

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANÁLISE DE IMPUREZAS ORGÂNICAS NO CLORIDRATO DE
BESIFLOXACINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
COM ELUIÇÃO ISOCRÁTICA E GRADIENTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOANNA WITTCKIND MANOEL

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANÁLISE DE IMPUREZAS ORGÂNICAS NO CLORIDRATO DE
BESIFLOXACINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
COM ELUIÇÃO ISOCRÁTICA E GRADIENTE

Dissertação apresentada por Joanna Wittckind Manoel

para obtenção do GRAU DE MESTRE

em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Maria Volpato

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24 de março de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elfrides Eva Schermann Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Vítor Todeschini

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Wittckind Manoel, Joanna

ANÁLISE DE IMPUREZAS ORGÂNICAS NO CLORIDRATO DE
BESIFLOXACINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA COM ELUIÇÃO ISOCRÁTICA E GRADIENTE /
Joanna Wittckind Manoel. -- 2016.
133 f.

Orientadora: Nádía Maria Volpato.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. besifloxacino. 2. controle de qualidade. 3.
impurezas. I. Maria Volpato, Nádía , orient. II.
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho, principalmente com saúde, para conseguir concluir mais uma etapa importante.

À Profa. Dra. Nádia Maria Volpato pela orientação, dedicação e oportunidade de adquirir conhecimentos. Obrigada pelo apoio, confiança e revisão crítica.

Aos professores do LCQFar, em especial ao professor Martin pelos incansáveis grupos de discussão, auxílio na solução de dúvidas e incentivo no decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório que sempre me auxiliaram em tudo que precisei.

Aos colegas do laboratório que viraram grande amigos no decorrer desta jornada. Obrigada pelo acolhimento, convívio, auxílio, conhecimentos compartilhados e momentos de descontração.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e transferência de conhecimento.

Às colegas Vanessa e Sara pelo apoio e acompanhamento na utilização do DSC.

À todos os colegas, que mesmo sendo de outros laboratórios, estiveram presentes nestes dois anos, discutindo conhecimentos e auxiliando nas análises, assim como participando de ações de extensão.

À UFRGS pela oportunidade de graduação e pós graduação, pela chance de poder ter ingressado e realizado a pós-graduação em uma universidade de excelente qualidade.

À minha família, que com certeza sem o apoio deles não teria base para chegar até aqui. Aos meus pais, Mauro e Janete, pelo apoio, incentivo e amor dispensados. Ao meu irmão Emanuel e sua família pelo incentivo e

companheirismo de hoje e sempre. Ao meu noivo Fabiano que esteve sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A análise de impurezas é uma etapa importante no controle de qualidade do insumo farmacêutico e do produto final. Provenientes da síntese do medicamento ou dos excipientes, mesmo em pequenas concentrações, as impurezas podem afetar a eficácia e a segurança. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados dois métodos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a avaliação do besifloxacino e sua impureza de síntese, um com eluição isocrática e outro com eluição gradiente. As análises por CLAE com modo de eluição isocrática foram executadas utilizando coluna Ciano, mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída por 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (88:12 v/v), eluída na vazão de 1,0 mL/min com detecção a 330 nm. O método com eluição gradiente foi conduzido com a mesma coluna e componentes da fase móvel modificando apenas as proporções entre fase orgânica e aquosa durante as análises. Os procedimentos foram validados de acordo com guias aceitos internacionalmente, observando-se resultados dentro dos limites aceitáveis. Os métodos apresentaram-se lineares na faixa de 140 a 260 µg/mL para o besifloxacino e de 0,3 a 2,3 µg/mL para a impureza A. Com volume de injeção de 20 µL, os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0,07 e 0,3 µg/mL. A precisão foi alcançada para todas as análises realizadas, obtendo DPR inter-dia igual a 6,47 e 6,36 para a impureza A com eluição isocrática e gradiente, respectivamente. A exatidão foi superior a 99% e a robustez apresentou resultados satisfatórios. No método isocrático obteve-se tempo de análise de 25 min e no gradiente de 15 min. O número de pratos teóricos no modo isocrático foi na ordem de 5000 enquanto no modo gradiente foi na ordem de 45000, ou seja, obteve-se maior eficiência da coluna com alteração da composição da fase móvel durante a eluição. No insumo besifloxacino e no produto farmacêutico utilizados neste trabalho, impurezas relacionadas estavam presentes, mas a impureza A não foi detectada. Os métodos propostos, considerando-se o limite de quantificação, podem ser aplicados na determinação quantitativa da impureza A na análise da matéria prima do besifloxacino, assim como na suspensão oftálmica.

Palavras chave: besifloxacino, controle de qualidade, cromatografia líquida, impurezas, validação

ABSTRACT

Analysis of impurities is an important step in quality control of pharmaceutical ingredients and final products. From drug synthesis or excipients, even in small concentrations, impurities may affect efficacy and safety. In the present study two chromatographic methods were developed and validated for high-performance liquid chromatography (HPLC) for the assessment of besifloxacin and its synthesis impurity, one with isocratic and another with gradient elution. Analyses by HPLC in isocratic elution mode were performed using Cyano column maintained at 25 °C. Mobile phase was composed of 0.5% triethylamine (pH 3.0): acetonitrile (88:12 v/v) eluted at a flow rate of 1.0 ml/min with detection at 330 nm. The method with gradient elution was carried out with the same column and mobile phase components modifying only proportion between organic and aqueous phase during analysis. The procedures have been validated according to internationally accepted guidelines, obtaining results within acceptable limits. The methods presented a linear response from 140-260 µg/mL for besifloxacin and from 0.3 to 2.3 mg/mL for impurity. With the injection volume of 20 µL, the limit of detection and limit of quantitation were, respectively, 0.07 and 0.3 µg/mL. Precision was achieved for all analyses, obtaining inter-day RSD equal to 6.47 and 6.36 for impurity A with isocratic and gradient elution, respectively. The accuracy was higher than 99% and robustness exhibited satisfactory results. In the isocratic method was obtained analysis time 25 min and 15 min gradient. The number of theoretical plates in the isocratic mode was of the order of 5000 while in the gradient mode was of the order of 45000, that is, gave greater efficiency of the column by changing the mobile phase composition during elution. In raw material of besifloxacin and pharmaceutical product used in this study, related impurities were present but the impurity A was not detected. The proposed methods, considering the limit of quantitation, can be in quantitative determination of impurity A in the analysis of besifloxacin raw material, as well as in ophthalmic suspension.

Keywords: besifloxacin, quality control, high performance liquid chromatography, impurities, validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do besifloxacino	36
Figura 2: Síntese do cloridrato de besifloxacino	40
Figura 3: Espectro de infravermelho do besifloxacino	48
Figura 4: Espectro de infravermelho da impureza A	49
Figura 5: Curva de aquecimento do besifloxacino obtido pelo DSC	51
Figura 6: Curva de aquecimento da impureza A obtido pelo DSC	52
Figura 7: Espectro de UV do besifloxacino (25µg/mL) em fase móvel constituída de 0,5% de TEA (pH 3.0) : acetonitrila (88:12 v/v)	66
Figura 8: Espectro de UV da impureza A (25µg/mL) em fase móvel constituída de 0,5% de TEA (pH 3.0) : acetonitrila (88:12 v/v)	66
Figura 9: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A obtido com as condições descritas por Costa <i>et al.</i> (2013): fase móvel 0,5% trietilamina, pH3,0: acetonitrila (74:26 v/v), coluna C18, vazão 1,0 mL/min e concentração de 100 µg/mL	68
Figura 10: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A com coluna C8, fase móvel constituída de 0,5% TEA (pH 3.0) e acetonitrila (60:40 v/v), vazão 1,0 mL/min, concentração do besifloxacino e impureza igual a 100 e 25 µg/mL, respectivamente	69
Figura 11: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A com a coluna fenil com fase móvel constituída de 0,5% TEA (pH 3,0) e acetonitrila (62:38) v/v), vazão 1,0 mL/min, concentração do besifloxacino e impureza igual a 50 e 5 µg/mL, respectivamente	70
Figura 12: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A com a coluna ciano e fase móvel constituída de 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (80:20 v/v) na concentração igual a 50 µg/mL para o besifloxacino e 5,0 µg/mL para a impureza	71
Figura 13: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A nas concentrações iguais a 200,0 e 1,0 µg/mL, respectivamente. IR1, IR2 e IR3 são impurezas relacionadas presentes no besifloxacino as quais possuem pico com resolução de 1,3; 1,7 e 1,4 conforme a ordem de eluição	73

Figura 14: Cromatograma do limite de detecção da impureza A pelo método sinal/ruído 3:1	79
Figura 15: Cromatograma do limite de quantificação da impureza A na concentração de 0,3 µg/mL pelo método sinal/ruído	80
Figura 16: Cromatograma da solução placebo da suspensão oftálmica pelo método cromatográfico com eluição isocrática	81
Figura 17: Cromatograma do placebo junto a impureza A	82
Figura 18: Cromatograma da suspensão oftálmica a 265,2 µg/mL em fase móvel na escala normal (a) e com destaque nas impurezas relacionadas (b)	82
Figura 19: Representação gráfica da curva analítica do besifloxacino por CLAE por eluição isocrática	84
Figura 20: Gráfico dos resíduos da linearidade do besifloxacino por CLAE por eluição isocrática	85
Figura 21: Representação gráfica da curva analítica da impureza A por CLAE por eluição isocrática.	88
Figura 22: Gráfico dos resíduos da linearidade da impureza A por CLAE por eluição isocrática	88
Figura 23: Gradientes testados durante o desenvolvimento do método com seu respectivos cromatogramas	100
Figura 24: Cromatograma da solução placebo da suspensão oftálmica B pelo método cromatográfico com eluição gradiente	104
Figura 25: Cromatograma da solução do placebo adicionada da impureza A	104
Figura 26: Cromatograma da suspensão oftálmica B na escala normal (a) e ampliada para visualizar as impurezas relacionadas (b)	105
Figura 27: Representação gráfica da curva analítica do besifloxacino por CLAE com eluição gradiente	107
Figura 28: Gráfico dos resíduos da linearidade do besifloxacino por CLAE com eluição gradiente	108
Figura 29: Representação gráfica da curva analítica da impureza A por CLAE com eluição gradiente	110
Figura 30: Gráfico dos resíduos da linearidade da impureza A por CLAE com eluição gradiente	111

- Figura 31:** Cromatograma das soluções besifloxacino e impureza A nas concentrações de 200,0 e 1,0 µg/mL, respectivamente (a); suspensão oftálmica a 265,2 µg/mL (b) e placebo (c) nos modos isocrático e gradiente. 122
- Figura 32:** Espectros de UV obtidos no CLAE das impurezas relacionadas 1 (a), 2 (b) e (3) 122
- Figura 33:** cromatogramas da solução de besifloxacino a 200.0 µg/mL nos comprimentos de onda 330 (a) e 280 (b). 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho do besifloxacino e suas respectivas atribuições	48
Tabela 2 - Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho do besifloxacino e suas respectivas atribuições	49
Tabela 3 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade	56
Tabela 4 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	57
Tabela 5 - Limites para ações relativas à presença de impurezas, conforme a dose diária recomendada, presente no ICH Q3A(R2)	58
Tabela 6 - Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações	61
Tabela 7 - Métodos de análise para determinação de besifloxacino encontrados na literatura	62
Tabela 8 - Resultados do teste de injeção de diferentes volumes do besifloxacino	71
Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas na validação do método analítico por CLAE para determinação de besifloxacino e impureza A com eluição gradiente	74
Tabela 10 - Excipientes farmacêuticos presentes na suspensão oftálmica de besifloxacino 0,6 % com suas respectivas porcentagens para a proposta da elaboração do placebo	75
Tabela 11 - Resultados da precisão do limite de quantificação 0,3 µg/mL.	81
Tabela 12 - Valores experimentais para curva padrão do besifloxacino obtidos por CLAE por eluição isocrática	83
Tabela 13 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de besifloxacino por CLAE por eluição isocrática	86
Tabela 14 - Valores experimentais para curva padrão da impureza A obtidos por CLAE por eluição isocrática	87
Tabela 15 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da impureza A por CLAE por eluição isocrática	89
Tabela 16 - Resultados da precisão do besifloxacino e da impureza A por eluição isocrática por CLAE.	90

Tabela 17 - Resultados do estudo de exatidão do besifloxacino e impureza A por eluição isocrática por CLAE	91
Tabela 18: Desvios % dos parâmetros cromatográficos do besifloxacino decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE isocrático	93
Tabela 19: Desvios % dos parâmetros cromatográficos da impureza A decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE isocrático	94
Tabela 20 - Condições cromatográficas utilizadas na validação do método analítico por CLAE para determinação de besifloxacino e impureza A por eluição gradiente	101
Tabela 21 - Programação do gradiente dos solventes utilizada na validação do método cromatográfico	101
Tabela 22 - Valores experimentais para curva padrão do besifloxacino obtidos por CLAE no método com eluição gradiente.....	106
Tabela 23 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de besifloxacino por CLAE por eluição gradiente.....	108
Tabela 24 - Valores experimentais para a curva padrão da impureza A obtida por CLAE com eluição gradiente	109
Tabela 25 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da impureza A por CLAE pelo método gradiente.....	111
Tabela 26 - Resultados da precisão do besifloxacino e da impureza A por eluição gradiente por CLAE	112
Tabela 27 - Resultados do estudo de exatidão do besifloxacino e impureza A por CLAE com eluição gradiente	113
Tabela 28 - Desvios % dos parâmetros cromatográficos do besifloxacino decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE gradiente	115
Tabela 29 - Desvios % dos parâmetros cromatográficos da impureza A decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE gradiente	116
Tabela 30 - Resultados da análise das áreas e percentuais das impurezas relacionadas do besifloxacino em modo isocrático e gradiente.	121

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agencia Nacional Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCB – Denominação comum brasileira

DPR – Desvio padrão relativo

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

FDA – Food and Drug Administration

ICH – Internacional Conference on Harmonization

HPLC – High Performance Liquid chromatography

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

IV – Infravermelho

TEA - Trietilamina

UV - Ultravioleta

USP – The United State Pharmacopeia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	33
3.1. Besifloxacino e conjuntivite.....	35
3.2. Características físico-químicas, farmacológicas, mecanismo de ação, relação estrutura-atividade e farmacocinética do besifloxacino.....	36
3.3. Impurezas.....	37
3.4. Síntese do besifloxacino.....	40
4. CAPÍTULO I: Caracterização do besifloxacino e da impureza A	43
4.1. Introdução.....	45
4.2 Besifloxacino.....	46
4.3 Impureza A.....	46
4.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	46
4.4.1. Resultados e discussão do infravermelho do besifloxacino.....	47
4.4.2. Resultados e discussão do infravermelho da impureza A.....	49
4.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	50
4.5.1. Resultados e discussão DSC do besifloxacino.....	51
4.5.2. Resultados e discussão DSC da impureza A.....	51
4.6. Conclusões.....	52

5. CAPÍTULO II: Desenvolvimento e validação método analítico com eluição isocrática.....	53
5.1. Introdução.....	55
5.2. CLAE.....	59
5.3. Materiais e métodos.....	63
5.4. Desenvolvimento do método analítico.....	64
5.4.1. Teste de solubilidade.....	64
5.4.2. Análise do espectro Ultravioleta (UV) do besifloxacino e impureza A.....	64
5.4.3. Testes de fase móvel e colunas cromatográficas.....	64
5.4.4. Testes de volume de injeção.....	65
5.4.5. Resultados e discussões.....	65
5.5. Validação analítica.....	73
5.5.1. Condições cromatográficas.....	73
5.5.2. Limite de Detecção e de Quantificação.....	74
5.5.3. Especificidade.....	75
5.5.4. Linearidade.....	76
5.5.5. Precisão.....	77
5.5.6. Exatidão.....	78
5.5.7. Robustez.....	79
5.5.8. Resultados e discussão.....	79
6. CAPÍTULO III: Desenvolvimento e validação método analítico com eluição gradiente.....	97
6.1. Desenvolvimento do método.....	99
6.2. Validação analítica.....	100
6.2.1. Condições cromatográficas.....	100
6.2.2. Limite de detecção e de quantificação.....	101
6.2.3. Especificidade.....	102
6.2.4. Linearidade.....	102
6.2.5. Precisão.....	103

6.2.6. Exatidão.....	104
6.2.7. Robustez.....	104
6.2.8. Resultados e discussões.....	104
7. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DAS IMPUREZAS RELACIONADAS.....	119
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

1. INTRODUÇÃO

Controle de qualidade de medicamentos é o conjunto de medidas destinadas a verificar as características de cada lote de medicamentos e demais produtos para que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (BRASIL, 1977). Tendo em vista que o controle de insumos é um ponto crucial para a garantia da qualidade do produto e para a segurança da população, a pesquisa de impurezas dos fármacos torna-se um quesito importante para contemplar a qualidade total.

Uma impureza farmacêutica é qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou produto terminado que não seja o próprio insumo ativo nem o(s) excipientes(s). Assim sendo, a sua presença, mesmo que em pequenas quantidades, pode influenciar na eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos. Por isso a pureza do medicamento e/ou insumo é sempre associada à qualidade do mesmo. É importante conhecer as fases do processo de fabricação, assim como acompanhar a estabilidade do medicamento para monitorar seu desempenho ao longo da sua vida útil. Aos poucos o interesse pela pesquisa de impurezas de medicamentos está aumentando devido à grande importância relacionada à eficácia do produto e segurança do consumidor (Kogawa, A. C., & Salgado, H. RN, 2016).

A importância da análise dos produtos de degradação e de impurezas recebe cada vez mais atenção na rotina da indústria farmacêutica, assim como nas pesquisas dos novos fármacos. Para o registro e comercialização de novos medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificadas como novas ou genéricas, foi publicada a RDC 53 de 04 de dezembro de 2015, a qual estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação. Alguns padrões de qualidade devem ser atendidos a fim de garantir a segurança e eficácia dos produtos.

O besifloxacino é uma fluoroquinolona utilizada no tratamento de infecções oftálmicas. Foi aprovado pelo US Food and Drug Administration (FDA), em maio de 2009, e é comercializado na forma de suspensão oftálmica. A literatura científica não descreve muitos trabalhos sobre a análise das impurezas e produtos de degradação deste fármaco, o qual, como os demais insumos, pode apresentar

potenciais impurezas como intermediários de síntese, que devem ser avaliadas. Não há monografias compendiais deste medicamento.

Com o propósito de estudar estas impurezas, diversas técnicas analíticas podem ser empregadas, entre elas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fim de garantir que os métodos desenvolvidos tenham credibilidade, os mesmos devem ser validados. Conforme o International Council for Harmonization (ICH), a RE nº899, de 29 de maio de 2003, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL,2003; ICH, 2005; BRASIL, 2016).

Assim, o presente trabalho visa desenvolver métodos analíticos passíveis de analisar e distinguir as possíveis impurezas encontradas na matéria-prima do cloridrato de besifloxacino de modo a avaliar a qualidade do insumo farmacêutico, bem como aplicar a metodologia ao produto acabado.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para a caracterização e determinação quantitativa de impurezas orgânicas presentes na matéria-prima e forma farmacêutica final do cloridrato de besifloxacino, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a matéria-prima de cloridrato de besifloxacino e as impurezas adquiridas por meio de técnicas termoanalíticas e espectrais;
- Desenvolver métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência para caracterizar, e se possível quantificar, possíveis impurezas orgânicas presentes no insumo;
- Comparar os resultados dos métodos desenvolvidos;
- Verificar a presença e teor percentual das impurezas através dos métodos analíticos desenvolvidos na forma farmacêutica suspensão oftálmica estéril de cloridrato de besifloxacino 0,6%.

•

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Besifloxacino e conjuntivite

Quinolonas são quimioterápicos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Os primeiros representantes desta classe foram utilizados no início dos anos 60, após a descoberta do ácido nalidíxico. Na década de 80, com adição de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico surgiram as fluoroquinolona, tendo como principal representante o ciprofloxacino (EMMERSON & JONES, 2003).

O fármaco Besifloxacino é uma fluoroquinolona de uso tópico exclusivamente oftálmico, até o momento. Foi aprovada pelo FDA, em 2009, para o tratamento de conjuntivite bacteriana (CHANG & FUNG, 2010). A ANVISA, através da Resolução nº 11 de março de 2010 incluiu o cloridrato de besifloxacino na lista de Denominações Comuns Brasileiras (DCB) (BRASIL, 2010). Foi desenvolvido pela empresa farmacêutica Bausch & Lomb Inc. e é comercializado com o nome de Besivance®, na forma de suspensão oftálmica 0,6 %, indicado no tratamento de conjuntivites de diferentes etiologias (BAUSCH & LOMB, 2010).

Conjuntivite é uma inflamação da conjuntiva ocular, membrana fina e transparente que reveste o globo ocular, e interior das pálpebras. Pode ser causada por vários agentes infecciosos (bactérias, vírus e fungos) e não infecciosos (alergia, causas químicas ou mecânicas). O contágio da conjuntivite bacteriana e viral é realizado pelo contato direto com as mãos, com a secreção e com objetos contaminados (HOVDING, 2008)

Os organismos que causam a conjuntivite bacteriana tende a ser diferente em neonatos, crianças e adultos. Dentre eles estão presentes *Chlamydia trachomatis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, espécies de *Moraxella* e *Acinetobacter* (TARABISHY & JENG, 2008)

O diagnóstico usualmente é clínico. O uso de antimicrobiano tópico no tratamento da conjuntivite bacteriana pode trazer uma melhora clínica e microbiológica mais rápida, reduzindo assim o risco de contágio e complicações (HUTNIK et al, 2010).

3.2. Características físico-químicas, mecanismo de ação, relação estrutura-atividade e farmacocinética do besifloxacin

O besifloxacin é um fármaco sintético quiral que possui nome químico de (+)-7-[(3R)-aminohexahidro-1H-azepin-1-il]-8-cloro-1-ciclopropil-6-fluor-4-oxo-1,4-deidroquinolona-3-ácido carboxílico. Sua fórmula química é $C_{19}H_{21}ClFN_3O_3$ e sua massa molar é 430,40 g/mol (CHANG & FUNG, 2010). O valor do pKa é igual a 6,41. A Figura 1 ilustra a estrutura química do besifloxacin:

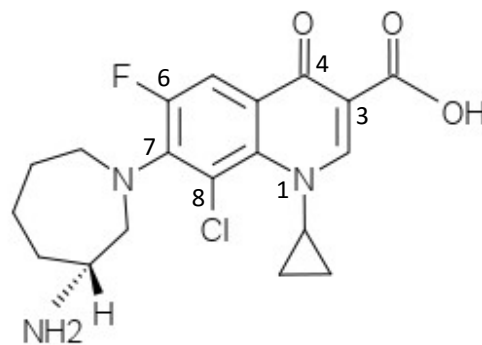


Figura 1: Estrutura química do besifloxacin

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste na inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV das bactérias, interferindo assim na transcrição e replicação do DNA bacteriano. O alvo preferencial na terapia de bactérias gram-negativas é a DNA girase e de gram-positivas a topoisomerase (CHANG & FUNG, 2010). Devido ao uso exagerado de antimicrobianos, tratamentos realizados com doses inapropriadas e globalização de uso, observa-se um aumento na resistência dos patógenos a antibióticos de uso oftálmico e sistêmicos (SHARMA, 2011)

Substituições na estrutura química das quinolonas possuem impacto direto ou subsequente na atividade antimicrobiana. O grupamento 1-N-ciclopropil fornece maior atividade contra bactérias aeróbias e, o cloro na posição 8 aumenta a potência contra enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV. A presença de heterociclos na posição 7, contendo átomos de nitrogênio, confere notável atividade contra Gram-positivos e *P. aeruginosa* (APPELBAUM & HUNTER, 2000; WARD *et al*, 2007).

A necessidade de mais de uma aplicação diária foi confirmada por WARD e colaboradores que estudaram a farmacocinética ocular e sistêmica do besifloxacino após uma única aplicação e encontraram níveis muito pequenos no plasma. PROKSCH e colaboradores (2009) sugerem a posologia de três vezes ao dia para atingir as concentrações de cura de conjuntivites causadas por bactérias. A meia vida observada em lágrimas humanas foi de 3,4 h e o tempo de residência médio na conjuntiva ocular igual a 4,7 h (CHANG & FUNG, 2010; OODOONEL & GELONE, 2012).

3.3 Impurezas

Impureza é qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o próprio insumo farmacêutico nem o(s) excipiente(s) (BRASIL, 2013). Vários órgãos reguladores como ICH, FDA e European Medicines Agency (EMA) especificam impurezas toleráveis e procedimentos analíticos adequados para a análise dessas substâncias.

As formulações de medicamentos possuem ingredientes ativos e excipientes. Também pode haver a presença de impurezas indesejadas, as quais podem influenciar nos estudos do fármaco. Portanto, juntamente com o ensaio de pureza do fármaco é necessário realizar a análise das possíveis impurezas encontradas no produto farmacêutico (NAGPAL *et al*, 2011).

As impurezas podem ser originadas em qualquer fase da fabricação, isolamento, purificação, secagem, armazenamento e transporte do insumo e/ou do produto. As fontes de degradação do fármaco podem ser originadas devido às condições de armazenamento e devido a fatores como exposição à luz, temperatura, oxidação e umidade. Decomposições também podem ser geradas por interação do ativo com os excipientes da formulação e contato com embalagem primária. Impurezas relacionadas com a estabilidade do fármaco podem ser geradas por cristalização, estereoquímica e presença de grupos funcionais (ICH, 2006; NAGPAL *et al*, 2011; BRASIL, 2013).

Pelo fato de uma impureza ser gerada a partir de diversas etapas, da fabricação até o armazenamento do produto final, é que o controle de qualidade

de todo o processo deve ser muito rigoroso. Os materiais de partida devem ser de alta qualidade, o controle do processo deve ser bem entendido e os procedimentos de purificação devem ser considerados a fim de não gerar produtos indesejáveis. O uso de solventes de conhecida toxicidade deveriam ser evitados, mesmo os voláteis. O monitoramento da estabilidade dos produtos finais a longo prazo, estabilidade acelerada e testes de estresse são muito importantes para garantir a manutenção da qualidade do produto (NAGPAL *et al*, 2011; Kogawa, A.C., & Salgado, H.R.N., 2016).

A estereoquímica da molécula ativa também pode ser uma causa de impureza. Uma das formas enantioméricas pode oferecer melhor eficácia farmacológica do que a outra ou mesmo do composto racêmico (NAGPAL *et al*, 2011). A análise desses componentes deve ser diferenciada, pois enantiômeros possuem propriedades físico-químicas idênticas. Assim, o método escolhido deve permitir a separação e caracterização da forma R e S.

Outro processo que pode gerar impurezas é a cristalização. Com a formação de polimorfos muitas características físicas podem ser alteradas como solubilidade, densidade e ponto de fusão. Quando não controlados, os polimorfos podem interferir na dissolução do medicamento podendo alterar também a ação esperada. A presença de grupos funcionais mais reativos e foto oxidação também são possíveis geradores de impurezas importantes.

Conforme o guia Q3A(R2) do ICH, as impurezas podem ser divididas em três categorias:

- Impurezas orgânicas
- Impurezas inorgânicas
- Solventes residuais

As impurezas orgânicas são consideradas substâncias que ocorrem durante o processo de fabricação e/ou armazenamento do medicamento. Podem ser identificadas ou não, ser volátil ou não volátil. Alguns exemplos de impurezas

orgânicas são os materiais de partida, os subprodutos intermediários e os produtos de degradação.

Impurezas inorgânicas também podem resultar do processo de fabricação. Normalmente são substâncias conhecidas e identificadas. Dentro dessa categoria encontram-se os reagentes, catalisadores e materiais auxiliares de filtração, por exemplo.

Os solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados como veículos no preparo da forma farmacêutica final e na purificação de insumos. A maioria desses possui toxicidade conhecida, por isso a seleção prévia desses componentes deve receber grande atenção. NAGPAL e colaboradores (2011) apresentam uma divisão em 3 classes: solventes a serem evitados, solventes limitados e os com baixo potencial tóxico. Essa divisão está relacionada aos riscos ao ser humano. Deve ser considerado que os estudos de toxicidade e genotoxicidade desses compostos não são realizados a longo prazo. Visto que o uso de medicamentos pode ser contínuo, é necessário ter bastante atenção na escolha dos solventes para a produção dos medicamentos.

Os limites de cada impureza não podem ser determinados de uma maneira geral. Cada medicamento possui características particulares de rotas de síntese e estrutura química, as quais podem ser mais propensas ou não a degradações. Na análise da matéria prima pode-se ter como base o laudo do fornecedor, no qual deve estar descrita a quantidade de impurezas totais e individuais; quando o medicamento é bem estudado, pode-se encontrar os níveis de aceitação e toxicidade na própria monografia em código oficial. O ICH apresenta os limites para identificação referentes a dose diária ingerida. Quando a dose for menor que 2 g/dia a impureza presente deve ser inferior a 0,1% ou 1 mg/dia ingerido, o valor que for menor. Se a dose for maior que 2 g/dia, a presença de impureza deve ser inferior a 0,05% da ingestão (ICH 2006; NAGPAL *et al*, 2011; BRASIL, 2013).

3.4. Síntese do besifloxacino

Tendo em vista que impurezas são componentes que coexistem de maneira indesejada no produto final ou matéria-prima, que surgem durante a fabricação

e/ou armazenamento subsequente, é importante conhecer a síntese do medicamento. Ao analisar a rota sintética e conhecer os intermediários de reação pode-se avaliar as potenciais impurezas de síntese. Uma das rotas sintéticas para a obtenção do besifloxacino está apresentada na Figura 2

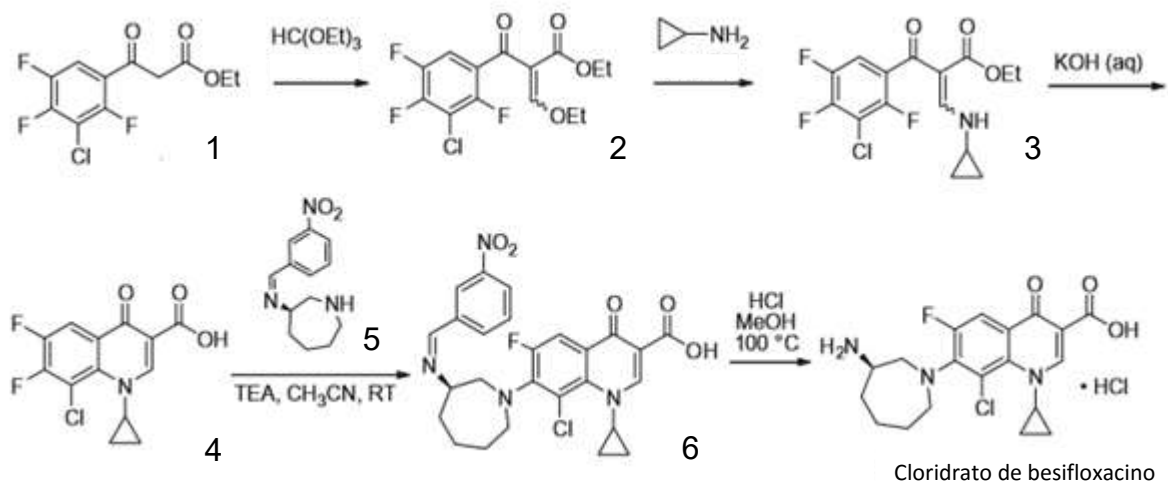


Figura 2: Síntese do cloridrato de besifloxacino (adaptado de KEVIN *et al*, 2011).

A síntese do besifloxacino começa com o composto oxopropanoato de 3-(3-cloro-2,4,5-trifluorofenil)-3-etila (**1**) adquirido comercialmente. A condensação do cetoéster com o ortoformato de trietila resulta em uma mistura de ésteres vinílicos (**2**). Substituição com ciclopropanamina converte **2** a vinil amina **3** como mistura de isômeros E e Z. A mistura é tratada com base e temperatura elevada para resultar na estrutura **4**. O isômero E isomeriza-se para o Z, o que subsequentemente gera uma substituição nucleofílica aromática intramolecular com concomitante saponificação para gerar a quinolona ácida **4**. Esta então é submetida a outra substituição nucleofílica com o composto **5** e a reação procede

regioseletivamente para fornecer o composto **6**. Metanólise de **6** em temperatura elevada gera o cloridrato de besifloxacino.

Com a importância de estudar as impurezas do besifloxacino adquiriu-se a impureza de trabalho, a qual corresponde a estrutura 4 da síntese do medicamento. A presença de intermediários de reação na matéria prima e produto final podem ocasionar alterações na qualidade e segurança dos mesmos

4. CAPÍTULO I: Caracterização do besifloxacino e da impureza A

4.1 Introdução:

No desenvolvimento de um estudo de controle de qualidade de um fármaco é necessário possuir máxima segurança nos resultados. A confiabilidade dos resultados obtidos no decorrer de experimentos, quer seja na rotina de uma empresa, assim como numa bancada de laboratório acadêmico, depende de vários fatores, dos quais, as substâncias utilizadas como referência possuem grande importância.

O FDA reconhece duas categorias de padrões de referência: compendiais e não compendiais. Os padrões de referência compendiais são obtidos de fontes como as farmacopeias, e não necessitam de caracterização posterior. Os padrões de referência não compendiais são substâncias com elevado teor de pureza, os quais devem ser caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza (RIBANI *et al*, 2004; BRASIL, 2010).

No Brasil, a RDC N°37, de 6 de julho de 2009, trata da admissibilidade das farmacopeias estrangeiras. O cloridrato de besifloxacino não está presente na Farmacopeia Brasileira, e, no início deste trabalho ainda não havia sido publicado monografia na USP, tampouco estava disponível o material de referência do fármaco, de modo que foi necessária a aquisição do mesmo de fonte não oficial. Na RDC N°17, de 16 de abril de 2010, que trata das boas práticas de fabricação de produtos farmacêuticos, há a informação de que sempre que existir, os padrões de referência oficiais estes devem ser utilizados. Caso não existam, o padrão deve ser do mais elevado grau de pureza possível e cuidadosamente caracterizado.

A aquisição de material não compendial deve ser realizada de empresas confiáveis, e, mesmo assim, testes de identificação devem ser realizados para assegurar sua identidade. Nas diferentes análises necessárias, é importante contabilizar o material disponível, assim como os equipamentos. Existem testes nos quais a amostra é totalmente consumida, em outras há a possibilidade de reutilização do material. Deve-se ter em mente também o quanto a informação de cada análise vai acrescentar na identificação que se está buscando.

Neste contexto, este capítulo tem como objetivo apresentar a caracterização das 2 substâncias utilizadas no decorrer do trabalho. A

caracterização do besifloxacino e da impureza A foram realizadas utilizando a espectrofotometria na região do infravermelho (IV) e a análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

4.2 Besifloxacino

A matéria-prima de cloridrato de besifloxacino foi adquirida da empresa BOC Sciences, identificada como Lote B13L1101 e teor declarado de 99,1 %.

4.3 Impureza A

A impureza de síntese do besifloxacino foi adquirida da empresa Sequoia Research Products, identificada como lote 1503012125c, com teor declarado no laudo de 99,7%. Seu nome químico é 8-cloro-1-cicopropil-6,7-difluoro-1,4-diidroquinolina-4-oxo-3-carboxílico.

4.4. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho (IV) é muito importante na análise de fármacos, pois pode ser aplicada a uma grande variedade de substâncias. O fundamento desta técnica é baseado em efeitos de absorção da radiação. Uma vez que as baixas energias da radiação IV não são suficientes para promover transições eletrônicas, a absorção resulta em modificações na energia vibracional da molécula. A faixa de radiação do infravermelho, no espectro eletromagnético, ocorre na faixa entre o visível e micro-ondas, sendo que a faixa de maior interesse se encontra na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Esta técnica mostra absorções específicas para determinados tipos de ligações químicas entre os átomos. Assim, uma amostra, contendo várias ligações, gera um espectro característico daquela substância. Caso já tenha sido estudada, e tenha um espectro de infravermelho elucidado, a comparação é uma evidência para confirmar a identidade química (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; PAVIA et al., 2008).

Com a evolução dos equipamentos, os espectrômetros com transformada de Fourier passaram a ser os mais utilizados. Ao invés de utilizar um monocromador, utiliza-se um interferômetro para medir frequências múltiplas simultaneamente, produzindo um interferograma que é recalculado usando algoritmos complexos para gerar o espectro final. Esta metodologia é bastante utilizada na análise de fármacos pois possui vantagens como alta velocidade de análise, alta resolução espectral, não é uma técnica destrutiva, melhor razão sinal-ruído e não emprega calor, minimizando assim possíveis transformações (PASQUINI, 2003; PAVIA et al., 2008)

Para a verificação das características de absorção das substâncias, foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho Spectrum BX FTIR equipado com acessório ATR MIRacle da marca PerkinElmer, instalado na central analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

A leitura da amostra pode ser feita diretamente, sem necessidade de pré-tratamento do material.

4.4.1. Resultados e discussão do infravermelho do besifloxacino

Conforme apresentado no espectro de infravermelho, ilustrado na Figura 3, pode-se visualizar as principais bandas de absorção, que caracterizam alguns grupos específicos da molécula em estudo. Estas bandas estão apresentadas na Tabela 1, juntamente com as respectivas atribuições (PAVIA, 2008).

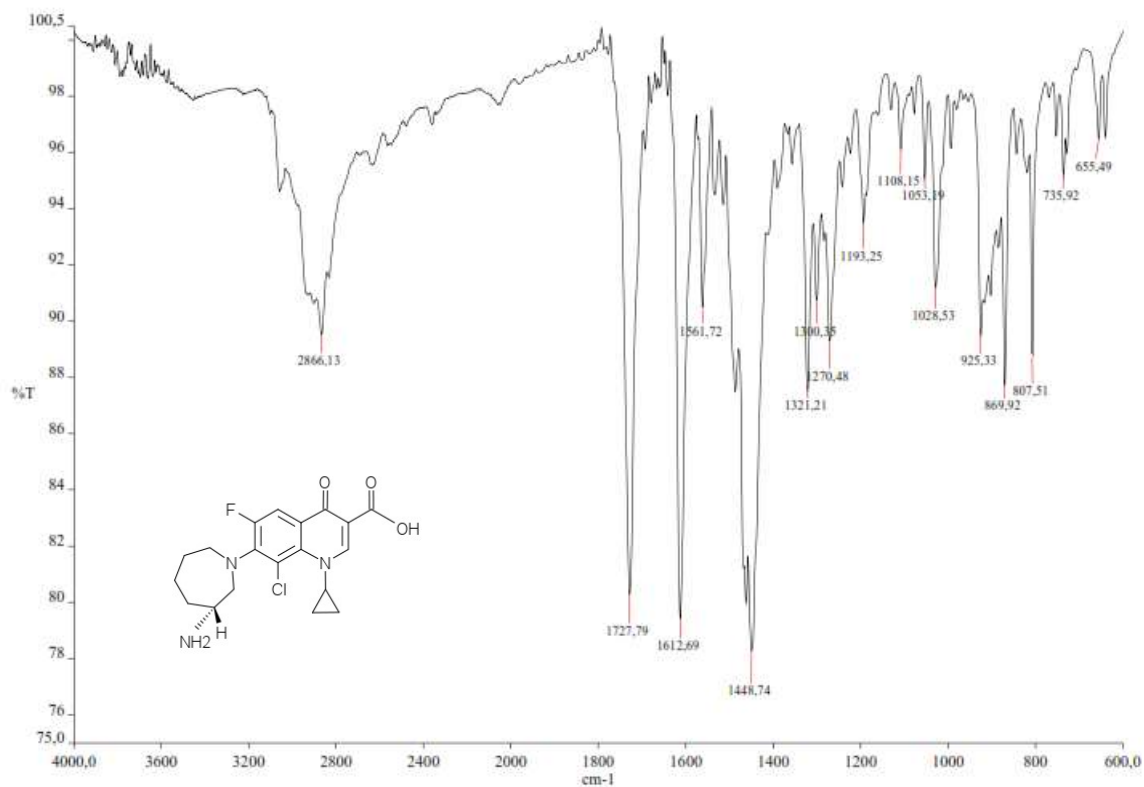


Figura 3: Espectro de infravermelho do besifloxacin.

Tabela 1: Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho do besifloxacin e suas respectivas atribuições.

Frequência experimental	Faixa literatura	Atribuição
1727,79	1700 – 1725	C=O Ácido Carboxílico
1612,69	1670 – 1600	C=O Cetona
1448,74	1600 - 1450	CH ₂ ciclopropila
2866,13	3000 - 2840	CH ₂ cicloexano

4.4.2. Resultados e discussão do infravermelho da impureza A

Na Figura 4 está apresentado o espectro de IV da impureza A e as atribuições dos principais grupamentos estão descritas na Tabela 2.

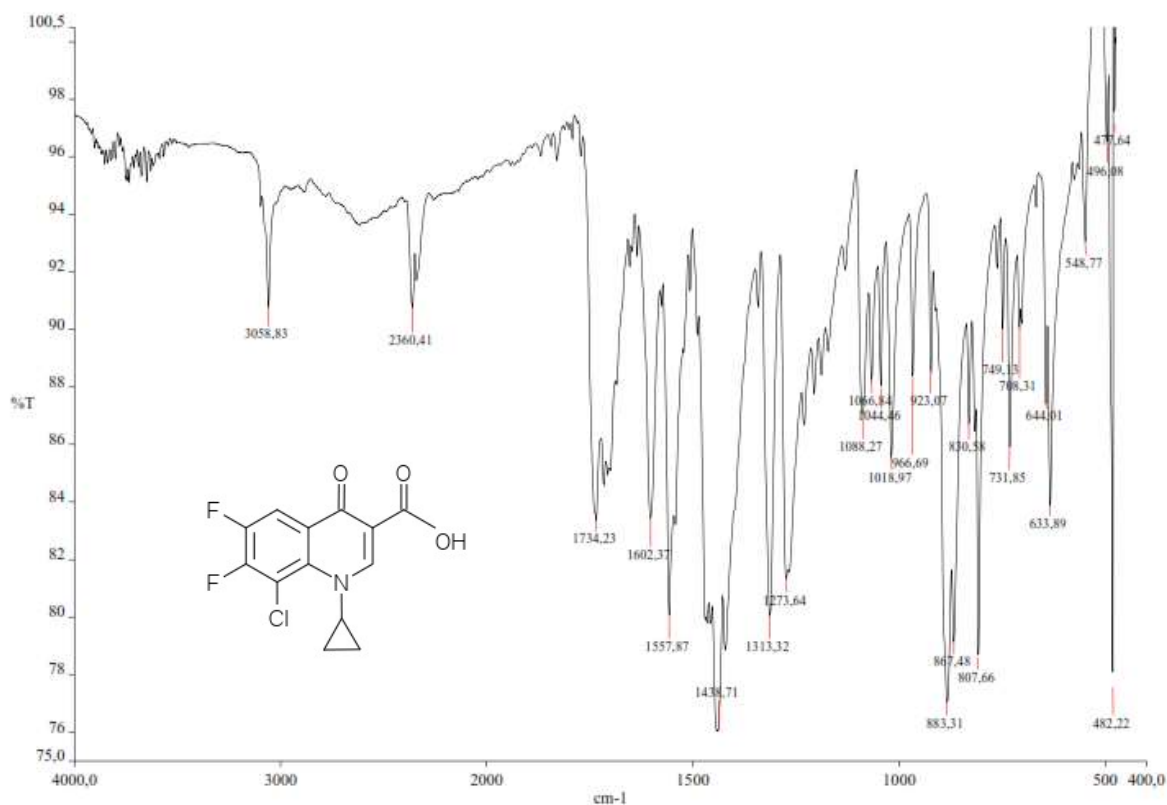


Figura 4: Espectro de infravermelho da impureza A.

Tabela 2: Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho do besifloxacino e suas respectivas atribuições.

Frequência experimental	Faixa Literatura	Atribuição
1734,23	1700 – 1725	C=O Ácido Carboxílico
1602,37	1670 – 1600	C=O Cetona
1438,71	1600 – 1450	CH ₂ ciclopropila

4.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica que possibilita medir o fluxo de calor diferencial entre a amostra e um material de referência termicamente inerte em função da temperatura e/ou tempo de aquecimento sob um programa controlado de temperatura (FB, 2010).

A técnica de DSC é muito consolidada, é utilizada na caracterização de matérias-primas e produtos acabados, em estudo de pré-formulação, na estabilidade e avaliação da interação fármaco/excipiente. Também é possível verificar por DSC a pureza do composto por meio da análise do pico de fusão obtido, aplicando a lei do ponto de fusão de Van't Hoff, a qual prevê alteração no ponto de fusão do composto puro devido à presença de impurezas. Permite a determinação direta da pureza de fármacos sem o uso excessivo de materiais de substâncias químicas de referência, tempo reduzido de análise e preparo de amostra (MOREIRA, 2010; OLIVEIRA, 2011).

Na área farmacêutica essa técnica é muito utilizada na caracterização térmica e determinação de pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismos. Os dados obtidos por análise térmica estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto farmacêutico, seja quanto à eficácia terapêutica do medicamento ou a estabilidade do mesmo ao longo do prazo de validade (OLIVEIRA et al, 2011).

Na realização do procedimento, foi pesado, aproximadamente, 1,5mg de besifloxacino e impureza A, separadamente, em porta amostra de alumínio, a qual foi selada e inserida no equipamento de DSC. Na realização da análise utilizou-se calorímetro DSC-60 da Shimadzu com rampa de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 50mL/min. Os dados obtidos foram analisados por Software TA-60 Analysis. O equipamento encontra-se no CDTF (Centro de Tecnologia Farmacêutica) da Faculdade de Farmácia, da UFRGS. A técnica compara diferenças no fluxo de calor entre a substância em análise e uma referência (porta amostra selado vazio), quando ao mesmo tempo são submetidas ao programa de temperatura controlada

4.5.1. Resultados e discussão DSC do besifloxacino:

A Figura 5 apresenta a curva de aquecimento obtida por DSC para o besifloxacino. Conforme demonstrado, o termograma da amostra analisada apresentou pico em 312,55 °C. O pico exotérmico possui uma deformação possivelmente pela degradação do sólido dentro do recipiente onde se encontra a amostra. Durante a análise ocorreu extravasamento do sólido, provavelmente devido ao 'flash point' que, pela literatura, é de 320,9 °C. O ponto de fusão descrito para o besifloxacino na patente do medicamento é igual a 282,7 °C e o termograma apresentado também possui o pico exotérmico alargado (SHAWER *et al.*, 2011).

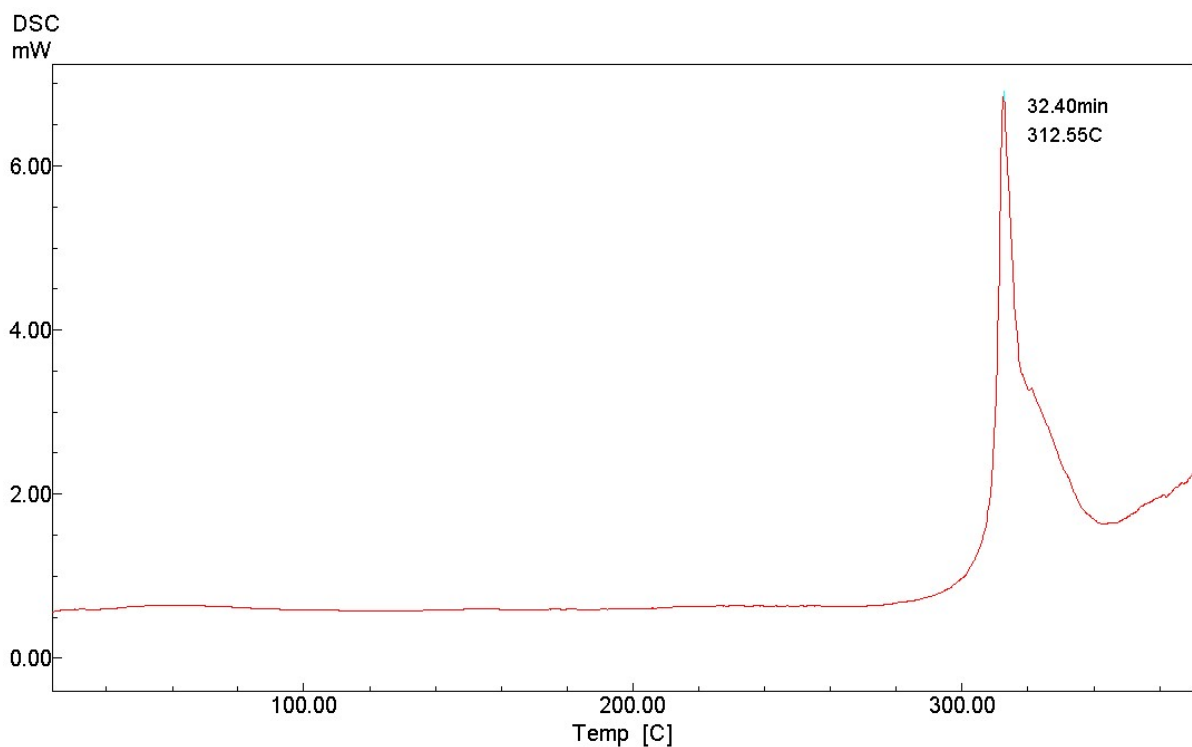


Figura 5: Curva de aquecimento do besifloxacino obtido pelo DSC.

4.5.2. Resultados e discussão DSC da impureza A:

O resultado da análise de DSC da impureza A está apresentado na Figura 6. Pode-se observar que o ponto de fusão experimental foi igual a 192,73°C e o processo foi endotérmico. O referencial teórico apresenta faixa de fusão de 194-195°C, observa-se assim que o ponto de fusão da amostra está próximo ao

especificado. O perfil do pico sugere pureza do material, pois não visualizou-se presença de outros picos e nem alargamento do mesmo.

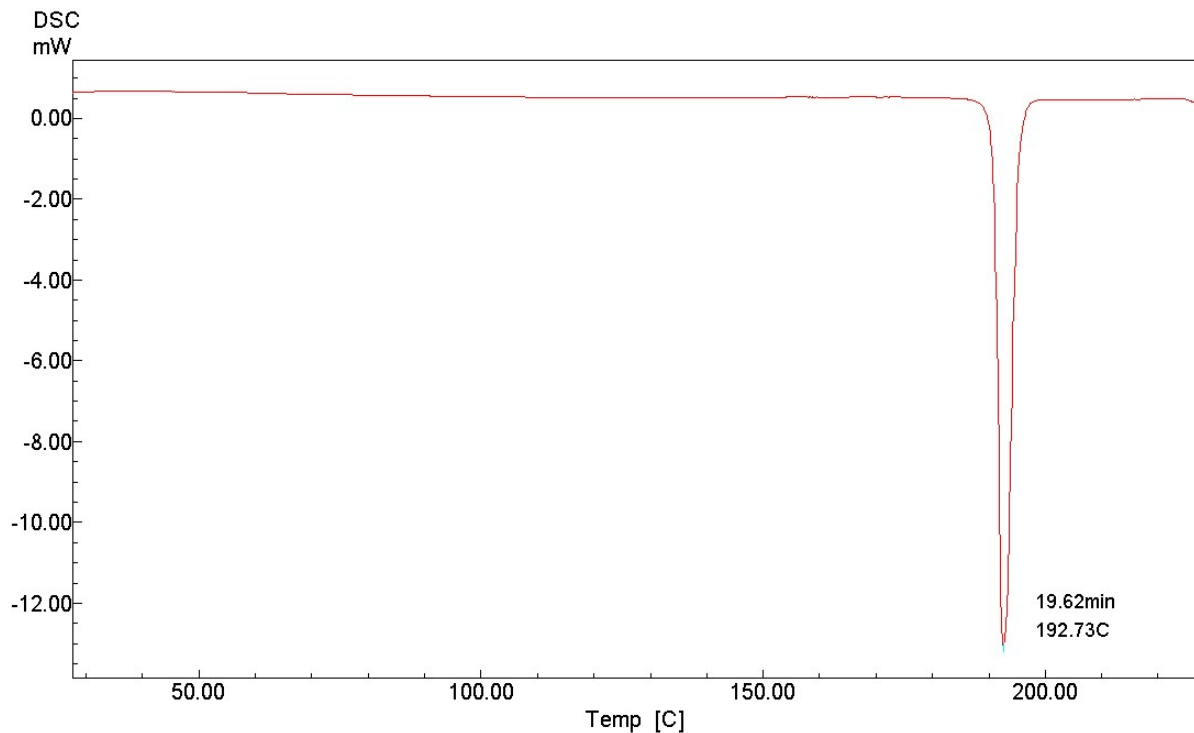


Figura 6: Curva de aquecimento da impureza A obtido pelo DSC.

4.6 Conclusões

Com base nas análises realizadas e nos resultados encontrados, pode-se concluir que as amostras utilizadas para caracterização, tanto do besifloxacino quanto da impureza A, correspondem à identidade especificada.

Após esses ensaios, para os propósitos deste trabalho, considera-se a impureza A, adquirida da empresa Sequoia, como substância química de referência para utilizar no decorrer do estudo de métodos de análise para sua presença no insumo besifloxacino. Complementarmente, o material besifloxacino foi utilizado como substância química de referência quando da avaliação da aplicabilidade dos métodos desenvolvidos ao produto farmacêutico contendo o fármaco

5. Capítulo II: Desenvolvimento e validação método analítico com eluição isocrática

5.1 Introdução

É necessário apresentar confiabilidade e qualidade nos resultados quando se desenvolve uma metodologia. Para garantir essas exigências o método proposto deve ser avaliado criteriosamente desde o planejamento até a aquisição dos dados. O processo que envolve todos esses cuidados é denominado validação. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, para determinações qualitativas, assim como semi-quantitativas e quantitativas de fármacos e outras substâncias presentes no produto farmacêutico. O método deve garantir, por meio de estudos experimentais, confiabilidade nos resultados. Os métodos devem ser validados ou revalidados antes da introdução na rotina de trabalho; quando as condições empregadas na validação inicial foram alteradas; e sempre que a formulação do medicamento for modificada, e o método não conseguir avaliar essas mudanças (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

A Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) harmonizou as exigências da validação dos métodos em guias. Um dos guias – Q2(R1) - apresenta uma discussão sobre as características a serem consideradas durante a validação dos procedimentos analíticos assim como termos e definições. Em outro guia - Q3A(R2) – são apresentadas orientações sobre a pesquisa e qualificação de impurezas orgânicas em materiais produzidos por síntese química.

Os guias existentes – ANVISA (2003), ICH (2005) e USP (2015) - não possuem um protocolo detalhado de como proceder a validação. Os parâmetros analíticos e os requisitos que devem ser preenchidos para obter credibilidade nos resultados estão descritos, mas não há apenas uma forma de realizar. Assim sendo, é de responsabilidade do analista verificar os parâmetros e planejar o necessário para concluir se o método é adequado para a amostra em questão. O processo da validação inicia com um bom planejamento, posteriormente, decisões devem ser tomadas considerando os resultados práticos e o embasamento teórico da técnica escolhida. No decorrer do trabalho, frequentemente há etapas que não geram resultados positivos, e são nesses momentos que se deve subsidiar a tomada de decisão no aprimoramento do método em desenvolvimento. Com

estudo e compreensão do procedimento, é possível se deter nos pontos mais cruciais, sem despendendo tempo e material.

Os parâmetros estudados na validação de um método analítico incluem fundamentalmente especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação e robustez. Para garantir a qualidade analítica também é recomendado que os equipamentos utilizados na validação estejam devidamente calibrados e que o analista possua qualificação e treinamento.

Conforme RE 899, publicada pela ANVISA, os métodos analíticos são classificados em diferentes categorias sendo que para cada uma delas, existem parâmetros específicos a serem averiguados. Essa classificação está indicada na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

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

FONTE: BRASIL, 2003.

E, para cada categoria há um conjunto de testes especificados na mesma resolução, apresentados na Tabela 4

Tabela 4: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

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

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

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

FONTE: BRASIL, 2003.

Conforme apresentado na Tabela 4, os parâmetros necessários para diferentes finalidades são diversos. Portanto, a validação de método para o componente principal no produto acabado e na matéria-prima e para a análise de impurezas possuem pequenas diferenças importantes a serem observadas. O doseamento de besifloxacino pertence a categoria I, a qual descreve os testes que normalmente são aplicados no decorrer de uma validação deste tipo, como especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. A determinação da impureza A no besifloxacino, pertence a categoria II, na qual, além dos parâmetros anteriormente citados, ainda é importante verificar os limites de detecção e quantificação, pois como a concentração dessas substâncias é muito pequena, é importante avaliar se o método proposto consegue avaliar essas concentrações tão baixas.

Nos guias existentes poucos limites são descritos para a análise específica de impurezas. Algumas monografias farmacopeicas apresentam os limites das impurezas relacionados à área do pico principal. Outra forma de avaliar o limite de impurezas é pelos dados do laudo do fornecedor, no qual consta o limite aceito de impurezas na matéria-prima. A consulta pública nº 129, de 12 de fevereiro de

2016 apresenta mais informações sobre a validação e limites para as impurezas para precisão e exatidão, por exemplo.

Os limites gerais especificados para impurezas, encontrados no ICH, estão apresentados na Tabela 5. Esses limites se referem ao máximo permitido de uma determinada impureza conforme a dose diária ingerida.

Tabela 5: Limites para ações relativas à presença de impurezas, conforme a dose diária recomendada, presente no ICH Q3A(R2).

Dose máxima diária	Reportar	Identificar	Quantificar
≤ 2g/dia	0,05 %	0,10 % ou 1,0 mg por dia ingerido (o que for inferior)	0,15 % ou 1,0 mg por dia ingerido (o que for inferior)
≥ 2g/dia	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Como pode-se observar na Tabela 5, o ICH se reporta a limites de impurezas apenas para medicamentos de administração sistêmica. O besifloxacino é uma suspensão de uso oftálmico, portanto não se enquadra nessas especificações. Caso considerar-se a posologia diária da suspensão oftálmica, ter-se-ia aplicado uma dose diária igual a 0,57 mg, ou seja, menor de 2g/dia de besifloxacino. Os valores calculados para a avaliação de impurezas, considerando a dose diária de 3 gotas, seriam correspondentes a 0,285, 0,570 e 0,855 µg de impureza para, respectivamente, reportar, identificar e quantificar.

Como a suspensão oftálmica não se enquadra nas especificações do ICH, considerou-se como limite da impureza o constante no laudo do fornecedor da matéria-prima de cloridrato de besifloxacino, empregada no presente trabalho. O limite especificado no laudo da empresa BOC Science é de ≤ 1,0 % para impurezas totais e ≤ 0,5 % para impurezas individuais. Considerando como limite 0,5 % de impureza individual, procedeu-se o cálculo referente ao produto acabado para determinar as faixas de análise dos parâmetros da validação

5.2 CLAE

CLAE é uma técnica separativa bastante utilizada em análise farmacêutica. Este é um dos métodos selecionados pela indústria farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos. É o procedimento mais preconizado pelos Códigos Oficiais, pois fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos fabricados (WATSON, 2005). Outras vantagens que podem ser citadas são: possibilidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos, pequeno tempo de análise, boa eficiência, resolução e detectabilidade (COLLINS, 2006).

A amostra costuma ser dissolvida na fase móvel - composta por um solvente ou por uma mistura destes – e introduzida em uma coluna cromatográfica preenchida com fase estacionária. A fase móvel é bombeada com vazão constante deslocando os componentes da mistura através da coluna, os quais se distribuem de acordo com suas afinidades. As substâncias com maior afinidade pela fase estacionária movem-se mais lentamente, enquanto que as com menor afinidade movem-se mais rapidamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, formando o cromatograma (Farmacopeia Brasileira, 2010).

A técnica por CLAE já é bastante notória, a maioria de suas aplicações nas análises farmacêuticas concentram-se na determinação quantitativa de fármacos. Na determinação de impurezas, entre 1995 e 2001, 53 % dos métodos foram realizados com o uso de CLAE, sendo que 94 % utilizaram detector UV (RAO & NAGARAJU, 2003).

Mesmo que seja uma técnica amplamente utilizada, o desenvolvimento de uma metodologia deve ser baseada no conhecimento do processo cromatográfico. É necessário conhecer a molécula que se pretende estudar, a massa molecular, a solubilidade, o espectro no ultravioleta, entre outros. A obtenção de uma separação aceitável entre os compostos e a detecção dos mesmos é o primeiro passo para o sucesso da análise. O conhecimento de cada parâmetro cromatográfico é importante para analisar os resultados obtidos no desenvolvimento e otimização do método

A adequabilidade do sistema (“system suitability”) deve ser conduzida a fim de avaliar a corrida cromatográfica. Esta avaliação pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI, 2004). Abaixo estão listados alguns parâmetros e suas finalidades:

Tempo de retenção: tempo decorrido do momento em que a amostra foi introduzida até o instante máximo do pico.

Fator de retenção (k'): mede a capacidade de um sistema cromatográfico para reter os componentes da amostra.

Resolução: Fornece uma medida quantitativa da habilidade da coluna em separar duas substâncias. É o grau segundo o qual um pico se distingue de outro em um cromatograma.

Assimetria: dois termos são utilizados para medir a simetria dos picos, o fator de assimetria, calculado a 10% da altura do pico; e o fator alargamento, calculado a 5% de sua altura. Esses cálculos são realizados comparando a base frontal com a base caudal do pico cromatográfico. A falta de simetria pode ocasionar perda de resolução cromatográfica e quantificações inadequadas.

Número de pratos teóricos: é o valor indicativo da performance da coluna, descreve a dispersão do pico cromatográfico em relação ao seu centro. É a medida da largura do pico em relação ao seu tempo de retenção.

Os parâmetros de conformidade do sistema devem ser avaliados para garantir qualidade nos resultados. Os limites recomendados, de acordo com FDA, estão apresentados na Tabela 6. Tipicamente, no mínimo dois destes critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema (RIBANI, 2004)

Tabela 6: Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações

Parâmetros	Recomendações
Fator de capacidade (k')	O pico principal deve estar afastado dos demais picos e do pico não retido, geralmente $k' > 2,0$.
Repetibilidade	Desvio padrão relativo $< 1 \%$ para $n > 5$.
Resolução (R_s)	$R_s > 2,0$ entre o pico de interesse e o do interferente potencial mais próximo (impureza, excipiente, padrão interno, produto de degradação)
Assimetria	Fator cauda ≤ 2
Pratos Teóricos	Em geral deve ser maior que 2000

FONTE: RIBANI, 2004.

Procurou-se na literatura científica trabalhos que abordassem a determinação de besifloxacino e de suas impurezas. Foram encontrados trabalhos utilizando CLAE para a determinação de besifloxacino em fluidos biológicos e tecidos, mas somente um abordava a determinação de besifloxacino com ênfase no controle de qualidade. Apenas um trabalho sobre as impurezas do besifloxacino foi encontrado, o qual se concentra na impureza enantiomérica, tendo sido publicado, em 2012, por WANG *et al.* Na Tabela 7 estão apresentados os métodos de análise cromatográfica do besifloxacino e impurezas encontrados na literatura

Tabela 7: Métodos de análise por cromatografia líquida para determinação de besifloxacino encontrados na literatura.

Coluna/Detecção	Fase móvel	Referência
Difenil / EM-EM	Formato de amônio 5 mM:água, pH 3,25, em combinação com acetonitrila:metanol (20:80 v/v)	ARNOLD <i>et al.</i> , 2008
C18 / UV 296 nm	Acetonitrila:tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 31mM, pH 3,0, (28:72 v/v)	BALZLI <i>et al.</i> , 2010
C18 / EM-EM	Acetonitrila:água com 0,2% ácido fórmico (20:80 v/v)	TORKILDSEN <i>et al.</i> , 2010
C18 / EM-EM	Acetonitrila:água com 0,2% ácido fórmico (20:80 v/v)	DONNENFELD <i>et al.</i> , 2011
C18 / UV 293 nm	Metanol:tampão fosfato monobásico de potássio (20mM, pH 3,0) (50:50 v/v)	WANG <i>et al.</i> , 2012
C18 / UV 295 nm	0,5 % trietilamina, pH 3,0 : acetonitrila (74:26 v/v)	COSTA <i>et al.</i> , 2014

Tendo em vista a pouca informação sobre as impurezas do besifloxacino e, com base nos trabalhos citados, desenvolveu-se e validou-se dois métodos analíticos por CLAE para determinação de besifloxacino e de suas impurezas na matéria-prima e forma farmacêutica suspensão oftálmica. Os métodos diferem-se na eluição da fase móvel, sendo um realizado em modo isocrático (apresentado no Capítulo II) e, outro em eluição gradiente (apresentado no Capítulo III)

5.3 Materiais e métodos

Empregou-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu 20A, equipado com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20 AC, forno CTO-20AC e detector PDA SPD-M20A. O software utilizado para controle e aquisição dos dados foi o LC-Solution.

A balança analítica utilizada foi da marca AND, modelo HM – 202 com precisão de 0,01 mg. O banho de ultrassom da marca Unique, modelo USC 5000. Pipetadores automáticos da marca Transferepette S Brand.

Os reagentes utilizados para o preparo da fase móvel e no decorrer do desenvolvimento da metodologia possuem grau cromatográfico. Somente a trietilamina e o ácido orto-fosfórico, devido à pequena proporção utilizada, foram grau PA. A acetonitrila da marca Tedia, a trietilamina Sigma-Aldrich e o ácido ortofosforico Vetec. A água milli Q foi produzida pelo sistema de purificação de água da marca Millipore, modelo Direct-Q 3 UV.

O cloridrato de besifloxacino possui pureza de 99,1%, e a impureza A de 99,7% e estão descritos nos itens 4.2 e 4.3 no primeiro capítulo. O produto acabado, suspensão oftálmica estéril (Besivance®), foi adquirido no comércio local, é composto por cloridrato de besifloxacino 0,6%, lote 241201 e vencimento em 03/2017.

O desenvolvimento da metodologia analítica iniciou com testes de solubilidade do fármaco, e posteriormente, realizou-se o preparo das soluções de besifloxacino e da impureza A. A escolha da fase móvel foi determinada a partir de dados da literatura e testes com diferentes proporções de solventes. A fase móvel de interesse seria aquela que apresentasse melhor seletividade e resultados adequados nos parâmetros cromatográficos, como o tempo de análise, por exemplo.

5.4. Desenvolvimento do método analítico

5.4.1. Teste de solubilidade

A solubilidade do cloridrato de besifloxacino e da impureza A foram testados com o uso dos solventes água, metanol e acetonitrila pelo método descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

5.4.2. Análise do espectro Ultravioleta (UV) do besifloxacino e impureza A

As soluções das amostras foram preparadas em diluente composto por 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (88:120 v/v) na concentração de 100 µg/mL. Conforme foram lidas no equipamento de UV diluiu-se na concentração necessária para melhor visualizar o espectro, obtendo uma concentração final de leitura a 25 µg/mL.

O equipamento utilizado foi espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1800. O branco utilizado foi a fase móvel em que as amostras foram preparadas.

5.4.3. Testes de fase móvel e colunas cromatográficas

A primeira fase móvel utilizada nos testes foi a preconizada por COSTA e colaboradores (2014) que descreve a composição e proporção dos solventes utilizados e, a partir desses dados, foram realizadas mudanças principalmente nas proporções das fases orgânica/aquosa sendo, também, necessária a troca da coluna.

As colunas cromatográficas empregadas no desenvolvimento do método analítico foram:

- Coluna C18/ 250 mm x 4,6 mm x 5µm / Zorbax eclipse Plus / Agilent
- Coluna C8 / 150 mm x 4,6 mm x 5 µm / Zorbax eclipse Plus / Agilent
- Coluna Phenyl /250 mm x 4,6 mm x 5µm / XBridge / Waters

- Coluna Ciano / 150 mm x 4,6 mm x 5µm / GL Science

5.4.4. Testes de volume de injeção

No início do desenvolvimento do método foram testados os volumes de injeção apenas do besifloxacino. Foi preparada uma solução de besifloxacino em fase móvel na concentração de 100 µg/mL, conforme método descrito por COSTA *et al.*. Os volumes injetados foram de 10, 20, 30, 40 e 50 µL. Os parâmetros cromatográficos foram analisados para a seleção do volume.

Posteriormente foi avaliado novamente o volume de injeção com a análise simultânea do fármaco e da impureza A. Foi preparada uma solução contendo 200 µg/mL de besifloxacino e 1,0 µg/mL de impureza A. Essa solução foi injetada nos volumes de 20, 30 e 40 µL. A intenção de avaliar um possível acréscimo no volume de injeção foi a possibilidade de melhor visualizar as impurezas contidas no besifloxacino.

5.4.5. Resultados e discussão

O cloridrato de besifloxacino solubilizou em água, porém em acetonitrila e metanol apresentou característica de muito pouco solúvel.

A impureza A não apresentou solubilidade em água, ligeiramente solúvel em acetonitrila e muito pouco solúvel em metanol.

A acetonitrila foi selecionada como solvente orgânico na fase móvel pela solubilidade e porque possui menor viscosidade comparada com o metanol - gerando assim menores pressões no sistema - e baixa absorção na região do UV.

Posteriormente, os espectros de UV foram avaliados. Os espectros de UV observados do besifloxacino e da impureza A estão apresentados respectivamente, nas Figuras 7 e 8.

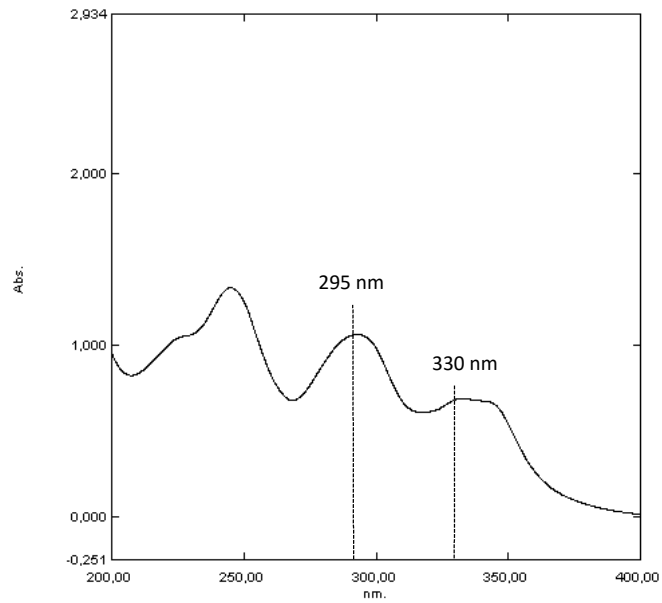


Figura 7: Espectro de UV do besifloxacino (25 µg/mL) em diluente composto por 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (88:12 v/v).

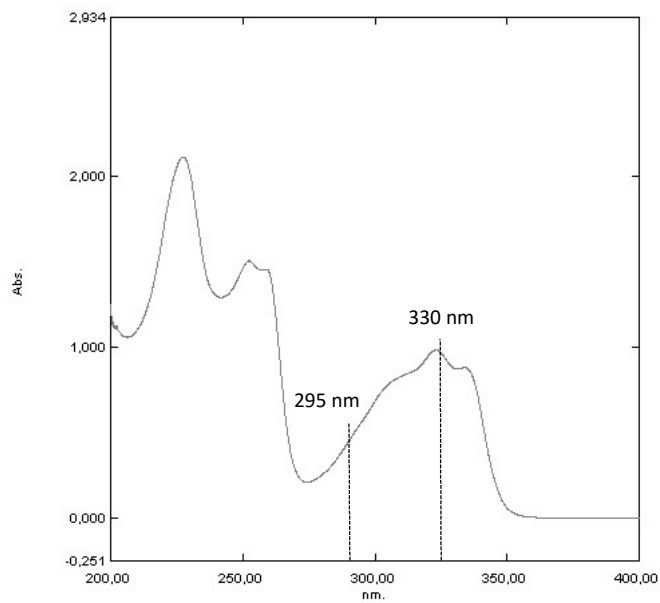


Figura 8: Espectro de UV da impureza A (25 µg/mL) em fase móvel constituída de 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (88:12 v/v).

O espectro do besifloxacino confere com o publicado na patente do medicamento (SHAWER *et al.* 2011).

O comprimento de onda escolhido para a análise simultânea de besifloxacino e impureza A foi 330 nm. O método descrito por COSTA e colaboradores (2014) utilizou 295 nm. Este comprimento de onda não foi utilizado pois não favorecia a análise da impureza A. Na escolha do comprimento de onda a ser utilizado levou-se em consideração um máximo de absorção no espectro de UV da impureza A que não coincidissem com um vale no espectro de absorção do besifloxacino, resultando na escolha de 330 nm.

A avaliação da fase móvel iniciou com a utilização do método proposto no trabalho anteriormente citado. Alterações testadas no decorrer do desenvolvimento do método iniciaram com a possibilidade de retirar a trietilamina, porém a supressão da trietilamina ocasiona excessivo alargamento do sinal cromatográfico. O fator cauda aumentou muito sem a adição da base (1.3 para 2.8).

A partir dos resultados dessas alterações na constituição da fase aquosa decidiu-se manter a adição de 0,5% de trietilamina e ajuste a pH 3,0 com ácido fosfórico. As proporções de fase orgânica e aquosa foram alteradas no decorrer do desenvolvimento do método conforme a coluna utilizada, visando obter adequada retenção e resolução para o besifloxacino e impureza A.

O primeiro teste foi realizado com a coluna C18, utilizando o método desenvolvido por COSTA *et al*, 2014. O pico do besifloxacino eluiu com tempo de retenção de 4,25 min. e, a impureza, de 52,12 min. Como a diferença no tempo de retenção foi muito grande, proporções da fase móvel foram alteradas a fim de conseguir menor tempo de retenção para a impureza A. Alterando apenas este parâmetro, conseguiu-se adiantar o pico da impureza, porém não houve retenção do besifloxacino que eluiu no frente. O cromatograma obtido com a coluna C18, nas condições desenvolvidas por COSTA e colaboradores (2014), está apresentado na Figura 9.

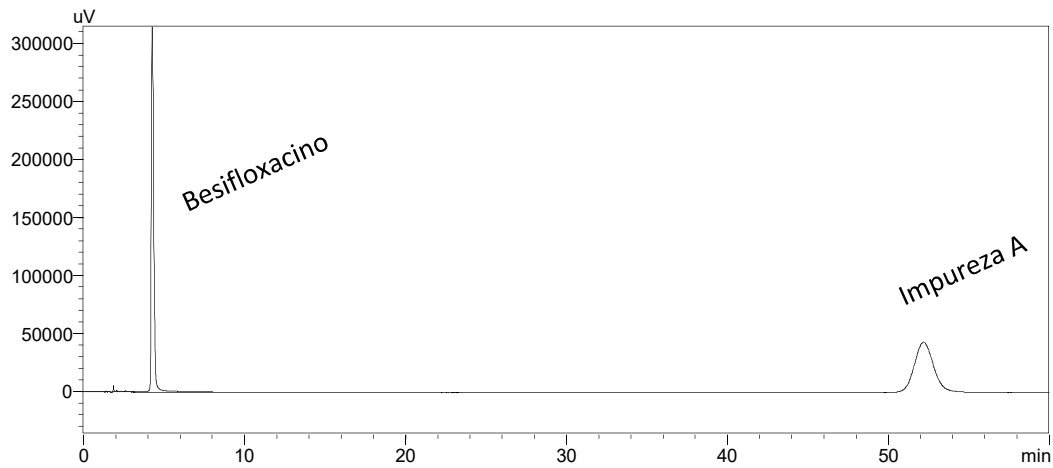


Figura 9: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A obtido com as condições descritas por Costa *et al.* (2013): fase móvel 0,5% trietilamina, pH3,0: acetonitrila (74:26 v/v), coluna C18, vazão 1,0 mL/min e concentração de 100 µg/mL.

Com os insatisfatórios resultados obtidos com a coluna C18, a primeira alteração proposta foi modificar a coluna. Como segunda opção utilizou-se a coluna C8, a qual também é uma coluna de fase reversa, porém possui menor número de carbonos ligados. Assim, apenas com a troca da coluna, a eluição do besifloxacino ocorreu em 3,83 min e da impureza A em 39,05 min. Então, novamente alterou-se as proporções da fase móvel afim de otimizar a eluição dos picos. Com 40% de fase orgânica, a impureza A passou para o tempo de 9,98 min, porém novamente observaram-se problemas, pois o besifloxacino também diminuiu o tempo de retenção para próximo ao fronte (1,95 min). Esta situação obtida com a coluna C8 está apresentada na Figura 10, a qual foi realizada com a proporção de fase móvel constituída por 0,5% TEA (pH 3,0) e acetonitrila (60:40).

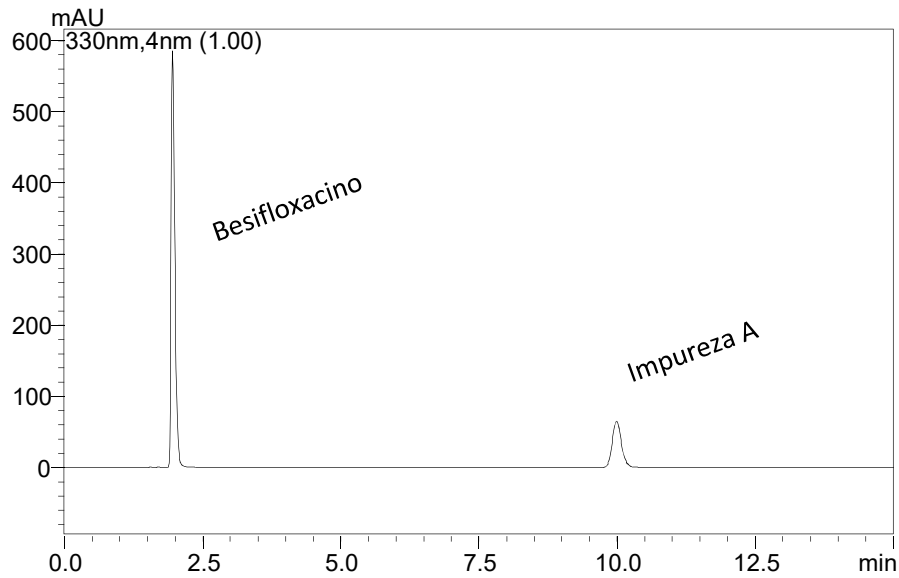


Figura 10: Cromatograma da solução de besifloxacin e impureza A com coluna C8, fase móvel constituída de 0,5% TEA (pH 3.0) e acetonitrila (60:40 v/v), vazão 1,0 mL/min, concentração do besifloxacin e impureza igual a 100 e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Como a coluna C8 também não apresentou resultados satisfatórios, optou-se por utilizar uma coluna com empacotamento diferente, também de fase reversa, porém menos apolar a coluna fenil, a qual apresentou, como melhor resultado obtido, com fase móvel constituída por 0,5% TEA (pH 3.0) e acetonitrila (62:38), o tempo de retenção do besifloxacin de 3,95 min e da impureza A de 18,25 min. O cromatograma obtido com a coluna fenil está apresentado na Figura 11.

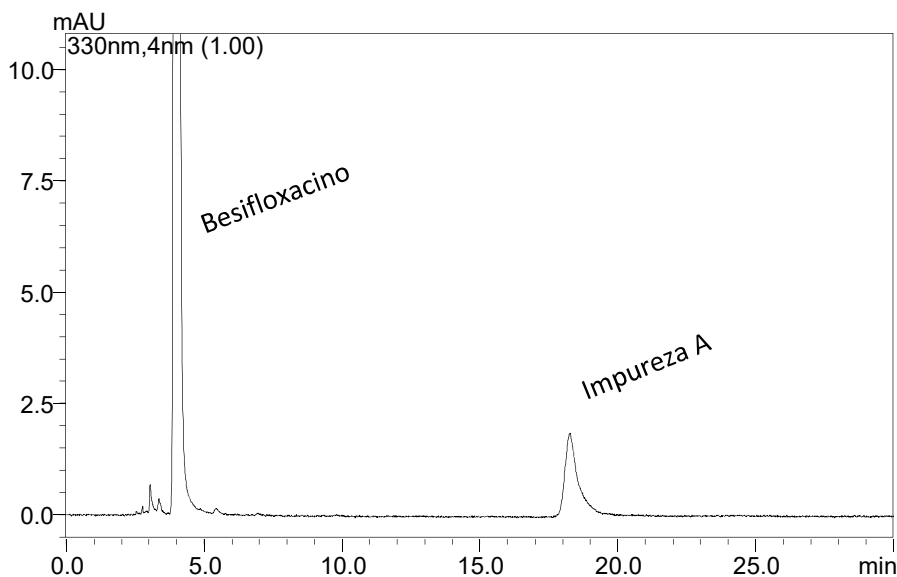


Figura 11: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A com a coluna fenil com fase móvel constituída de 0,5% TEA (pH 3,0) e acetonitrila (62:38) v/v), vazão 1,0 mL/min, concentração do besifloxacino e impureza igual a 50 e 5 µg/mL, respectivamente.

Por último, foi testada a coluna ciano com fase móvel na proporção de 74:26 (0,5% TEA pH 3.0 e acetonitrila). O tempo de eluição do besifloxacino e impureza A foi, respectivamente, de 2,56 e 8,87 min, porém não observou-se pureza do pico do besifloxacino (0,2854).

Assim, nesta coluna foram testadas várias proporções diferentes de fase orgânica e aquosa, desde 45 até 10% de orgânica. No decorrer das análises o principal parâmetro analisado foi o tempo de retenção. Quando alcançou-se 20% de fase orgânica visualizou-se o besifloxacino no tempo de 3,32 min e da impureza A 12,65 min, conforme apresentado na Figura 12. Para a análise somente do besifloxacino e da impureza A, esta proporção mostrava-se promissora, pois o tempo de retenção estava mais apropriado comparado com as outras condições testadas, a pureza do pico do besifloxacino era igual a um e o da impureza estava próximo da unidade. Porém, ao longo do desenvolvimento visualizando os cromatogramas, sempre observou-se a presença de três pequenos picos com tempos de retenção menores que o besifloxacino. A fim de dar atenção a esses picos, aumentou-se um pouco mais a proporção de fase aquosa na eluição dos compostos e obteve-se os tempos de 4,97 min para o besifloxacino e 20,44 min.

para a impureza A, definindo assim a escolha da coluna e a proporção de fase móvel para o método isocrático.

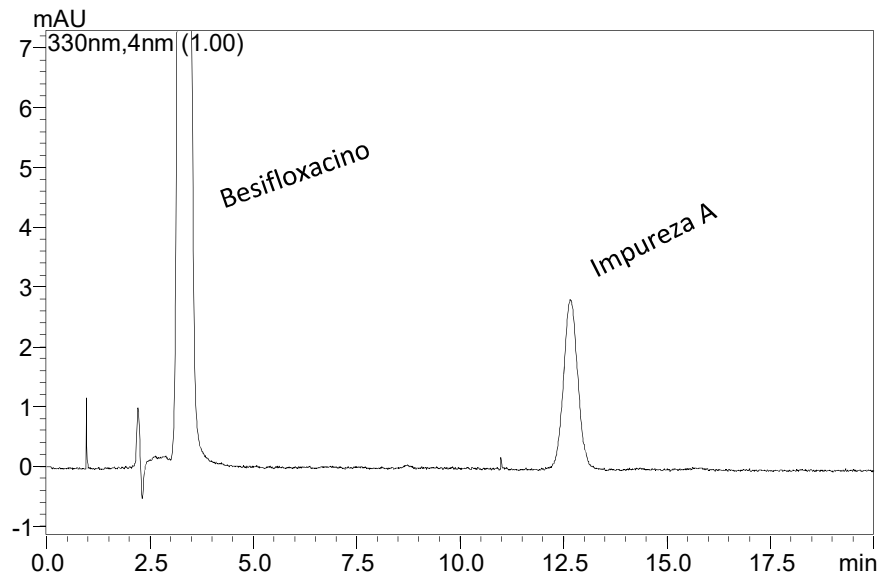


Figura 12: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A com a coluna ciano e fase móvel constituída de 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (80:20 v/v) na concentração igual a 50 µg/mL para o besifloxacino e 5,0 µg/mL para a impureza.

As análises dos volumes de injeção do besifloxacino foram realizadas com a mesma coluna, proporção de fase móvel, vazão, temperatura da coluna indicados no método descrito por COSTA et al., 2014 na concentração de 100 µg/mL. Os volumes foram injetados em duplicatas e os valores médios dos principais parâmetros cromatográficos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados do teste de injeção de diferentes volumes do besifloxacino.

Volume de injeção (µL)	Tempo (min)	Área do pico	Fator cauda	Pratos teóricos
10	4,51	2260507	1.61	5.355
20	4,49	4485715	1.74	4.774
30	4,46	6794201	1.90	4.189
40	4,44	9023723	2.05	3.639
50	4,43	11329702	2.20	3.210

Como esperado, a área do pico aumentou conforme o acréscimo do volume injetado. Os valores do fator cauda e pratos teóricos foram os avaliados com mais critério para a escolha do volume de injeção. Os maiores valores de fator cauda e menor valor de pratos teóricos foram visualizados nos volumes de 40 e 50 μL , descartando assim a possibilidade de utilizar esses no método. O volume de 10 μL foi o que obteve-se menor fator cauda e maior número de pratos teóricos. Porém, levando em consideração que o objeto de análise são as impurezas, as quais se encontram em pequena concentração na matéria-prima ou produto acabado, optou-se por não utilizar um volume tão baixo de injeção. Assim, o escolhido foi o de 20 μL o qual obteve baixo fator cauda comparado aos demais e razoável número de pratos teóricos.

Ainda, quando analisou-se o volume de injeção com a presença da impureza, verificou-se todos parâmetros cromatográficos citados anteriormente, mas principalmente a resolução entre os picos. O método utilizado neste momento da análise está apresentado na Tabela 9.

O cromatograma apresentado na Figura 13 mostra 3 picos mais polares e estes foram associados a impurezas relacionadas, as quais receberam maior atenção nesta etapa. Com o aumento do volume de injeção, a área do pico do besifloxacino e sua base aumentaram também, prejudicando um pouco a resolução entre os sinais. Como a concentração do besifloxacino não pode ser menor devido à proporção da quantidade de impureza, avaliou-se a resolução e visualização destes picos alterando apenas o volume de injeção. Concluiu-se que manter o volume de 20 μL seria o mais indicado para a análise simultânea do besifloxacino, impureza A e ainda as impurezas relacionadas, visto que o acréscimo de volume prejudicou a análise

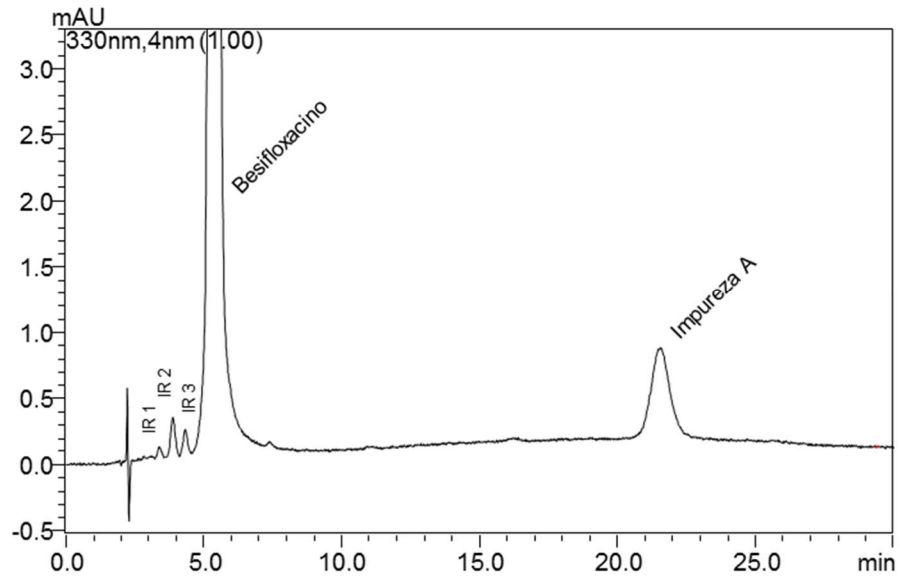


Figura 13: Cromatograma da solução de besifloxacino e impureza A nas concentrações iguais a 200,0 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. IR1, IR2 e IR3 são impurezas relacionadas presentes no besifloxacino as quais possuem pico com resolução de 1,3; 1,7 e 1,4 conforme a ordem de eluição.

5.5. Validação analítica

5.5.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas na validação do método estão apresentadas na Tabela 9. As soluções analisadas por CLAE foram sempre previamente filtradas através de membrana de poro 0,45 μm .

Tabela 9: Condições cromatográficas utilizadas na validação do método analítico por CLAE para determinação de besifloxacino e impureza A com eluição isocrática.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (88:12 v/v)
Vazão	1,0 mL/min
Coluna	GLScience Ciano (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Detecção	Luz ultravioleta com detector de arranjo de diodo. Quantificação em 330 nm com largura de banda espectral de 4 nm.
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	20 µL

5.5.2. Limite de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado sob as condições de análise estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) é descrito como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequados em ensaios quantitativos, principalmente para impurezas e produtos de degradação de fármacos e formas farmacêuticas (BRASIL, 2003). Como o trabalho abrange impurezas, estes parâmetros assumem considerável importância, pois os contaminantes estarão presentes na matéria-prima ou produto acabado em pequenas concentrações. Para estimar o valor experimental dos limites, o ICH preconiza três maneiras diferentes: visual, razão sinal/ruído e através do desvio padrão da resposta e inclinação da reta.

O método visual consiste em preparar soluções com decrescentes concentrações conhecidas do material, de maneira que, quando observar o cromatograma consiga distinguir o sinal obtido do ruído da linha de base (SHABIR, 2003; RIBANI, 2004).

A razão sinal/ruído é utilizada quando pode-se visualizar o ruído da linha de base. Para realizar essa determinação, soluções de diferentes concentrações decrescentes são preparadas e analisadas, comparando o sinal detectado com o ruído da linha de base. As proporções aceitas para limite de detecção e

quantificação são respectivamente 3:1 ou 2:1 e 10:1 (SHABIR, 2003; RIBANI, 2004).

Considerando o método de desvio padrão da resposta, a RDC 899, apresenta as fórmulas para o cálculo do limite de detecção e quantificação como descrito abaixo:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

onde, DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas padrão construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva.

5.5.3. Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Para a forma farmacêutica, este parâmetro foi estudado a partir da análise de uma solução placebo, da suspensão oftálmica do besifloxacino e de soluções do fármaco e da impureza A. Os dados referentes aos excipientes foram obtidos a partir da bula do medicamento Besivance® e, a concentração dos excipientes foi proposta conforme dados da literatura apresentados na Tabela 10 (ROWE *et al.*, 2012).

Tabela 10: Excipientes farmacêuticos presentes na suspensão oftálmica de besifloxacino 0,6 % com suas respectivas porcentagens propostas para a elaboração do placebo.

Excipiente	Porcentagem proposta
Cloreto de benzalcônio	0,01 %
Policarbofila	0,50 %
Manitol	10,00 %
Poloxâmer	15,00 %
Cloreto de sódio	0,45 %
Edetato dissódico dihidratado	0,05 %
Água para injeção	q.s.p. 100%

A solução proposta para o placebo foi preparada conforme a proporção apresentado na Tabela 10. A solução da suspensão oftálmica foi preparada diluindo 2 mL do colírio em fase móvel obtendo concentração final teórica de 265,2 µg/mL para o fármaco. O besifloxacino e a impureza A também foram preparados em fase móvel nas concentrações de 200 e 1,0 µg/mL, respectivamente. Todas as soluções foram filtradas em filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro e posteriormente analisadas no CLAE.

5.5.4. Linearidade

Este parâmetro avalia a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (BRASIL, 2003). A linearidade foi avaliada com o preparo de sete diferentes concentrações do cloridrato de besifloxacino e da impureza A. As curvas do fármaco e da impureza foram preparadas e analisadas separadamente. O intervalo de concentração utilizado para o besifloxacino foi de 140-260 µg/mL, enquanto o da impureza A foi 0,3-2,3 µg/mL.

Como descrito na RDC 899, na determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas o alcance do teste deve ser de 80% a 120% da concentração teórica do analito. Tendo em consideração o máximo de impureza permitido encontrado na matéria-prima, calculou-se a concentração necessária do fármaco para que o método conseguisse detectar a impureza desde seu limite de quantificação até o limite máximo permitido. Para conseguir detectar a impureza nas faixas determinadas, a concentração do fármaco deve ser igual a 200 µg/mL. Este valor foi adotado como ponto médio da curva para o besifloxacino, e concentrações inferiores e superiores foram calculadas para a construção da mesma. Realizou-se o preparo de uma solução estoque a cada dia e as mesmas foram diluídas à sete concentrações finais: 140; 160; 180; 200; 220; 240 e 260 µg/mL.

O preparo de amostra da solução do besifloxacino foi realizado pesando 20 mg de besifloxacino, a cada dia de análise, o qual foi transferido cuidadosamente para balão volumétrico (BV) de 50 mL. A solução resultante possui concentração de 400 µg/mL. Com o auxílio de pipeta automática, alíquotas de 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 mL dessa solução foram transferidos para BV de 10 mL, previamente identificados, e o volume foi completado com fase móvel.

Conforme a legislação vigente, a faixa de concentração para a determinação de impurezas inicia no nível de impureza esperado (calculado conforme os guias ou declarado pelo fabricante) até 120 % do limite máximo especificado. Para uma análise mais detalhada e criteriosa, o menor valor da curva de linearidade da impureza A foi o limite de quantificação. Portanto, a faixa da curva foi calculada tendo como referência o LQ como ponto mínimo e, o recomendado pela legislação como limite máximo. Pelo laudo do fornecedor, o limite máximo de impureza permitido na matéria-prima besifloxacino é de 0,5%. Com esse dado, calculou-se a partir da concentração da amostra de besifloxacino, o máximo de impureza permitido. Sendo 200 µg/mL a concentração do fármaco, o limite máximo da impureza A é de 1,0 µg/mL. Portanto, a faixa analisada incluiu as concentrações de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,3 µg/mL.

O preparo das soluções da impureza, foi realizado pesando 10 mg de impureza A que, com cuidado, foram transferidos para BV de 200 mL. A solução resultante possui concentração de 50 µg/mL. Com o auxílio de pipeta automática, alíquotas de 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 460 µL dessa solução foram transferidas para BV de 10 mL, previamente identificados, e o volume foi completado com fase móvel.

Todas as soluções, tanto do besifloxacino quanto da impureza A, foram filtradas com filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro, e em seguida, procedeu-se a análise cromatográfica. Foram realizadas análises em três dias diferentes e duas leituras de cada amostra.

5.5.5. Precisão

A precisão de um método representa a dispersão de resultados entre experimentos independentes, repetidos de uma mesma amostra, sob condições

definidas. Avalia a proximidade dos resultados em uma série de medidas. A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária

Para realizar esta análise foram preparadas soluções contendo os pontos médios das curvas da linearidade, ou seja, 200 µg/mL para o besifloxacino e 1,0 µg/mL para a impureza A. Foram preparadas 6 soluções independentes em três dias diferentes. Cada amostra foi lida duas vezes. As soluções estoque do besifloxacino e da impureza A foram preparadas separadamente, as substâncias foram pesadas e diluídas com fase móvel. Uma alíquota de cada uma foi adicionada a um balão volumétrico o qual também foi preenchido com fase móvel. Após filtração em filtro de 0,45 µm as amostras foram analisadas em CLAE. O experimento do terceiro dia foi realizado por um analista diferente.

5.5.6. Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Para verificar este parâmetro foram preparadas soluções de besifloxacino e impureza A em concentrações conhecidas e as áreas obtidas foram submetidas à equação da linearidade para assim calcular a concentração experimental. O cálculo da exatidão foi realizado comparando a concentração teórica conhecida com a experimental, conforme cálculo disponível na RDC 899, 2003.

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

O valor da concentração do besifloxacino foi fixada em 200 µg/mL e as concentrações da impureza A foram estudadas em 3 diferentes níveis. Foi realizado adição da impureza A nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL, as quais correspondem à concentração estudada na validação do método e variações de ± 50%. As preparações foram executadas em triplicata. Também foram preparadas soluções individuais de besifloxacino e da impureza A, nas concentrações de 200 e 1,0 µg/m, respectivamente.

5.5.7. Robustez

A robustez do método foi testada através de variações no pH da fase móvel, vazão, temperatura e proporção de acetonitrila e trietilamina na fase móvel. Duas soluções foram preparadas em fase móvel uma contendo 1,0 µg/mL de impureza e outra 200 e 1,0 µg/mL de besifloxacino e impureza A, respectivamente.

5.5.8. Resultados e discussão

Para avaliar o limite de detecção e quantificação da impureza A foram analisadas amostras em concentrações próximas ao esperado, diluindo-as em fase móvel. Foi realizado uma curva de 9 pontos com diluições nas concentrações de 0,2 a 1,0 µg/mL Após o preparo e leitura da curva proposta os resultados foram analisados conforme os cálculos apresentados na RDC 899, pelo método de desvio padrão da resposta. O limite de detecção foi igual a 0,02 µg/mL e o de quantificação 0,07 µg/mL.

Ao injetar soluções nessas concentrações não foram observados picos integrados. Portanto, foram preparadas soluções na faixa de 0,01 – 3,0 µg/mL e, de posse dos cromatogramas, visualizou-se com cuidado que, na concentração de 0,07 µg/mL havia uma alteração na linha de base, conforme apresentado na Figura 14. A proporção sinal/ruído 3:1 foi alcançada nesta concentração.

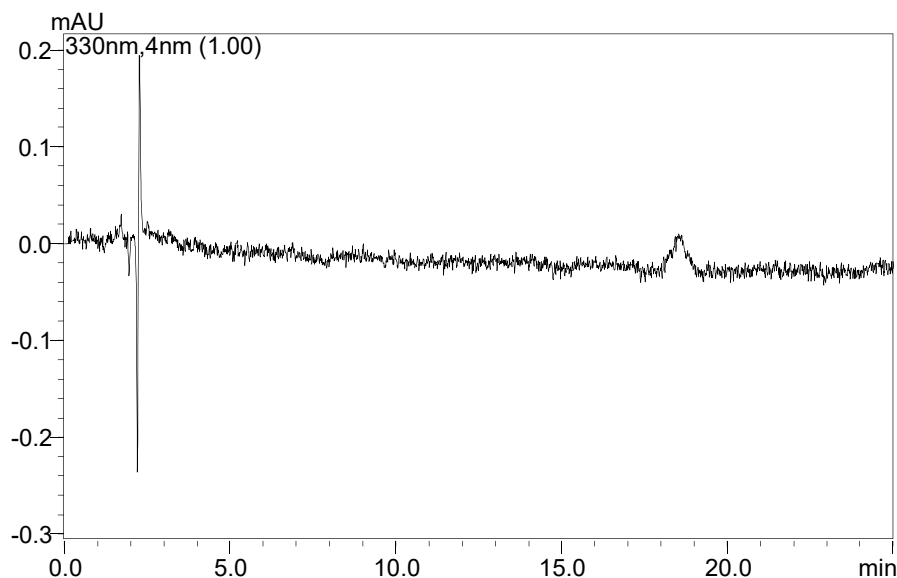


Figura 14: Cromatograma do limite de detecção da impureza A pelo método razão sinal ruído 3:1

O limite de quantificação foi realizado pela relação sinal/ruído 10:1. Essa proporção foi alcançada na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 15 apresenta o cromatograma do limite de quantificação da impureza A.

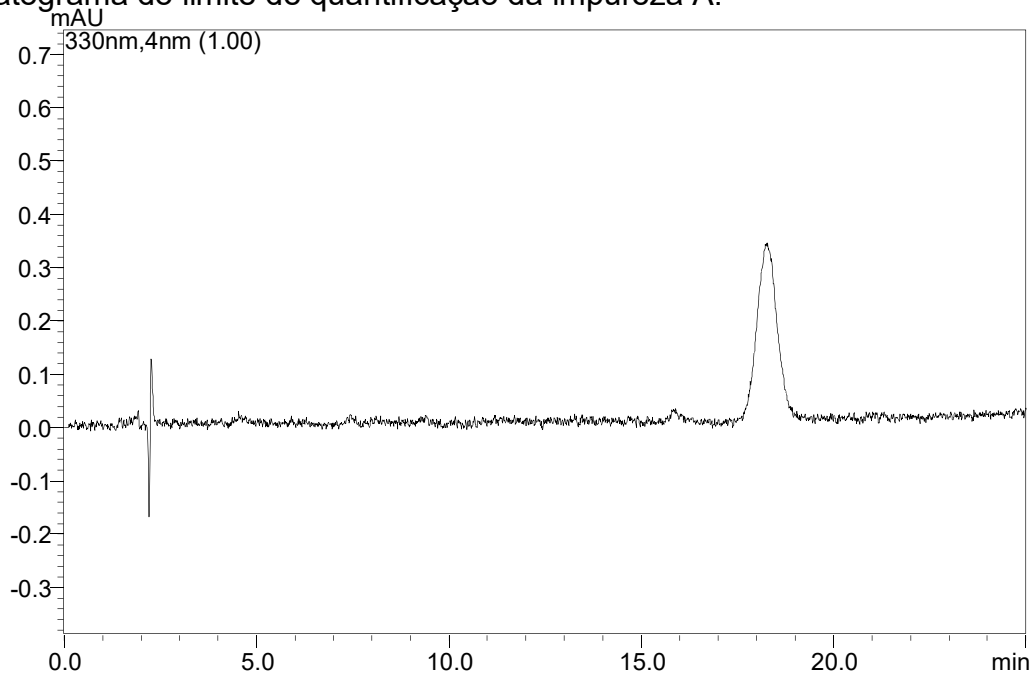


Figura 15: Cromatograma do limite de quantificação da impureza A na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ pelo método sinal/ruído.

As concentrações encontradas para os limites de detecção e quantificação foram então 0,07 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Visto que este é um dado muito importante na análise de impurezas é necessário bastante cautela na análise desta etapa. Como apresentado nos resultados, os métodos existentes não apresentam as mesmas respostas e, ainda é possível ter mais de uma interpretação nos cálculos necessários pois não especifica qual desvio padrão utilizar. Por isso, o conhecimento do método, o cuidado do preparo das amostras e a interpretação dos resultados são passos muito importantes para a determinação destes limites.

Após a determinação do limite de quantificação foi realizada uma precisão em três dias na concentração proposta para o LQ. Os valores estão apresentados na Tabela 11. Os desvios padrões relativos estão dentro dos limites especificados, ou seja menor que 10% para o limite de quantificação conforme ERMER & MILLER, 2006, e abaixo de 20% conforme RIBANI e colaboradores, 2004

portanto o limite de quantificação está adequado para prosseguir as análises da validação.

Tabela 11: Resultados da precisão do limite de quantificação 0,3 µg/mL da impureza A.

	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Áreas	Conc. (µg/mL)	Áreas	Conc. (µg/mL)	Áreas	Conc. (µg/mL)
	8430	0,298	9072	0,317	9149	0,320
	8436	0,298	9069	0,317	9189	0,321
	8501	0,300	9277	0,323	9139	0,319
DPR	0,47	0,40	1,30	1,13	0,29	0,25
	DPR áreas: 3,94			DPR conc.: 3,40		

O cromatograma da solução placebo está apresentado na Figura 16, placebo junto com impureza na Figura 17 e suspensão oftálmica em fase móvel na Figura 18.

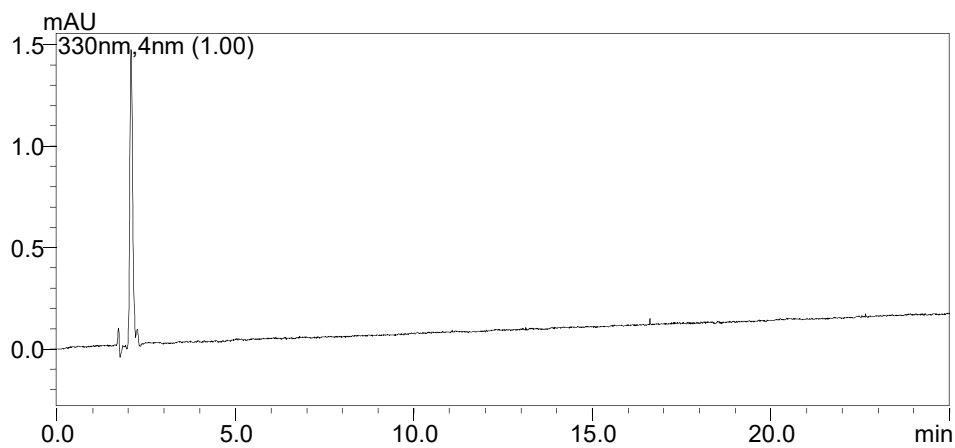


Figura 16: Cromatograma da solução placebo da suspensão oftálmica pelo método cromatográfico com eluição isocrática

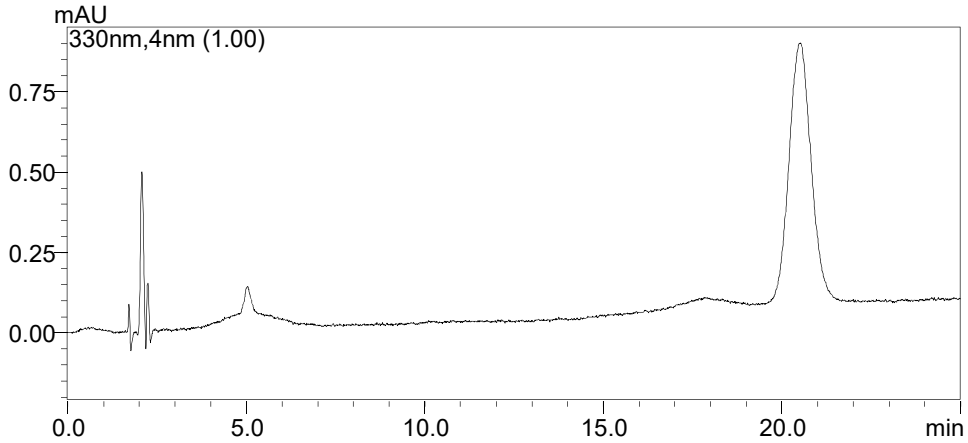


Figura 17: Cromatograma do placebo acrescido da impureza A a 1,0 µg/mL

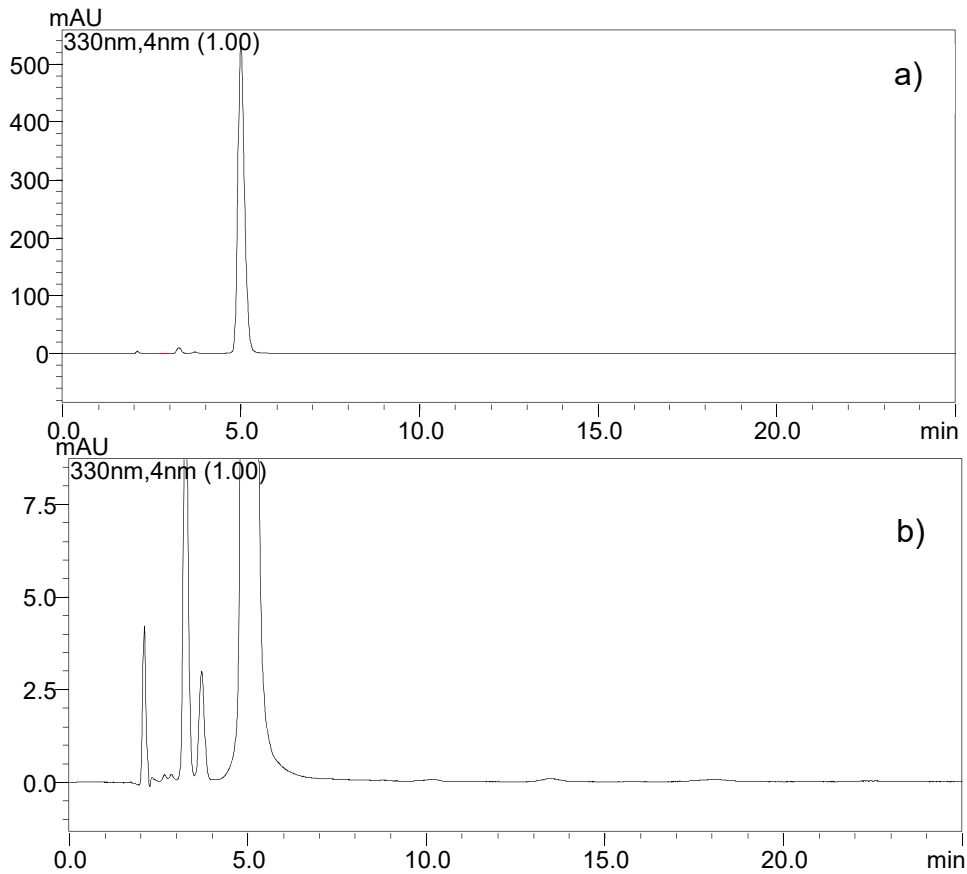


Figura 18: Cromatograma da suspensão oftálmica a 265,2 µg/mL em fase móvel na escala normal (a) e com destaque nas impurezas relacionadas (b)

Como pode-se observar nos cromatogramas apresentados, o método é específico, visto que nenhum componente do placebo interfere na análise de besifloxacino e da impureza A.

No estudo da linearidade, após a injeção das amostras, as áreas foram registradas, e a relação entre concentração e área obtida foi avaliada. Os resultados obtidos no estudo da linearidade do besifloxacino estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores experimentais para curva padrão do besifloxacino obtidos por CLAE no método com eluição isocrática.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração absoluta ($\mu\text{g/mL}$)	Área absoluta ^a	Área média	DPR (%) ^b
140	141,4	3728201	3816535	2,63
	142,1	3925901		
	141,4	3795504		
160	161,6	4361886	4411462	1,99
	162,4	4512703		
	161,6	4359797		
180	181,8	4914745	4961618	1,62
	182,7	5054391		
	181,8	4915717		
200	202,0	5484497	5569865	1,33
	203,0	5611769		
	202,0	5613329		
220	222,2	6051435	6071861	1,97
	223,3	6200267		
	222,2	5963880		
240	242,4	6604403	6637211	1,40
	243,6	6742058		
	242,4	6565172		
260	262,6	7127032	7177242	1,92
	263,9	7333506		
	262,6	7071190		

a: cada valor corresponde à média de duas injeções e provém de um dos 3 dias de análise.

b: o DPR apresentado computa os dados de área nos 3 dias de análise sem correção para as concentrações exatas

A representação da curva padrão, obtida por regressão linear, encontra-se na Figura 20. A equação obtida foi $Y = 27631x - 69908$, e o coeficiente correlação (r) igual a 0,9978, e o de determinação (R^2) 0,9956 ou seja, 99,56% da variação da área pode ser explicada pelo acréscimo da concentração. Existe uma forte relação entre a concentração do analito e a resposta na área do pico cromatográfico. Na estatística do intercepto, o valor de P foi maior que 0,05 ($P=0,43$), o que demonstra que o intercepto não difere estatisticamente da origem.

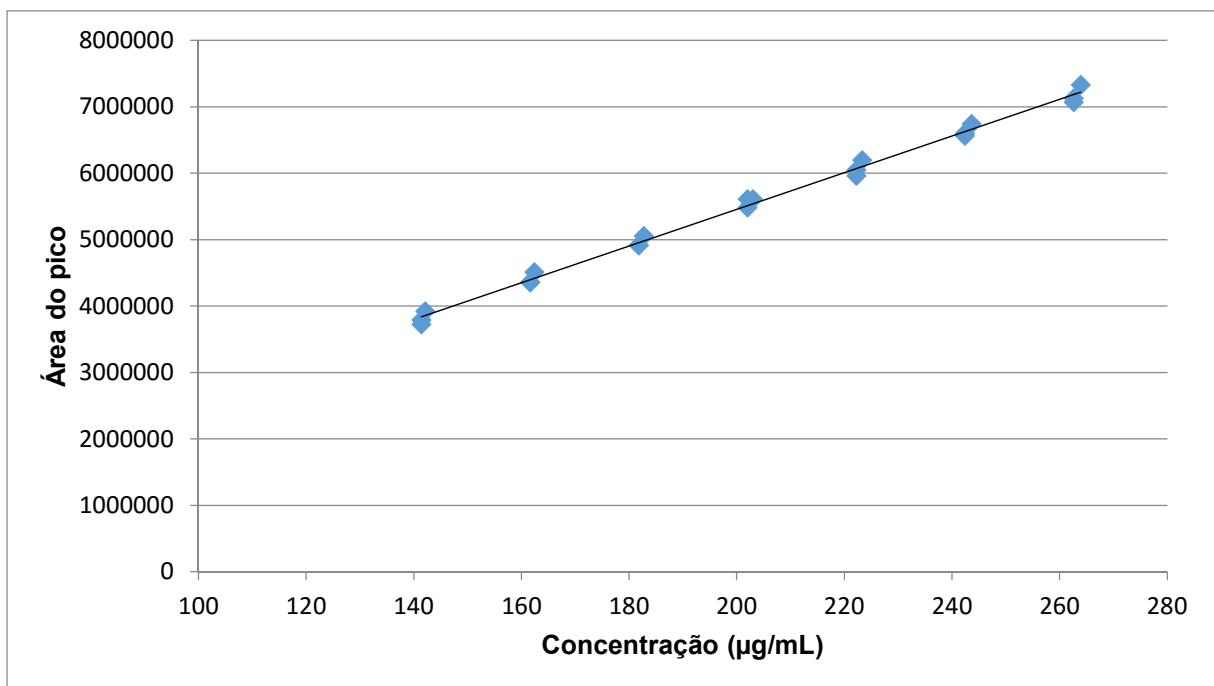


Figura 19: Representação gráfica da curva analítica do besifloxacino por CLAE por eluição isocrática.

Os resíduos constituem a diferença entre os valores experimentais e os valores preditos pela equação da reta, apresentando, assim, uma estimativa do erro da regressão. A análise dos resíduos não apresentou nenhum padrão de distribuição, ou seja, indício de anormalidade pois distribuem-se aleatoriamente, sem apresentar alguma tendência. Observou-se que não há valores entre -2,00 e +2,00%, quando padronizados, caracterizando que não há valores “outliers”

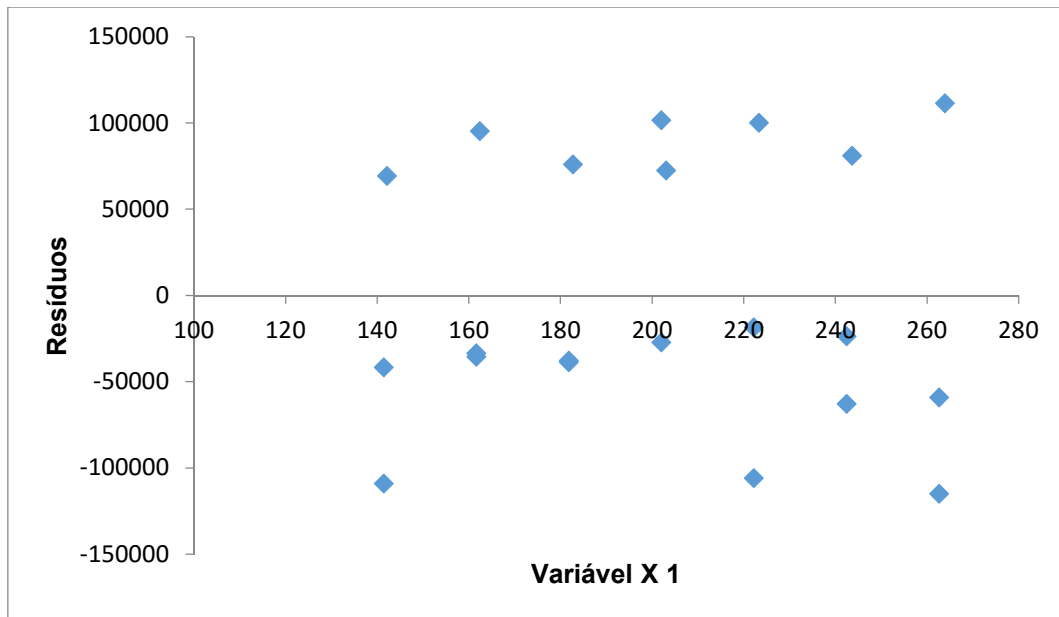


Figura 20: Gráfico dos resíduos da linearidade do besifloxacino por CLAE por eluição isocrática.

A validade do modelo de regressão linear e a significância da estatística da reta ajustada foram também testadas por meio da Análise de Variância (ANOVA). Os valores estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de besifloxacino por CLAE por eluição isocrática..

Fontes de Variação	GI	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	6	$2,623 \cdot 10^{13}$	$4,37 \cdot 10^{12}$	426,73	2,85
Regressão linear	1	$2,622 \cdot 10^{13}$	$2,62 \cdot 10^{13}$	2559,28	4,6
Desvio linearidade	5	$1,115 \cdot 10^{10}$	$2,23 \cdot 10^9$	0,22	2,96
Dentro	14	$1,434 \cdot 10^{11}$	$1,02 \cdot 10^{10}$		
Total	20	$2,638 \cdot 10^{13}$			

A partir dos dados da ANOVA pode-se afirmar que a regressão linear foi significativa, com $F = 2559,28$, e que não ocorreu desvio da linearidade, visto que o F calculado (0,22) para esta fonte de variação foi menor que o F tabelado (2,96).

A linearidade da impureza A foi avaliada na faixa de 0,3 – 2,3 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14

Tabela 14: Valores experimentais para curva padrão da impureza A obtidos por CLAE por eluição isocrática.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração absoluta (µg/mL)	Área absoluta^a	Área média	DPR (%)^b
0,3	0,306	8433	8882	4,40
	0,303	9070		
	0,309	9144		
0,6	0,612	18124	18439	2,03
	0,606	18340		
	0,618	18853		
0,9	0,918	29290	29186	2,99
	0,909	28267		
	0,927	30001		
1,2	1,224	39283	39306	4,75
	1,212	37450		
	1,236	41185		
1,5	1,530	48174	49139	2,53
	1,515	48699		
	1,545	50542		
1,8	1,836	59258	59799	5,10
	1,818	57058		
	1,854	63081		
2,3	2,346	75241	76152	4,57
	2,323	73219		
	2,369	79995		

a: cada valor corresponde à média de duas injeções e provém de um de cada 3 dias de análise..

b: o DPR apresentado computa os dados de área nos 3 dias de análise sem correção para as concentrações exatas.

A representação gráfica da curva padrão, obtida por regressão linear, encontra-se na Figura 22. A equação obtida foi $y = 33182x - 1452,7$, o coeficiente de correlação (r) foi a 0,9982, e o coeficiente de determinação (R^2) 0,9965, ou seja, 99,65% da variação da área pode ser explicada pelo acréscimo de concentração. Existe uma forte relação entre a concentração do analito e a resposta na área do pico cromatográfico

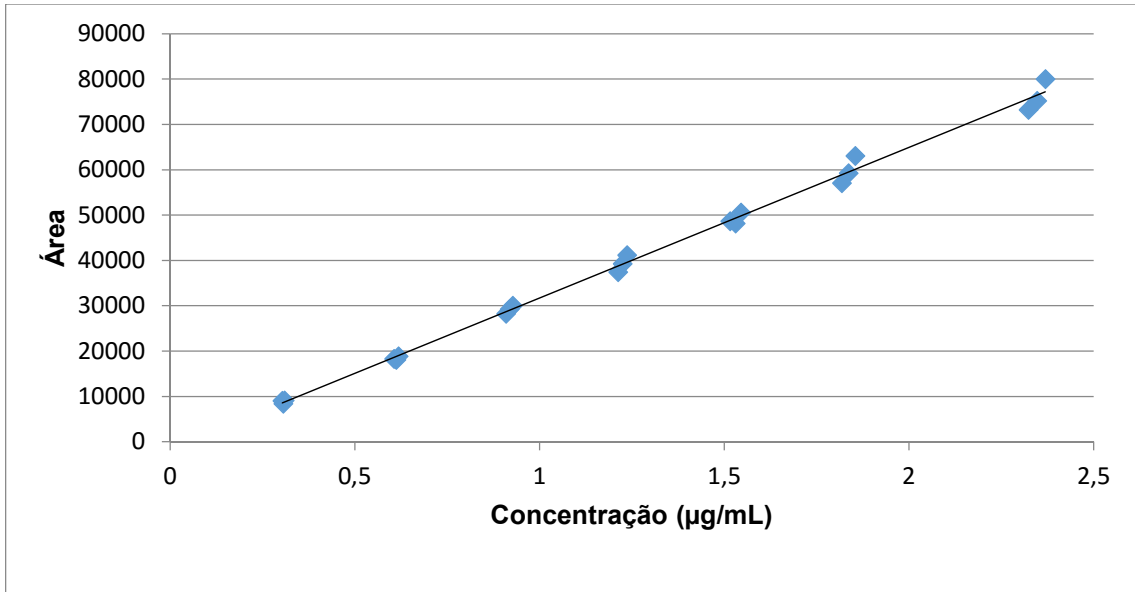


Figura 21: Representação gráfica da curva analítica da impureza A por CLAE com eluição isocrática.

Os resíduos foram avaliados a fim de verificar a confiabilidade dos resultados da regressão linear. O gráfico dos resíduos está apresentado na Figura 23. Os resultados demonstram que houve certa tendência de heterocedasticidade, e na análise dos mesmos padronizados dois valores da maior concentração ficaram ligeiramente superiores a faixa de $\pm 2,00$ (2,26 e 2,13), porém como a diferença foi pequena, não se considerou como um “outlier”.

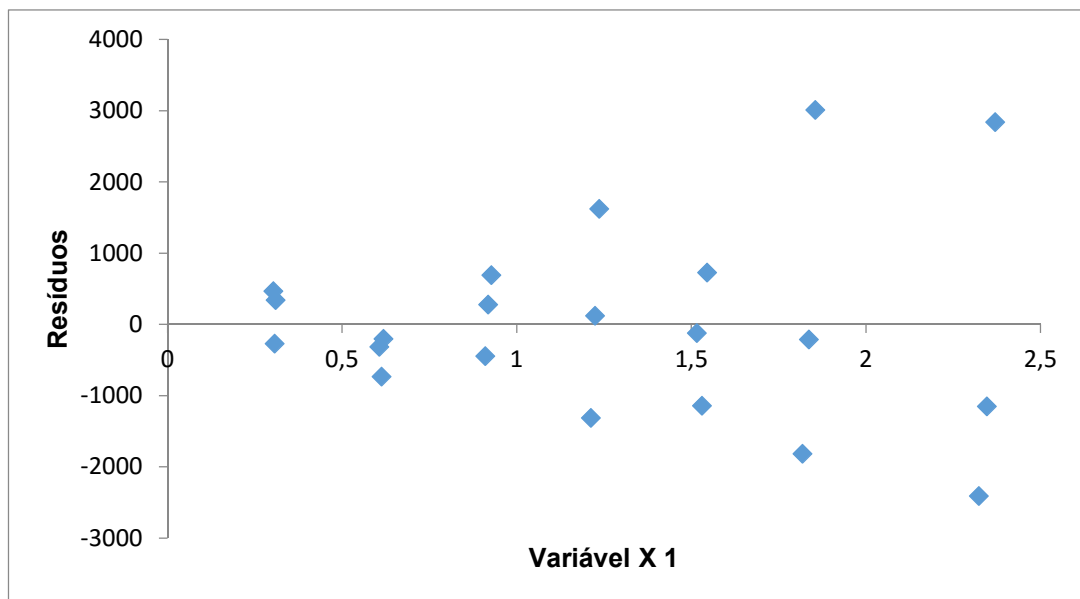


Figura 22: Gráfico dos resíduos da linearidade da impureza A por CLAE por eluição isocrática

O modelo de regressão linear foi avaliado pela ANOVA, os valores estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da impureza A por CLAE por eluição isocrática.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	6	$9,999 \cdot 10^9$	$1,67 \cdot 10^9$	424,63	2,85
Regressão linear	1	$9,998 \cdot 10^9$	$1,00 \cdot 10^{10}$	2547,41	4,6
Desvio linearidade	5	$1,368 \cdot 10^6$	$2,74 \cdot 10^5$	0,07	2,96
Dentro	14	$5,494 \cdot 10^7$	$3,92 \cdot 10^6$		
Total	20	$1,005 \cdot 10^{10}$			

Analisando os dados obtidos na ANOVA visualizou-se que a regressão foi significativa com $F = 2547,41$, o que demonstra que o modelo linear descreve os resultados obtidos experimentalmente. O desvio da linearidade também foi analisado, tendo como resultado o F calculado (0,07) menor que o F tabelado (2,96), o que indica um resultado satisfatório, ou seja, que não ocorreu desvio.

Avaliando-se que a última concentração da curva da linearidade da impureza A poderia ser suprimida a fim de melhorar a avaliação dos resultados, a curva com seis pontos no intervalo de 0,3 a 1,8 $\mu\text{g/mL}$ apresentou equação da reta igual a $y = 33344x - 1586,7$ e coeficiente de determinação (R^2) 0,9963. Ao verificar os resíduos padronizados um valor da concentração de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ ficou fora do intervalo de -2 a 2 (2,54) e, no gráfico dos resíduos diminuiu a presença de tendência observada anteriormente na curva com os 7 pontos. O desvio da linearidade foi satisfatório pois o F calculado (0,11) foi menor que o F tabelado (3,26).

Os valores experimentais obtidos na análise da linearidade da impureza A foram mais satisfatórios na faixa de 0,3 – 1,8 $\mu\text{g/mL}$, o coeficiente de correlação foi condizente com o valor especificado na legislação. A análise de resíduos e ANOVA também demonstraram confiabilidade nos dados obtidos pelo método proposto.

A Tabela 16 apresenta os resultados do estudo da precisão do besifloxacino. Os valores de DPR de cada dia foram menores que 2%, indicando

que o método possui repetibilidade. A precisão intermediária foi avaliada calculando o DPR de todas as 18 análises dos três dias. O valor igual a 1,21 demonstra que o método está adequado pois está dentro dos limites de aceitação dos órgãos vigentes.

Os resultados da análise da precisão da impureza A estão apresentados na Tabela 16. Como pode-se visualizar os DPR da impureza são maiores que o do besifloxacino. Quando analisa-se traços ou impurezas, devido à pequena concentração do analito, são aceitos desvios de até 20%, dependendo da complexidade da amostra, conforme RIBANI e colaboradores, 2004. E, ERMER & MILLER, 2006 apresentam como critério de aceitação valores $\leq 10\%$ para o limite de quantificação. Como os desvios encontrados foram inferiores a 10% considera-se que o método possui precisão inter e intra-dia aceitáveis.

Tabela 16: Resultados da precisão do besifloxacino e da impureza A por eluição isocrática por CLAE

	Besifloxacino			Impureza A		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Áreas	5505467	5651957	5482386	25827	28251	29719
	5493841	5522378	5489055	24152	27237	27472
	5550705	5557669	5466922	25666	27519	25772
	5545378	5634612	5649203	27912	24239	27306
	5698330	5531834	5545091	29814	30401	27566
	5541375	5479038	5580299	28493	27267	28911
Média	5572516	5562915	5535492	26977	27486	27791
DPR	1,32	1,21	1,27	7,82	7,23	4,94
Média Geral		5556974			27418	
DPR		1,21			6,47	

Tabela 17: Resultados do estudo de exatidão do besifloxacino e impureza A por eluição isocrática por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Média Áreas Besifloxacino	Concentração obtida		Concentração (µg/mL)	Média áreas impureza A	Concentração obtida	
		pela curva da linearidade (µg/mL)	%			pela curva da linearidade (µg/mL)	%
200	5342215	195,87	97,94	0,5	16728	0,55	107,43
200	5327919	195,35	97,68	1.0	34147	1,07	105,18
200	5368374	196,82	98,41	1.5	50329	1,56	102,00
Besifloxacino 200	5365222	196,70	98,35	Impureza 1.0	32888	1,03	101,46

Como observou-se na Tabela 17, os percentuais de recuperação para a impureza A foram satisfatórios pois apresentaram valores inseridos na faixa de 80-110%, comprovando que o método apresenta recuperação adequada, ou seja, é exato, para o nível de concentração estudada.

Também pode-se analisar a exatidão avaliando os valores das concentrações comparadas ao seu respectivo padrão. Determinando as concentrações esperadas e as áreas obteve-se valores de recuperação do besifloxacino iguais a 99,57; 99,30 e 100,06% e, da impureza A de 101,73; 103,83 e 102,02% para as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL, respectivamente.

Nas Tabelas 18 e 19 estão apresentados os dados obtidos na análise da robustez do besifloxacino e da impureza A, respectivamente

Tabela 18: Desvios % dos parâmetros cromatográficos do besifloxacino decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE isocrático.

Condição		Tempo de retenção (min)	Diferença (%) ^(b)	Área	Diferença (%)	Fator cauda	Diferença (%)	Número de pratos teóricos	Diferença (%)
Nominal^(a)		4,99		5570028		1,283		3173	
pH fase móvel	2,9	5,26	5,38	5584137	0,25	1,235	-3,74	3232	1,87
	3,1	5,21	4,37	5580490	0,19	1,262	-1,60	3202	0,92
%TEA	0,4	4,93	-1,28	5582764	0,23	1,301	1,44	3080	-2,93
	0,6	5,25	5,12	5581284	0,20	1,245	-2,96	3204	0,98
Vazão (mL/min)	0,9	5,57	11,59	6184748	11,04	1,300	1,33	3400	7,16
	1,1	4,55	-8,86	5062113	-9,12	1,276	-0,55	3012	-5,07
T(°C)	24	5,07	1,50	5564403	-0,10	1,283	0,04	3092	-2,55
	26	4,98	-0,30	5563622	-0,12	1,287	0,31	3218	1,43
0,5% TEA : ACN	87:13	5,30	6,13	5569732	-0,01	1,273	-0,74	3229	1,78
	89:11	5,30	6,13	5561965	-0,14	1,304	1,68	3138	-1,10

a) pH 3,0; 0,5% TEA; Vazão 1.0 mL/min; 25 °C; 0,5 %TEA:TEA (88:12 v/v)

b) Diferença percentual (%): [(valor alteração – valor nominal)] / valor nominal x 100

Tabela 19: Desvios % dos parâmetros cromatográficos da impureza A decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE isocrático.

Condição		Tempo de retenção (min)	Diferença (%) ^(b)	Área	Diferença (%)	Fator cauda	Diferença (%)	Número de pratos teóricos	Diferença (%)	Teor	Diferença (%)
Nominal^(a)		20,20		33642		1,093		5407		103,49	
pH fase móvel	2,9	20,39	0,95	34588	2,81	1,130	3,43	5276	-2,42	105,97	2,40
	3,1	20,36	0,76	34642	2,97	1,135	3,89	5292	-2,13	106,30	2,72
%TEA	0,4	20,38	0,88	33970	0,97	1,163	6,45	5322	-1,57	102,96	-0,51
	0,6	20,38	0,86	34463	2,44	1,098	0,46	5118	-5,33	103,63	0,14
Vazão (mL/min)	0,9	22,61	11,93	33848	0,61	1,100	0,64	6145	13,65	99,48	-3,87
	1,1	18,41	-8,85	29672	-11,80	1,073	-1,83	5140	-4,93	91,44	-4,71
T(°C)	24	20,67	2,34	30662	-8,86	1,090	-0,23	5563	2,89	98,62	-2,12
	26	20,01	-0,94	31702	-5,77	1,082	-1,01	5633	4,18	101,30	-2,12
0,5% TEA : ACN	87:13	18,85	-6,67	31689	-5,81	1,107	1,28	5787	7,04	99,51	-3,85
	89:11	21,69	7,37	31148	-7,41	1,065	-2,52	5430	0,43	99,85	-3,52

a) pH 3,0; 0,5% TEA; Vazão 1.0 mL/min; 25 °C; 0,5 %TEA:TEA (88:12 v/v)

b) Diferença percentual (%): [(valor alteração – valor nominal)] / valor nominal x 100

Os resultados foram avaliados comparando os valores da condição normal do método com os obtidos nas alterações propostas. O desvio ou diferença percentual foi calculado pois permite comparação entre variáveis com diferentes unidades. Observa-se que, como esperado, quando modifica-se a vazão, os tempos de retenção alteram, assim como os valores das áreas. Os outros parâmetros não apresentaram grandes variações que comprometam a análise do besifloxacino e da impureza A. Pode-se avaliar que o método é robusto frente às pequenas variações nas condições propostas no método

**6. Capítulo III: Desenvolvimento e validação de método analítico com
eluição gradiente**

6.1. Desenvolvimento do método

O método desenvolvido no Capítulo I apresentou resultados satisfatórios porém, tempo de análise de 25 minutos. Este tempo não é interessante na rotina das análises do setor de controle de qualidade, pois cada vez mais há interesse em diminuir o tempo e assim otimizar as análises. O desenvolvimento do método gradiente foi realizado com os mesmos componentes para fase aquosa e fase orgânica empregados no modo isocrático, ou seja, 0,5% de trietilamina (pH 3,0) e acetonitrila. Iniciou-se a avaliação com diferentes rampas de eluição partindo de proporções de fase orgânica de 10 a 20%, chegando ao máximo de 26 e 30%. Os cromatogramas obtidos, nesta etapa, não foram adequados para a análise simultânea do besifloxacino e impureza A, pois em algumas condições o besifloxacino eluiu próximo ao fronte e, em outras, o tempo de acondicionamento à condição inicial não apresentou eficiência, devido ao pouco tempo de retorno à proporção inicial dos componentes da fase móvel.

Analisando os primeiros estudos realizados, decidiu-se iniciar com a condição apresentada no método descrito no capítulo anterior. Na proporção de fase móvel de 0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila (88:12 v/v) observou-se os picos das impurezas relacionadas menos retidos pela coluna. Afim de preservar a visualização de eluição desses picos no cromatograma, manteve-se essa proporção para o início da análise e alterou-se a concentração máxima de fase orgânica para 35 e 40%. O tempo para retornar à condição inicial foi aumentado para quase 5 min para garantir as condições de partida na próxima injeção. A proporção de 40% de fase orgânica foi definida como valor máximo pois foi observado maior número de pratos teóricos comparado a 35%. As diferentes proporções testadas no desenvolvimento do método estão apresentadas na Figura 23

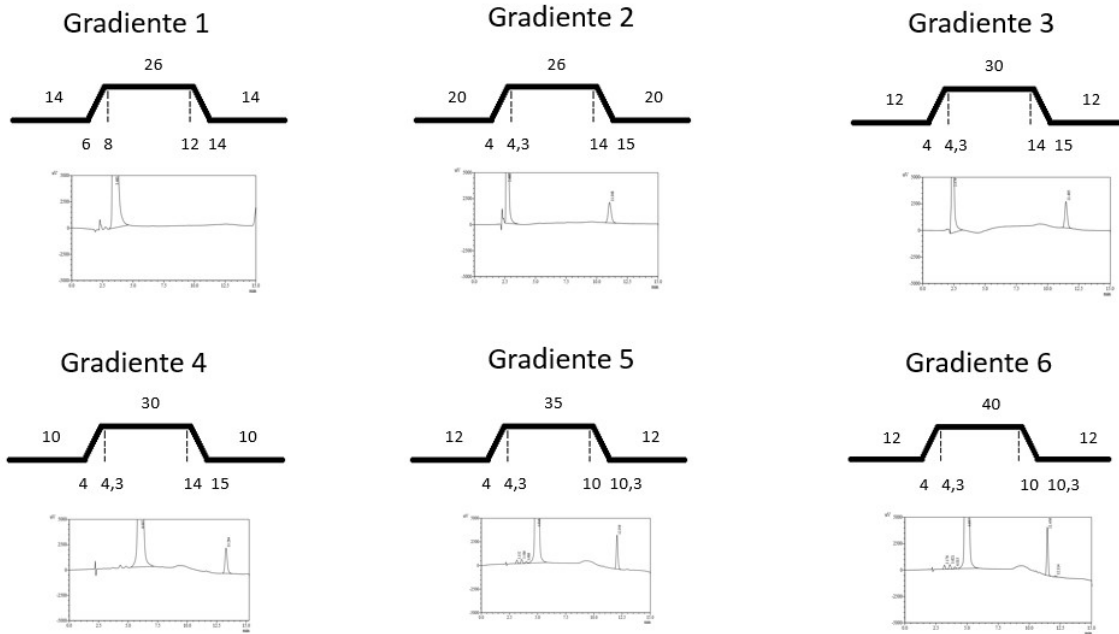


Figura 23: Gradientes testados durante o desenvolvimento do método com seu respectivos cromatogramas.

6.2. Validação analítica

6.2.1. Condições cromatográficas

Na análise do método por eluição gradiente a filtração das amostras também foi realizada em filtros de membrana de poro 0,45 μm . Na Tabela 20 estão apresentadas as condições cromatográficas definidas para a validação do método.

Tabela 20: Condições cromatográficas utilizadas na validação do método analítico por CLAE para determinação de besifloxacino e impureza A por eluição gradiente.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	0,5% de trietilamina (pH 3,0) : acetonitrila em modo gradiente (*)
Vazão	1,0 mL/min
Coluna	GLScience Ciano (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Detecção	Luz ultravioleta com detector de arranjo de diodo. Quantificação em 330 nm com largura de banda espectral de 4 nm.
Temperatura	25°C
Volume de injeção	20 µL

* proporção apresentada na Tabela 21.

Tabela 21: Programação do gradiente dos solventes utilizada na validação do método cromatográfico.

Tempo (min)	% Fase aquosa	% Fase orgânica	Eluição
	0,5% de trietilamina (pH 3,0)	Acetonitrila	
0 → 4.0	88	12	Isocrática
4.0 → 4.3	88 → 60	12 → 40	Gradiente
4.3 → 10.0	60	40	Isocrática
10.0 → 10.3	60 → 88	40 → 12	Gradiente
10.3 → 15.0	88	12	Isocrática

6.2.2. Limite de Detecção e de Quantificação

A determinação dos valores dos limites de detecção e de quantificação foram realizados pelo método cromatográfico com eluição isocrática apresentado no Capítulo II. Considerou-se os valores de 0,07 e 0,3 µg/mL para detecção e quantificação, respectivamente. Este parâmetro foi calculado pelo método isocrático devido à estabilidade da linha de base. Como a estimativa pela curva não demonstrou eficácia, a determinação foi realizada pela relação sinal/ruído, a qual é melhor visualizada no método isocrático

6.2.3. Especificidade

A especificidade do método foi estudada analisando uma solução placebo frente à suspensão oftálmica, ao besifloxacino e a impureza A. Os dados referentes ao placebo foram retirados da bula do medicamento e, o método de preparo está especificado no item 5.5.3. do Capítulo II. As soluções de besifloxacino e impureza A foram preparadas em fase móvel na concentração de 200 µg/mL de besifloxacino e 1,0 µg/mL de impureza A. Todas as soluções foram filtradas em filtro de 0,45 µm de poro e posteriormente analisadas por CLAE.

6.2.4. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da análise de curvas separadas do besifloxacino e da impureza A. As determinações utilizadas para o besifloxacino foram realizadas com 7 níveis nas concentrações finais iguais a 140, 160, 180, 200, 220, 240 e 260 µg/mL. Essas soluções foram preparadas em fase móvel como descrito no item 5.5.4, Capítulo II. O preparo das soluções da impureza A, também apresentadas no referido capítulo, foram realizadas obtendo concentrações finais de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,3 µg/mL.

Todas as soluções foram filtradas com filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro e posteriormente analisadas por CLAE conforme o método descrito para eluição gradiente no item 6.2.1.

6.2.5. Precisão

A análise da dispersão dos resultados foi avaliada com preparo independente das soluções de besifloxacino e impureza A. O medicamento com besifloxacino na concentração de 200 µg/mL e a impureza a 1,0 µg/mL foram diluídos em fase móvel. Foram preparadas 6 soluções estoques em três diferentes dias, sendo que no terceiro dia o preparo foi realizado por outro operador. As amostras foram filtradas e, as áreas de duas injeções de cada solução foram analisadas posteriormente.

6.2.6. Exatidão

As soluções utilizadas no experimento da exatidão foram preparadas diluindo as substâncias em fase móvel. A concentração do besifloxacino foi fixada em 200 µg/mL e a impureza foi adicionada nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL. O preparo foi realizado em triplicata para cada nível de análise. Também foram analisadas separadamente uma solução a 200 µg/mL de besifloxacino e a 1,0 µg/mL de impureza A.

6.2.7. Robustez

Este parâmetro foi avaliado a partir do preparo de soluções de impureza A a 1,0 µg/mL e de besifloxacino e impureza A nas concentrações iguais a 200 e 1,0 µg/mL, respectivamente. As modificações propostas ao método foram: pH da fase móvel, temperatura e proporção de trietilamina na fase móvel.

6.2.8. Resultados e discussão

A especificidade do método foi avaliada analisando uma solução placebo frente a suspensão oftálmica e ao padrão do besifloxacino e impureza A. Na Figura 24 está apresentado o cromatograma da solução placebo da suspensão oftálmica na escala que visualizou-se as impurezas e, na Figura 25 o cromatograma da impureza A adicionada ao placebo. A Figura 26 apresenta o cromatograma da suspensão oftálmica na escala normal e ampliada para melhor visualização das impurezas

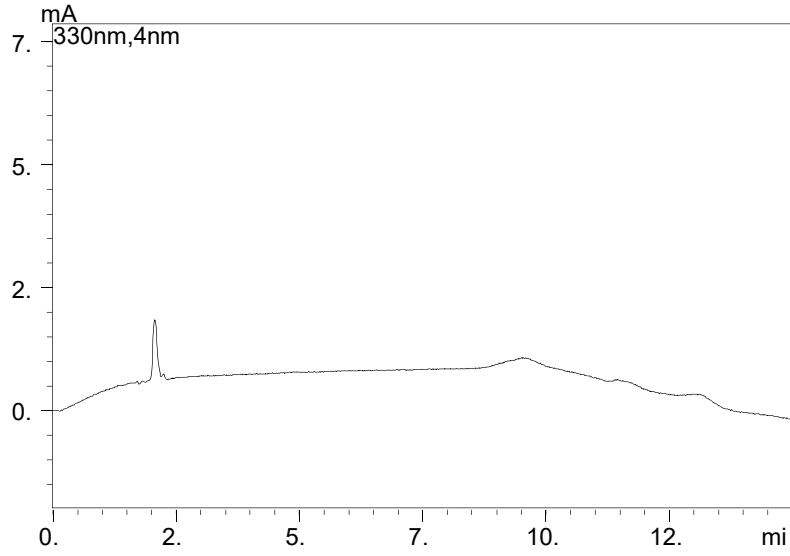


Figura 24: Cromatograma da solução placebo da suspensão oftálmica B pelo método cromatográfico com eluição gradiente.

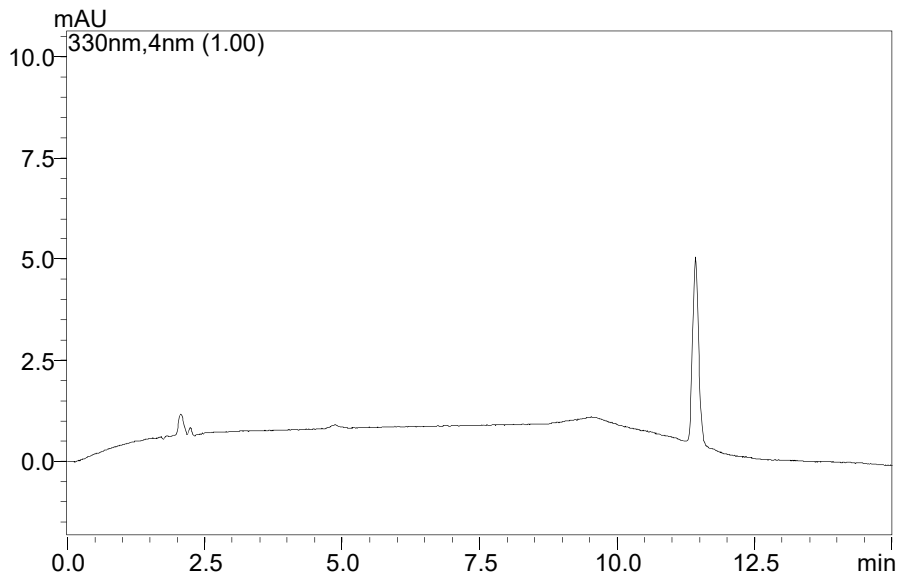


Figura 25: Cromatograma da solução do placebo adicionada da impureza A na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$

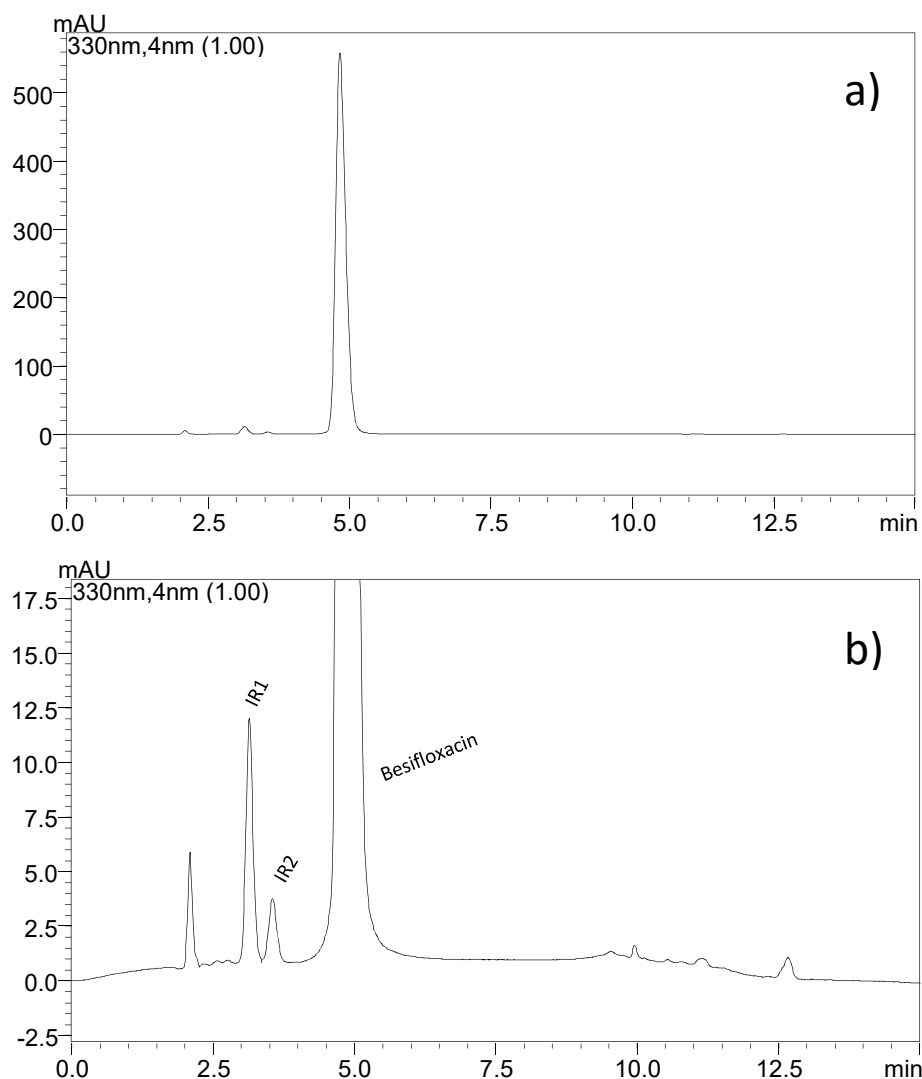


Figura 26: Cromatograma da suspensão oftálmica na escala normal (a) e ampliada para melhor visualização das impurezas relacionadas (b). O picos apresentados possuem pureza igual a 1 e a resolução de 1,7; 1,8 para as IR1 e IR2 e igual a 4,02 para o besifloxacino.

Os cromatogramas apresentados demonstram a especificidade do método. Assim como na eluição isocrática, o placebo não interferiu na análise de besifloxacino e impureza A na suspensão oftálmica. Foi observado boa resolução entre os sinais observados e a pureza de pico foi igual a 1.0 para o besifloxacino e impureza A em todos os cromatogramas obtidos na especificidade.

A linearidade do besifloxacino, realizada com 7 diferentes concentrações, apresentou os resultados descritos na Tabela 22

Tabela 22: Valores experimentais para curva padrão do besifloxacino obtidos por CLAE no método com eluição gradiente.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração absoluta (µg/mL)	Área absoluta^a	Área média	DPR (%)^b
140	141,4	3809820	3933187	2,72
	142,1	3996661		
	140,7	3993081		
160	161,6	4456571	4487942	2,31
	162,4	4603897		
	160,8	4403358		
180	181,8	5024641	5085971	1,28
	182,7	5154517		
	180,9	5078756		
200	202,0	5613232	5641420	1,51
	203,0	5737109		
	201,0	5573920		
220	222,2	6197088	6287452	1,25
	223,3	6340418		
	221,1	6324850		
240	242,4	6766952	6835472	0,98
	243,6	6900252		
	241,2	6839214		
260	262,6	7311382	7495629	2,31
	263,9	7520006		
	261,3	7655499		

a: cada valor corresponde à média de duas injeções e provém de um dos três dias de análise.

b: o DPR apresentado computa os dados de área nos 3 dias de análise sem correção para as concentrações exatas

O gráfico da curva padrão, obtido por regressão linear, encontra-se na Figura 27. A equação obtida foi $y = 29317x - 241102$ e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9947, ou seja, 99,47% da variação da área pode ser explicada pelo acréscimo da concentração de besifloxacino. Existe uma forte relação entre a concentração e a resposta na área do pico cromatográfico.

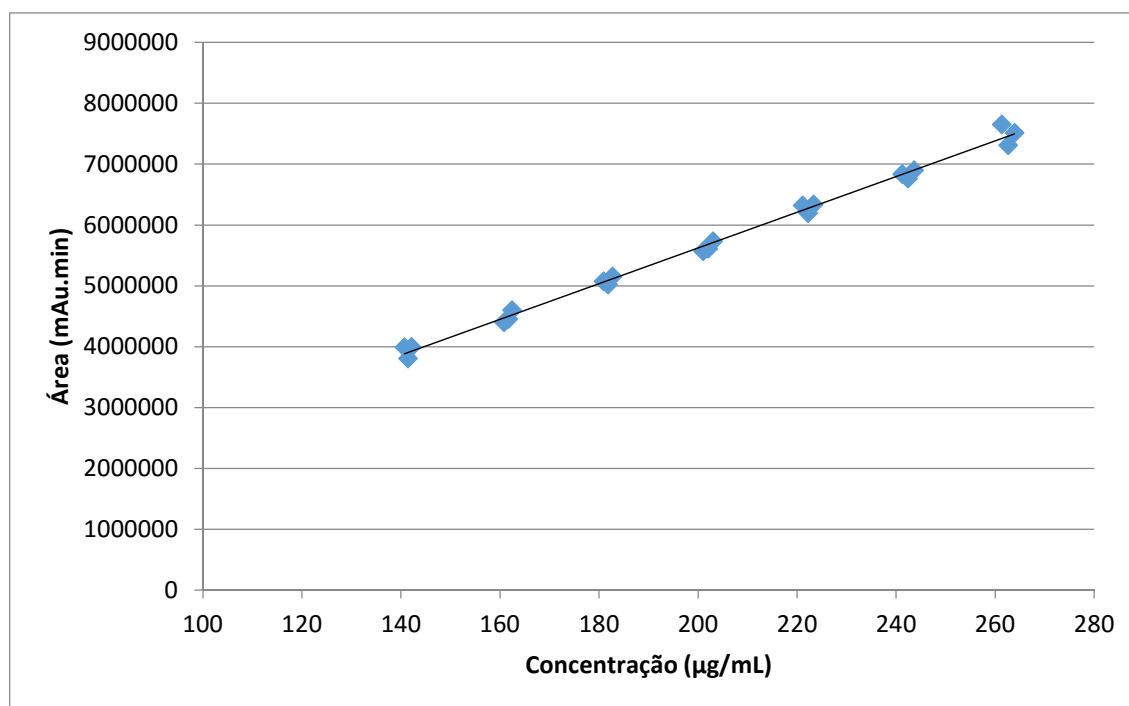


Figura 27: Representação gráfica da curva analítica do besifloxacino por CLAE com eluição gradiente.

A análise dos resíduos gerou o gráfico apresentado na Figura 28, no qual pode-se visualizar que não ocorreu formação de nenhuma tendência. Nos resíduos padronizados apenas um valor ficou entre -2,0 e 2,00, na concentração de 260 µg/mL (2,65). Analisando o valor de P, foi observado que o intercepto difere estatisticamente da origem ($P=0,03$), pois foi inferior a 0,05. Entretanto, o valor da área correspondente a origem foi próximo a 2% (2,1%), portanto pode-se considerar que não há interferência na validação (CARR & WAHLICH, 1990).

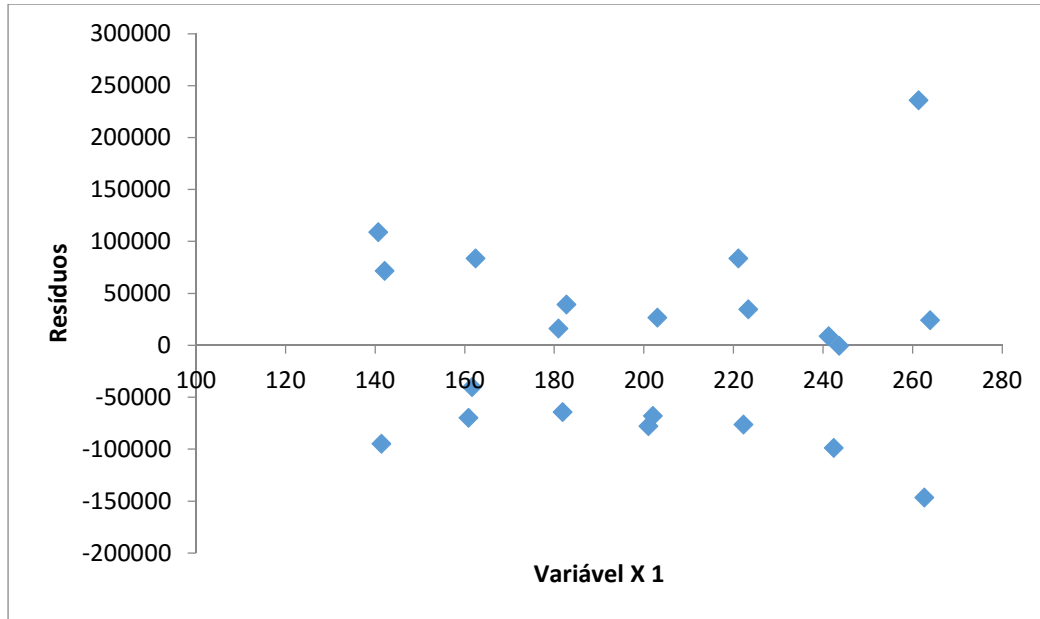


Figura 28: Gráfico dos resíduos da linearidade do besifloxacino por CLAE com eluição gradiente.

A regressão linear e a significância da estatística da reta ajustada foram testadas por meio da ANOVA. Os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão de besifloxacino por CLAE por eluição gradiente.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	6	$2,948 \cdot 10^{13}$	$4,91 \cdot 10^{12}$	462,26	2,85
Regressão linear	1	$2,947 \cdot 10^{13}$	$2,95 \cdot 10^{13}$	2772,17	4,6
Desvio linearidade	5	$1,507 \cdot 10^{10}$	$3,01 \cdot 10^9$	0,28	2,96
Dentro	14	$1,488 \cdot 10^{11}$	$1,06 \cdot 10^{10}$		
Total	20	$2,963 \cdot 10^{13}$			

Observando os dados gerados pela ANOVA, pode-se verificar que a regressão foi significativa, com $F = 2772,17$, o que demonstra que o modelo linear descreve os resultados do experimento. Também pode-se observar que não houve desvio da linearidade, visto que o F calculado (0,28) foi menor que o F tabelado (2,96). O coeficiente de correlação está coerente com a legislação vigente e analisando os resíduos visualiza-se que o último ponto da curva poderia ser suprimido para melhorar os indicadores de avaliação. Suprimindo a última

concentração não se observa valores de resíduos padronizados superiores a 2. A linearidade realizada para análise do besifloxacino por CLAE com eluição gradiente demonstrou ser eficaz para o método proposto. De posse dos resultados pode-se afirmar que, na faixa de 140 – 260 $\mu\text{g/mL}$ o método é linear, porém ao chegar próximo a concentração máxima da curva da linearidade deve-se ter mais cuidados.

A linearidade da impureza A realizada na faixa de 0,3 – 2,3 $\mu\text{g/mL}$ apresentou como resultados os valores descritos na Tabela 24.

Tabela 24: Valores experimentais para a curva padrão da impureza A obtida por CLAE com eluição gradiente.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração absoluta ($\mu\text{g/mL}$)	Área absoluta ^a	Área média	DPR (%) ^b
0,3	0,306	10201	10442	2,00
	0,303	10556		
	0,309	10568		
0,6	0,612	20590	20936	2,52
	0,606	20673		
	0,618	21544		
0,9	0,918	32430	32081	2,09
	0,909	31307		
	0,927	32506		
1,2	1,224	43761	42874	2,34
	1,212	41784		
	1,236	43076		
1,5	1,530	53260	53056	1,19
	1,515	52349		
	1,545	53559		
1,8	1,836	64343	63630	2,81
	1,818	61594		
	1,854	64953		
2,3	2,346	81842	81559	2,20
	2,323	79642		
	2,369	83193		

a: cada valor corresponde à média de duas injeções e provém de um dos 3 dias de análise.

b: o DPR apresentado computa os dados de área nos 3 dias de análise sem correção para as concentrações exatas

A Figura 29 apresenta o gráfico da curva padrão, obtida por regressão linear. A equação da reta obtida foi $y = 34837x - 144,9$. O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9993, o que corresponde que 99,93% da variação da área pode ser explicada pelo acréscimo na concentração. Há correlação entre a concentração do analito e a resposta na área do pico cromatográfico. O valor de P para a significância do intercepto foi superior a 0,05 (0,64), o que demonstra que o intercepto não difere estatisticamente da origem.

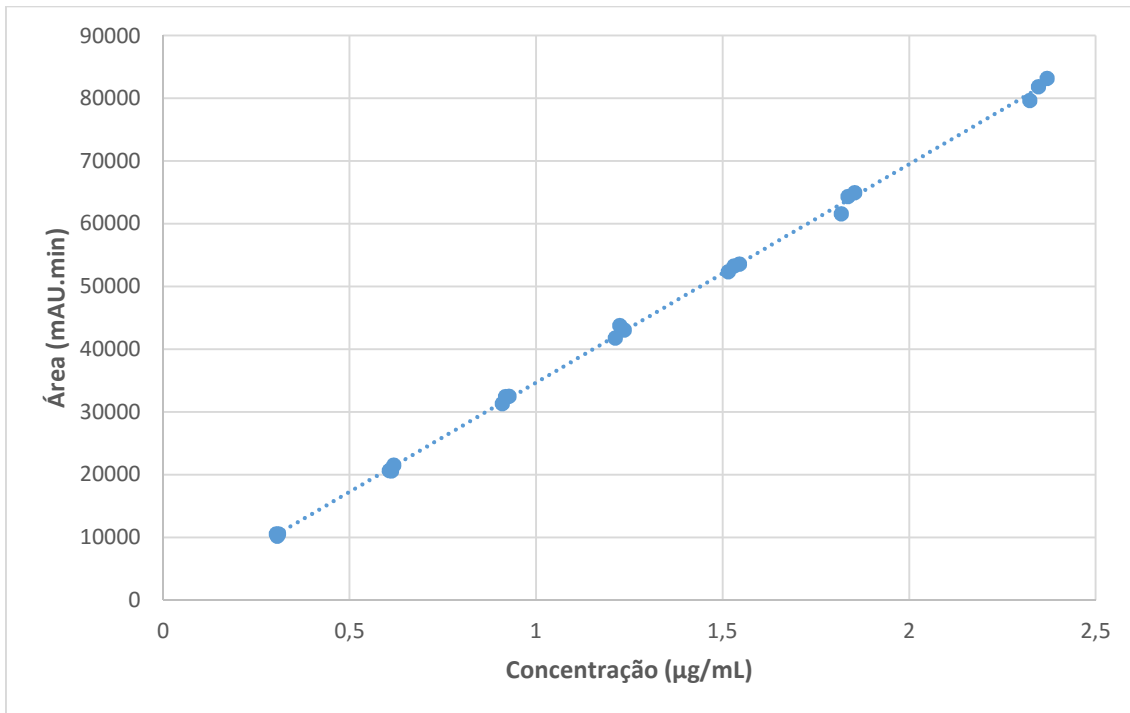


Figura 29: Representação gráfica da curva analítica da impureza A por CLAE com eluição gradiente.

Para complementar a estatística dos resultados, os resíduos foram avaliados. Na Figura 30 está apresentado o gráfico no qual pode-se visualizar que não houve formação de nenhuma tendência. E os resíduos padronizados não apresentaram valores entre -2,0 e 2,0

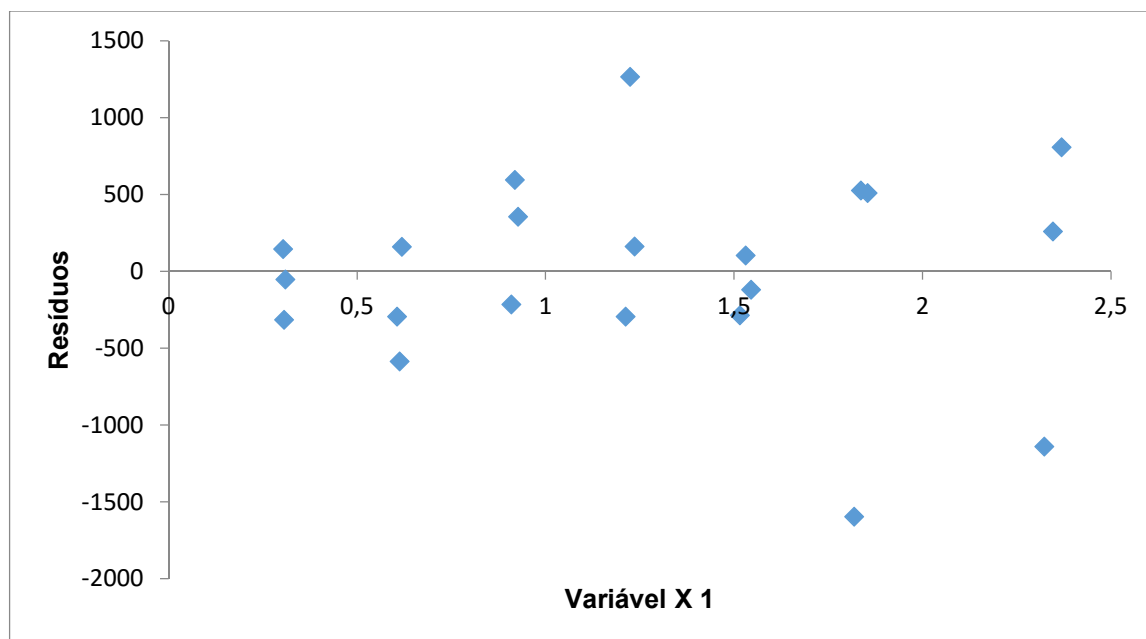


Figura 30: Gráfico dos resíduos da linearidade da impureza A por CLAE com eluição gradiente.

Os valores obtidos na análise da ANOVA estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da impureza A por CLAE pelo método gradiente.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	6	$1,1033 \cdot 10^{10}$	$1,84 \cdot 10^9$	1497,80	2,85
Regressão linear	1	$1,1032 \cdot 10^{10}$	$1,10 \cdot 10^{10}$	8986,01	4,6
Desvio linearidade	5	$9,3315 \cdot 10^5$	$1,87 \cdot 10^5$	0,15	2,96
Dentro	14	$1,7188 \cdot 10^7$	$1,23 \cdot 10^6$		
Total	20	$1,1051 \cdot 10^{10}$			

Os resultados da ANOVA demonstraram que, como de interesse, a regressão foi significativa pois observou-se $F = 8986,01$. Este valor demonstra que o modelo linear descreve os resultados obtidos experimentalmente. Para avaliar o ajuste do modelo, o valor tabelado de 2,96 foi superior ao calculado (0,15), o que significa que o método é satisfatório, ou seja, não há desvio na linearidade

A partir das análises dos valores da linearidade da impureza A por eluição gradiente visualizou-se resultados satisfatórios. Os valores na faixa de 0,3 – 2,3 µg/mL demonstraram característica linear, com coeficiente de determinação igual a 0,9993, ou seja, dentro dos limites especificados. A análise dos resíduos também demonstrou validade nos resultados obtidos.

Na Tabela 26 estão apresentados os valores da precisão do método por eluição gradiente do besifloxacino e da impureza A.

Tabela 26: Resultados da precisão do besifloxacino e da impureza A por eluição gradiente por CLAE

	Besifloxacino			Impureza A		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Áreas	5585063	5712761	5563236	28404	30403	32985
	5570240	5595279	5563374	26590	28762	29380
	5633859	5631755	5548435	28603	29329	31317
	5621595	5706360	5730640	30862	25901	29262
	5791632	5608062	5622337	32528	32583	29270
	5609292	5557265	5667985	30448	29389	30419
Média	5635280	5635247	5616001	29572	29394	30439
DPR	1,42	1,11	1,28	7,15	7,42	4,90
Média Geral	5628843			29802		
DPR	1,21			6,36		

Constata-se nos valores apresentados, que o DPR foi inferior a 2% tanto para a precisão inter-dia quanto intra-dia para o besifloxacino, demonstrando a precisão do método para o fármaco nas condições do experimento.

O intervalo aceitável do desvio padrão relativo para impurezas possui maior valor devido às baixas concentrações das soluções analisadas. São aceitos desvios de até 20%, dependendo da complexidade da amostra, conforme RIBANI e colaboradores, 2004. E, ERMER & MILLER, 2006 apresentam como critério de aceitação valores $\leq 10\%$ para o limite de quantificação. Portanto, com os valores obtidos experimentalmente, pode-se concluir que o método por CLAE com eluição gradiente também é preciso na análise da impureza A.

Os resultados expostos na Tabela 27 apresentam os valores experimentais da análise da exatidão

Tabela 27: Resultados do estudo de exatidão do besifloxacino e impureza A por CLAE com eluição gradiente.

Concentração (µg/mL)	Média Áreas Besifloxacino	Concentração obtida		Concentração (µg/mL)	Média áreas impureza A	Concentração obtida	
		pela curva da linearidade (µg/mL)	%			pela curva da linearidade (µg/mL)	%
200	5638548	200,55	100,03	0,5	20075	0,58	111,62
200	5614301	199,73	99,61	1.0	37768	1,09	104,64
200	5619076	199,89	99,70	1.5	55463	1,60	102,32
Solução referência				Solução referência			
Besifloxacino	5591643	198,95	99,23	Impureza	35441	1,02	104,64
200				1.0			

Os resultados da exatidão se mostraram satisfatórios pois os valores se encontram dentro dos especificados para a adição de 1,0 e 1,5 µg/mL. Porém, na adição mais próxima ao limite de quantificação a recuperação foi pouco acima do preconizado, o que demonstra que deve-se ter cuidado nas análises dos resultados. Pois, conforme os critérios de aceitação da exatidão do AOAC,2000, a recuperação média deve estar entre 80-110%.

Outra maneira de avaliar a exatidão é comparar as concentrações esperadas com as experimentais frente a um padrão. A recuperação para o besifloxacino no método gradiente foi igual a 100,84; 100,40 e 100,49%, enquanto da impureza A foi de 113,29. 106,57 e 104,33% referente à concentração de 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL, respectivamente.

Os resultados experimentais da análise da robustez do besifloxacino e impureza A por CLAE com eluição gradiente estão apresentadas nas Tabelas 28 e 29

Tabela 28: Desvios % dos parâmetros cromatográficos do besifloxacino decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE gradiente.

Condição		Tempo de retenção (min)	Diferença (%) ^(b)	Área	Diferença (%)	Fator cauda	Diferença (%)	Número de pratos teóricos	Diferença (%)
Nominal^(a)		4,85		5647538		1.279		2802	
pH fase móvel	2,9	5,08	4,66	5677236	0,53	1.224	-4,30	3056	9,08
	3,1	5,03	3,62	5668412	0,37	1.262	-1,37	2967	5,89
%TEA	0,4	4,72	-2,65	5678007	0,54	1.291	0,90	2961	5,70
	0,6	4,85	0,01	5642434	-0,09	1.280	0,08	2809	0,25
T(°C)	24	4,91	1,12	5663742	0,29	1.284	0,35	2775	-0,94
	26	4,81	-0,90	5659085	0,20	1.282	0,20	2819	0,62

a) pH 3,0; 0,5% TEA; Vazão 1.0 mL/min; 25 °C; 0,5 %TEA:TEA (88:12 v/v)

b) Diferença percentual (%): [(valor alteração – valor nominal)] / valor nominal x 100

Tabela 29: Desvios % dos parâmetros cromatográficos da impureza A decorrentes das alterações deliberadas no teste de robustez empregando o método por CLAE gradiente.

Condição		Tempo de retenção (min)	Diferença (%) ^(b)	Área	Diferença (%)	Fator cauda	Diferença (%)	Número de pratos teóricos	Diferença (%)	Teor	Diferença (%)
Nominal^(a)		11,40		35469		1.246		44943		102,21	
pH fase móvel	2,9	11,38	-0,15	30298	-14,58	1.096	-12,00	53835	19,78	88,83	-13,09
	3,1	11,37	-0,25	30429	-14,21	1.097	-11,96	52697	17,25	88,05	-13,85
%TEA	0,4	11,37	-0,25	35990	1,47	1.260	1,12	49030	9,09	103,35	1,12
	0,6	11,40	-0,06	35468	0,00	1.252	0,52	45190	0,55	101,87	-0,33
T(°C)	24	11,46	0,50	35551	0,23	1.246	0,00	43296	-3,66	100,35	0,69
	26	11,35	-0,44	35664	0,55	1.261	1,20	45148	0,46	102,92	0,69

a) pH 3,0; 0,5% TEA; Vazão 1.0 mL/min; 25 °C; 0,5 %TEA:TEA (88:12 v/v)

b) Diferença percentual (%): [(valor alteração – valor nominal)] / valor nominal x 100

Os resultados da robustez foram avaliados comparando os valores na condição normal do método com as variações propostas. Pode-se verificar que na eluição gradiente o pH da fase móvel demonstrou ser um ponto crítico na análise da impureza A. As outras alterações não demonstraram interferir no método proposto

7. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DAS IMPUREZAS RELACIONADAS

A eluição isocrática é aquela na qual a força cromatográfica da fase móvel permanece constante durante toda a separação. A eluição por gradiente, é aquela na qual a composição da fase móvel varia durante a separação, de modo que a força cromatográfica aumenta gradativamente (COLINS, BRAGA, BONATTO, 2006). Essas definições são amplamente conhecidas nas análises por CLAE e, ao estudar peculiaridade de cada um, pode-se otimizar o método a fim de analisar as substâncias de interesse de maneira mais eficaz.

A eluição isocrática é o modo preferido de trabalho devido a simplicidade, conveniência e repetitividade das análises. O uso do gradiente permite análises mais rápidas e capazes de separar compostos com faixas mais amplas de hidrofobicidade quando comparadas as metodologias com eluição isocrática. Um exemplo seria a análise de amostras complexas para as quais se necessita reduzir o tempo de eluição dos compostos de interesse com diferentes polaridades. No uso de eluição gradiente deve-se considerar que a configuração da instrumentação analítica é mais exigente, há maiores problemas no ruído da linha de base. Assim, além da atenção com a pureza dos solventes, a transferência de método entre diferentes equipamentos pode apresentar variabilidades. Vale destacar que alguns prejuízos podem ocorrer no desempenho final da análise cromatográfica, especialmente em casos de insuficiente volume ou inadequada homogeneização da fase móvel, como a deformação da banda cromatográfica, e também devido à diferença da força de interação da mistura da fase móvel com a coluna. Deve-se considerar que na eluição gradiente a regeneração da coluna antes da próxima análise é necessária, e este retorno às condições iniciais pode implicar num acréscimo de tempo e consumo de fase móvel entre cada análise (COLINS, BRAGA, BONATTO, 2006; DOS SANTOS NETO, 2011).

Tendo em vista que a análise simultânea do besifloxacino e impureza A por CLAE com eluição isocrática totalizou 25 minutos, optou-se por também desenvolver um método que possibilitasse a análise dos dois compostos em menor tempo. Neste sentido, a eluição gradiente foi avaliada e após alterações nas proporções da fase móvel, obtiveram-se as condições metodológicas que

viabilizam a análise dos dois compostos no tempo de 15 minutos, conforme apresentado no Capítulo III. A diferença entre os métodos foi apenas o modo de eluição, ou seja, os outros parâmetros como vazão, temperatura e coluna permaneceram inalterados.

Após a análise dos dados da validação dos dois métodos pode-se concluir que os resultados de linearidade, precisão, exatidão e robustez estão dentro dos limites preconizados nos guias existentes. Todos os parâmetros da validação foram satisfatórios, tanto na análise do besifloxacino quanto da impureza A. A preocupação com a linha de base no método gradiente foi monitorada constantemente visto que impurezas estão presentes em pequenas concentrações, e isto não poderia ser uma adversidade para o método, visto que não se pode confundir uma alteração na linha de base devido à eluição com a presença de impurezas. Na avaliação da impureza A, as áreas e, o fator cauda foram semelhantes. Observou-se alteração no tempo como esperado, e também no número de pratos teóricos, cujo valor obtido pelo modo isocrático foi na ordem de 5 mil, enquanto no modo gradiente foi na ordem de 45 mil, ou seja, obteve-se maior eficiência cromatográfica com alteração da composição da fase móvel durante a eluição.

No decorrer do trabalho foi visualizada a presença de três picos constantes nos cromatogramas do besifloxacino. Avaliou-se a área das impurezas de 24 injeções de soluções da matéria prima besifloxacino e relacionou-se as mesmas com a área do pico principal, por normalização de área, nos comprimentos de onda de 245 e 330 nm, o máximo de absorção do besifloxacino e o selecionado para realizar o trabalho, respectivamente. O valor médio das áreas e o valor percentual de cada impureza estão apresentados na Tabela 30

Tabela 30: Resultados da análise das áreas e percentuais das impurezas relacionadas do besifloxacino em modo isocrático e gradiente.

Isocrático						
Detecção		Besifloxacino	IR1	IR2	IR3	Impureza A
245 nm	Área	10780582	34612	25056	8223	0
	%	99,37	0,32	0,23	0,08	0
330 nm	Área	5687960	41439	30862	8460	0
	%	98,60	0,72	0,54	0,15	0
Gradiente						
Detecção		Besifloxacino	IR1	IR2	IR3	Impureza A
245 nm	Área	11072137	70933	58904	35328	0
	%	98,53	0,63	0,52	0,31	0
330 nm	Área	5773695	41007	31189	8268	0
	%	98,62	0,70	0,53	0,14	0

Os cromatogramas da suspensão oftálmica, besifloxacino e impureza A e placebo estão apresentados na Figura 31. Pode-se visualizar os picos das impurezas relacionadas presentes no besifloxacino, assim como no produto acabado. E, na Figura 32, estão dispostos os espectros ultravioleta obtidos no DAD por CLAE das impurezas relacionadas

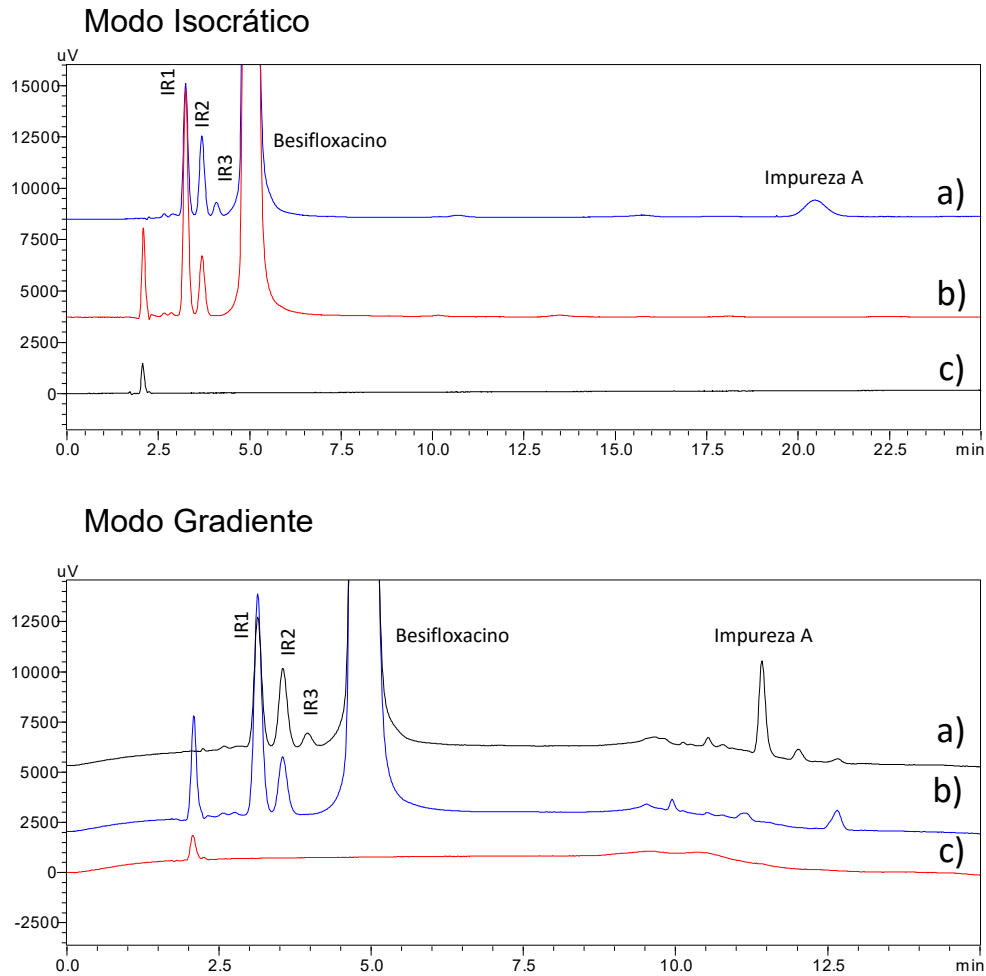


Figura 31: Cromatograma das soluções besifloxacino e impureza A nas concentrações de 200,0 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (a); suspensão oftálmica a 265,2 $\mu\text{g/mL}$ (b) e placebo (c) nos modos isocrático e gradiente.

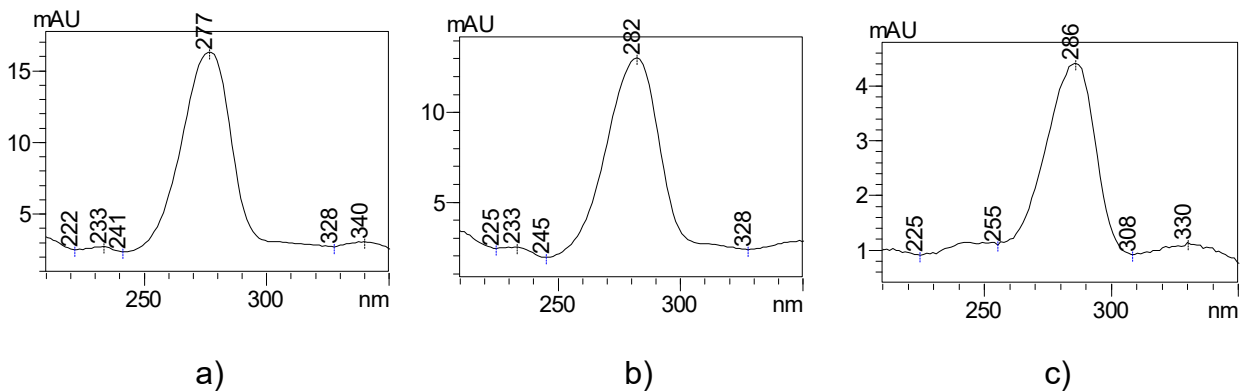


Figura 32: espectros de UV obtidos por CLAE das impurezas relacionadas 1 (a), 2 (b) e 3 (c).

Pode-se observar que a detecção a 330 nm resulta nos mesmos percentuais para o fármaco e as três impurezas relacionadas IR1, IR2 e IR3 tanto no modo gradiente quanto no isocrático. O comprimento de onda foi escolhido para otimizar a detecção da impureza A, visto que este é o seu máximo no solvente constituído pela fase móvel. Entretanto, as impurezas relacionadas tem mínimo de absorção em 245 nm e 330 nm, conforme pode ser visualizado na Figura 32, fato que, porém, não impediu sua detecção. O método de normalização de áreas é muito dependente do fator de resposta das substâncias frente ao detector. Na obtenção dos cromatogramas em 245 nm, em modo isocrático, perde-se informação quantitativa referente às impurezas relacionadas, e, aparentemente, a pureza do besifloxacino resulta mais elevada (99,37%).

Com o intuito de melhor visualizar as impurezas relacionadas verificou-se o cromatograma no máximo de absorção dessas impurezas, ou seja, 280 nm. Na Figura 33 estão dispostos os cromatogramas nos comprimentos de onda 330 e 280 nm, no qual visualizamos maior absorção das impurezas relacionadas no comprimento de onda diferente da impureza A.

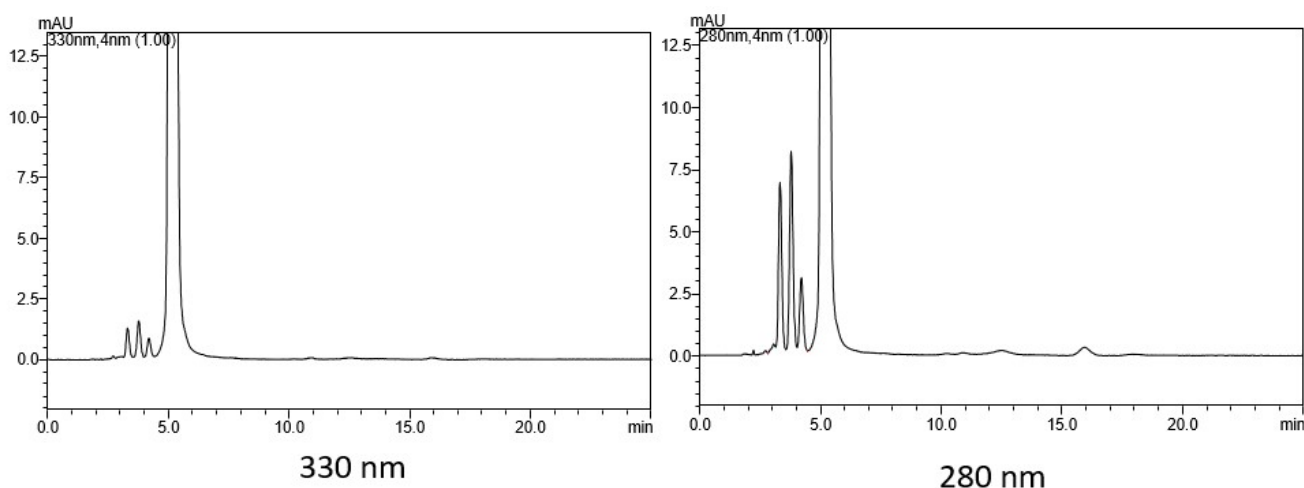


Figura 33: cromatogramas da solução de besifloxacino a 200.0 $\mu\text{g/mL}$ nos comprimentos de onda 330 (a) e 280 (b).

Naturalmente, a normalização de áreas para impurezas não identificadas, ou seja, relacionadas ao fator de resposta do fármaco em questão, apresenta esta característica de fornecer resultados dependentes da detecção, principalmente em se tratando da espectrofotometria no UV-Vis. A limitação, embora previsível, deveria ser ressaltada nas condições metodológicas selecionadas

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os métodos de DSC e IV permitiram para analisar os materiais adquiridos. O IV permite avaliar e confirmar os grupos funcionais. O DSC mostrou-se adequado para a análise da impureza, já para o besifloxacino apresentou uma deformação no pico.
- O método por eluição isocrática é adequado para a identificação do besifloxacino e impureza A. Mostrou-se específico, preciso, linear, exato e robusto para a identificação e análise quantitativa do fármaco e de sua impureza de síntese, porém com tempo de análise foi de 25 min.
- O método por eluição gradiente também apresentou resultados satisfatórios, entretanto pode-se observar que é mais sensível, suscetível a alterações na resposta com pequenas variações do método. O tempo de eluição dos compostos foi de 15 min e o número de pratos teóricos da impureza A foi bastante superior ao método isocrático, demonstrando assim maior eficiência.
- Os métodos apresentados podem ser utilizados na análise da matéria prima assim como do produto acabado suspensão oftálmica.

Perspectiva para trabalhos futuros: elucidar as impurezas relacionadas utilizando espectrometria de massas e promover degradações no fármaco afim de avaliar os produtos de degradação, os quais são potenciais impurezas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELBAUM, P. C., & HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, n. 1, p. 5-15, 2000.

ARNOLD, D. R., GRANVIL, C. P., WARD, K. W., & PROKSCH, J. W. Quantitative determination of besifloxacin, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent, in human tears by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 867, n. 1, p. 105-110, 2008.

BAUSH & LOMB, Besivance. [on line]. Disponível em <http://www.besivance.com/>. [Acessado em 26 de maio de 2014]

BALZLI, C. L., CABALLERO, A. R., TANG, A., WEEKS, A. C., & O'CALLAGHAN, R. J. Penetration and effectiveness of prophylactic fluoroquinolones in experimental methicillin-sensitive or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* anterior chamber infections. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 36, n. 12, p. 2160-2167, 2010.

BRASIL. Decreto nº. 79.094, de 5 de janeiro de 1977: Regulamenta a Lei nº. 6.360/76. **Diário Oficial da União**, 1977.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução nº1, de 29 de julho de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução ANVISA nº 11, de 9 de março de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução ANVISA nº 58, de 20 de dezembro de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016

KOGAWA, A. C., & SALGADO, H. RN. Impurities and Forced Degradation Studies: A Review. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 1, p. 18-24, 2016.

CARR, G. P., & WAHLICH, J. C.. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 8, n. 8-12, p. 613-618, 1990.

CHANG, M.H.; FUNG, H.B. Besifloxacin: A Topical Fluoroquinolone for the Treatment of Bacterial Conjunctivitis. **Clinical Therapeutics**, v.32, n.3, p.454-471, 2010.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATTO, P. S.; **Fundamentos de Cromatografia**, 1ª ed., Editora Unicamp: Campinas, 2006.

COSTA, M. C., BARDEN, A. T., ANDRADE, J. M., OPPE, T. P., & SCHAPOVAL, E. E.. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and Cytotoxicity Studies. **Talanta**, v. 119, p. 367-374, 2014.

DONNENFELD, E. D., COMSTOCK, T. L., & PROKSCH, J. W. Human aqueous humor concentrations of besifloxacin, moxifloxacin, and gatifloxacin after topical ocular application. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 37, n. 6, p. 1082-1089, 2011.

DOS SANTOS NETO, A.J. A importância do volume do misturador de solventes em HPLC gradiente. **Scientia Chromatographica**, 2011.

EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. suppl 1, p. 13-20, 2003.

ERMER, J., & MILLER, J. H. M. McB (Ed.). **Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice**. John Wiley & Sons, 2006.

HODVING, G. Acute bacterial conjunctivitis. **Acta Ophthalmologica**. V.86, p.5-17, 2008

HUTNIK, C.; MOHAMMAD-SHAHI, M.H. Bacterial conjunctivitis. **Clinical Ophthalmology**, v.4, p.1451-1457, 2010

ICH; *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.

ICH; *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Q3B (R2), *Harmonized Tripartite Guidelines, Impurities in New Drug Products – Q3B (R2)*, In: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use*, 2 June, 2006

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 32, n. 1, 2009 .

MOREIRA, G. F., BALBO, A., Achete, C. A., BARIN, J. S., WOLLINGER, W., Nogueira, R., BITENCOURT, C.F. & CAIXEIRO, J. M. R.. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para determinação da pureza de fármacos. 2010.

NAGPAL,S.; KARAN; UPADHYAY,A.; BHARDWAJ,T.R.; THAKKAR,A. A Review on Need and Importance of Impurity Profiling. **Current Pharmaceutical Analysis**. V.7, n.1, p.62-70, 2011.

OLIVEIRA M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

PASQUINI, Celio. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PAVIA, D., LAMPMAN, G., KRIZ, G., & VYVYAN, J. **Introduction to spectroscopy**. 4 ed. Cengage Learning, 2008

PROKSCH, J. W., GRANVIL, C. P., SIOU-MERMET, R., COMSTOCK, T. L., PATERNO, M. R., & WARD, K. W. Ocular pharmacokinetics of besifloxacin following topical administration to rabbits, monkeys, and humans. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 335-344, 2009.

RAO, R. N., & NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 33, n. 3, p. 335-377, 2003.

REZENDE, Ricardo Leite de Oliveira. **Separação dos enantiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno por CLAE em fase estacionária quiral**. 2008. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-04022009-195023/>>. Acesso em: 2014-06-09.

RIBANI, M., BoOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROWE, R. C., Sheskey, P. J., COOK, W. G., & FENTON, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 7 ed., Washington: American Pharmaceutical Association, 2012.

SHABIR, G. A.. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopeia and ICH. **Journal of Chromatography A**. v.987, p. 57-66, 2003.

SHARMA, S. Antibiotic resistance in ocular bacterial pathogens. **Indian Journal of Medical Microbiology**. V.29, n.3, p.218-222, 2011.

SHAWER *et al.* Amorphous besifloxacin solid. [S.I.]: Google Patents. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US20110144329A1/en>, 2015.

TARABISHY, A.B.; JENG, B.H. Bacterial conjunctivitis: A review for internists. **Cleveland Clinic Journal os Medicine**. V.75, n.7, p.507-512, 2008

TORKILDSEN, G., PROKSCH, J. W., SHAPIRO, A., LYNCH, S. K., & COMSTOCK, T. L. Concentrations of besifloxacin, gatifloxacin, and moxifloxacin in human conjunctiva after topical ocular administration. **Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)**, v. 4, p. 331, 2010.

USP 38 – **The United States Pharmacopeia**. 38ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention 2015.

WANG, Z.; WANG,S.; ZHU, F.; CHEN,Z.;YU, L.; ZENG, S. Determination of Enantiomeric Impurity in Besifloxacin Hydrochloride by Chiral High-Performance Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization. **Chirality**. V.24, n.7, p.526-531, 2012.

WARD, K. W., LEPAGE, J. F., & DRIOT, J. Y. Nonclinical pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of BOL-303224-A, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent for topical ophthalmic use. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 243-256, 2007.

WATSON, G. D.; **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**, 2^a ed., Churchill Livingstone: London, 2005