, por diluições sucessivas. Todas as soluções (400,0; 40,0; e 4,0 µg/mL) foram analisadas. Alíquotas de 2,0 mL de cada solução de excipiente, a 40,0 µg/mL, foram misturadas de maneira a se obter uma solução final de placebo (Placebo-mix) com 5,0 µg/mL. Os comprimentos de onda empregados nas análises foram entre 281 e 298 nm.

4.2.4.2.7. Teste de recuperação – Exatidão

A recuperação do método foi avaliada para todas as amostras comerciais. A preparação dos padrões e das amostras foi semelhante àquelas descritas nos itens 4.2.4.2.1. e 4.2.4.2.4., respectivamente.

Foram transferidas alíquotas da solução padrão e da amostra para um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com metanol, conforme o esquema ilustrado na *Tabela 9*. O percentual de recuperação (%R) foi calculado de acordo com o indicado pela *Association of Official Analytical Chemists International* (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2002):

$$\%R = \frac{(Ca - Cna)}{Cp} x100, \qquad (5)$$

onde:

Ca = Concentração de fármaco encontrada na amostra adicionada de padrão;

Cna = Concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão;

Cp = Concentração teórica de padrão.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Tabela 9 – Quantidades adicionadas de soluções de amostras e de padrões para realização do teste de recuperação empregando-se o método espectrofotométrico no UV.

Balão volumétrico	Volume adicionado				Volume final (mL)(*)	Concentração final (µg/mL)
	Amostra (10,00 µg/mL)		Padrão (10,00 µg/mL)			
	(mL)	(µg)	(mL)	(µg)		
1	3,00	30,00	----------		10,00	3,00
2	3,00	30,00	3,00	30,00	10,00	6,00
3	3,00	30,00	4,00	40,00	10,00	7,00
4	3,00	30,00	5,00	50,00	10,00	8,00
5	----------		3,00	30,00	10,00	3,00

(*) Completado com fase móvel

4.2.4.2.8. Precisão – desvio padrão relativo (DPR)

A precisão do método proposto foi efetuada para cada amostra em estudo pela avaliação da repetibilidade de 10 determinações de amostras com concentração igual a 5,0 µg/mL , conforme procedimento descrito no item 4.2.4.2.5.

4.2.4.2.9. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade

Para a determinação do LD e do LQ empregando o método proposto, foram preparadas soluções padrão de cada fármaco na mesma concentração das soluções de trabalho, isto é, 10,0 μg/mL, conforme procedimento descrito no item 4.2.4.2.1. Foram efetuadas diluições seriadas, com intervalo entre 1,0 a 3,0 μg/mL. Cada solução foi analisada em triplicata e as médias das absorbâncias foram determinadas. Os desvios padrão (DP) e DPR associados às concentrações analisadas foram obtidos através da equação representativa da curva de calibração.

Os LD e LQ foram realizados segundo as seguintes equações:

$$LD = \frac{DPm}{\alpha} x3,0 \qquad (6)$$

e

$$LQ = \frac{DPm}{\alpha} x10,0; \qquad (7)$$

onde:

DPm = Desvio padrão médio da resposta;

α = Inclinação da curva de calibração.

4.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.5.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos

Com base em dados fornecidos pela literatura, foram efetuadas várias tentativas de separação e análise quantitativa dos antibióticos quinolônicos propostos neste trabalho. Para estabelecer a fase móvel ou sistema eluente ideal, várias combinações de solventes foram empregadas em diferentes proporções, bem como o uso de modificadores orgânicos, como por exemplo trietilamina (TEA). As vazões experimentais foram àquelas compatíveis com a coluna cromatográfica. Os comprimentos de onda empregados foram avaliados por espectrofotometria no UV, a partir de soluções padrão preparadas na fase móvel. Após estudos sistemáticos, para a padronização do método proposto foram fixados os seguintes parâmetros cromatográficos:

- Sistema eluente ou fase móvel → água:acetonitrila:trietilamina (80:20:0,3% v/v), pH 3,3 ajustado com ácido ortofosfórico;
- Vazão → 1,0 mL/min;
- Temperatura → ambiente (24 ± 2°C);
- Coluna → LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm, 125 x 4 mm);
- Tempo de permanência das soluções no ultra-som: 25 mim
- Volume de injeção → 20 μL;
- Atenuação dos picos: Shimadzu® LC10 → 7 e 8; Varian® 4400 → 2;
- Detecção no UV → CIP , PEF e NOR (279 nm); LOM, GAT e LEV (288, 293 e 295 nm, respectivamente).

4.2.5.2. Validação do método para análise das amostras comerciais

Foi validado um único método analítico quantitativo para a análise dos seis antibióticos quinolônicos em procedimentos separados.

4.2.5.2.1. Preparação das soluções padrão

As soluções padrão foram preparadas de forma semelhante ao descrito no item 4.2.4.2.1. Porém, as massas pesadas de cada fármaco foram tais que equivalessem a 25,0 mg de base livre. Portanto, pesou-se 29,11 mg de CIP, 34,9 mg de PEF, 27,6 mg de LOM, e 25,0 mg de GAT, LEV e NOR, respectivamente. A solubilização dos fármacos e as diluições foram realizadas na fase móvel, com exceção do NOR para o qual, a solubilização e a preparação da solução de trabalho se fez em metanol. A concentração das soluções estoque obtidas foi 250,0 μg/mL e das soluções de trabalho, 50,0 μg/mL. Para tanto, as alíquotas tomadas para diluição foram de 20,0 mL.

4.2.5.2.2. Construção das curvas de calibração

As curvas de calibração foram construídas com seis níveis de concentração, a partir da diluição das soluções de trabalho com fase móvel, em intervalos de concentração entre 4,0 a 24,0 μg/mL. As curvas foram ajustadas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (HARRIS, 2001; LEITE, 2002).

4.2.5.2.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada através da proporcionalidade das respostas entre a média das áreas dos picos obtidos e as concentrações dos padrões empregados para cada curva de calibração.

4.2.5.2.4. Preparação das amostras

As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito no item 4.2.4.2.4. A solubilização e as diluições das amostras foram realizadas com fase móvel, com exceção das amostras de NOR que foram solubilizadas em metanol. A concentração das soluções amostra de trabalho foi de 50,0 µg/mL obtidas a partir de alíquotas de 5,0 mL das soluções estoque diluídas com fase móvel.

4.2.5.2.5. Análise das amostras – Determinação dos teores porcentuais

Todas as amostras foram analisadas na concentração de 15,0 µg/mL, obtidas a partir da diluição de uma alíquota de 3,0 mL da solução amostra de trabalho, com fase móvel. A preparação das amostras foi semelhante ao descrito no item 4.2.4.2.5.

4.2.5.2.6. Teste de interferência dos excipientes – Especificidade

Tomando por base os intervalos de concentração da curva de calibração, foram preparadas soluções de excipientes e dos placebos disponíveis de modo semelhante ao preparo das amostras como descrito no item 4.2.5.2.4. Foram analisados 3 níveis de concentração, isto é, 4,0, 12,0 e 24.0 µg/mL de cada composto.

4.2.5.2.7. Teste de recuperação – Exatidão

A preparação dos padrões e das amostras foi similar ao procedimento descrito nos itens 4.2.4.2.7. A *Tabela 10* ilustra o esquema da adição de padrão às amostras analisadas.

Tabela 10 – Quantidades adicionadas de soluções de amostras e de padrões para realização do teste de recuperação empregando-se o método por CLAE.

Balão volumétrico	Volume adicionado				Volume final (mL)(*)	Concentração final (µg/mL)
	Amostra (50,00 µg/mL)		Padrão (50,00 µg/mL)			
	(mL)	(µg)	(mL)	(µg)		
1	3,00	150,00	----------		25,00	6,00
2	3,00	150,00	3,00	150,00	25,00	12,00
3	3,00	150,00	4,00	200,00	25,00	14,00
4	3,00	150,00	5,00	250,00	25,00	16,00
5	----------		3,00	150,00	25,00	6,00

* Completado com fase móvel

4.2.5.2.8. Precisão – desvio padrão relativo (DPR)

A precisão do método proposto foi efetuada para cada amostra em estudo pela avaliação da repetibilidade de 10 determinações de amostras com concentração igual a 15,0 µg/mL, conforme procedimento descrito 4.2.5.2.5.

4.2.5.2.9. Teste de robustez

Este parâmetro foi avaliado através de pequenas modificações na composição da fase móvel usada pelo método proposto.

4.2.5.2.10. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade

Os cálculos desenvolvidos para a determinação dos LD e LQ seguiram as mesmas equações descritas no item 4.2.4.2.9. A preparação das soluções analíticas foi semelhante à descrita no item 4.2.5.2.1. Foram efetuadas diluições seriadas, a partir das soluções de trabalho 50,0 µg/mL, com intervalo entre 0,25 a 4,0 µg/mL.

5. RESULTADOS

5.1. Espectrofotometria na região do infravermelho

As *Figuras 11, 12, 13, 14, 15* e *16* ilustram os espectros de absorção na região do infravermelho dos padrões de CIP, GAT, LEV, LOM, NOF e PEF, respectivamente.

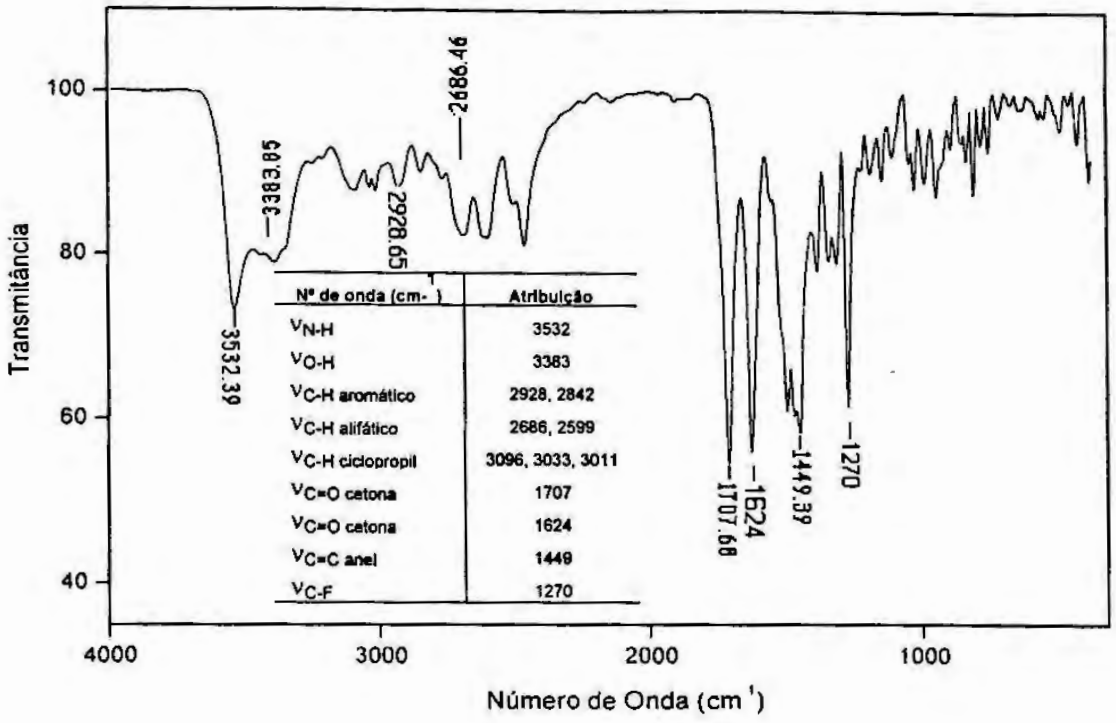


Figura 11 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ciprofloxacino

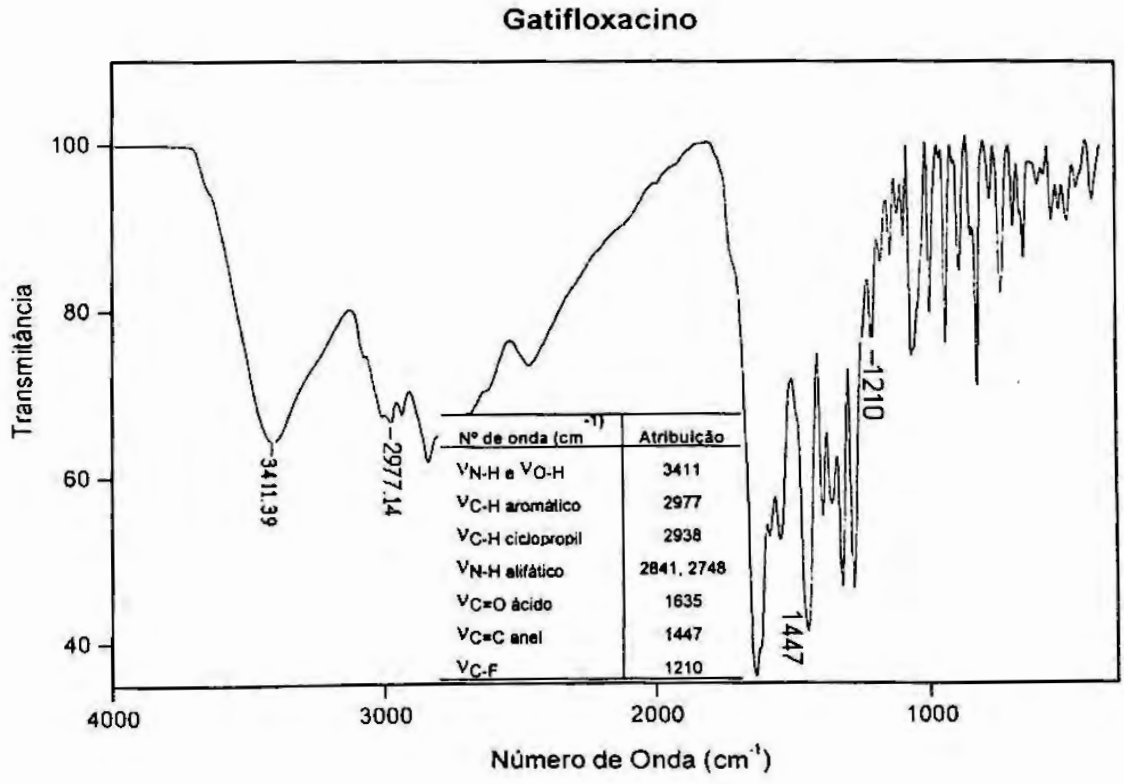


Figura 12– Espectro de absorção na região do infravermelho do gatifloxacino

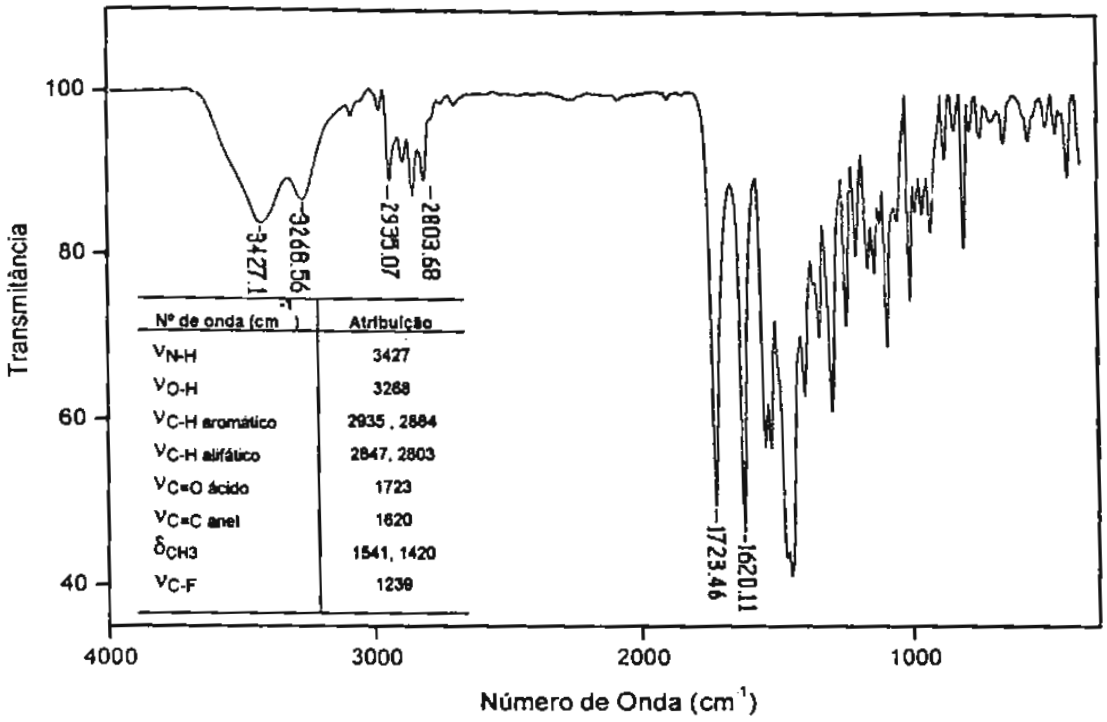


Figura 13– Espectro de absorção na região do infravermelho do levofloxacino

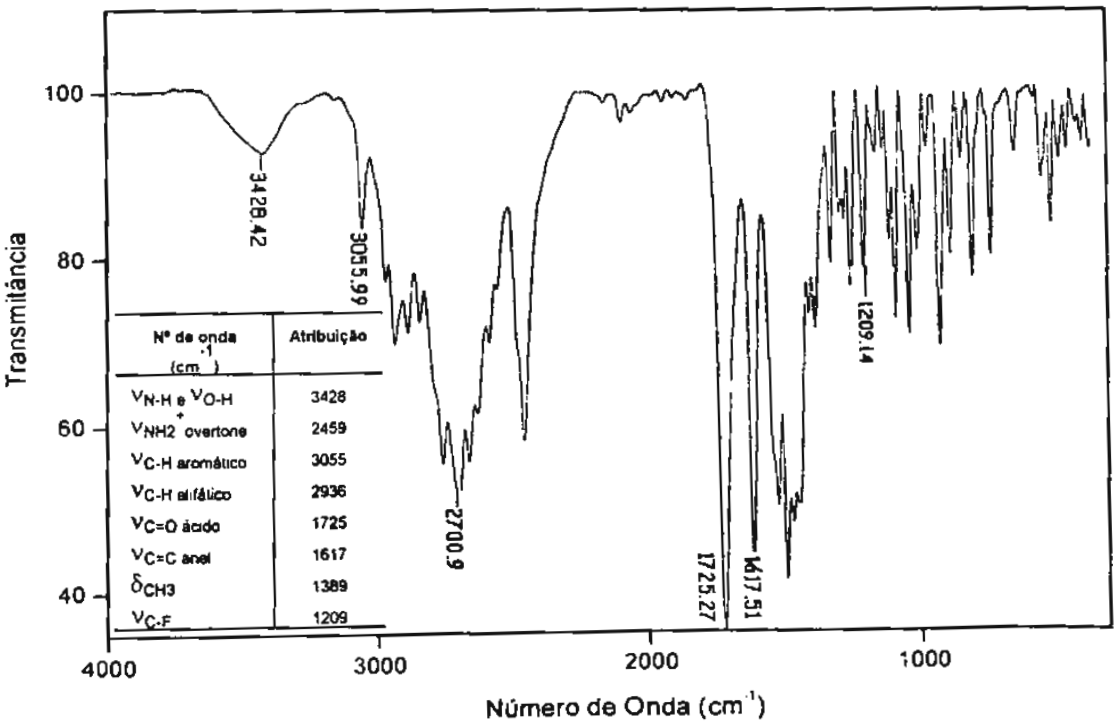


Figura 14– Espectro de absorção na região do infravermelho do lomefloxacino

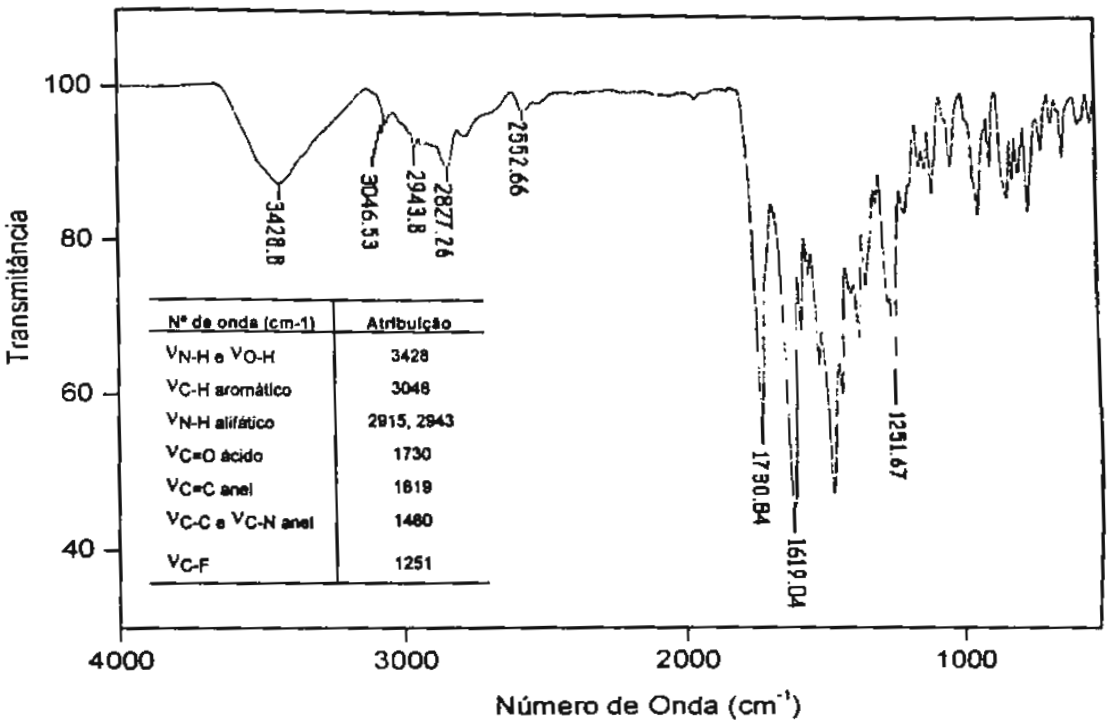


Figura 15– Espectro de absorção na região do infravermelho do norfloxacino

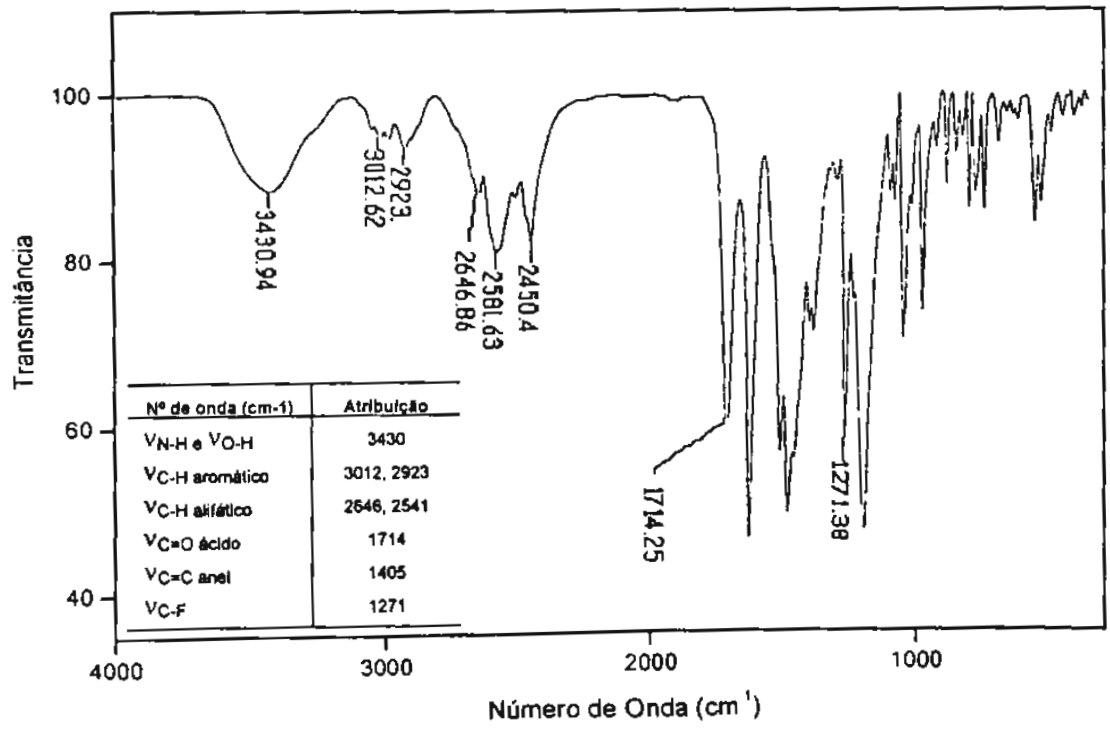


Figura 16– Espectro de absorção na região do infravermelho do pefloxacino

5.2. Análise elementar

A *Tabela 11* lista os resultados dos teores de C, H e N determinados por análise elementar e os percentuais de água determinados por TG.

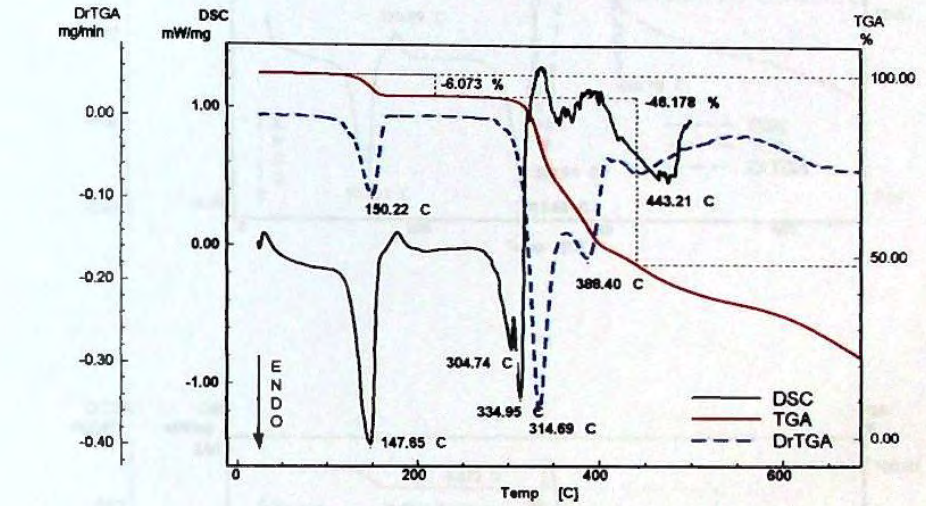
Tabela 11 – Resultados da análise elementar: determinação do teor de CHN e percentagem de água dos padrões de antibióticos quinolônicos.

FÁRMACO (%)	%C		%H		%N		$\%H_2O$	
	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.
CIP - 99,5	52,92	52,51	4,96	5,59	10,89	11,03	4,67	6,07
CIP - 99,3	52,92	51,60	4,96	5,52	10,89	10,76	4,67	5,84
CIP - 98,4	52,92	51,81	4,96	5,74	10,89	10,64	4,67	5,67
CIP - 94,2	52,92	52,43	4,96	5,58	10,89	10,95	4,67	5,63
GAT - 99,6	59,37	57,70	6,55	6,24	10,93	10,30	7,03	6,67
LEV - 100,0	58,43	58,34	5,72	5,77	11,34	11,21	2,43	2,33
LOM - 99,2	52,65	52,75	5,19	5,29	10,84	10,92	0,00	0,00
LOM - 100,2	52,65	52,51	5,19	3,34	10,84	10,79	0,00	0,00
NOR- 100,1	60,18	57,24	5,68	5,91	13,16	12,70	0,00	3,57
NOR - 99,3	60,18	58,79	5,68	5,87	13,16	12,78	0,00	0,56
NOR - 99,8	60,18	57,88	5,68	5,91	13,16	12,57	0,00	1,48
PEF - 100,6	46,44	47,03	6,06	6,01	9,03	9,27	7,74	6,59

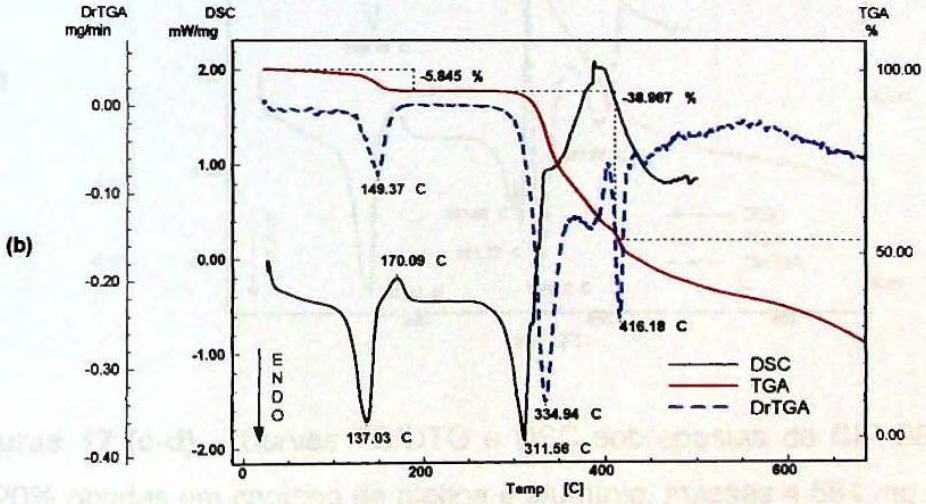
5.3. Estudos termoanalíticos

5.3.1. Ciprofloxacino

Nas *Figuras 17 (a-d)* estão representadas as curvas TG/DTG e DSC sobrepostas dos padrões de CIP.

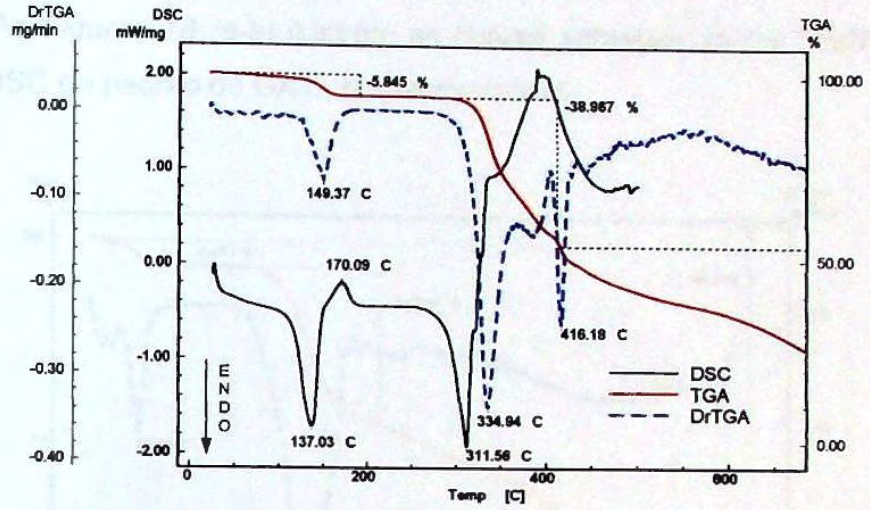


(b)

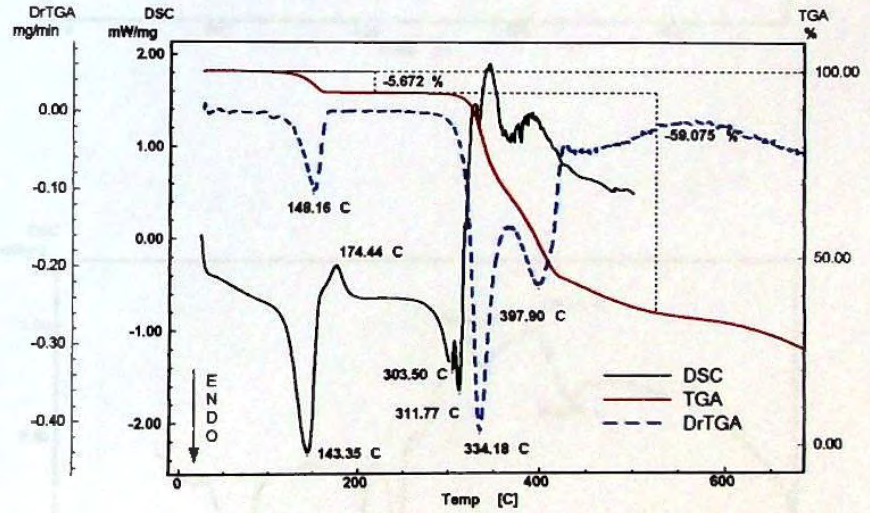


Figuras 17 (a-b) – Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de CIP 99,50% e 99,30% obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,199 mg e 1,450 mg e 4,260 mg e 1,160 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min

(c)



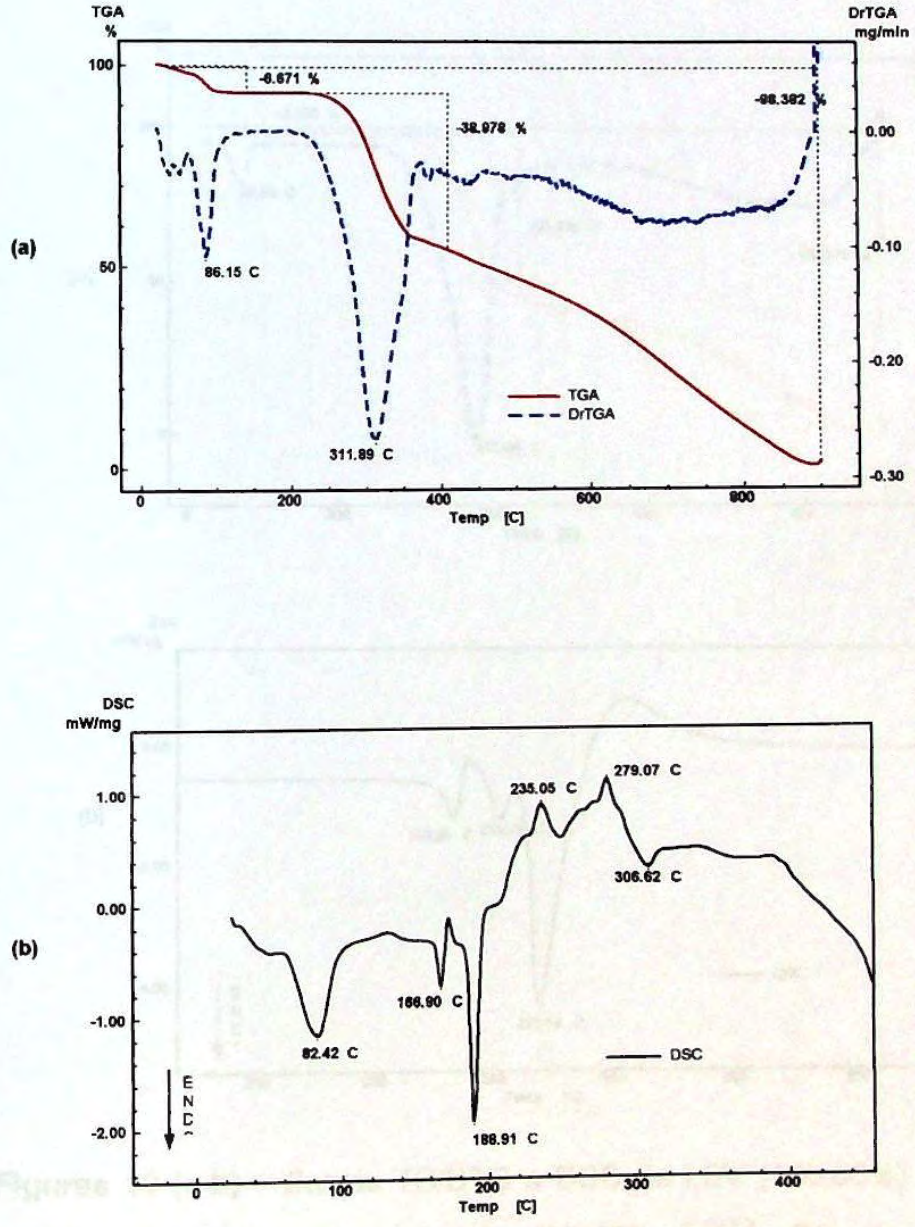
(d)



Figuras 17 (c-d) – Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de CIP 98,40% e 94,20% obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,584 mg e 1,000 mg e 4,142 mg e 1,910 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.3.2. Gatifloxacino

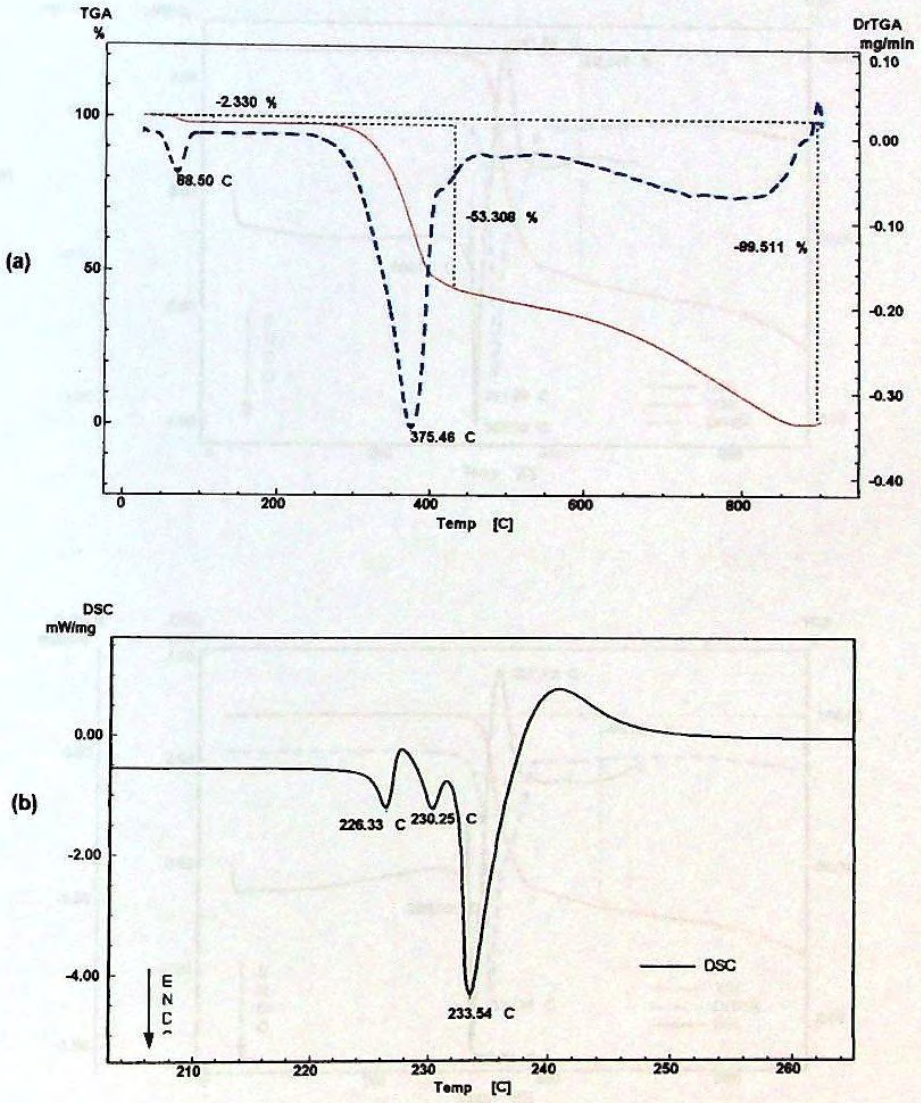
As *Figuras 18 (a-b)* ilustram as curvas sobrepostas de TG/DTG e a curva DSC do padrão de GAT., respectivamente.



Figuras 18 (a-b) – Curvas TG/DTG e DSC de GAT (100,60%) obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 5,067mg e 1,650mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.3.3. Levofloxacino

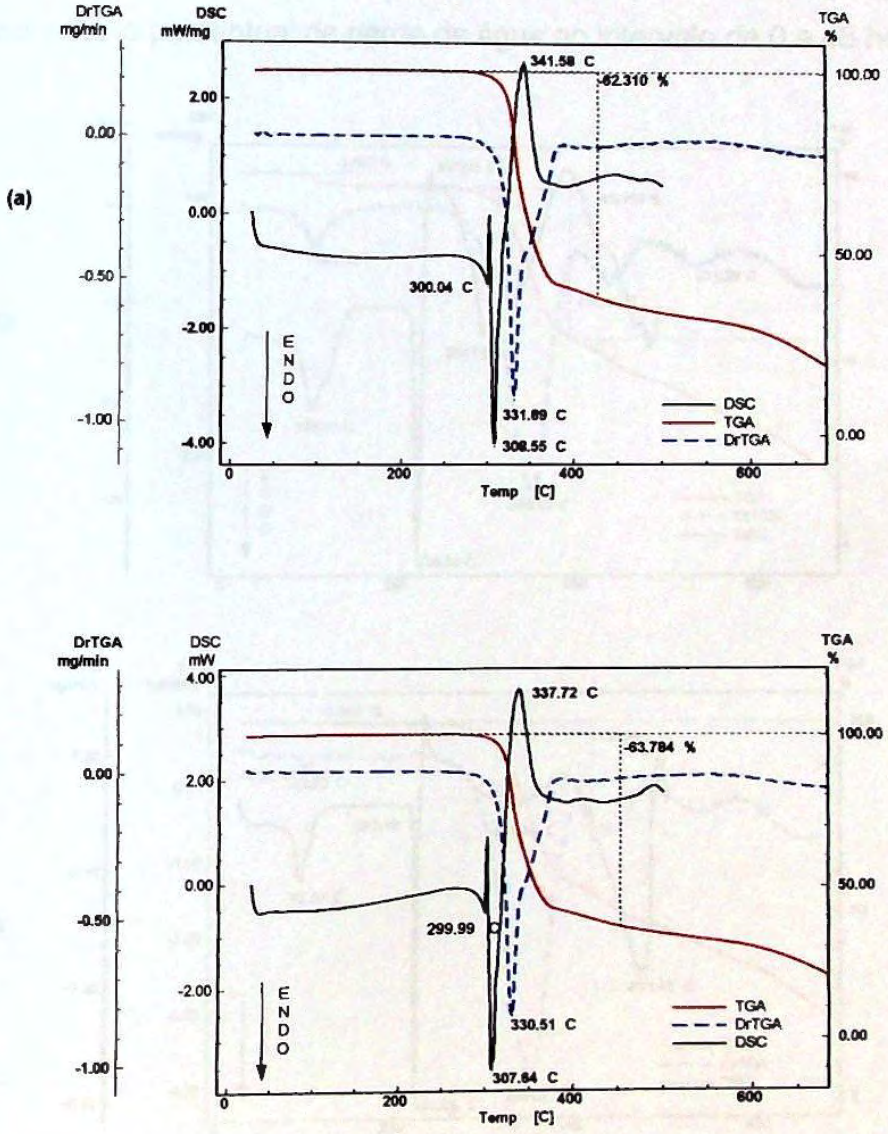
As *Figuras 19 (a-b)* ilustram as curvas TG/DTG sobrepostas e a curva DSC do padrão de LEV, respectivamente.



Figuras 19 (a-b) – Curvas TG/DTG e DSC de LEV (100,00%) obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,292 mg e 1,600 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.3.4. Lomefloxacino

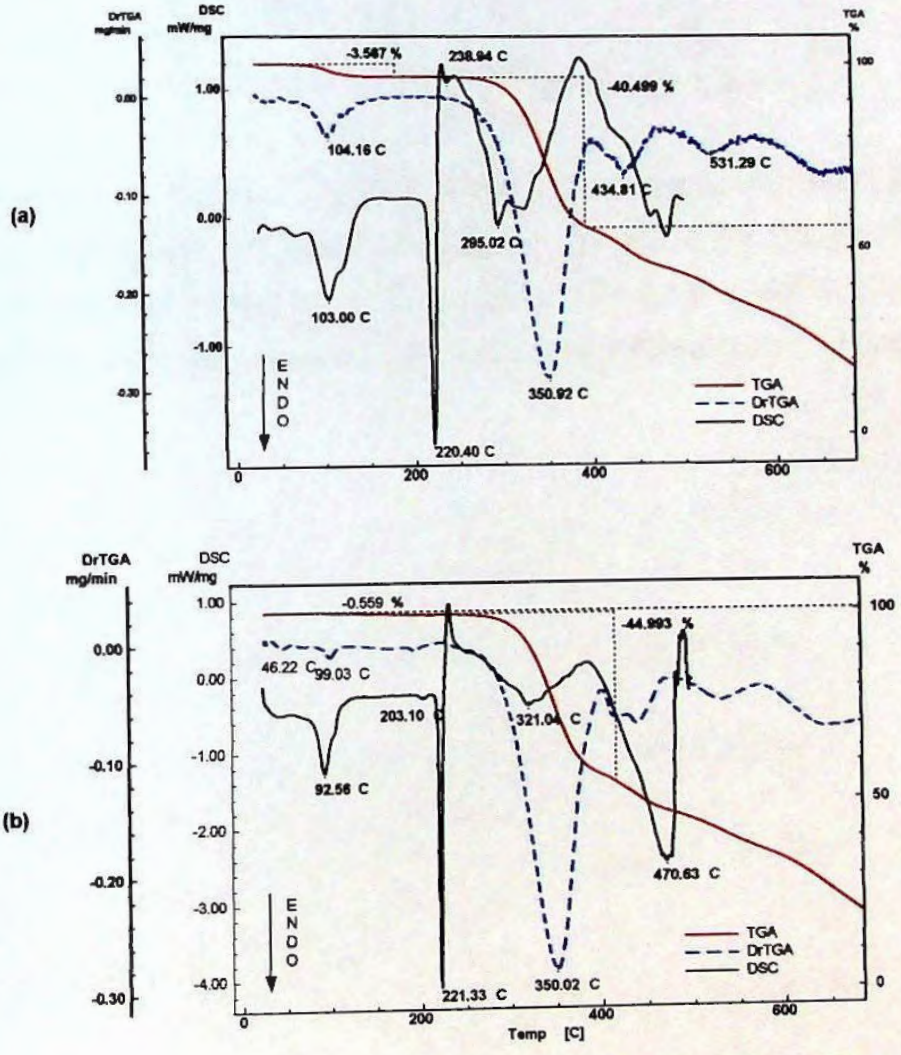
As *Figuras 20 (a-b)* ilustram as curvas de TG/DTG sobrepostas e a curva DSC dos padrões de LOM.



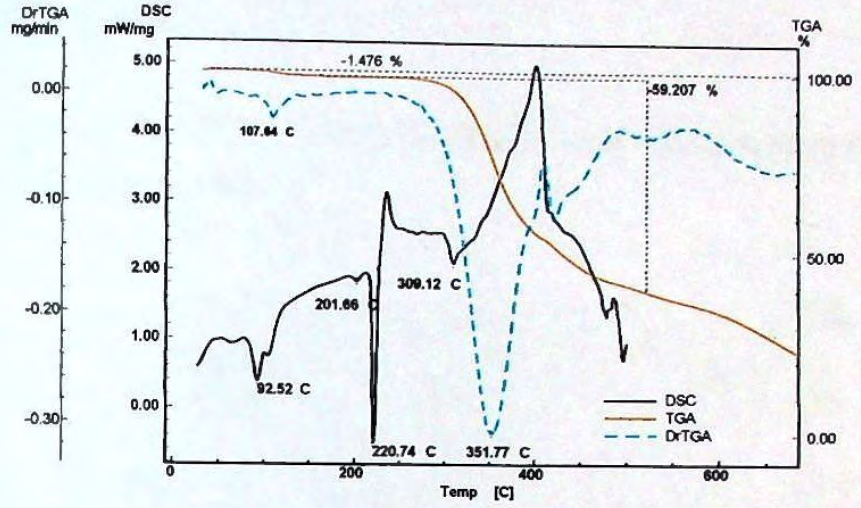
Figuras 20 (a-b) – Curvas TG/DTG e DSC de LOM 99,20% e 100,20% obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,277 mg e 1,090 mg e 4,128 mg, 1,160 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.3.5. Norfloxacino

Nas *Figuras 21 (a-c)* estão representadas as curvas TG/DTG e DSC sobrepostas dos padrões de NOR. Na *Figura 21d* estão representadas as curvas sobrepostas da TG do padrão NOR (100,1%), empregado para demonstrar o percentual de perda de água no intervalo de 0 a 48 horas.



Figuras 21 (a-b) – Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de NOR 100,10% e 99,30% obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,289 mg e 1,660 mg e 4,114 mg e 1,760 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.



Figuras 21c – Curvas TG/DTG e DSC sobrepostas de NOR (99,80%) obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,741 mg e 1,540 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

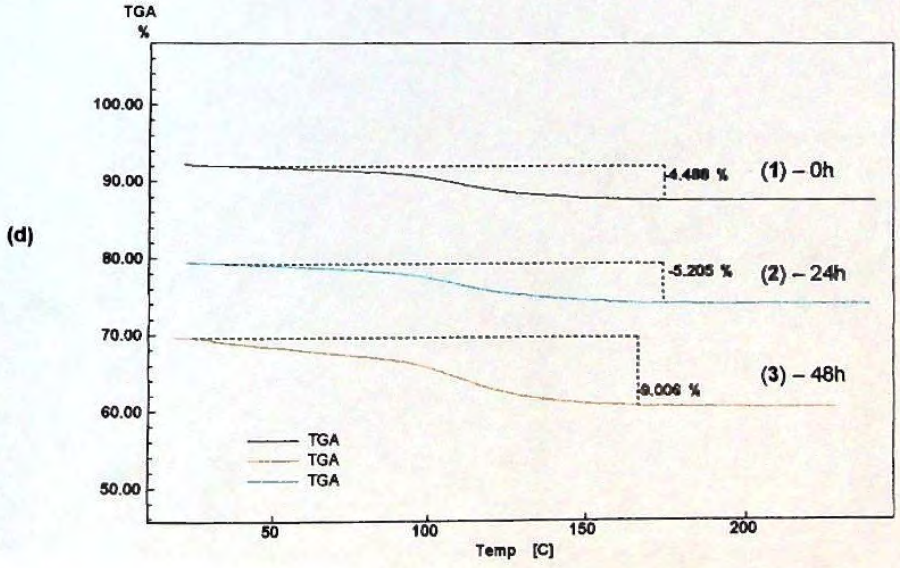
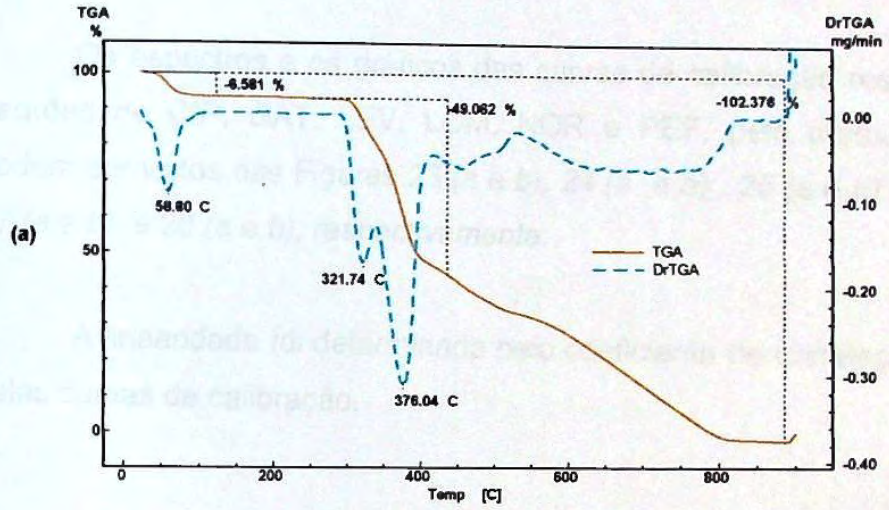


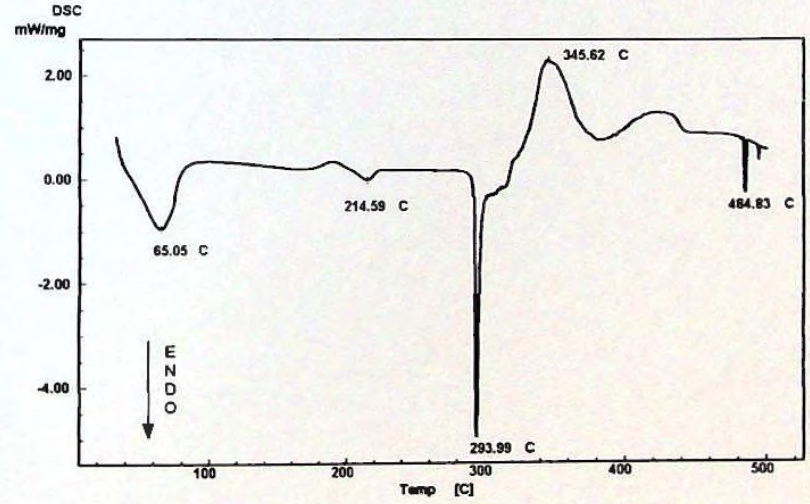
Figura 21d – Percentual de perda de água através das curvas TG sobrepostas de NOR (100,10%), com intervalo de 0 e 48 horas, obtidas em cadinho de platina massas (**1**) 5,214 mg, (**2**) 4,995 mg e (**3**) 5,652 mg, em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min), temperatura 25 a 900°C com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.3.6. Pefloxacino

As *Figuras 22 (a-b)* ilustram as curvas TG/DTG sobrepostas e a curva DSC do padrão de PEF.



(a)



(b)

Figuras 22 (a-b) – Curvas TG/DTG e DSC de PEF (100,60%) obtidas em cadinho de platina e alumínio, massas 4,209 mg e 1,840 mg, respectivamente; temperatura 25 a 900°C (TG) e 25 a 600°C (DSC), em atmosfera de N_2 (50,0 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.4. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

5.4.1.Validação do método para análise das amostras comerciais

5.4.1.1. Construção das curvas de calibração e linearidade

Os espectros e os gráficos das curvas de calibração resultantes dos padrões de CIP, GAT, LEV, LOM, NOR e PEF, pelo método proposto, podem ser vistos nas *Figuras 23 (a* e *b), 24 (a* e *b) , 25 (a* e *b) , 26 (a* e *b), 27 (a* e *b)* e 28 *(a* e *b), respectivamente.*

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r) obtido pelas curvas de calibração.

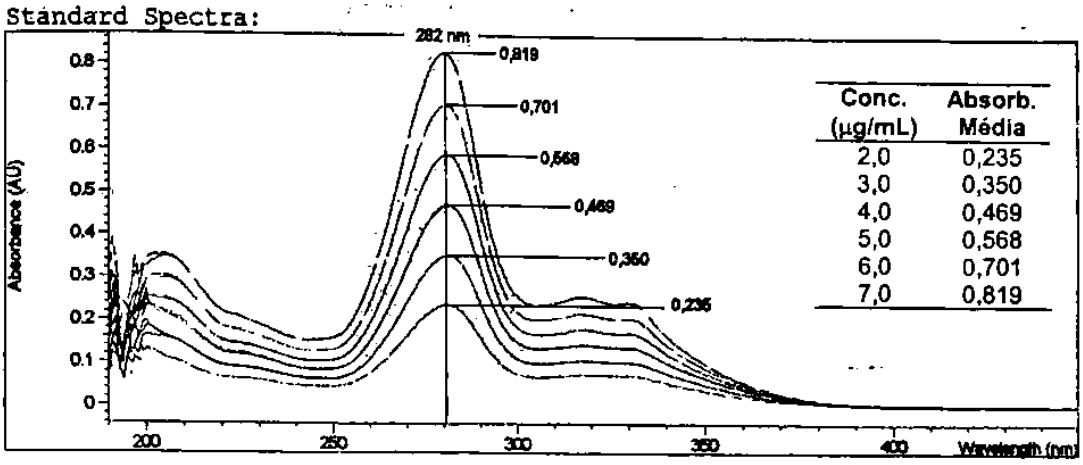


Figura 23a – Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do CIP em 282 nm nas concentrações 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

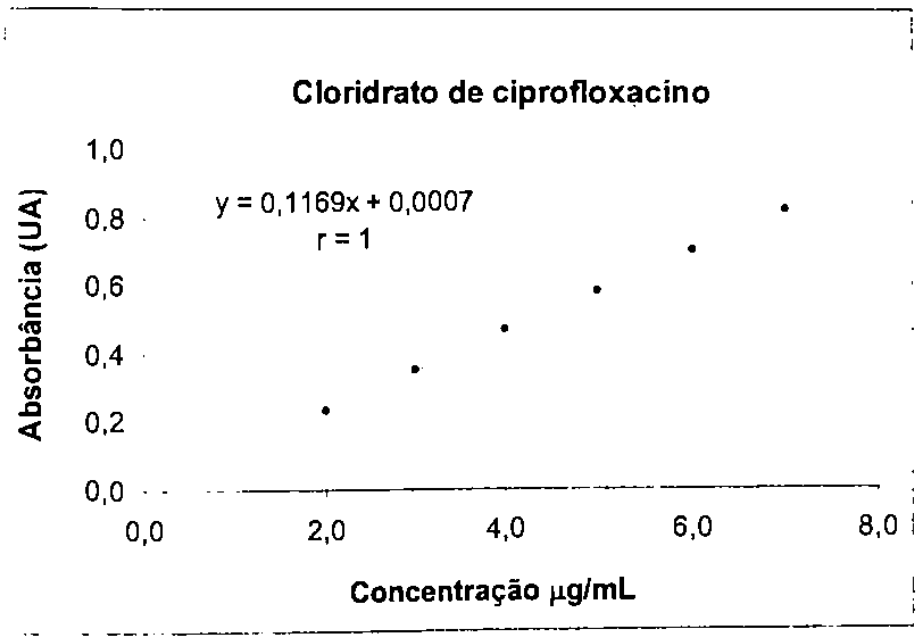


Figura 23b – Curva de calibração de CIP em 282 nm nas concentrações 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

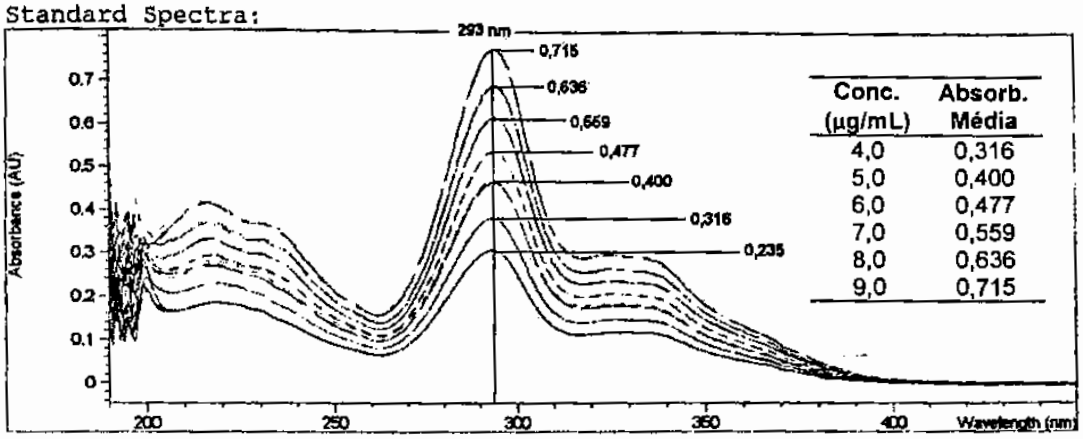


Figura 24a – Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do GAT em 293 nm nas concentrações 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ; 8,0 e 9,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

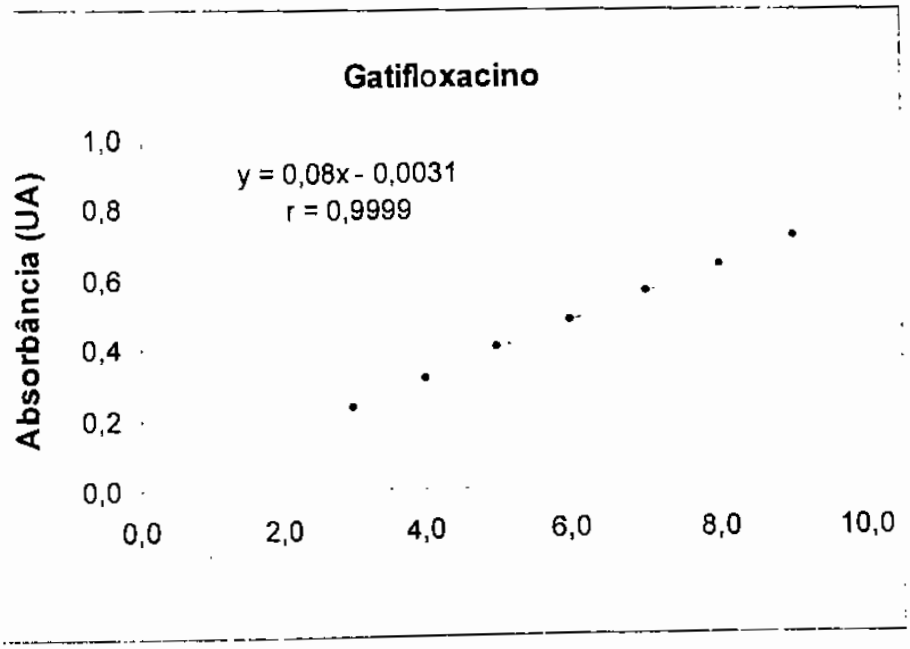


Figura 24b – Curva de calibração do GAT em 293 nm nas concentrações 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ; 8,0 e 9,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

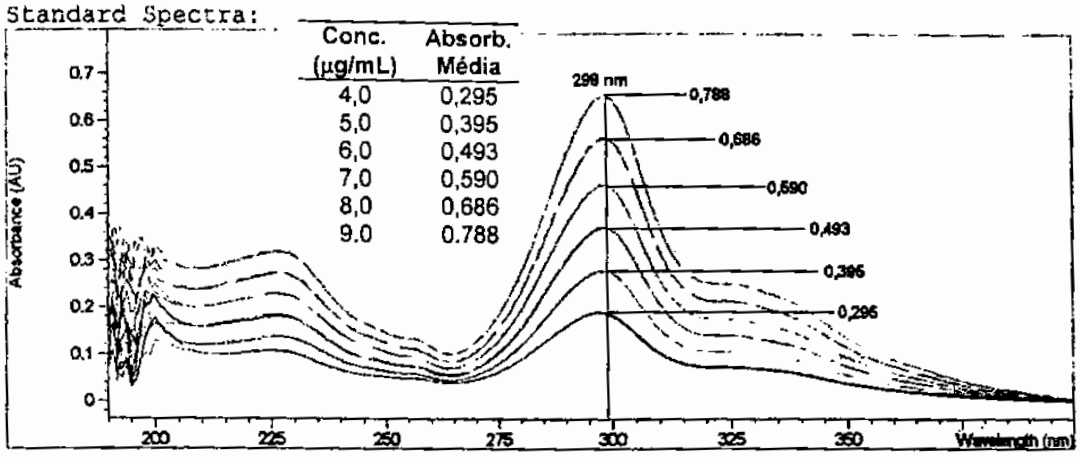


Figura 25a – Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do LEV em 298 nm nas concentrações 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

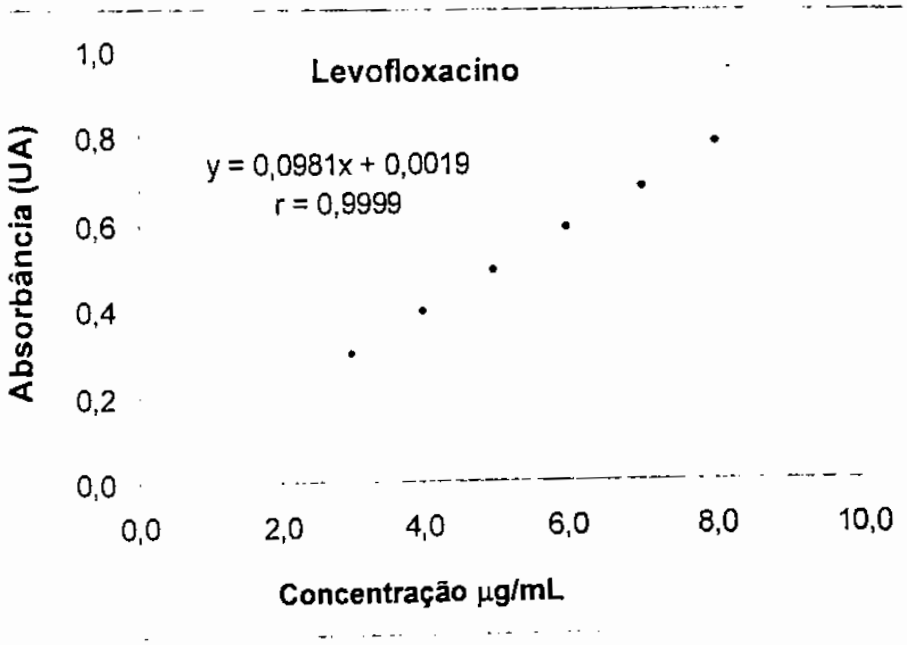


Figura 25b – Curva de calibração LEV em 298 nm nas concentrações 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

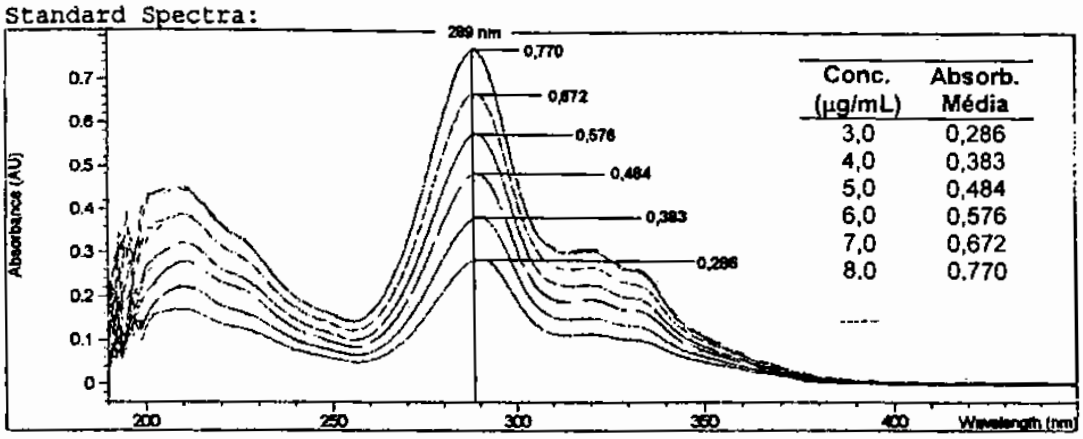


Figura 26a – Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do LOM em 289 nm nas concentrações 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

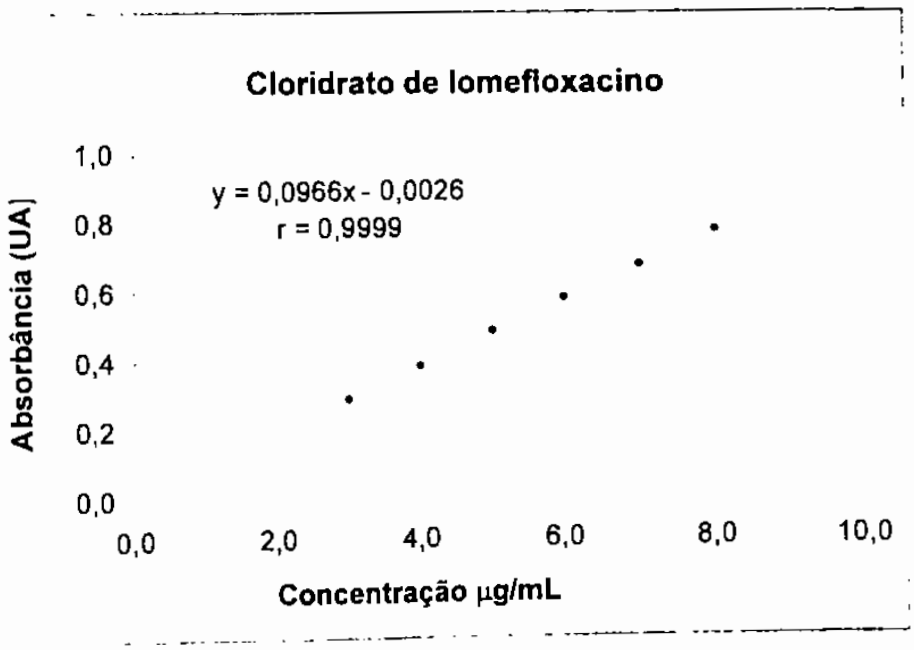


Figura 26b – Curva de calibração do LOM em 289 nm nas concentrações 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 µg/mL , utilizando-se metanol como solvente.

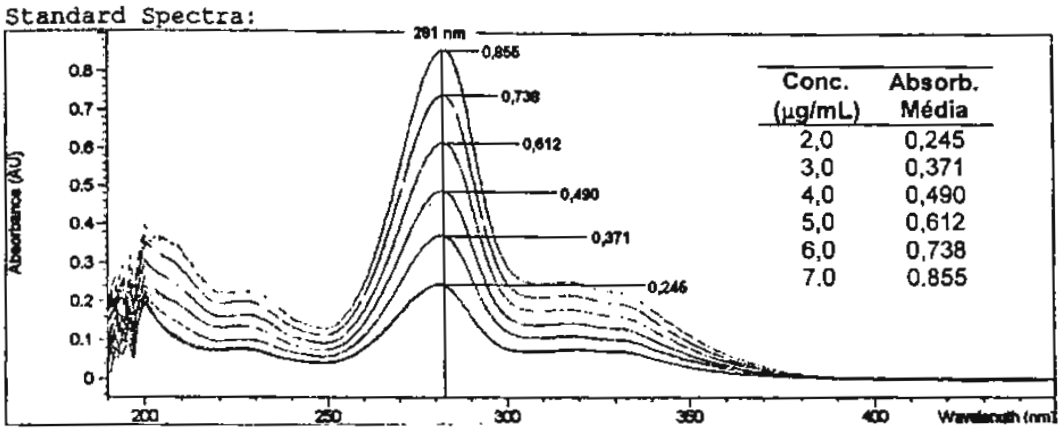


Figura 27a – Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do NOR em 281 nm nas concentrações 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

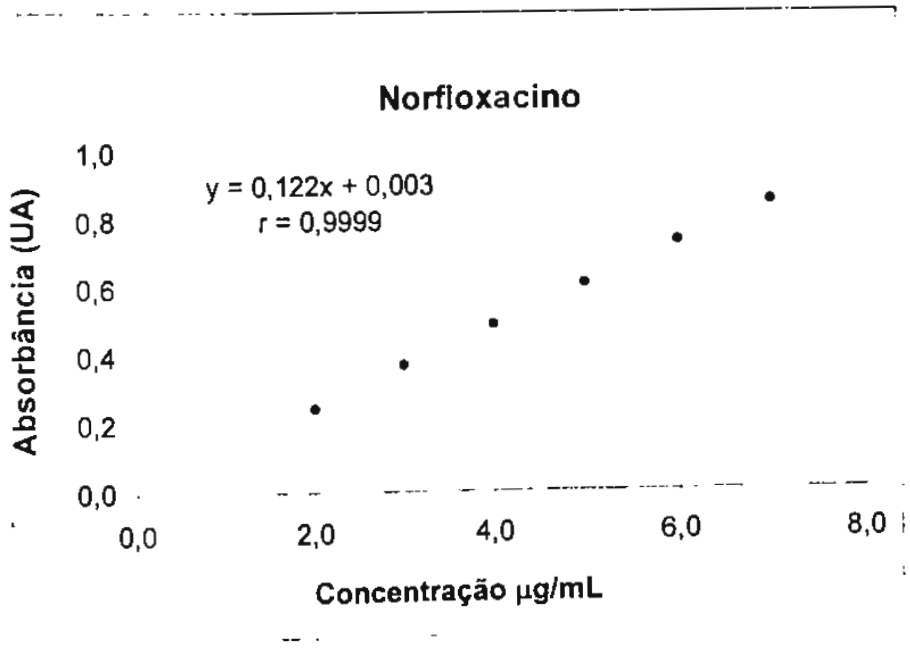


Figura 27b – Curva de calibração do NOR em 281 nm nas concentrações 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

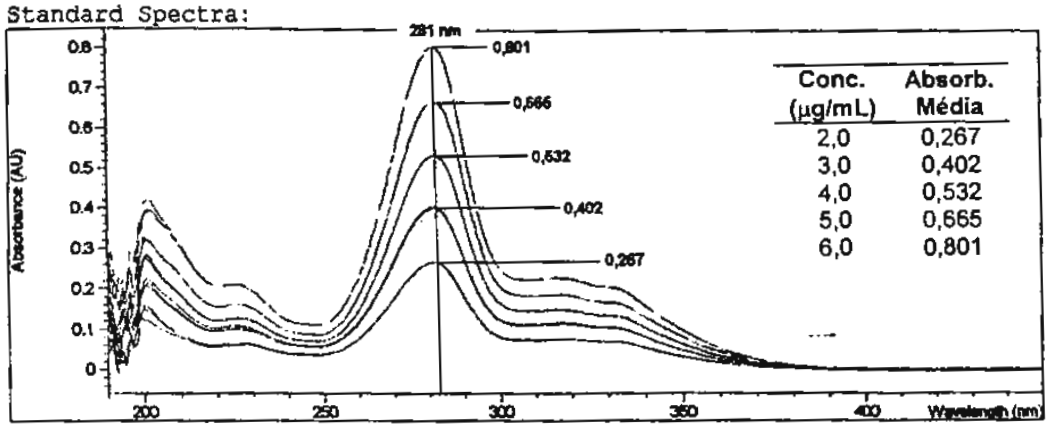


Figura 28a – Espectro de absorção na região do UV para obtenção da curva de calibração do PEF em 281 nm nas concentrações de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

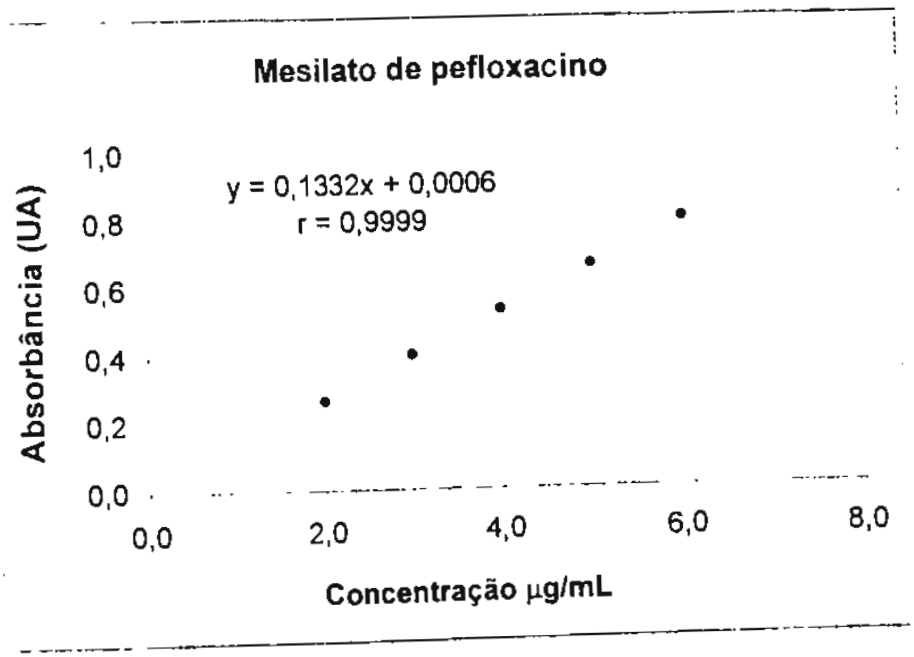


Figura 28b – Curva de calibração do PEF em 281 nm nas concentrações de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente.

5.4.1.2. Teste de recuperação – Exatidão

Os dados da recuperação das soluções padrão adicionadas às amostras analisadas, pelo método espectrofotométrico proposto, podem ser vistos na *Tabela 12*.

5.4.1.3. Precisão – Desvio padrão relativo (DPR)

A *Tabela 13* mostra os dados estatísticos obtidos nas análises das amostras que confirmam a precisão do método espectrofotométrico proposto.

5.4.1.4. Análise das amostras – Determinação dos teores percentuais

Os teores percentuais dos fármacos encontrados nas amostras comerciais pelo método espectrofotométrico proposto podem ser vistos na *Tabela 13*.

Tabela 12 – Recuperação da solução padrão adicionada às amostras analisadas empregando o método espectrofotométrico proposto.

Número da amostra	Concentração final (µg/mL)	Quantidade encontrada[a] (µg/mL)	Recuperação (%)	
			Resultado	Média
1	6,00	5,76	101,97	98,61
	7,00	6,62	97,37	
	8,00	7,60	97,40	
2	6,00	5,82	99,52	98,19
	7,00	6,77	98,30	
	8,00	7,67	96,75	
3	6,00	6,27	104,43	102,41
	7,00	7,36	103,07	
	8,00	8,12	99,74	
4	6,00	6,27	102,30	102,24
	7,00	7,31	102,64	
	8,00	8,29	101,79	
5	6,00	5,96	100,25	101,54
	7,00	7,04	102,32	
	8,00	8,05	102,05	
6	6,00	5,98	101,41	100,34
	7,00	6,96	100,70	
	8,00	7,88	98,92	
7	6,00	6,27	99,13	99,09
	7,00	7,35	101,42	
	8,00	8,13	96,71	
8	6,00	6,20	101,42	102,53
	7,00	7,33	104,49	
	8,00	8,24	101,68	
9	6,00	6,23	101,92	100,21
	7,00	7,14	99,22	
	8,00	8,15	100,21	
10	6,00	6,31	102,11	101,11
	7,00	7,38	103,35	
	8,00	8,15	97,88	
11	6,00	5,84	98,97	98,58
	7,00	6,84	99,23	
	8,00	7,75	97,55	
12	6,00	5,85	98,63	98,29
	7,00	6,82	98,06	
	8,00	7,80	98,16	

[a] Média de 3 determinações

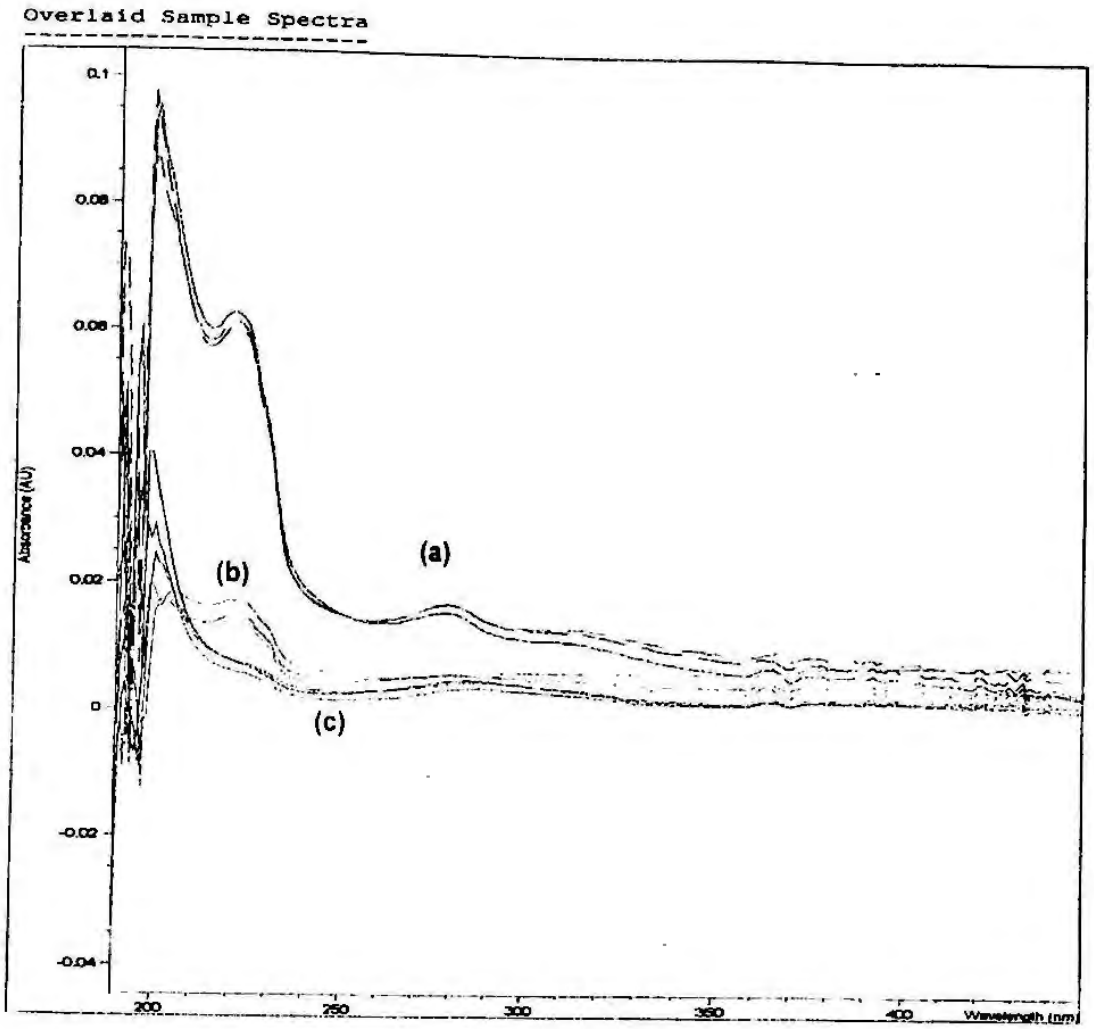
Tabela 13 – Dados estatísticos obtidos nas análises das amostras empregando o método espectrofotométrico proposto.

Número da amostra	Concentração teórica declarada (μg/mL)	Concentração experimental encontrada (μg/mL)	DP [a]	DPR (%)	TEOR (%) intervalo de confiança [b]
1	5,00	5,34	0,03	0,55	103,62± 0,02
2	5,00	5,26	0,03	0,63	105,15 ± 0,02
3	5,00	5,00	0,03	0,96	99,97 ± 0,05
4	5,00	5,25	0,02	0,44	104,87 ± 0,02
5	5,00	4,92	0,02	0,45	98,32 ± 0,02
6	5,00	4,96	0,02	0,34	99,18 ± 0,01
7	5,00	5,06	0,03	0,64	101,25 ± 0,02
8	5,00	5,07	0,04	0,71	101,33 ± 0,01
9	5,00	5,15	0,04	0,71	103,03 ± 0,03
10	5,00	5,48	0,02	0,47	101,72 ± 0,02
11	5,00	4,92	0,02	0,36	98,48 ± 0,01
12	5,00	4,76	0,01	0,29	95,16 ± 0,01

[a] Média de 10 determinações
[b] grau = 95%

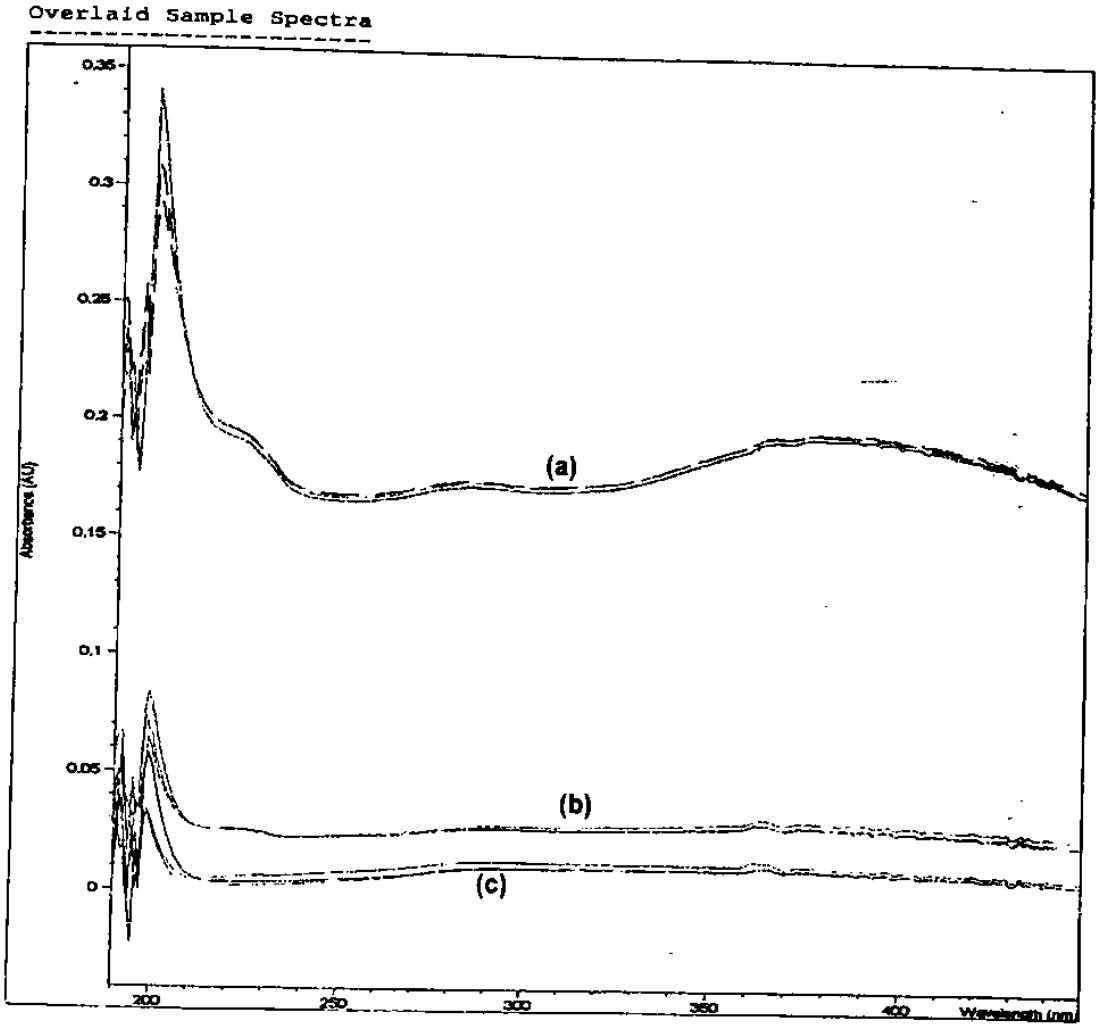
5.4.1.5. Teste de interferência dos excipientes – Especificidade

As *Figuras 29 (a-m)* ilustram os espectros de absorbância dos placebos e dos excipientes obtidos pelo método proposto.



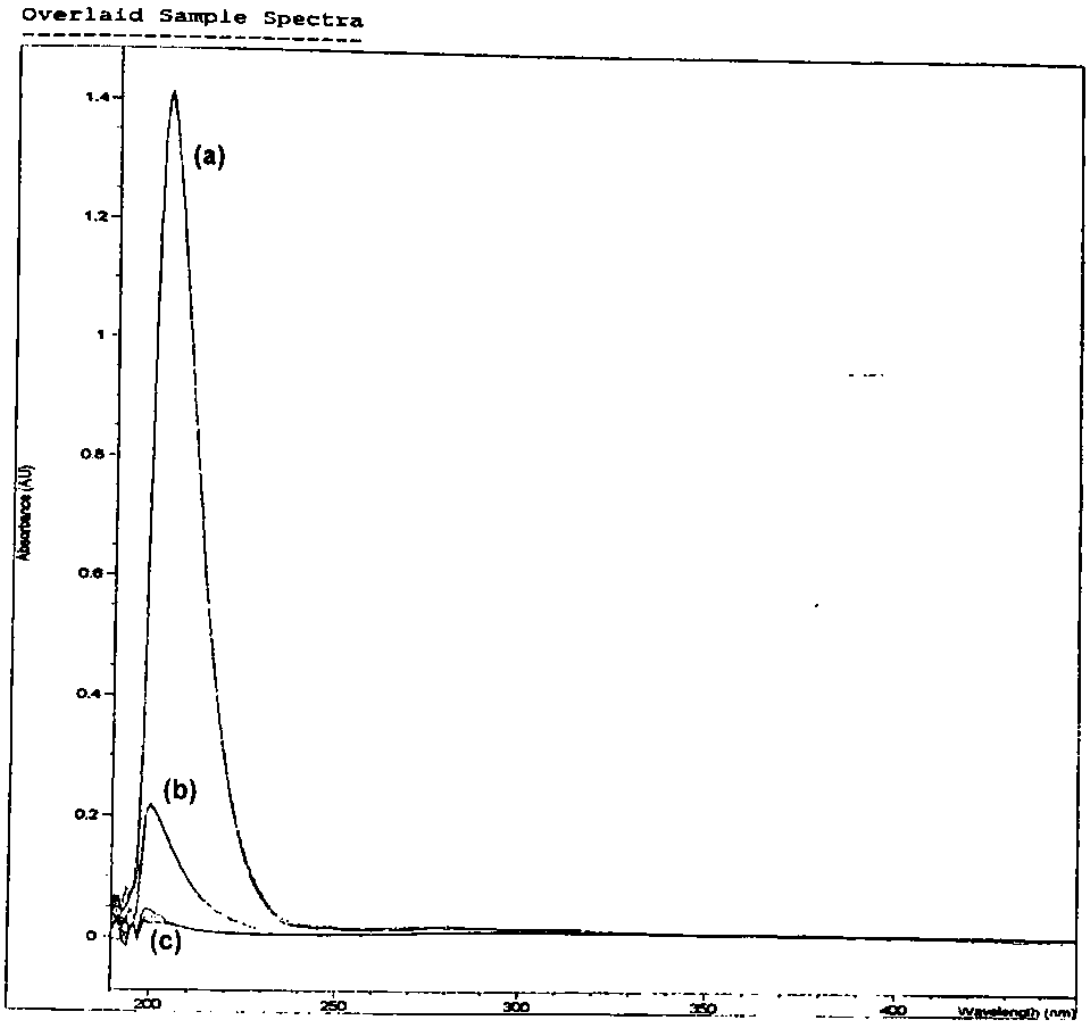
Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,01680	0,01654	0,01453	0,01377	0,01344
(b)	40,0	0,00574	0,00567	0,00545	0,00538	0,00513
(c)	4,0	0,00351	0,00356	0,00370	0,00356	0,00336

Figura 29a – Espectro de absorbância do placebo correspondente ao núcleo dos comprimidos de cloridrato de lomefloxacino do laboratório F, analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



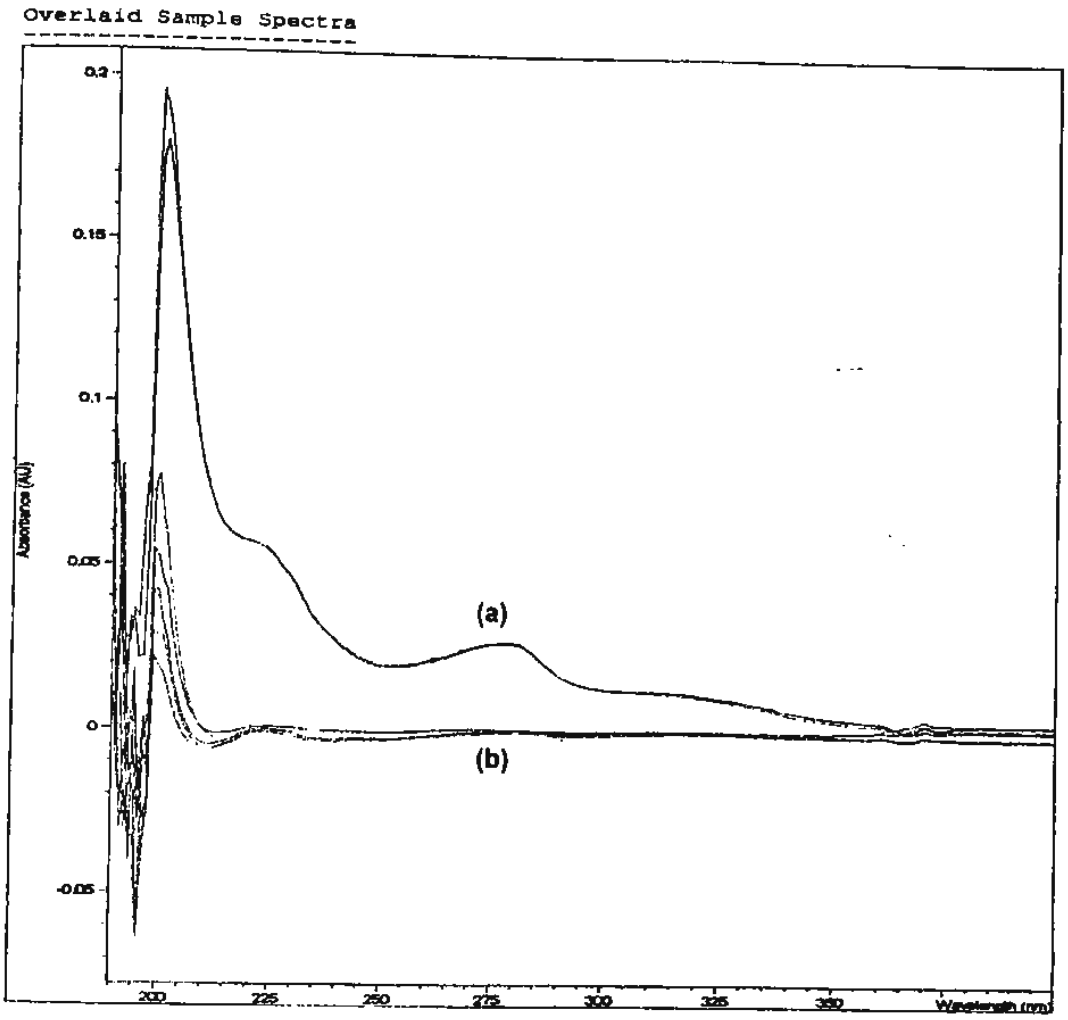
Concentração (μg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	**282**	**289**	**293**	**298**
(a)	400,0	0,17232	0,17256	0,17245	0,17194	0,17137
(b)	40,0	0,02686	0,02685	0,02734	0,01039	0,01464
(c)	4,0	0,01257	0,01265	0,01316	0,01326	0,01319

Figura 29b – Espectro de absorbância do placebo correspondente ao revestimento dos comprimidos de cloridrato de lomefloxacino do laboratório F, analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



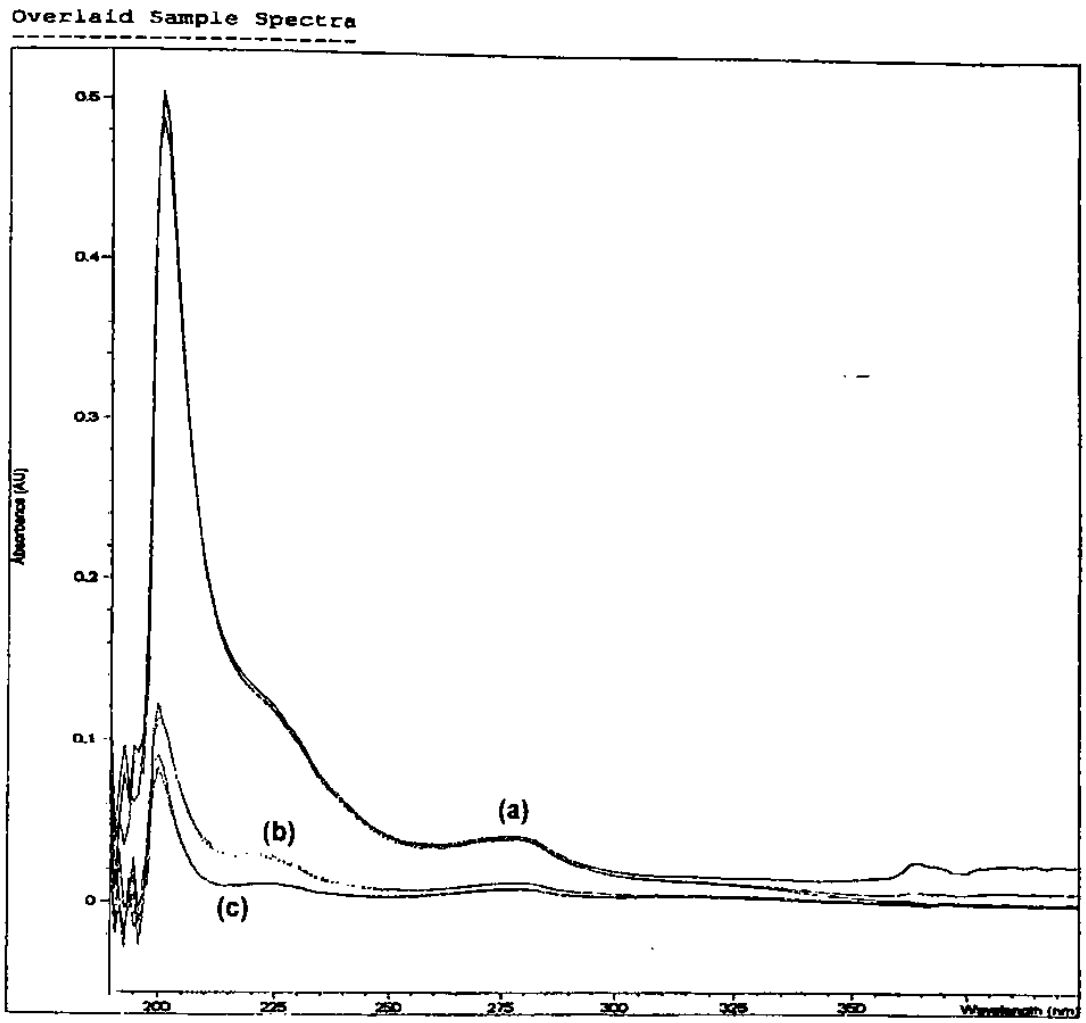
Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,01892	0,01897	0,01806	0,01764	0,01739
(b)	40,0	0,01146	0,01154	0,01225	0,01145	0,01156
(c)	4,0	0,01146	0,01149	0,01225	0,01223	0,01217

Figura 29c – Espectro de absorbância do placebo dos comprimidos de cloridrato de lomefloxacino do laboratório G, analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



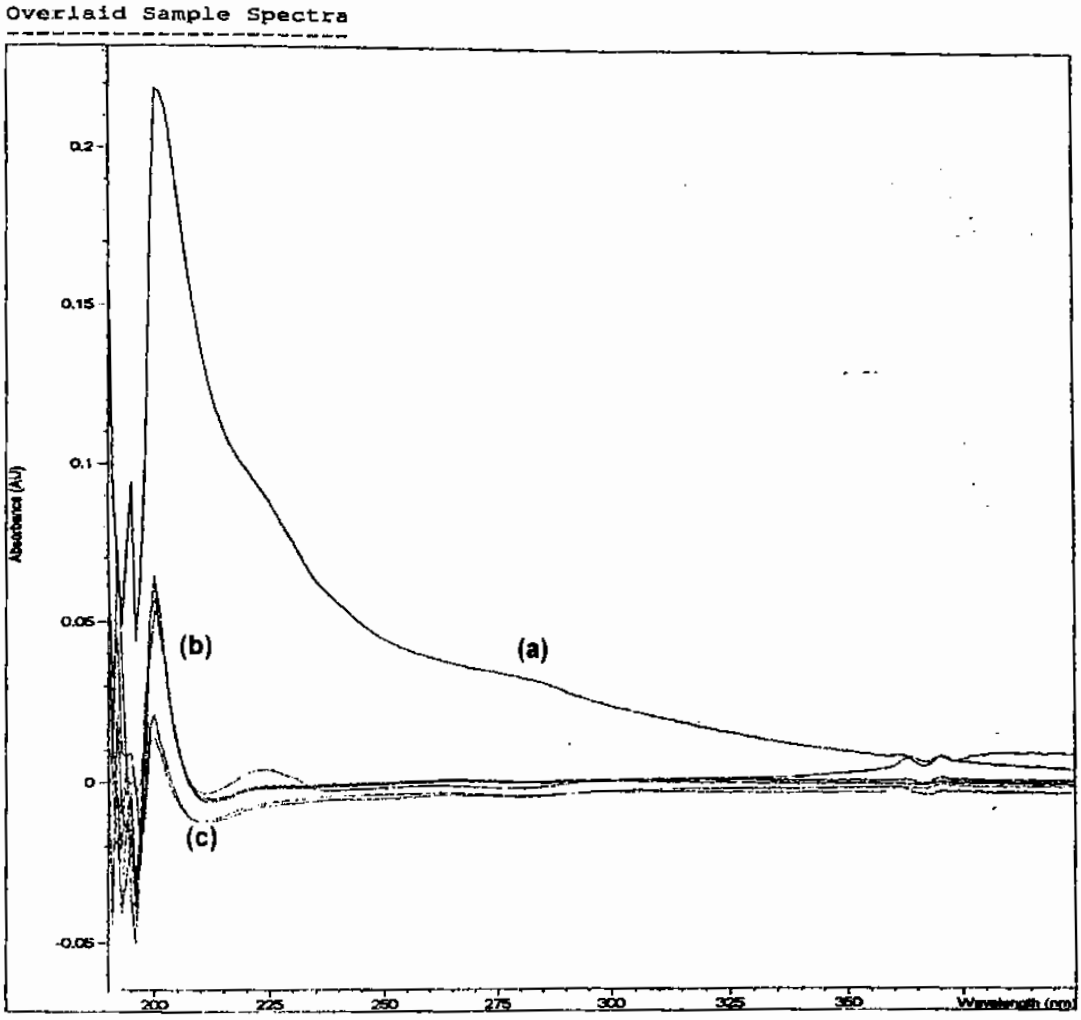
Concentração (μg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,02635	0,02573	0,01808	0,01507	0,01344
(b)	40,0	0,00025	0,00017	0,00025	-0,00027	-0,00017
(c)	4,0	-0,00010	-0,00002	-0,00068	-0,00053	-0,00005

Figura 29d – Espectro de absorbância de amido analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



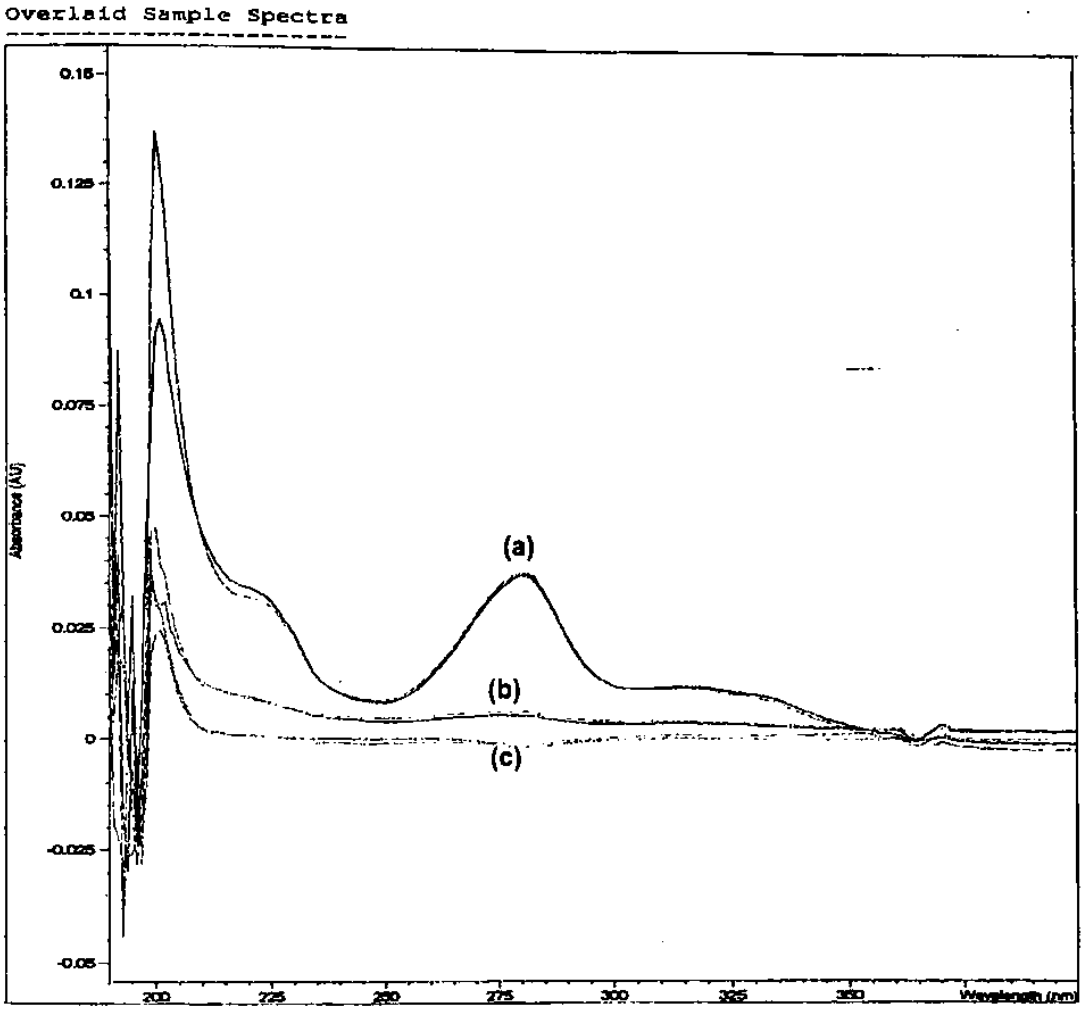
Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,04035	0,03930	0,02812	0,02395	0,02047
(b)	40,0	0,01221	0,01725	0,00751	0,00652	0,00583
(c)	4,0	0,00816	0,00780	0,00437	0,00381	0,00345

Figura 29e – Espectro de absorbância do estearato de magnésio analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



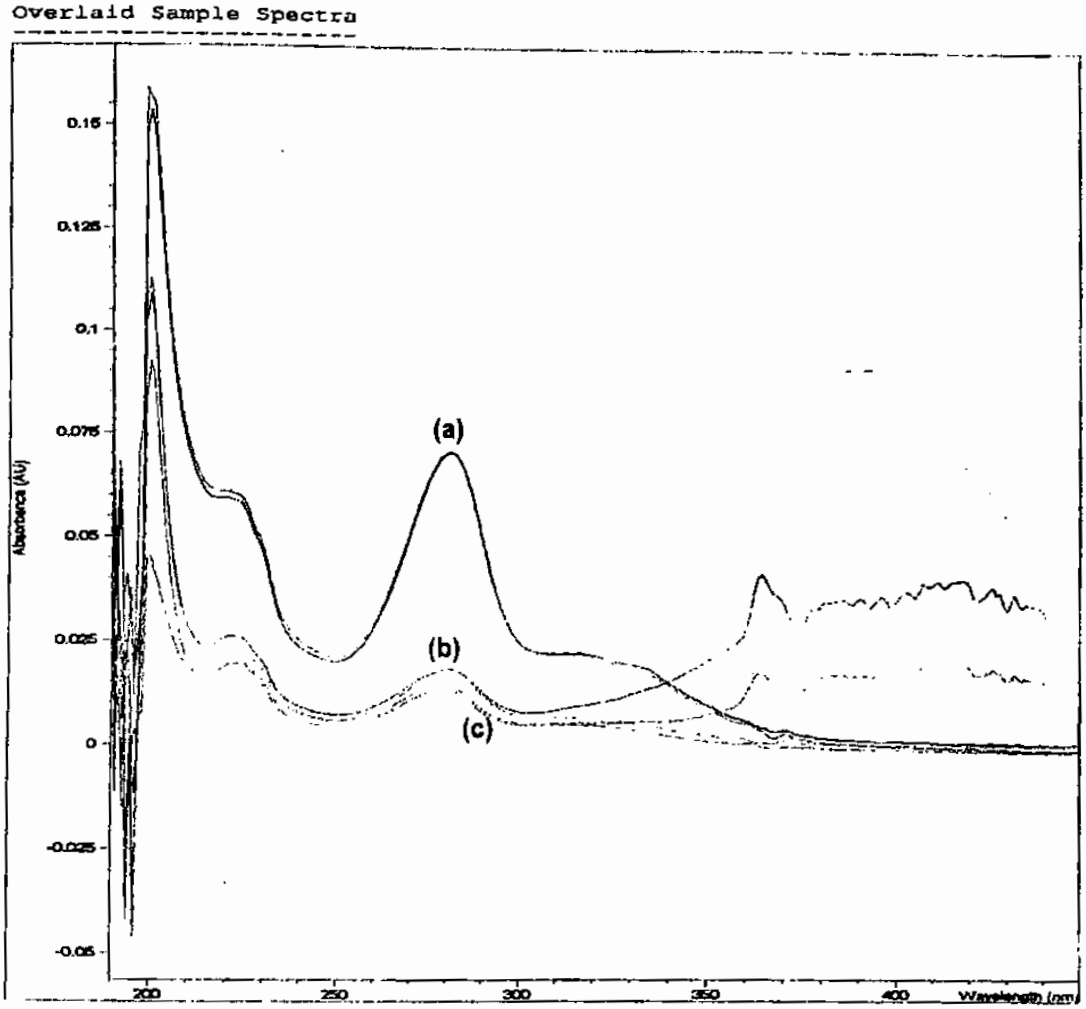
Concentração (μg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,03274	0,03243	0,09158	0,27081	0,24928
(b)	40,0	0,00031	0,00023	0,00048	0,00078	0,00105
(c)	4,0	-0,00146	-0,00146	-0,00037	0,00293	-0,00251

Figura 29f – Espectro de absorbância da etilcelulose analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente



Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,03712	0,03645	0,02453	0,01761	0,01322
(b)	40,0	0,00559	0,00553	0,00349	0,00398	0,00382
(c)	4,0	-0,00088	-0,00080	-0,00072	-0,00033	0,00000

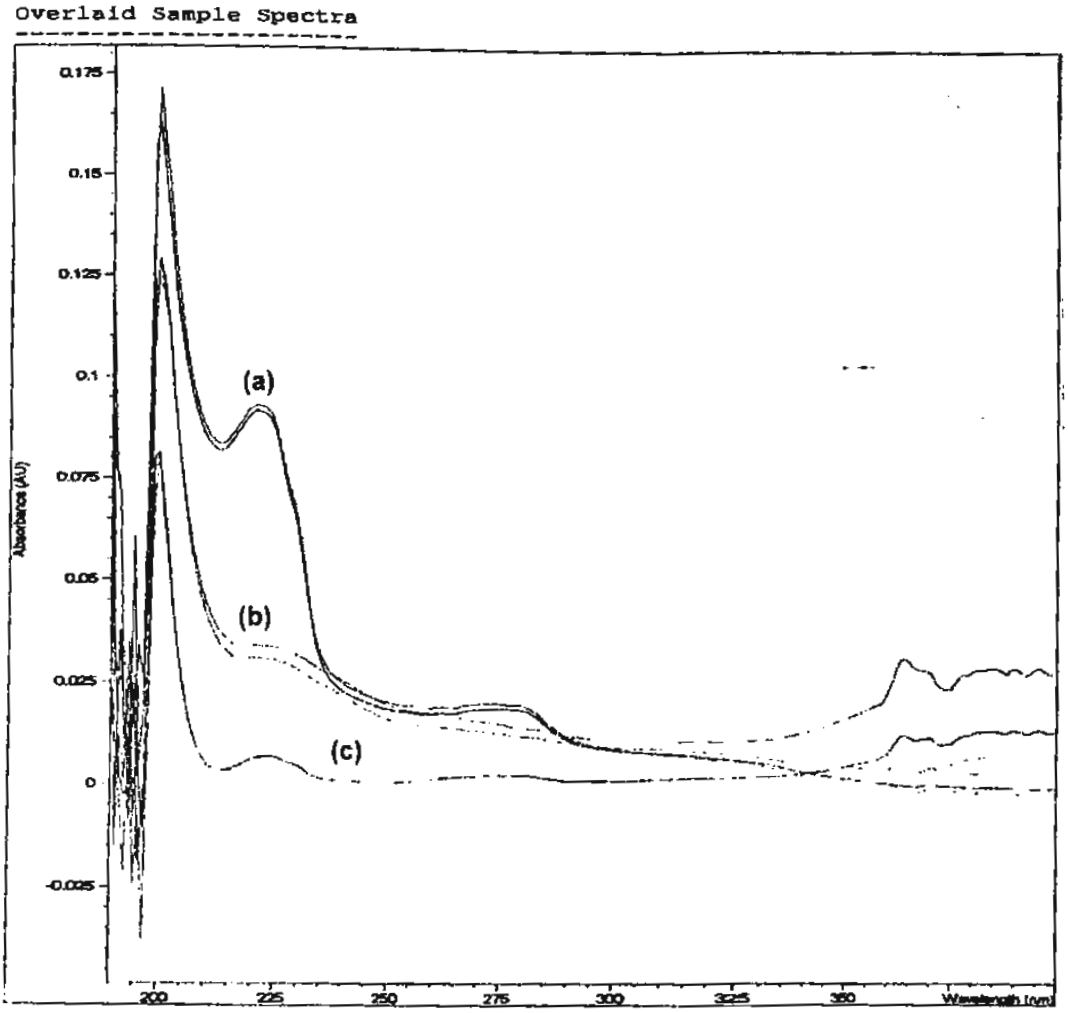
Figura 29g – Espectro de absorbância da gelatina analisada por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



Concentração (μg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,07076	0,07048	0,05298	0,03838	0,02714
(b)	40,0	0,01773	0,01756	0,01299	0,00994	0,00779
(c)	4,0	0,00136	0,00134	0,00863	0,00660	0,00054

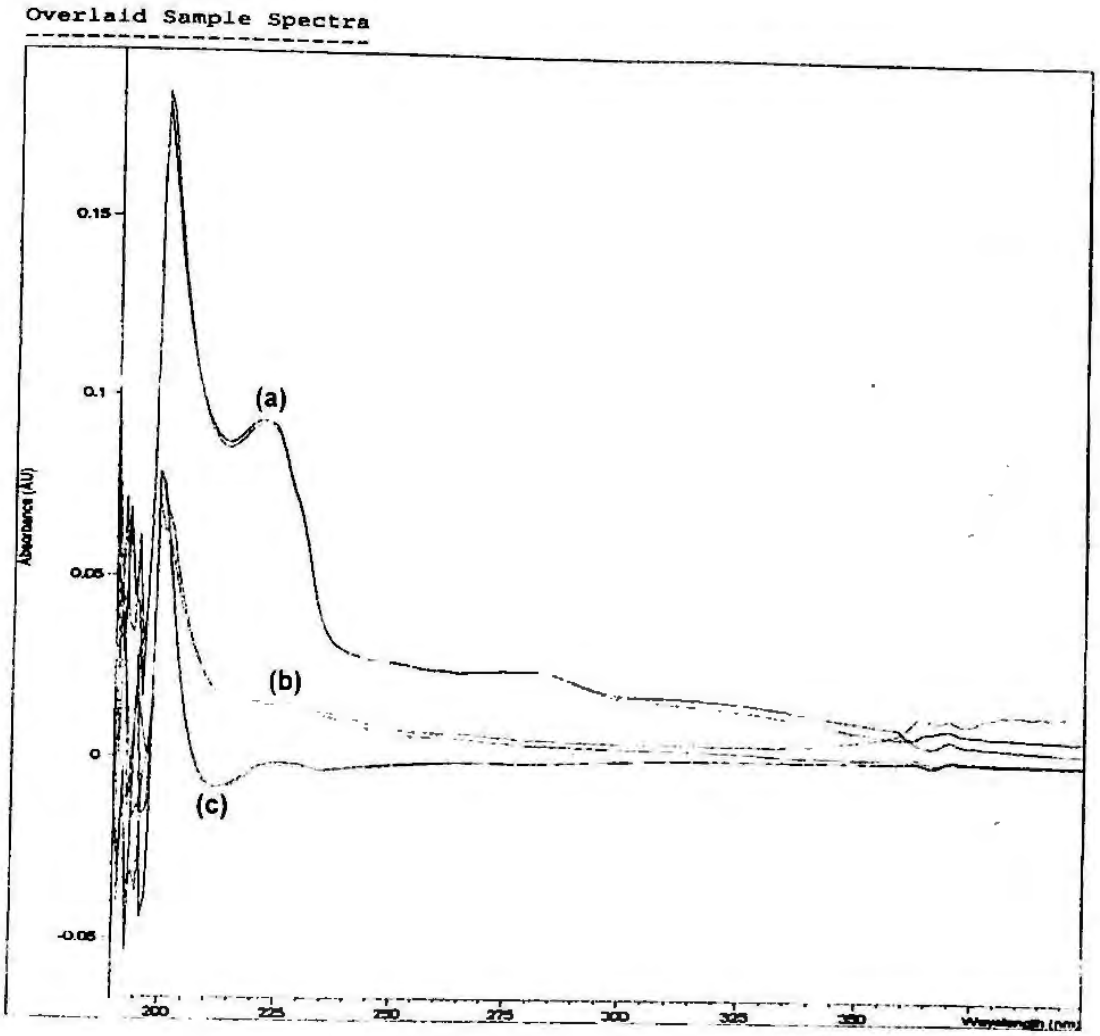
Figura 29h – Espectro de absorbância do glicolato de sódio analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



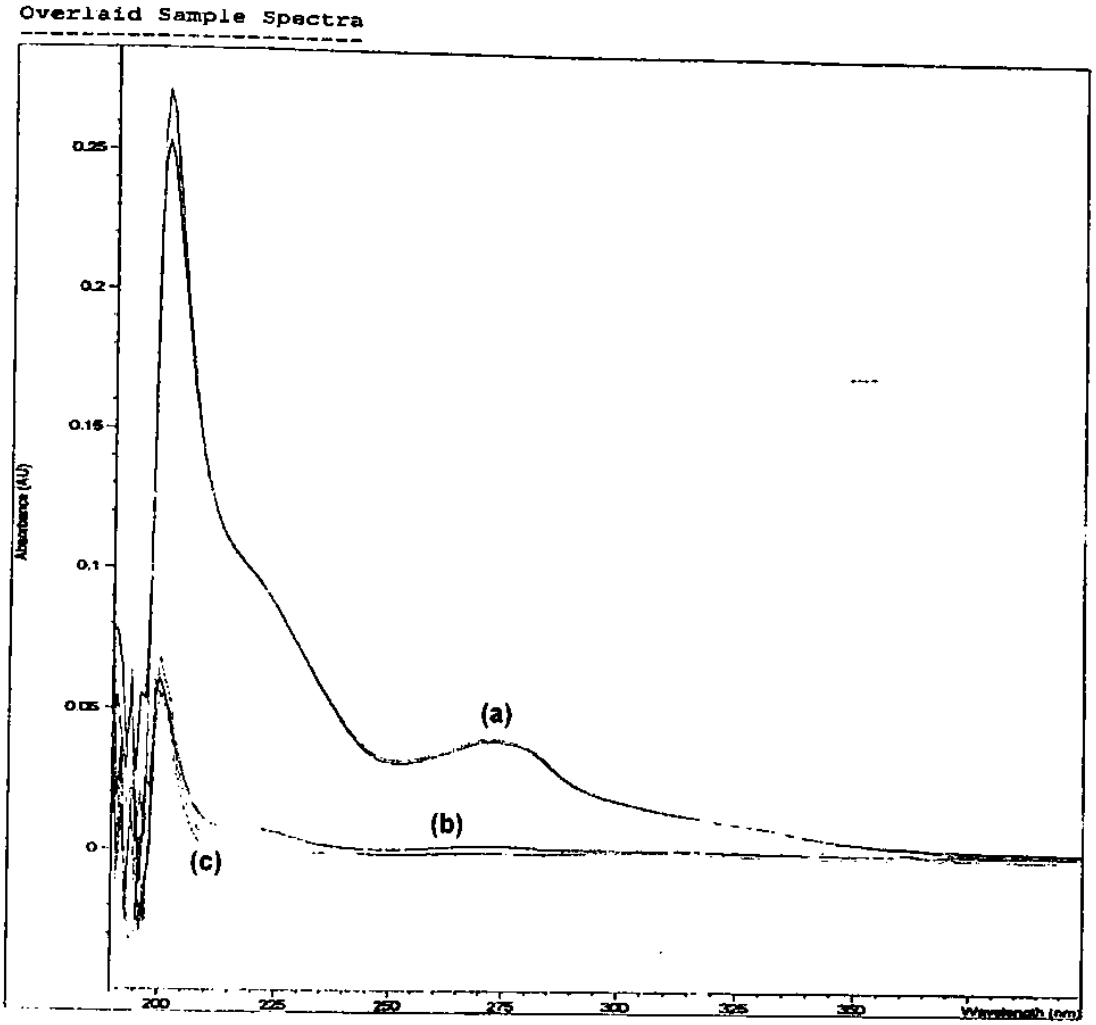
Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,01828	0,01766	0,01954	0,01027	0,00916
(b)	40,0	0,01418	0,01401	0,01071	0,01022	0,01164
(c)	4,0	0,00252	0,00243	0,00128	0,00121	0,00116

Figura 29i – Espectro de absorbância da hidroxipropilmetilcelulose analisada por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



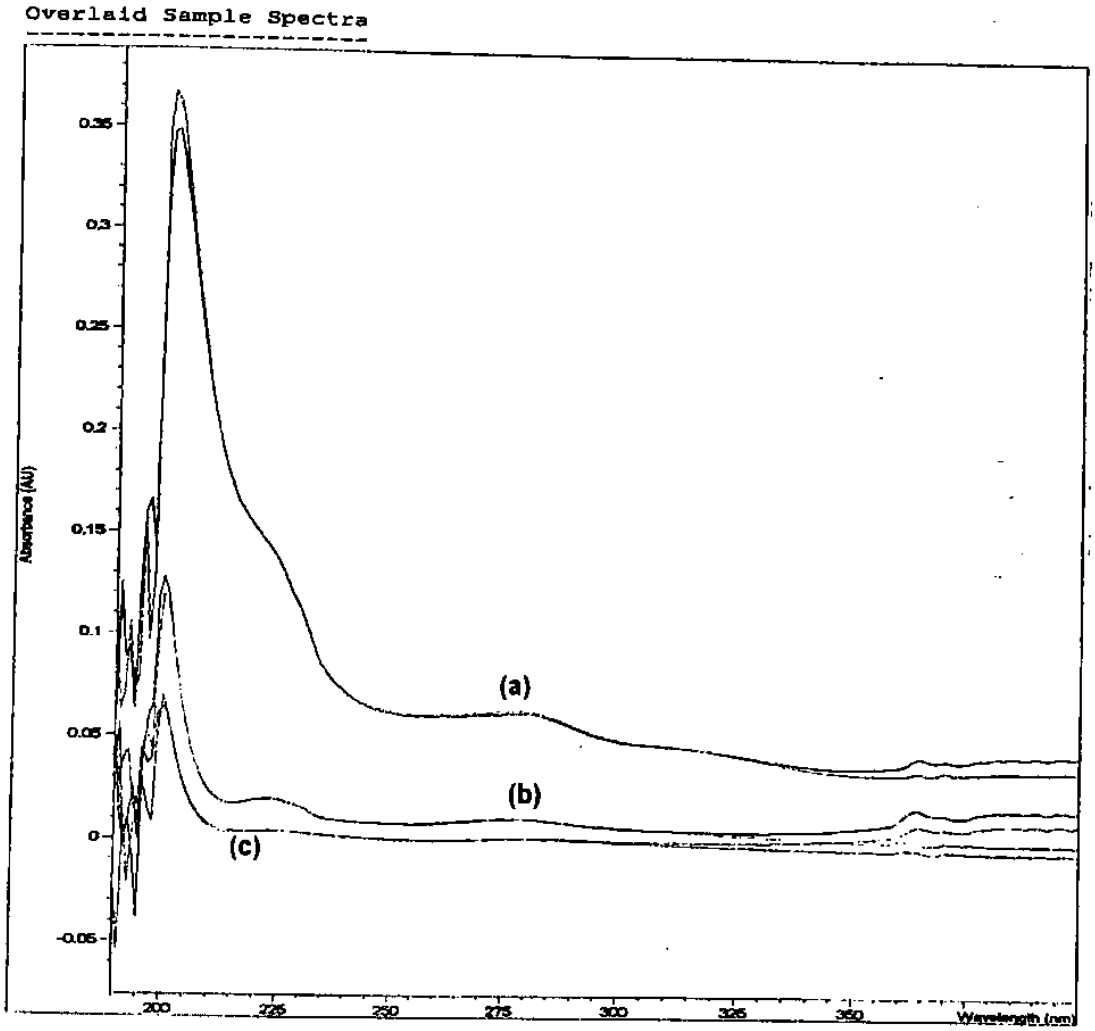
Concentração (μg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,02480	0,02462	0,02191	0,01989	0,01796
(b)	40,0	0,00413	0,00413	0,00391	0,00371	0,00352
(c)	4,0	-0,00091	-0,00098	-0,00053	-0,00020	-0,00007

Figura 29j – Espectro de absorbância do óxido de titânio analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU) λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,03593	0,03473	0,02509	0,02179	0,01892
(b)	40,0	0,00142	0,00132	0,00138	0,00149	0,00568
(c)	4,0	-0,00066	-0,00072	-0,00051	-0,00037	-0,00033

Figura 29I – Espectro de absorbância do talco analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.



Concentração (µg/mL)		Absorbância (AU)				
		λ (nm)				
		281	282	289	293	298
(a)	400,0	0,06230	0,06195	0,05678	0,05313	0,04889
(b)	40,0	0,01051	0,01027	0,00869	0,00764	0,00670
(c)	4,0	0,00121	0,00126	0,00073	0,00029	0,00011

Figura 29m – Espectro de absorbância do "placebo-mix" analisado por espectrofotometria no UV, empregando metanol como solvente.

5.4.1.6. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade

Os LD e LQ para os fármacos quinolônicos foram os seguintes:

- Cloridrato de ciprofloxacino
  - LD = 0,38 μg/mL
  - LQ = 1,27 μg/mL
- Gatifloxacino
  - LD = 0,36 μg/mL
  - LQ = 1,23 μg/mL
- Levofloxacino
  - LD = 0,37 μg/mL
  - LQ = 1,24 μg/mL
- Cloridrato de lomefloxacino
  - LD = 0,38 μg/mL
  - LQ = 1,25 μg/mL
- Norfloxacino
  - LD = 0,38 μg/mL
  - LQ = 1,22 μg/mL
- Mesilato de pefloxacino
  - LD = 0,31 μg/mL
  - LQ = 1,03 μg/mL

5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.5.1. Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos

5.5.1.1. Seleção dos comprimentos de onda – espectros de absorbância

Com o intuito de verificar o melhor comprimento de onda a ser empregado na cromatografia, foram desenvolvidos os espectros de absorção na região do UV de cada fármaco, com concentração de 5,0 μg/mL, solubilizado na fase móvel. As *Figuras 30, 31, 32, 33, 34* e *35* ilustram os espectros de absorção no UV das soluções de CIP, GAT, LEV, LOM, NOR E PEF, respectivamente.

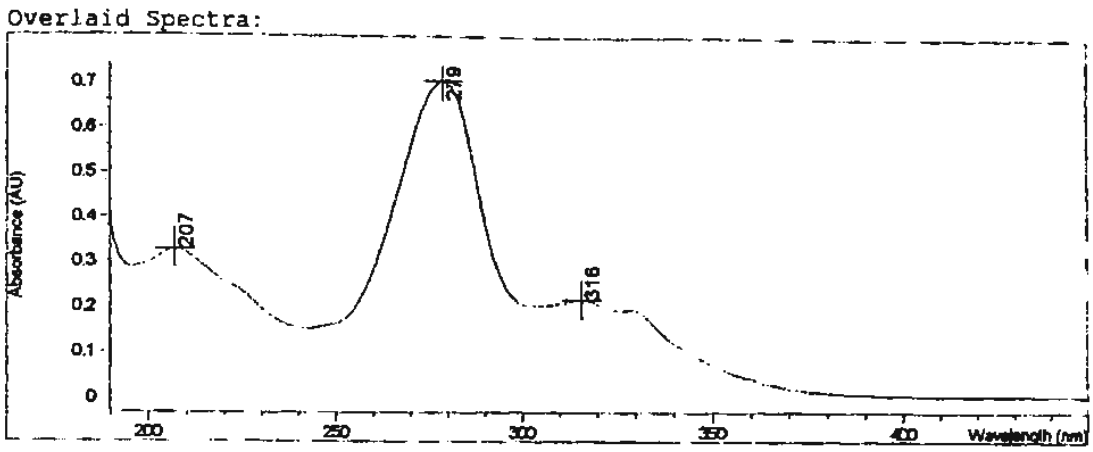


Figura 30 – Espectro de absorção de CIP na concentração de 5,0 µg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico.

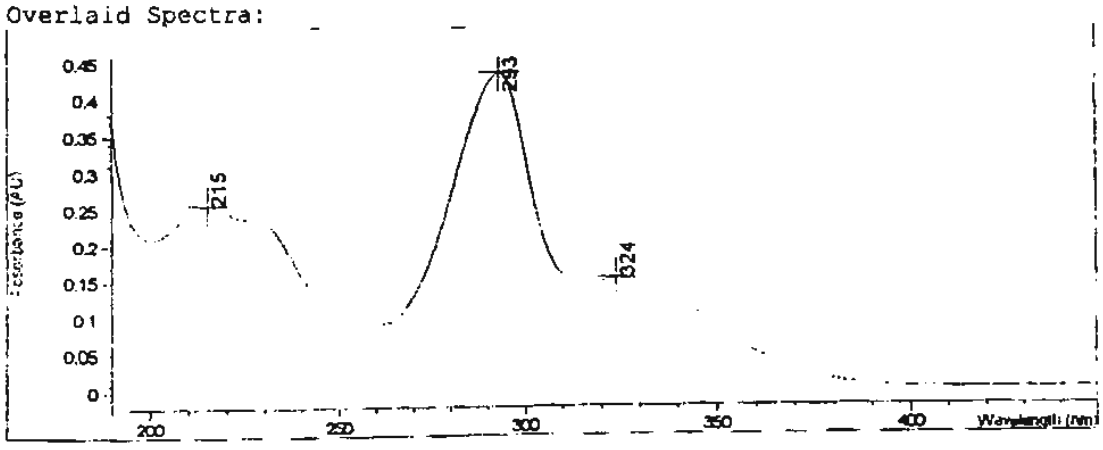


Figura 31 – Espectro de absorção de GAT na concentração de 5,0 µg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico.

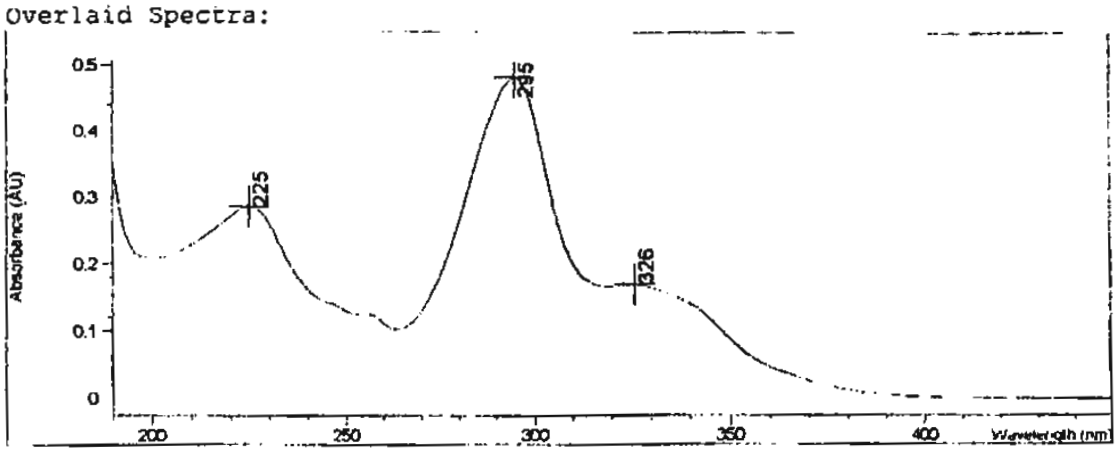


Figura 32 – Espectro de absorção de LEV na concentração de 5,0 µg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico.

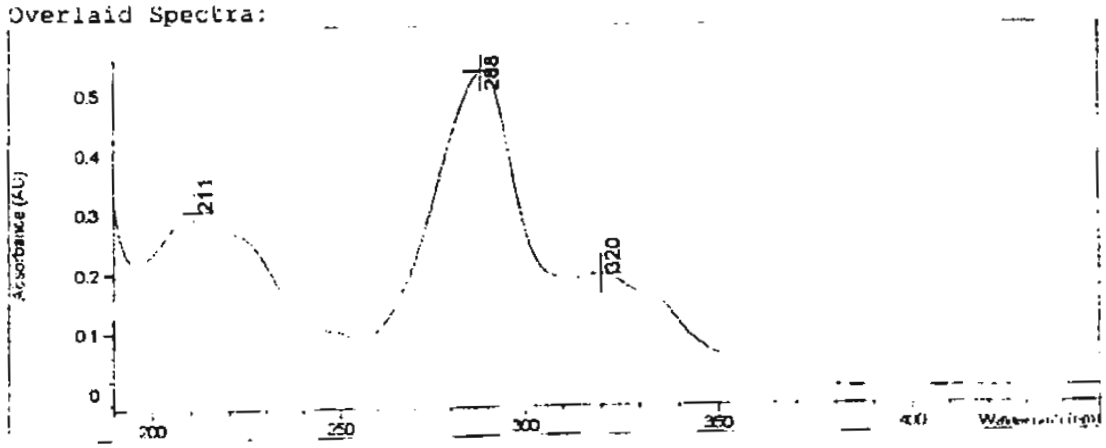


Figura 33 – Espectro de absorção de LOM na concentração de 5,0 µg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico.

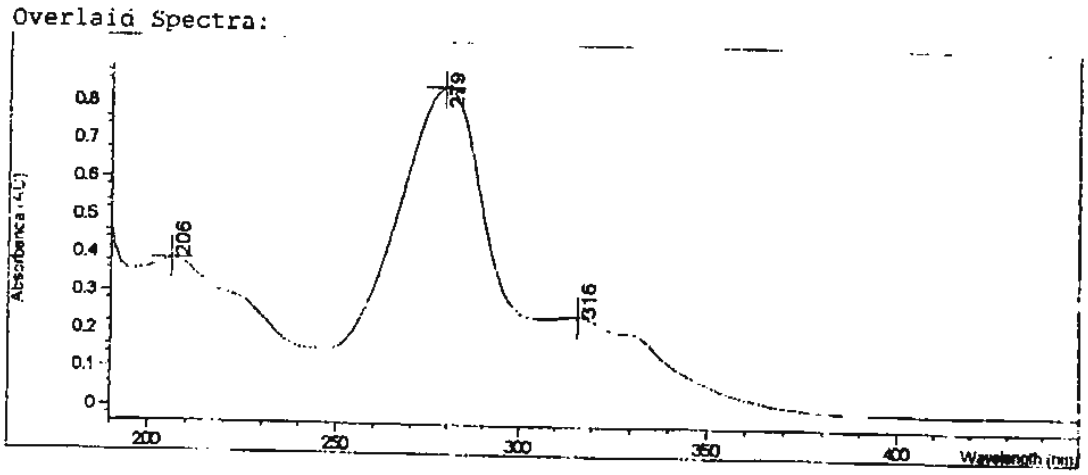


Figura 34 – Espectro de absorção de NOR em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3) na concentração de 5,0 μg/mL.

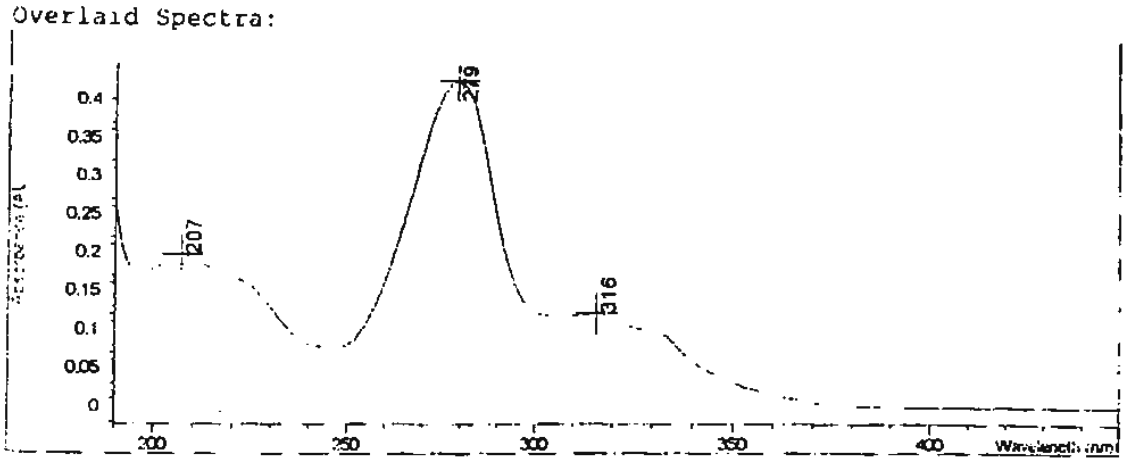


Figura 35 – Espectro de absorção de PEF na concentração de 5,0 μg/mL em H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3 ajustado com ácido fosfórico.

5.5.2. Aplicação do método proposto: soluções padrão e amostra

As *Figuras 36 (a, b, c, d); 37 (a, b); 38 (a, b), 39 (a, b) , 40(a, b, c)* e *41 (a, b)* ilustram os cromatogramas referentes às soluções padrão e amostras de CIP, GAT, LEV, LOM, NOR e PEF, respectivamente, pelo método proposto.

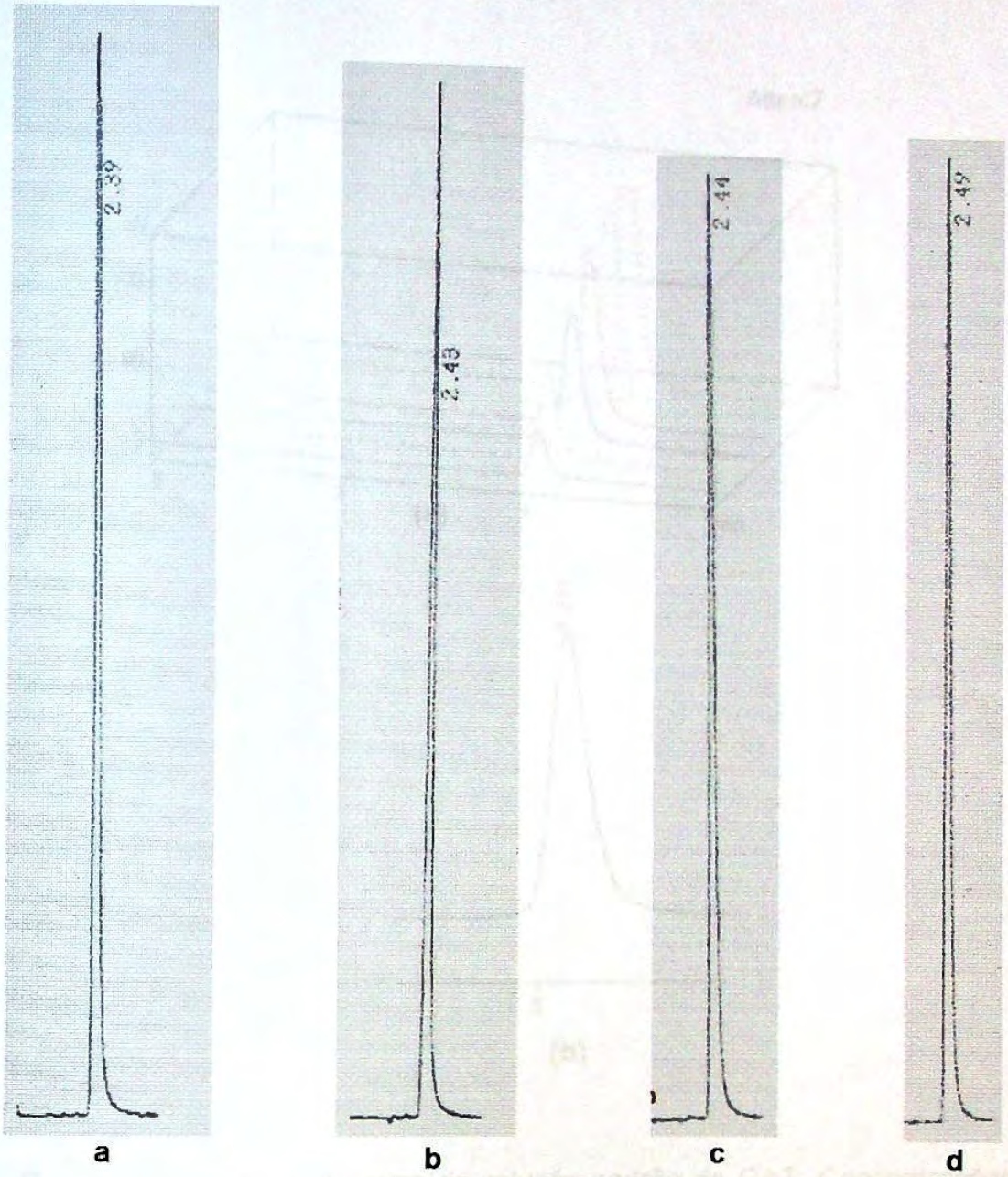


Figura 36 – **(a)** Cromatograma da solução padrão de cloridrato de CIP 16,0 µg/mL; **(b), (c) e (d)** referem-se às soluções de amostras (15,0 µg/mL) de CIP, comprimidos 500 e 250 mg e solução injetável frasco-ampola 20,0 mg/mL, respectivamente. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido modelo Varian® 5000; coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm); fase móvel constituída por H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3 v/v), pH 3,3; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 279 nm e temperatura ambiente de 24 ± 2ºC. Tempo de retenção ± 2,5 minutos.

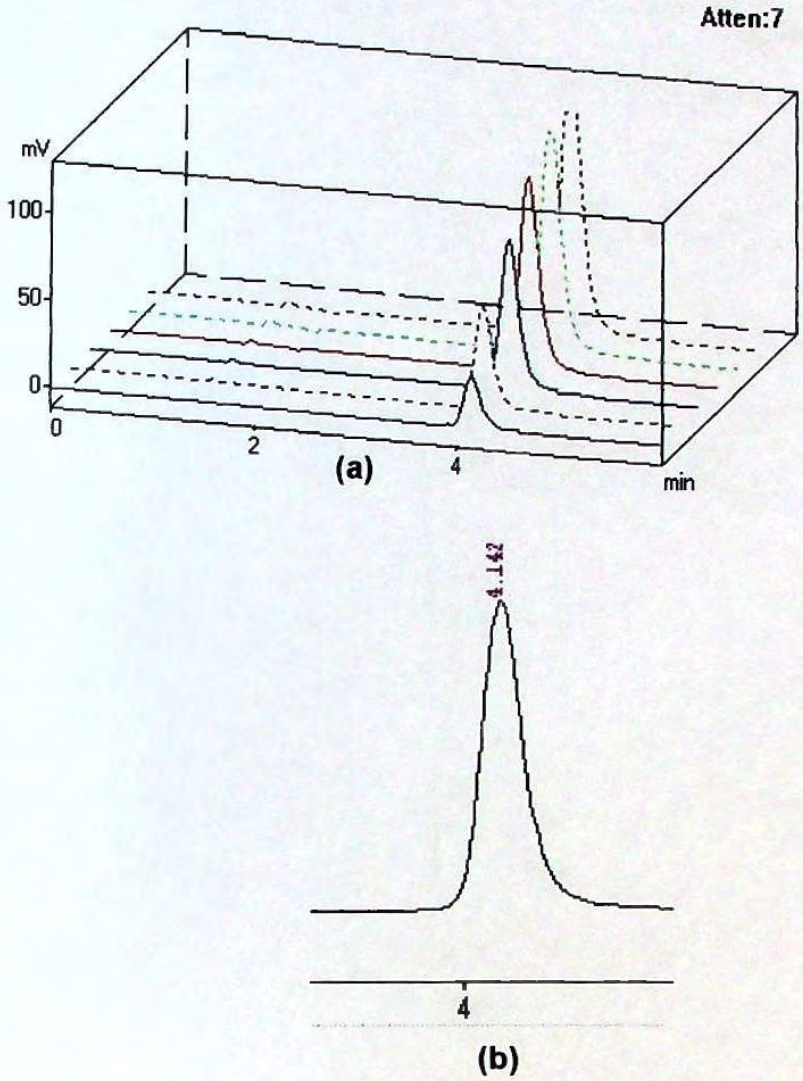


Figura 37 – **(a)** Cromatograma da solução padrão de GAT. Concentrações empregadas: 4,0 µg/mL (linha sólida preta), 8,0 µg/mL (linha tracejada preta), 12,0 µg/mL (linha sólida azul), 16,0 µg/mL (linha sólida vermelha), 20,0 µg/mL (linha tracejada verde) e 24,0 µg/mL (linha tracejada vermelha). **(b)** solução de amostra (15,0 µg/mL) referente a comprimidos de 400 mg.de GAT. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Shimadzu® modelo CL-9A. coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm); fase móvel constituída por H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3 v/v), pH 3,3; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 293 nm e temperatura ambiente de 24 ± 2°C. Tempo de retenção ± 4,0 minutos.

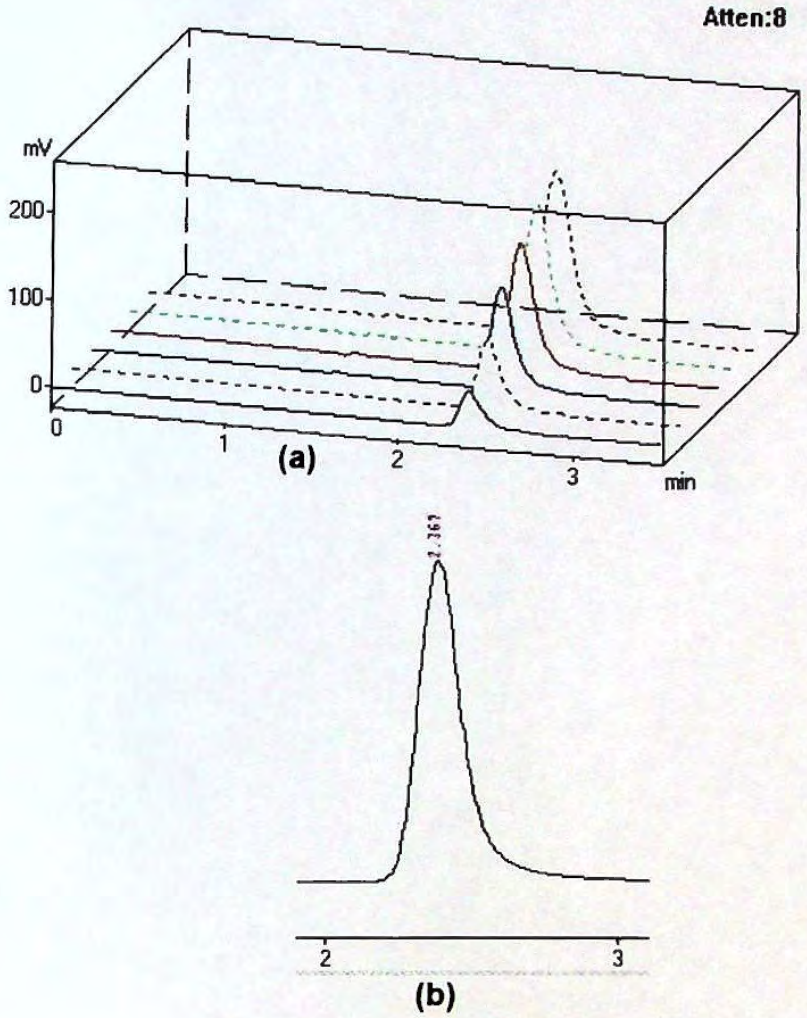


Figura 38 – **(a)** Cromatograma da solução padrão de LEV. Concentrações empregadas: 4,0 µg/mL (linha sólida preta), 8,0 µg/mL (linha tracejada preta), 12,0 µg/mL (linha sólida azul), 16,0 µg/mL (linha sólida vermelha), 20,0 µg/mL (linha tracejada verde) e 24,0 µg/mL (linha tracejada vermelha). **(b)** solução de amostra (15,0 µg/mL) referente a comprimidos de 250 mg de LEV. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Shimadzu® modelo CL-9A. coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm); fase móvel constituída por H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3 v/v), pH 3,3; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 295 nm e temperatura ambiente de 24 ± 2°C. Tempo de retenção ± 2,5 minutos.

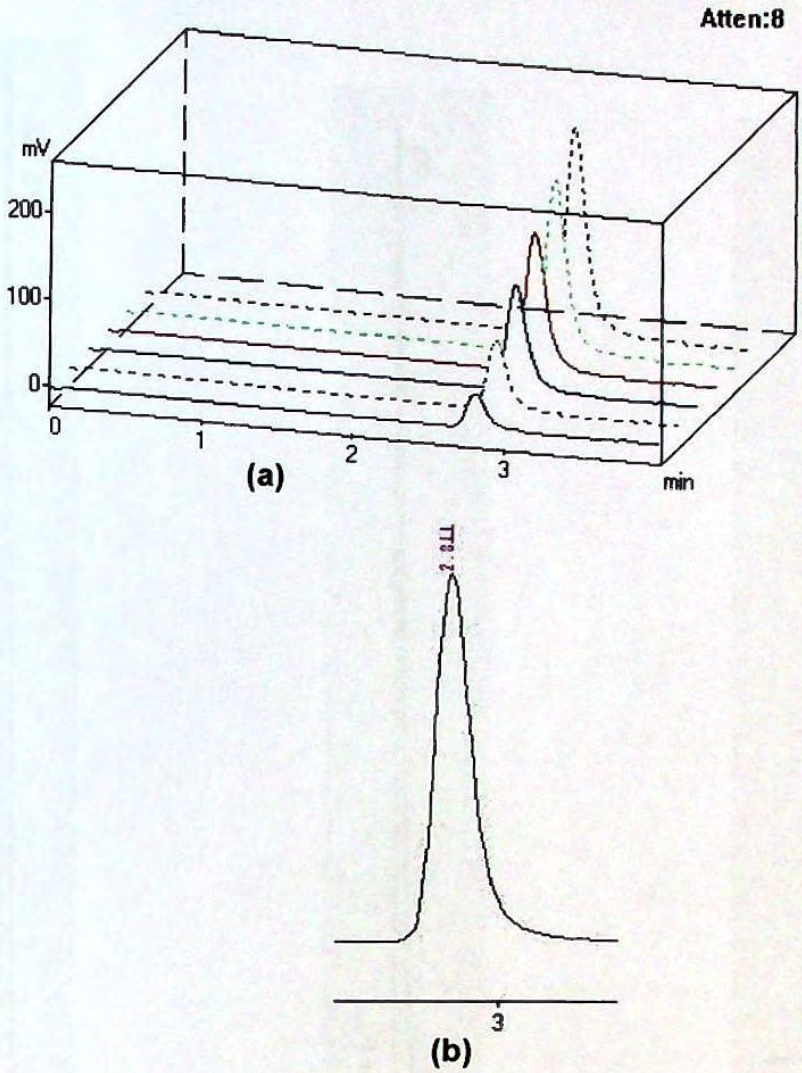


Figura 39 – **(a)** Cromatograma da solução padrão de cloridrato de LOM. Concentrações empregadas: 4,0 µg/mL (linha sólida preta), 8,0 µg/mL (linha tracejada preta), 12,0 µg/mL (linha sólida azul), 16,0 µg/mL (linha sólida vermelha), 20,0 µg/mL (linha tracejada verde) e 24,0 µg/mL (linha tracejada vermelha). **(b)** solução de amostra (15,0 µg/mL) referente a comprimidos de 400 mg de LOM. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Shimadzu® modelo CL-9A. coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm); fase móvel constituída por H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3 v/v), pH 3,3; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 288 nm e temperatura ambiente de 24 ± 2°C. Tempo de retenção ± 3,0 minutos.

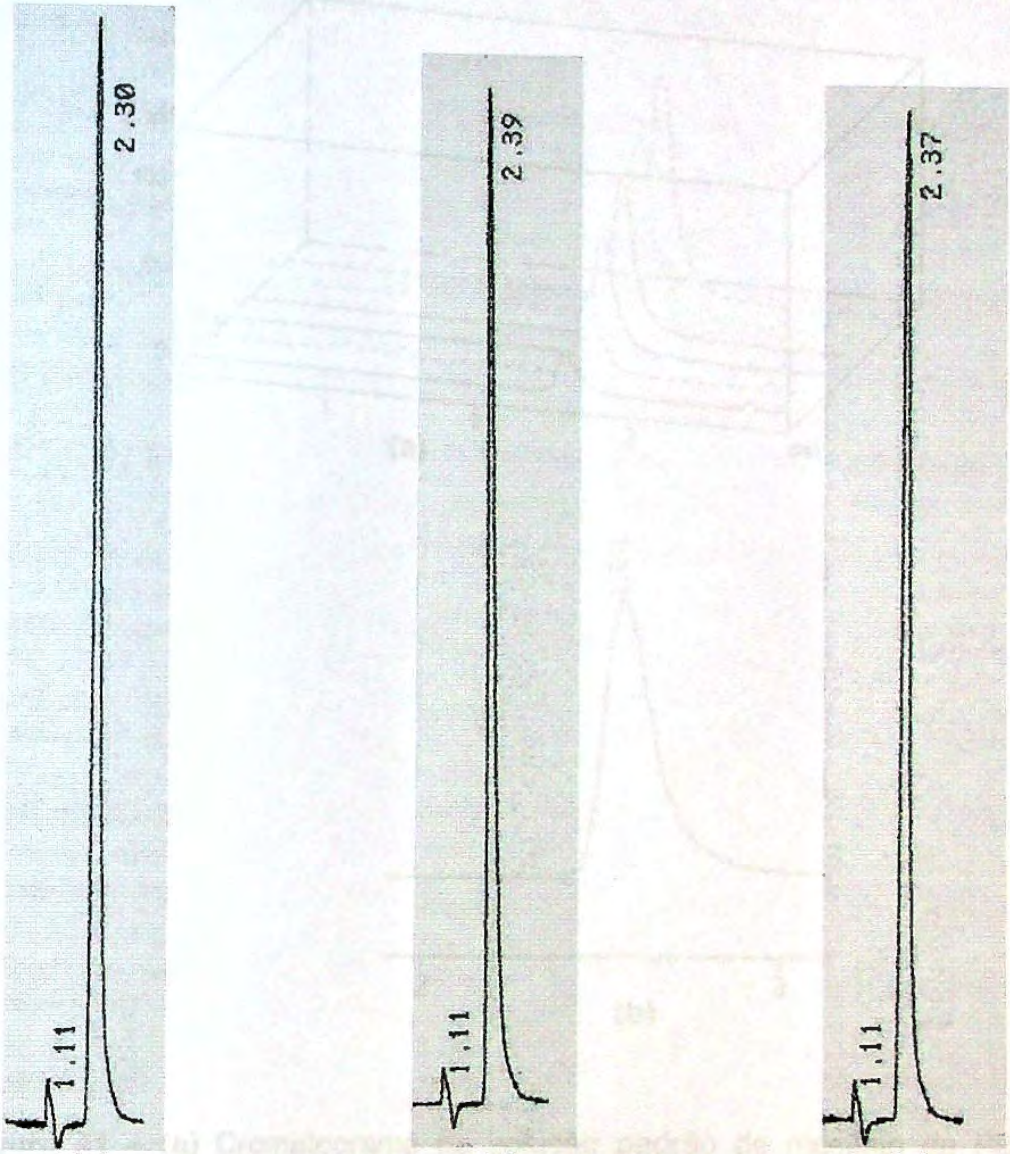


Figura 40 – **(a)** Cromatograma da solução padrão de NOR 16,0 µg/mL; **(b)** e **(c)** referem-se às soluções de amostras (15,0 µg/mL) de NOR, comprimidos 400 mg fornecidos pelos laboratórios I e J, respectivamente. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido modelo Varian® 5000; coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm); fase móvel constituída por H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3 v/v), pH 3,3; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 279 nm e temperatura ambiente de 24 ± 2ºC. Tempo de retenção ± 2,5 minutos.

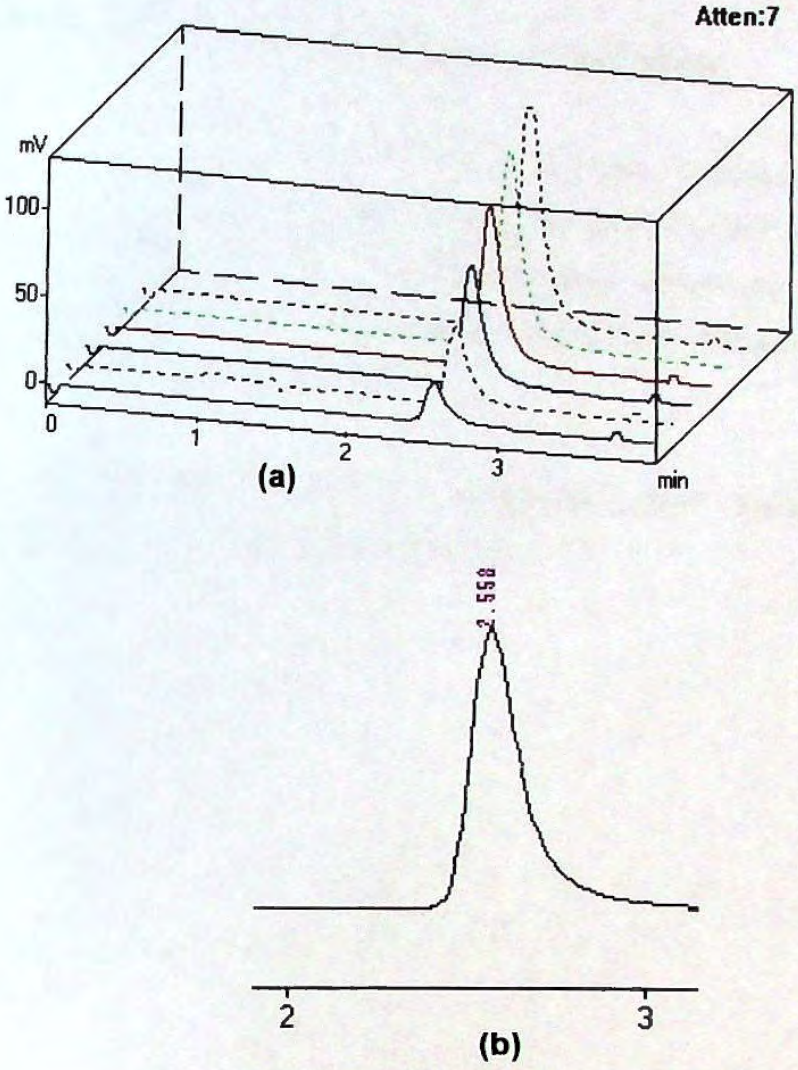


Figura 41 – (a) Cromatograma da solução padrão de mesilato de PEF. Concentrações empregadas: 4,0 µg/mL (linha sólida preta), 8,0 µg/mL (linha tracejada preta), 12,0 µg/mL (linha sólida azul), 16,0 µg/mL (linha sólida vermelha), 20,0 µg/mL (linha tracejada verde) e 24,0 µg/mL (linha tracejada vermelha). **(b)** solução de amostra (15,0 µg/mL) referente a comprimidos de PEF 400 mg. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Shimadzu® modelo CL-9A. coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm); fase móvel constituída por H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3 v/v), pH 3,3; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 279 nm e temperatura ambiente de 24 ± 2ºC. tempo de retenção ± 2,5 minutos.

5.5.3. Construção das curvas de calibração e linearidade

As *Tabelas 14, 15, 16, 17, 18* e *19* apresentam os dados obtidos na construção das curvas de calibração dos padrões de CIP, GAT, LEV, LOM, NOR e PEF, respectivamente. Os gráficos das curvas de calibração resultantes dos padrões acima mencionados podem ser vistos nas *Figuras 42, 43, 44, 45, 46* e *47*, respectivamente.

A linearidade do método foi determinada pelo coeficiente de correlação (r) obtido pelas curvas de calibração.

Tabela 14 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do CIP, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3.

Concentração (µg/mL)	Área Média[(a)] (mV.min)
4,0	10293
8,0	20605
12,0	31527
16,0	42440
20,0	53037
24,0	63794

[(a)] Média de três leituras

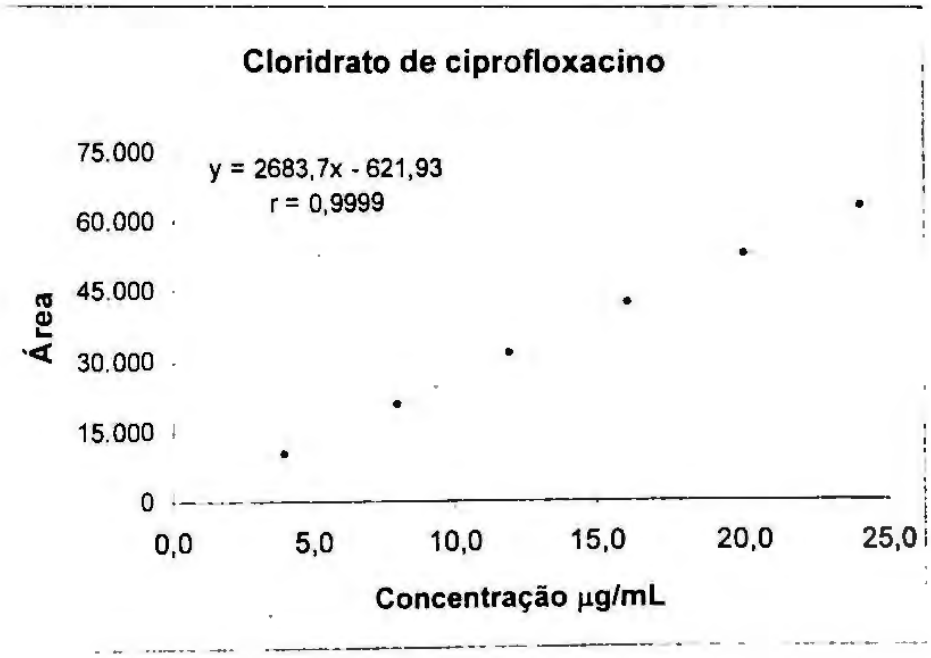


Figura 42 – Curva de calibração do CIP em 279 nm nas concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL , em fase móvel.

Tabela 15 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do GAT, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3.

Concentração (µg/mL)	Área Média[(a)] (mV.min)
4,0	402676
8,0	815040
12,0	1225542
16,0	1620242
20,0	2020677
24,0	2431389

[(a)] Média de três leituras

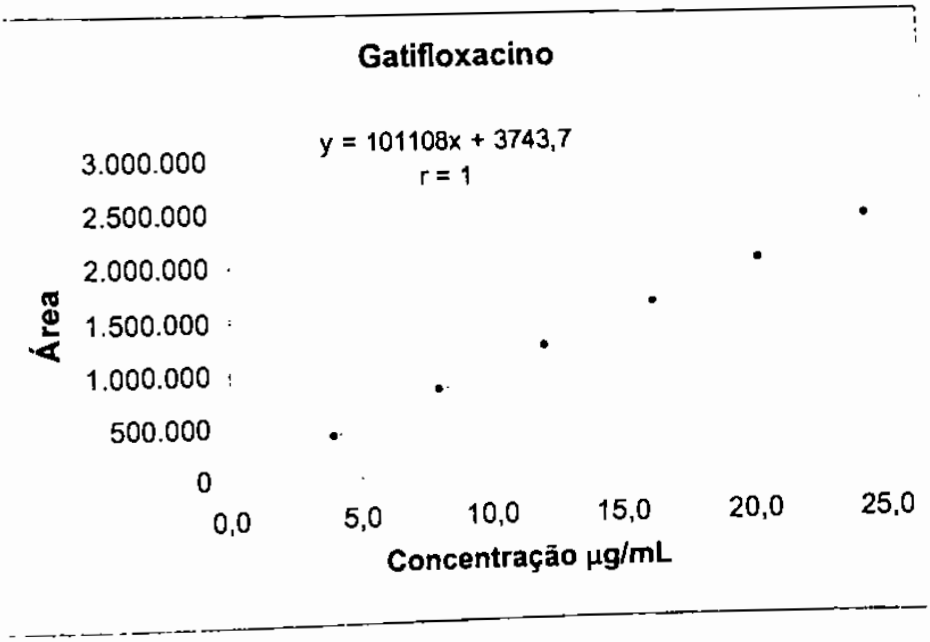


Figura 43 – Curva de calibração do GAT em 293 nm nas concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL , em fase móvel.

Tabela 16 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do LEV, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3.

Concentração (µg/mL)	Área Média[(a)] (mV.min)
4,0	416767
8,0	839234
12,0	1249330
16,0	1667501
20,0	2083327
24,0	2472697

[(a)] Média de três leituras

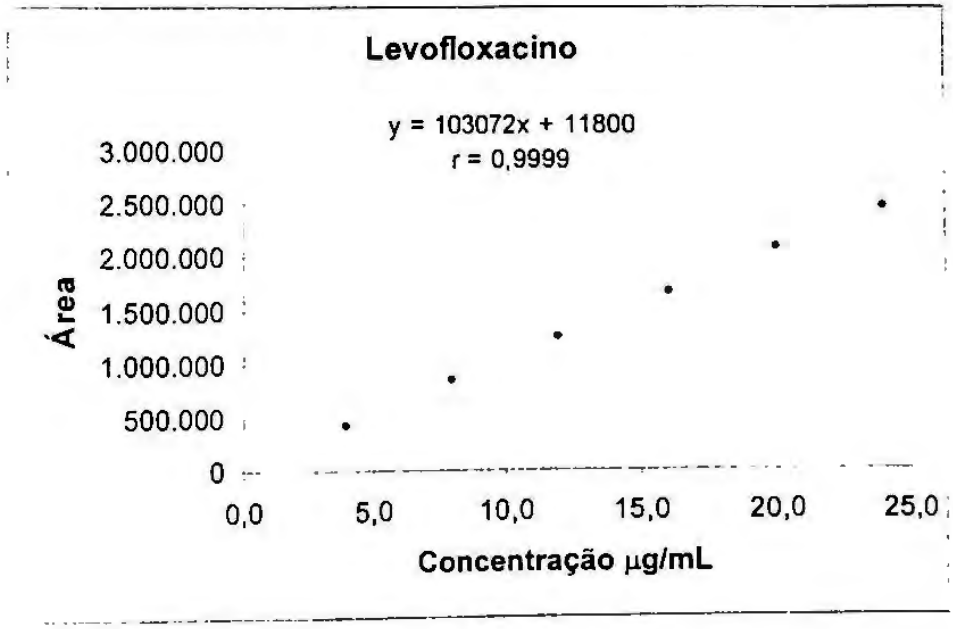


Figura 44 – Curva de calibração do LEV em 295 nm nas concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL , em fase móvel.

Tabela 17 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do LOM, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3.

Concentração (µg/mL)	Área Média[(a)] (mV.min)
4,0	412736
8,0	823851
12,0	1244163
16,0	1662542
20,0	2066915
24,0	2472717

[(a)] Média de três leituras

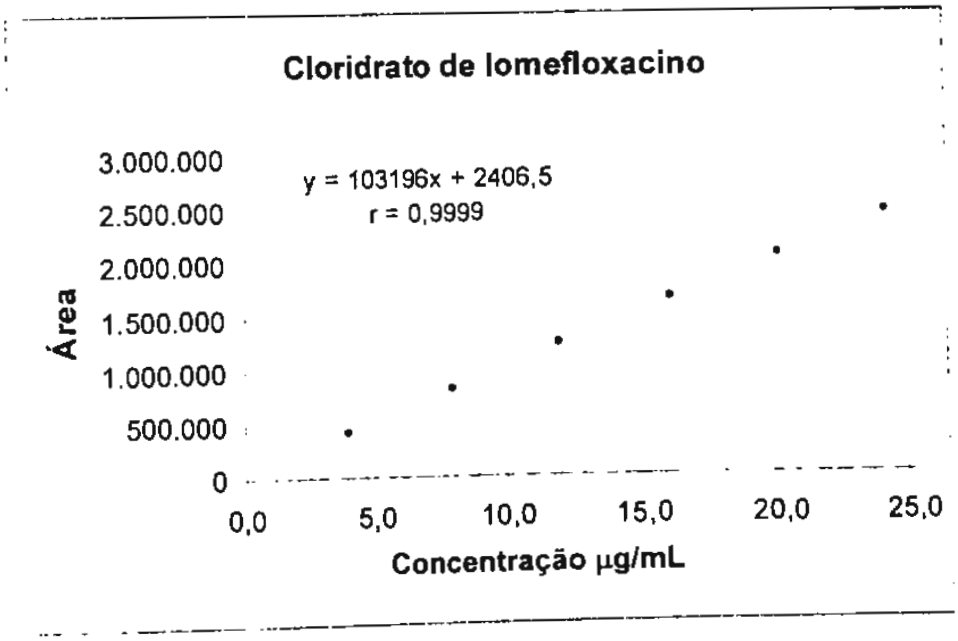


Figura 45 – Curva de calibração do LOM em 288 nm nas concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL , em fase móvel.

Tabela 18 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do NOR, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3.

Concentração (µg/mL)	Área Média[(a)] (mV.min)
4,0	10313
8,0	21311
12,0	32524
16,0	43656
20,0	55138
24,0	66874

[(a)] Média de três leituras

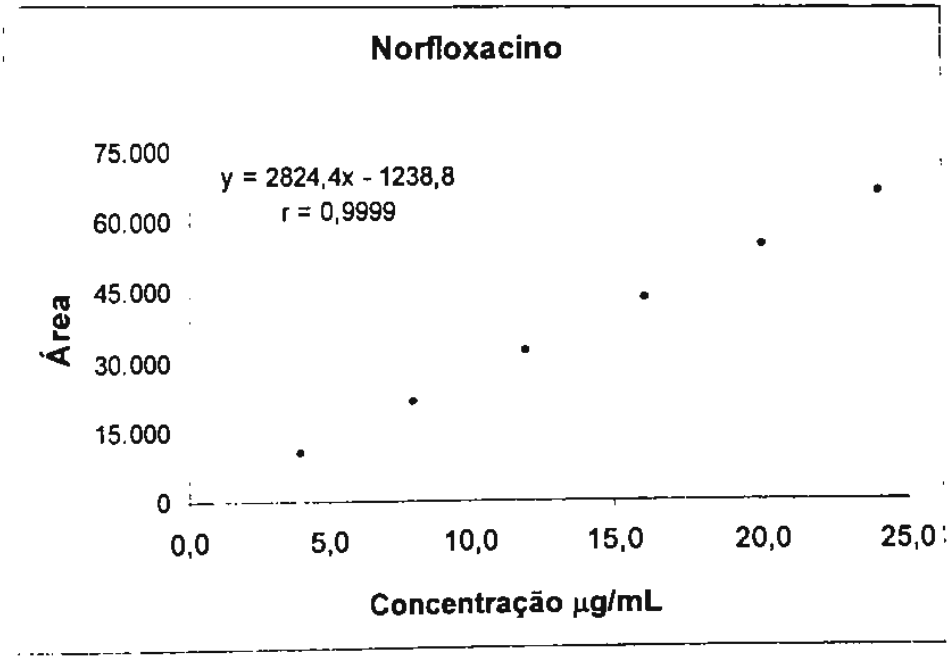


Figura 46 – Curva de calibração do NOR em 279 nm nas concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL , em fase móvel.

Tabela 19 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do PEF, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna LiChrospher® RP-18, eluente H_2O:ACN:TEA (80:20:0,3), pH 3,3.

Concentração (µg/mL)	Área Média[(a)] (mV.min)
4,0	256044
8,0	499604
12,0	753955
16,0	1007354
20,0	1257199
24,0	1504493

[(a)] Média de três leituras

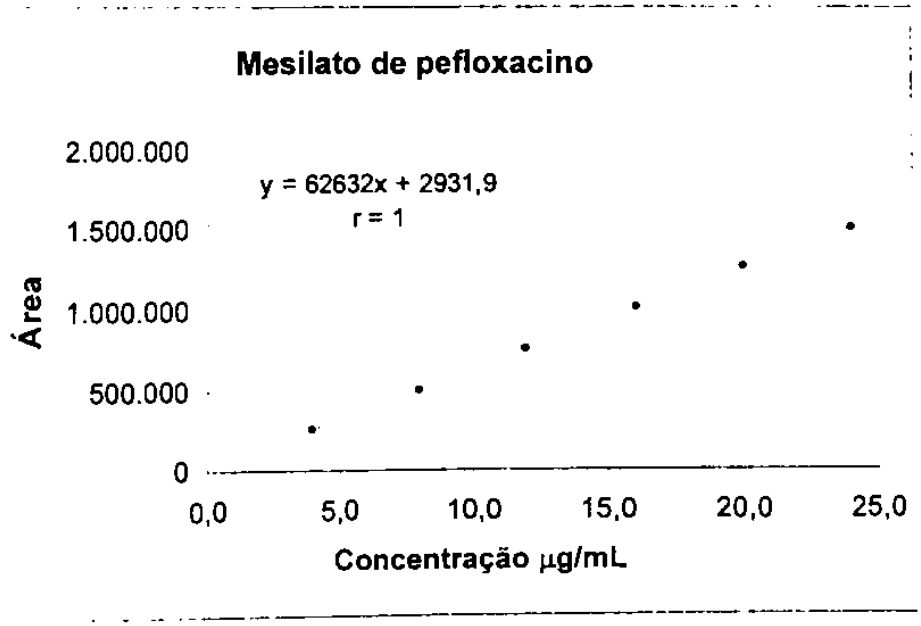


Figura 47 – Curva de calibração do PEF em 279 nm nas concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL , em fase móvel.

5.5.4. Teste de recuperação – Exatidão

Os dados da recuperação das soluções padrão adicionadas às amostras analisadas pelo método cromatográfico proposto, podem ser vistos na *Tabela 20.*

5.5.5. Precisão – Desvio padrão relativo (DPR)

A *Tabela 21* mostra os dados estatísticos obtidos nas análises das amostras que confirmam a precisão do método cromatográfico proposto.

5.5.6. Análise das amostras – Determinação dos teores percentuais

Os teores percentuais dos fármacos encontrados nas amostras comerciais pelo método cromatográfico proposto podem ser vistos na *Tabela 21.*

5.5.7. Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) – Sensibilidade

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os fármacos quinolônicos foram os seguintes:

- Cloridrato de ciprofloxacino
  - LD = 0,16 µg/mL
  - LQ = 0,50 µg/mL
- Gatifloxacino
  - LD = 0,13 µg/mL
  - LQ = 0,39 µg/mL
- Levofloxacino
  - LD = 0,15 µg/mL
  - LQ = 0,46 µg/mL
- Cloridrato de lomefloxacino
  - LD = 0,17 µg/mL
  - LQ = 0,52 µg/mL
- Norfloxacino
  - LD = 0,28 µg/mL
  - LQ = 0,86 µg/mL
- Mesilato de pefloxacino
  - LD = 0,08 µg/mL
  - LQ = 0,25 µg/mL

Tabela 20 – Recuperação da solução padrão adicionada às amostras analisadas empregando o método cromatográfico proposto.

Número da amostra	Concentração final (µg/mL)	Quantidade encontrada[a] (µg/mL)	Recuperação (%)	
			Resultado	Média
1	12,0	12,3	103,3	102,2
	14,0	14,2	100,8	
	16,0	16,4	102,6	
2	12,0	11,9	101,5	101,4
	14,0	14,1	102,4	
	16,0	15,9	100,3	
3	12,0	12,2	102,7	100,5
	14,0	14,1	100,9	
	16,0	18,9	97,9	
4	12,0	12,3	99,6	99,7
	14,0	14,4	100,2	
	16,0	16,4	99,7	
5	12,0	12,1	97,4	98,3
	14,0	14,2	99,6	
	16,0	16,0	97,9	
6	12,0	11,9	96,9	99,3
	14,0	14,2	100,8	
	16,0	16,1	100,1	
7	12,0	11,9	98,5	98,9
	14,0	13,9	99,3	
	16,0	15,8	98,9	
8	12,0	11,8	98,6	99,2
	14,0	13,8	99,2	
	16,0	15,9	99,6	
9	12,0	12,2	102,6	102,4
	14,0	14,1	100,7	
	16,0	16,3	103,9	
10	12,0	12,1	102,7	102,7
	14,0	14,1	102,6	
	16,0	16,2	102,8	
11	12,0	11,9	100,2	99,7
	14,0	13,8	99,3	
	16,0	15,8	99,1	
12	12,0	11,8	103,6	101,9
	14,0	13,7	101,7	
	16,0	15,6	100,4	

[a] Média de 3 determinações

Tabela 21 – Dados estatísticos obtidos nas análises das amostras empregando o método cromatográfico proposto.

Número da amostra	Concentração teórica declarada (μg/mL)	Concentração experimental encontrada (μg/mL)	DP [a]	DPR (%)	TEOR (%) intervalo de confiança [b]
1	15,00	15,51	0,08	0,51	103,38 ± 0,06
2	15,00	16,05	0,13	0,78	107,01 ± 0,09
3	15,00	15,06	0,08	051	100,43 ± 0,06
4	15,00	15,88	0,03	0,17	105,89 ± 0,02
5	15,00	15,30	0,10	0,65	101,99 ± 0,07
6	15,00	15,15	0,09	0,56	100,98 ± 0,06
7	15,00	14,68	0,05	0,37	97,85 ± 0,04
8	15,00	14,82	0,10	0,65	98,80 ± 0,07
9	15,00	14,94	0,06	0,40	99,59 ± 0,04
10	15,00	14,91	0,11	0,74	99,41 ± 0,08
11	15,00	14,91	0,08	0,51	99,37 ± 0,05
12	15,00	14,06	0,13	0,92	93,75 ± 0,09

[a] Média de 10 determinações
[b] grau = 95%

6. DISCUSSÃO

6.1. Quinolonas – aspectos gerais

As infecções causadas por microrganismos constituem um problema mundial. Os antibióticos trouxeram benefícios incontáveis à população desde a sua introdução no campo do tratamento das infecções microbianas. Porém, hoje existe uma grande preocupação com o aumento da resistência bacteriana devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos.

O campo de pesquisa de novos agentes antimicrobianos parece inesgotável. Devido ao desenvolvimento da resistência microbiana todos os anos novas substâncias são avaliadas com relação ao potencial de se converterem em novos antibióticos ou novos agentes quimioterápicos, pois a batalha travada entre os agentes antimicrobianos e microrganismos resistentes é contínua.

As quinolonas, também chamadas de fluoroquinolonas, têm sido uma importante classe de agentes quimioterápicos aliados ao arsenal terapêutico antiinfeccioso da atualidade, devido ao perfil e eficácia de ação superior a de muitos outros agentes. Entretanto, também têm sido alvo de grandes preocupações, no contexto mundial, devido ao uso abusivo e excessivo como promotor de crescimento em animais.

Existem muitos métodos para determinação qualitativa e quantitativa de antibióticos quinolônicos relatados em literatura empregando as mais diversas técnicas, porém, muitas vezes os procedimentos são trabalhosos, demandam muito tempo, não possibilitam a aplicação na rotina analítica de laboratórios de controle de qualidade, além de serem pouco específicos, quando comparados com métodos cromatográficos (JOSHI, 2002).

Os métodos que empregam microorganismos, que são muito sensíveis a um determinado fármaco, freqüentemente carecem de especificidade quando comparados a métodos cromatográficos (cromatografia gasosa e CLAE) (MEDINA; POOLE; ANDERSEN, 1998). Os métodos imunoenzimáticos empregados nas análises clínicas e pesquisas biológicas, também apresentam a desvantagem de não serem aplicados na rotina de laboratórios de análises químicas (HAGE, 1999).

A cromatografia gasosa é um método rápido e específico, mas requer temperaturas elevadas para operação, podendo ocasionar degradação térmica dos fármacos e, freqüentemente necessitar de derivatização para aumentar a volatilidade e melhorar a separação cromatográfica. Além disso, é geralmente inapropriado para análise de substâncias com alta polaridade (DANIELSON *et al.*, 1993; PREU; GUYOT; PETZ, 1999).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura referentes a quinolonas aborda os aspectos farmacológicos em humanos, desenvolvimento de resistência microbiana, uso como aditivo na dieta animal para crescimento e aumento da produção, bem como análise e monitoramento de resíduos na carne e no leite. Poucos trabalhos são direcionados para o controle de qualidade de medicamentos e matéria-prima.

Até o momento não foram encontrados trabalhos na literatura referentes à quantificação de levofloxacino e gatifloxacino em formulações farmacêuticas. Apenas o ciprofloxacino e o norfloxacino estão oficializados nas Farmacopéias Americana e Britânica e, ainda assim o método recomendado para determinação quantitativa do norfloxacino, na Farmacopéia Britânica (BRITISH, 1999), é a titulação em meio não aquoso.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

As matérias-primas de antibióticos quinolônicos, relacionados na *Tabela 6*, procederam de diferentes laboratórios e foram doadas para serem empregadas como padrões de referência. Todos foram analisados pelas técnicas de análise elementar e calorimétricas. Para o desenvolvimento e validação dos métodos propostos, foram selecionados aqueles que apresentaram o maior grau de pureza relatado, conforme ilustrado na Tabela 6, sem qualquer tratamento prévio.

6.2. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros no IV podem ser usados para identificar compostos puros ou para detecção e identificação de impurezas. De uma certa forma o espectro obtido pode ser visto como a impressão digital do composto (MENDHAM *et al.*, 2002).

A espectroscopia vibracional é uma técnica que auxilia apenas na identificação de algumas funções orgânicas presentes nos compostos, seu emprego na identificação e caracterização total de uma determinada substância nem sempre é possível.

A literatura referente ao uso da espectroscopia no IV para caracterização e identificação de quinolonas é bastante precária. A maioria dos trabalhos de pesquisa utiliza padrões não farmacopéicos, doados por indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento ou otimização de metodologias analíticas. Entretanto, em nenhum dos trabalhos citados nas referências desta pesquisa foi relatada a caracterização prévia da matéria-prima por IV ou qualquer outra metodologia.

Os espectros do cloridrato de lomefloxacino e do norfloxacino, desenvolvidos em pastilha de brometo de potássio apresentaram concordância com aqueles encontrados na literatura (MAZUEL, 1991; SANZGIRI; KNAUB; RILEY, 1994).

6.3. Análise elementar

A análise elementar é uma ferramenta útil para a avaliação da fórmula empírica dos compostos através da composição centesimal. Por ser uma técnica simples, rápida e segura deveria sempre ser realizada previamente ao desenvolvimento de métodos analíticos, pois aumentaria a confiabilidade do composto que estaria sendo empregado como padrão, evitando a possibilidade de erros analíticos.

A análise elementar foi realizada com todos os padrões secundários relacionados na *Tabela 6*. Através dos resultados percentuais obtidos para C, H e N e a percentagem de água por termogravimetria ilustrados na *Tabela 11*, pôde-se atribuir a correta composição centesimal dos compostos e confrontar com os laudos fornecidos pelos laboratórios farmacêuticos. Dessa forma, percebeu-se que o levofloxacino recebido de um laboratório farmacêutico, como sal cloridrato, na verdade tratava-se de um composto não ligado, isto é, base livre.

No caso do levofloxacino e gatifloxacino, por exemplo, faz-se necessário a correta caracterização da composição centesimal, uma vez que compostos podem estar na forma de base livre, mono ou dicloridrato, com diferentes graus de hidratação ou também na forma chamada de intermediário (CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE, 2004). O lomefloxacino, além da forma cloridrato, pode também apresentar-se como sal mesilato (SANZGIRI; KNAUB; RILEY, 1994).

6.4. Estudos termoanalíticos

As curvas TG/DTG desenvolvidas em atmosfera dinâmica de ar não apresentaram diferenças significativas nos perfis quando comparadas com àquelas obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

As curvas de DSC mostraram que as quinolonas são bastante estáveis até altas temperaturas, concordando com as informações da literatura (BELAL; AL-MAJED; AL-OBAID, 1999).

Os resultados da TG e análise elementar contribuíram sobremaneira na elucidação das fórmulas estruturais das quinolonas testadas. As fórmulas ilustradas na revisão de literatura deste trabalho foram apresentadas já considerando as devidas correções quanto ao grau de hidratação e forma molecular, graças aos resultados fornecidos por essas duas técnicas acima citadas.

As curvas TG/DTG e DSC mostraram perfis termoanalíticos similares entre os padrões obtidos de diferentes procedências, com pequenas variações nos valores de perda de massa referentes à etapa de desidratação. Esses resultados podem ser devidos à variação de umidade relativa à qual a amostra foi submetida durante a análise.

Com exceção dos padrões de lomefloxacino, todos os demais fármacos apresentaram diferentes graus de hidratação. A literatura relata que o norfloxacino anidro pode rapidamente formar diferentes hidratos em poucas horas de exposição (MAZUEL, 1991). Este fato deveria ser observado todas as vezes que um novo lote de medicamento estivesse sendo preparado pois, como foi demonstrado, ao final de 48h é possível ter um ganho de 9,00% de água, o que acarretaria erro na pesagem da matéria-prima e, conseqüentemente afetaria a concentração final do produto e a eficácia terapêutica.

Apesar do norfloxacino ser higroscópico, dentre as quinolonas estudadas, é o que apresenta menor solubilidade em água e não é disponível na forma de sal, por isso não há apresentação comercial injetável. Segundo Nichols (2004), é uma quinolona de espectro limitado e tem uma absorção oral incompleta.

Farmacopéia Americana (UNITED, 2004) não faz distinção entre método cromatográfico e não cromatográfico, quanto aos parâmetros de performance analítica. Assim, pode-se concluir que os mesmos podem ser empregados para qualquer tipo de ensaio.

6.4.1. Ciprofloxacino

As curvas TG/DTG evidenciaram duas etapas principais de variação de massa (Δm), associadas à desidratação (entre 120-170°C) e decomposição térmica acima de 250°C com perda de massa contínua. As curvas DSC mostraram um evento endotérmico (Temp-pico DSC variaram entre 137 a 148°C), característico da desidratação e um evento exotérmico após a desidratação, o qual pode ser atribuído a uma transição de fase. A decomposição térmica (eventos exotérmicos) ocorre simultaneamente à fusão (evento endotérmico).

6.4.2. Gatifloxacino

As curvas TG/DTG evidenciaram desidratação térmica entre 25 e 90°C. Na curva DSC, antes de 200 °C, foi observado na decomposição térmica apenas um evento exotérmico característico de transição de fase logo após a desidratação, seguido de dois eventos, exo e endotérmicos, característico de fusão ($T.pico_1$ = 160,90°C; $T.pico_2$ = 188,91°C) indicando a presença de polimorfismo.

6.4.3. Levofloxacino

A curva TG/DTG evidenciou uma etapa de perda de água entre 25 e 90°C condizente com o resultado obtido pela análise elementar. Pôde-se observar na curva DSC, fusão seguida de decomposição acima de 200°C caracterizada por três picos de fusão ($T.pico_1$ = 226,33°C; $T.pico_2$ = 30,25°C; $T.pico_3$ =233,54°C) evidenciando polimorfismo.

6.4.4. Lomefloxacino

As curvas TG/DTG do LOM (99,20%) e TG/DTG do LOM (100,20%) evidenciam que os mesmos são termicamente estáveis até aproximadamente 280°C e se decompõem, entre 290-620°C. Portanto, não houve perda de água, confirmando os resultados obtidos pela análise elementar. As curvas DSC do LOM 99,20% e LOM 100,20% mostraram eventos endo e exotérmicos entre 300 e 320°C.

6.4.5. Norfloxacino

As curvas TG/DTG dos padrões de NOR evidenciaram valores diferenciados de perda de massa devido à desidratação, o que pode ser atribuído a diferentes tratamentos no processo de secagem da amostra original. As curvas TG/DTG (*Figura 21d*) obtidas para amostras expostas ao ambiente (umidade relativa aproximadamente 70,00%) por 48h, indicaram que houve absorção de água de até ± 9,00%. As curvas DSC evidenciaram que os padrões fundem próximos a 220°C e ficam susceptíveis à decomposição térmica (eventos exo e endotérmicos).

6.4.5. Pefloxacino

Foi observada nas curvas TG/DTG, desidratação do padrão de PEF entre 25 e 90°C e a decomposição térmica da espécie anidra iniciou por

volta de 290°C. Na curva DSC foram observados dois eventos exo e endotérmicos, característicos de transição de fase, por volta de 214°C. O composto se manteve estável até por volta de 280° quando teve início a fusão (T.fusão = 293,99°C), seguida de decomposição.

6.5. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A maior parte dos métodos espectroscópicos descritos na literatura para análise de quinolonas refere-se à espectrofotometria no visível, através da formação de complexos estáveis coloridos com metais pesados. O mecanismo envolvido nas reações, muitas vezes, é pouco compreendido, o que dificulta o conhecimento dos fatores e parâmetros que podem interferir nas análises. Da mesma forma, alguns métodos espectrofluorimétricos citados na literatura para análise de quinolonas, também se baseiam no princípio da complexometria com metais pesados. Alguns deles empregam as chamadas "terras raras" como o európio e o térbio, na formação dos complexos.

Verificou-se que na literatura há poucos métodos empregando a espectrofotometria direta no UV para determinação quantitativa de quinolonas, quer seja em formulações farmacêuticas quer seja em matrizes biológicas. Na maioria dos casos, os métodos citados são por espectrofotometria derivada ou diferencial, e envolvem procedimentos demorados, trabalhosos e muitas vezes empregam reativos muito dispendiosos.

A escolha do comprimento de onda na região do UV, para a determinação e quantificação das quinolonas em formulações farmacêuticas, em metanol, foi feita com base em estudo desenvolvido, empregando várias combinações de solventes, de tal maneira que se pudesse trabalhar com máximo de resposta (absorbância) por concentração e conseqüentemente menor limite de detecção.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Não foi necessário fazer correção do pH para a solução padrão, bem como para as amostras analisadas, uma vez que o solvente de escolha foi o metanol.

A vantagem da escolha do metanol para validação do método por espectrofotometria no UV consiste no fato de que, em meio não aquoso, as moléculas não sofrem hidrólise, a solubilidade de alguns compostos é maior quando comparada a do meio aquoso (ex: norfloxacina que é praticamente insolúvel em água). Além disso, muitos dos excipientes das formulações não são solúveis neste solvente, o que diminui o potencial de interferências no método proposto.

As diluições das amostras foram feitas de maneira que as soluções para análise estivessem sempre dentro da faixa de linearidade da curva de calibração, obedecendo à lei de Lambert-Beer. Segundo Mendham (2002), não há uma regra geral para a escolha da concentração a ser preparada, dependendo do instrumento que está sendo usado. Em geral, as concentrações a serem analisadas devem ter absorbância entre 0,3 e 1,5.

Tanto para o método espectrofotométrico quanto para o método cromatográfico padronizou-se para tomada de ensaio, massas de amostras equivalentes a aproximadamente ¼ do princípio ativo contido nas formulações. Além disso, massa maior implicaria em mais etapas de diluição e conseqüentemente maior gasto de solvente.

A Farmacopéia Americana (UNITED, 2004) preconiza teores para norfloxacino comprimidos e ciprofloxacino comprimidos e injetáveis valores entre 90,00 a 110,00%, calculados sobre base livre anidra. Enquanto que a Farmacopéia Britânica (BRITISH, 1999) estabelece teores somente para matéria-prima do norfloxacino e do ciprofloxacino: 99,00 a 101,00% e 98,00 a 102,00%, respectivamente. Embora, o gatifloxacino, o levofloxacino, o cloridrato de lomefloxacino e o mesilato de pefloxacino não estejam descritos em nenhuma farmacopéia, os teores encontrados nas amostras analisadas estão dentro dessa faixa recomendada pela Farmacopéia Americana (UNITED, 2004), o que provavelmente indica que esses valores estariam em conformidade com o aceitável.

Os teores de todas as amostras analisados pelo método espectrofotométrico direto no UV foram determinados nas concentrações de 5,0 μg/mL, enquanto que para o método cromatográfico, 15,0 μg/mL por representar o ponto central de menor incerteza dentro dos mínimos quadrados da reta de calibração.

As *Figuras 29 (a-m)* ilustraram os espectros de absorbância dos placebos e dos excipientes obtidos pelo método espectrofotométrico proposto. Percebe-se que no intervalo de 281 a 298 nm não houve interferência significativa por parte dos placebos e nem tampouco dos excipientes analisados, ainda que em concentrações entre 8 a 80 vezes maior do que aquelas normalmente encontradas nas formulações farmacêuticas.

6.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os comprimentos de onda estabelecidos para análise de cada quinolona por espectrofotometria no UV não foram os mesmos empregados para detecção na CLAE, devido ao fato dos solventes utilizados exercerem diferentes efeitos sobre o deslocamento dos compostos no espectro no UV. Foi efetuada a avaliação do comprimido de onda mais adequado para as análises cromatográficas. As *Figuras 30 a 35* mostraram os resultados.

A CLAE é a técnica mais comumente empregada na análise de quinolonas nas diversas matrizes. Contudo, verificou-se que há poucos trabalhos na literatura enfocando o controle de qualidade de antibióticos quinolônicos em formulações farmacêuticas empregando esta técnica.

Embora as formulações farmacêuticas disponíveis no comércio para tratamento de infecções em humanos ou em animais não apresentem associações fixas de antibióticos quinolônicos, a análise simultânea das quinolonas torna-se útil nos casos em que se deseja investigar resíduos de antibióticos em matrizes biológicas.

Apesar da literatura (CIOLA, 1998) recomendar o uso de solução tampão para análise de compostos de caráter ácido fraco, o método cromatográfico empregando coluna em fase reversa, desenvolvido neste trabalho, mostrou-se adequado para análise dos antibióticos quinolônicos propostos.

Apesar das diferenças na composição das formulações das amostras de cada laboratório, os excipientes selecionados para o estudo foram aqueles de uso comum na farmacotécnica de comprimidos, e, nenhum deles interferiu nos métodos propostos.

Soluções de placebos e excipientes foram preparadas de modo semelhante às das amostras e injetadas no cromatográfo. Assim como no método espectrofotométrico, os placebos e excipientes não interferiram no método cromatográfico proposto.

As amostras injetáveis não apresentaram excipientes que merecessem atenção sob o ponto de vista de oferecer interferência nos métodos propostos (espectrofotométrico e cromatográfico).

Houve pequeno aumento no tempo de retenção dos picos quando o pH da fase móvel variou em 0,5 unidade. Praticamente nenhum efeito foi observado quando 5,0mL de água ou acetonitrila foram alterados na composição da fase móvel, confirmando assim a robustez do método proposto.

7. CONCLUSÕES

1. Devido ao grande número de antibióticos quinolônicos existentes e a similaridade entre as estruturas, faz-se necessária a eleição de técnicas analíticas sensíveis e confiáveis para a análise quantitativa. Os métodos analíticos propostos neste trabalho contemplam estas características.

2. A espectroscopia vibracional na região do IV não se prestou como técnica adequada para a identificação e caracterização segura das quinolonas estudadas, uma vez que não fomeceu uma "impressão digital" única para cada fármaco. Os resultados não foram conclusivos devido à similaridade e complexidade das moléculas, devendo neste caso serem utilizadas técnicas mais apropriadas como a ressonância magnética nuclear (RMN) ou cristalografia por raios-X.

3. A análise elementar, através da determinação centesimal de C, H e N. se prestou como ferramenta segura para confirmação da identidade dos compostos analisados;

4. Embora haja muita semelhança entre as quinolonas estudadas, as curvas TG/DTG e DSC dos antibióticos avaliados, ao contrário da espectroscopia no IV, apresentaram sutilezas que são características individuais de cada fármaco. Assim, as curvas termoanalíticas obtidas podem ser empregadas como padrão referencial para cada composto.

5. Os métodos desenvolvidos e validados por espectrofotometria direta na região do UV e a CLAE permitiram a análise quantitativa das quinolonas de 2ª e 3ª gerações propostas neste trabalho, em formulações farmacêuticas.

6. Os parâmetros estatísticos obtidos mostraram que os métodos propostos por espectrofotometria no UV e CLAE têm boa correlação linear ($0,9999 \leq r \leq 1$). Os coeficientes de variação comprovaram a precisão dos métodos e os testes de recuperação apresentaram resultados que comprovaram a exatidão dos métodos propostos.

7. O método espectrofotométrico proposto não permitiu análise simultânea de antibióticos quinolônicos. Já com o método cromatográfico é possível investir na otimização de alguns parâmetros analíticos com o intuito de alcançar este objetivo.

8. É provável que outros antibióticos quinolônicos, disponíveis ou não no mercado nacional, possam ser analisados pelos métodos propostos.

9. Os placebos e os excipientes analisados não interferiram com os métodos espectrofotométrico e cromatográfico desenvolvidos e validados, confirmando assim a especificidade dos métodos propostos.

10. Os métodos padronizados neste trabalho podem ser aplicados na rotina diária de um laboratório analítico de controle de qualidade de medicamentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

ABDOU, H.; HANNA, S.; MUHAMMAD, N. Métodos instrumentais de análise. In: GENNARO, A.R., ed. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.34. p.633-673.

AL-RASHOOD, K.A.; ABDEL-MOETY, E.M.; AL-DEEB, O.A.; KHALIL, A.A.; KHATTAB, N.A. Derivative spectrophotometry for stability-indicating determination of norfloxacin in bulk form and tablets. **Sci. Pharm.**, Wien, v.62, p.225-235, 1994.

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. Cromatografia líquida. In: _____. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. cap.4, p.27-64.

ARGEKAR, A.P.; KPADIA, S.U.; RAJ, S.V.; KUNJIR, S.S. Quantitative determination of lomefloxacino, ofloxacin, pefloxacino, pefloxacino and enrofloxacin in pharmaceutical dosages, bulks grugs and process monitoring of enrofloxacin by HPLC-RP. **Indian Drugs**, Mumbai, v.33, p.261-266, 1996.

ARTESEROS, J.A.H.; BARBOSA, J.; COMPANO, R.; PRAT, M.D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.945, p.1-24, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1, p.xx.

[1] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

BARBOSA, J.; BERGES, R; SANZ-NEBOT, V. Solvatochromic parameter values and pH in aqueous-organic mixture and use in liquid chromatography. Prediction of retention of series of quinolones. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.719, p.27-36, 1996.

BELAL, F.; AL-MAJED, A.A.; AL-OBAID, A.M. Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. **Talanta**, Amsterdam, v.50, n.4. p.765-786, 1999.

BHOWAL, S.K.; DAS, T.K. Spectrophotometric determination of same recently introduced antibacterial drugs using ferric chloride. **Anal. Lett.**, New York, v.24, p.25-37, 1991.

BRITISH pharmacopoeia 1999. London: Her Majesty's Stationery Office, 1999. p.369-370, 1034-1035.

BRITTAIN, G.H. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharm. Technol.**, Duluth, v.2, n.3, p.4-9, 1998.

BUDVARI-BARANY, Z.S.; SZASZ, G.Y.; TAKACS-NOVAK, K.; HERMECZ, I.; LORE, A. The pH influence on the HPLC-retention of chemotherapeutic fluorquinolone derivatives. J. **Liq. Chromatogr.**, New York, v.14, p.3411-3424, 1991.

BURHENNE, J.; LUDWIG, M.; SPITELLER, M. Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS. **Chemosphere**, Amsterdam, v.38, p.1279-1286, 1999.

CARLUCCI, G. Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high performance liquid chromatography. J. **Chromatogr., A**, Amsterdam, v.812, p.343-367, 1998.

CASS, B.Q.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC**: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: UFSCar, 2001. 77p.

CHOWDARY, K.P.R.; RAO, G.D. Spectrophotometric method for the determination of lomefloxacino hydrochroride. **Indian Drugs**, Mumbai, v.34, p.107-108, 1997.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**: HPLC. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 179p.

CORDOBA-BORREGO, M.; CORDOBA-DIAZ, M.; CORDOBA-DIAZ, D. Validation of high-performance liquid chromatographic method for the determination of norfloxacin and its application to stability studies (photo-stability study of norfloxacin). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.18, p.919-926, 1999.

DANIELSON, N.D.; HOLEMAN, J.A.; BRISTOL, D.C.; KIZNER, D.H. Simple methods for the qualitative identification and quantitative determination of macrolide antibiotics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.11, p.121-130, 1993.

DJURDJEVIC, P.T.; JELIKIC-STANKOV, M.; STANKOV, D. Fluorescence reaction and complexation equilibria between norfloxacin and aluminnium (III) ion in chloride medium. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.300, p.253-259, 1995.

DOLLERY, S, ed. **Therapeutic drugs**. Edinburg, New York: Churchill Livingstone, 1991. v.1, p.C247-C251, v.2, N123-N127.

DOWELL, S.F.; MARCY, S.M.; PHILIPS, W.R.; HERBEN, M.A.; SCHWARTZ, B. Otitis media: principles of judicious use of antimicrobial agents. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.101, n.1, suppl., p.165-171,1998.

DRAKOPOULOS, A.I.; IOANNOU, P.C. Spectrofluorimetric study of acid-base equilibrium and complexation behavior of the fluorquinolonas antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacino in aqueous solution. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.354, p.197-204, 1997.

EV, L.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.27, p.91-96, 2002.

FATHY, M.; HASSAN, M.A.; MOHAMED, F.A. Differential scanning calorimetry to investigate the compatibility of ciprofloxacin hydrochloride with excipients. **Pharmazie**, Eschborn, v.57, p.825-828, 2002.

FIERENS C.; HILLAERT. S.; VAN DEN BOSSCHE W. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.22, p.763-772, 2000.

FLURER, C.L. Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.18, p.2427-2437, 1997.

FONSECA, A.L. Definições e generalidades. In: _____. **Antibióticos na clínica diária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. cap.1, p.1-8.

FONSECA, A.L. Classificação. In: _____. **Antibióticos na clínica diária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. cap.2, p.9-6.

FONSECA, A.L. Mecanismo de ação. In: _____. **Antibióticos na clínica diária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. cap.3, p.17-32.

FRATINI, L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometric using iron(III) nitrate. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.127, p.279-282, 1996.

FURLANETTO, S.; ORLANDINI, S.; LA PORTA, E.; CORAN, S.; PINZAUTI, S. Optimization and validation of a CZE method for rufloxacin hydrochloride determination in coated tablets. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.28, p.1161-1171, 2002.

GENNARO, A.R. Anti-Infectives. In: _____. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 19.ed. Easton: Mack, 1995. v.2, cap.76, p.1312-1313.

GIRON D. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. **Acta Pharm. Jugosl.**, Zagreb, v.40, p.95-157, 1990.

GRAHAME-SMITH, D.G.; ARONSON, J.K. A farmacoterapia das doenças infecciosas: agentes bacterianos: o tratamento das infecções baterianas. In: _____. **Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.22.2, p.187-196.

GUO, Y.; AN, H.M. Determination of lomefloxacin aspartate in pharmaceutical raw materials and injections solutions by reversed-phase HPLC. *Yaowu Fenxi Zazhi*, 1998, 18 (1), 25-27. *apud* **Anal. Abstr.**, Letchworth, v.18, p.1024, abst.6G79, 1998.

HAGE, D.S. Immunoassays. **Anal. Chem.**, Columbus, v.71, n.12, p.294R-304R, 1999.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: Mcgraw-Hill, 1996. pag 1065-1068.

HARRIS, D.C. Métodos de calibração. In: _____. **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. cap.5, p.81-95.

HARRIS, D.C. Análise gravimétrica e por combustão. In: _____. **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. cap.27, p.685-701.

HUSAIN, S.; KHALID, S.; NAGARAJU, V.; RAO, R.N. High-performance liquid chromatographic separation and determination of small amounts of process impurities of ciprofloxacin in bulk drugs formulations. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.705, p.380-384, 1995.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Topic Q2A. Tex on validation of analytical procedures: definitions and terminology, US FDA Federal Register, v.60, 1995 (CPMP/ICH/381/95). Disponível em: http://www.pharma.gally.ch/navigation/ich.html. Acesso em: 12 nov. 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Topic Q2B. Tex on validation of analytical procedures: definitions and terminology, US FDA Federal Register, v.60, 1995 (CPMP/ICH/281/95). Disponível em: http://www.pharma.gally.ch/navigation/ich.html. Acesso em: 12 nov. 2004.

INSIDE LABORATORY MANANGEMENT – **AOAC INTERNATIONAL**. Thermal Analysis, sep-oct, 2002.

JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.28, p.795-809, 2002.

KEMPROTEC LIMITED. Pharmaceuticals. **Gatifloxacin**: description. Disponível em: http://www.dehany.clara.net/gatiflox.htm. Acesso em: 26 out. 2004.

KILIÇ, E.; KOSEOGLU, F.; AKAYT, M.A. The non-aqueous titrimetric assay of selected antibiotics using tetra-N-butylammonium hydroxide as titrant. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.12, p.347-352, 1994.

KIRKILAND, K.M.; MCCOMBS, D.A.; KIRKLAND, J.J. Rapid, high-resolution high-performance liquid chromatography of antibiotics. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.660, p.327-337, 1994.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALIER, J.H. Antibióticos. In: _____. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap.33, p.575-617.

KOTZ, J.C.; TREICHEL, P. Equações Químicas e Estequeometria. In:_____. **Química e reações químicas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. cap.4, p.101-121.

LACROIX, P.M.; CURRAN, N.M.; SEARS, R.W. High-pressure liquid chromatographic methods for ciprofloxacin hydrochloridre and related compounds in raw materials. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.14, p.641-654, 1996.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4.ed. São Paulo: Átomo, 2002. p.69-72.

LIANG, H.; KAYS, M.B.; SOWINSKI, K.M. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacino determination in human plasma. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v.772, n.1, p.53-63, 2002.

LIU, R.L.; XU, J.R.; LIU, Y.G.; YAO, Z. Studies on methods for determination of ciprofloxacin hydrochloride. Yaowu Fenxi Zazhi, jan 1994, **14** (1), 45-46. *apud* **Anal. Abstr.**, Letchworth, v.56, n.7, p.1171, abstr.7G47, 1994.

LIZONDO, M.; PONS, M.; GALLARDO. M.; ESTELRICH, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.15, p.1845-1849, 1997.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.S. Development and validation of a nonaqueous titration with perchoric acid to determine sparfloxacin in tablets. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.52, p.227-229, 2001.

MARTINDALE: The complete drug reference. 32.ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. p.185-189, 233-236.

MAZUEL, C. Norfloxacin. **Anal. Profiles Drug Subst. Excipients**, San Diego, v.20, p.557-600, 1991.

MCCAIG, L.F.; HUGHES J.M. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.273, p.214-219, 1995.

MEDISCOVER: Infectious Diseases. **Antimicrobial Therapy in the 21ts Century**. Disponível em: http://www.mediscover.net/Articledet.cfm?ArticleID=88. Acesso em: 15 nov. 2004.

MEDINA, M.B.; POOLE, D.J.; ANDERSEN, M.R. A Screening method for á-Lactams in tissues hydrolyzed with penicillinase I and lactamase II. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.81, p.963-972, 1998.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M., eds. Espectroscopia eletrônica molecular. In: _____. **VOGEL: análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. cap.17, p.351-385.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M., eds. Espectroscopia vibracional. In: _____. **VOGEL: análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. cap.18, 386-399.

MERAS, I.D.; PENA, A.M.; CACERES, M.I.R.; LOPEZ, F.S. Simultaneous fluorometric determination of nalidixic acid and 7-hydroxymethylnalidixic acid by partial least square calibration. **Talanta**, Amsterdam, v.45, p.899-907, 1998.

MERCK index: an encyclopedia of chemical and drugs. 13.ed. Whitehouse Station: Merck, 1996. p.403, 777, 994-995, 1200-1201, 1212-1213, 1266-1267.

MORLEY, J.A.; EROLD Jr., L. Determination of fluorquinolne antibacterial as N-Acyl derivatives. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.37, p.295-299, 1993.

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

NICHOLS, W.K. Antiinfecciosos. In: GENNARO, A.R., ed. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.87, p.1567-1624.

NOVAKOVIC, J.; NESMERAK, K.; NOVA, H.; FILKA, K. An HPTLC method for determination and purity control of ciprofloxacin HCl in coted tablets. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.25, p.957-964, 2001.

NYQUIST, A.C. Antibiotic prescribing for children with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.279, p.875, 1998.

OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE. World Health Report on Infectious Diseases 2000. Disponível em: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/other_versions/index-rpt2000_text.html#ch1>. Acesso em: 26 out.2004.

PAGES, C.P.; CURTIS, M.J.; MORLEY, C.S.; MICHAEL, J.A.W.; BRIAN, B.H. Infecções Bacterianas. In: _____. **Farmacologia Integrada.** São Paulo: Manole, 1999. cap.23, p.419-444.

PARADISE, J.L.; ROCKETTE, H.E.; COLBORN, D. K.; BERNARD, B.S.; SMITH, C.G.; KURS-LASKY, M.; JANOSKY, J.E. Otitis media in 2253 pittsburgh-area infants: prevalence and risk factors during the first two years of life. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.99, p.318-333, 1997.

PEREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ-LOZANO, C.; TOMAS, V.; CARPENA, J. Determination of norfloxacin in real sample by different spectrofluorimetric techniques. **Analyst**, Letchworth, v.122, p.705-708, 1997.

PHELPS, C.E. Bug/drug resistance: sometimes less is more. **Med. Care**, Philadelphia, v.27, n.2, p.194-203, 1989.

PREU, M.; GUYOT, D.; PETZ, M. Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.818, p.95-198, 1999.

PULGARIN, J.A.M.; MOLINA, A.A.; LOPEZ, P.F. Direct determination of nalidixic acid in urine by matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry. ***Talanta.*** v.43, p.431-438, 1996.

PULGARIN, J.A.M.; MOLINA, A.A.; LOPEZ, P.F. Direct determination of nalidixic acid in urine by matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v.43, p.431-438, 1996.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Agentes antibacterianos. In: _____. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.43, p.576-594.

REESE, R.E.; BETTS, R.F.; GUMUSTOP, B. Fluoroquinolonas. In: _____. **Manual de antibióticos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. cap.32, p.640-664.

RIZK, M.; BELAL, F.; IBRAHIM, F.; AHMED, S.; EL-ENANY, N. Spectrofluorimetric analysis of certain 4-quinolone in pharmaceuticals and biological fluids. **Pharm. Acta Helv.**, Zürich, v.74, p.371-377, 2000.

RxLIST: THE INTERNET DRUG INDEX. **Tequin**: description. Disponível em: http://www.rxlist.com/cgi/generic3/gatifloxacin.htm. Acesso em: 26 out. 2004.

SANZGIRI, Y.D.; KNAUB, S.R.; RILEY, C.M. Lomefloxacin. **Anal. Profiles Drug Substances Excipients**, San Diego, v.23, p.324-369, 1994.

SICHINA, W.J. Characterization of pharmaceuticals using thermal analysis. **Thermalanalysis**, American Laboratory, p.16-25, January, 2001.

SODHI, R.A.; CHAWLA, J.L.; SANE, R.T. Extractive colorimetric, microbiological and high performance thin layer chromatographic determination of lomefloxacin. **Indian Drugs**, Mumbai, v.34, p.512-519, 1997.

STANKOV, M.; STANKOV, D.; VESELINOVIC, D.; DJURDJEVIC, P. Fluorimetric and derivative-spectrophotometric determination of norfloxacin. **Spectrosc. Lett.**, Monticello, v.26, n.9, p.1709, 1993.

SUN, S.-W.; CHEN, L.-Y. Optimization of capillary electrophoretic separation of quinolones antibacterials using the overlapping resolution mapping scheme. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.766, p.215-224, 1997.

SWARTZ, M.T.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.**, Duluth, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

TAVARES, L.P. **Manual de terapêutica antimicrobiana**. S.l.: Hospital de São Sebastião, 2001. Disponível em: http://www.otorrino.com.pt/resources/antimicrobianos.pdf. Acesso em: 17 mar. 2003.

TAIZHOU RISHENG PHARMACHUTICAL & CHEMICAL. Products. **Ciprofloxacin Hydrochloride**: properties. Disponível em: http://www.rishengchem.com/products-e6.htm. Acesso em: 15 nov. 2004.

THOMPSON, K.C. Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium. **Thermochim. Acta**, Amsterdam, v.355, p.83-87, 2000.

THOMPSON, K.C. Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium. **Thermochim. Acta**, Amsterdam, v.355, p.83-87, 2000.

THOPPIL, S.O.; AMIN, P.D. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of ciprofloxacin as bulk drug and in farmacetical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.22, p.699-703, 2000.

TIEFENBACHER, E.M.; HAEN, E.; PRZYBILLA, B.; KURZ, H. Photodegradation of some quinolones used as antimicrobial therapeutics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**. Amsterdam, v.83, p.463-467, 1994.

TORNIAINEN. K.; TAMMILEHTO, S.; ULVI, V. The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.132, p.53-61, 1996.

UNITED States pharmacopoeia. 27.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. p.454-457, 1342-1343.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? ***Uso racional de medicamentos: temas selecionados.*** v.1, n.4, 2004. p.1-6.

WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Managing antibiotic resistance. **New Engl. J. Med.**, Waltham, v.343, p.1961-1963, 2000.

WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Anti-infective drug resistance. Disponível em: http://www.who.int/emc/amr.html. Acesso em: 12 nov.2004.

ZHANG, L.T.; YUAN, Z.F.; CHEN, R.H.; ZHOU, Z.X.; ZHOU, Y.M.; ZHANG, A.H.; LIU, W.N.; ZHANG, Z.H. Determination of ciprofloxacin hydrochloride in tables by differential spectrophotometry. *Yaowu Fenxi Zazhi*, jan 1997, **17** (1), 33-34. *apud*: **Anal. Abstr.**, Letchworth, v.59, p.1186, abstr.8G62, 1997.

ZHANG, S.F.; sun, z.x.; sun, z.l. Determination of ciprofloxacin lactate in injections by acid dye biphasic titration. *Yaowu Fenxi Zazhi*, 1996 **16** (6), 402. *apud* **Anal. Abstr.**, Letchworth, v.59, p.713, abstr.5G53, 1997.