

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARCUS VINICIUS MARTINS RUBATINO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DE  
ROXITROMICINA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULAS**

Alfenas/MG

2017

**MARCUS VINICIUS MARTINS RUBATINO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DE  
ROXITROMICINA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULAS.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Desenvolvimento e avaliação de fármacos e medicamentos. Orientadora: Prof(a) Dra. Magali Benjamim de Araújo.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Rubatino, Marcus Vinicius Martins.

Desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação de roxitromicina na forma farmacêutica cápsulas / Marcus Vinicius Martins Rubatino -- Alfenas-MG, 2017.

81 f.

Orientadora: Magali Benjamim de Araújo  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Roxitromicina. 2. Processos Microbiológicos - Ágar. 3. Difusão – Ágar. 4. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. 5. Liberação Controlada de Fármacos. 6. Estudos de Validação. I. Araújo, Magali Benjamim de.  
II. Título.

CDD-615.3

MARCUS VINICIUS MARTINS RUBATINO.

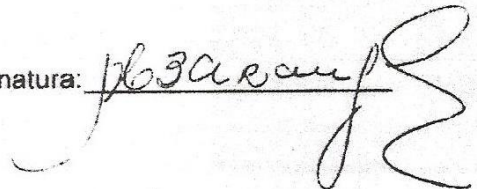
**"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DE  
ROXITROMICINA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULA"**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 24/03/17

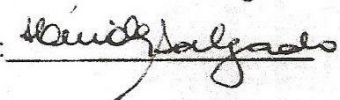
Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



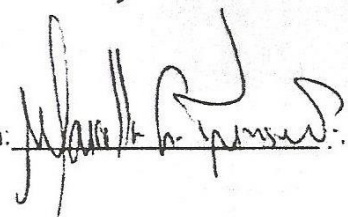
Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado  
UNESP/Araraquara

Assinatura:



Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



## **AGRADECIMENTOS**

A minha Orientadora, Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo. Obrigado pela paciência, pela disponibilidade, pelas orientações e por ter me oportunizado essa experiência de grande crescimento pessoal e profissional.

A minha esposa, Adriane, companheira inseparável com quem dividi as angustias e preocupações nas horas mais difíceis. Obrigado pela sua bondade e por sua dedicação e, principalmente, por acreditar em mim, inclusive nos momentos em que eu mesmo não acredito.

A minha enteada, Amanda. Obrigado pela amizade e pelo carinho de sempre.

Ao meu filho, Mateus. Obrigado por ter sido, ainda no ventre de sua mãe, a minha grande fonte de motivação e inspiração na reta final deste projeto.

Aos meus pais e irmãos pelos exemplos de retidão, honestidade e seriedade com os quais tanto aprendi ao longo de toda vida e formaram a pessoa que sou hoje.

Aos Professores Doutores André Luís Morais Ruela e Lucélia Magalhães da Silva, os quais colaboraram de forma inestimável durante a execução do projeto.

Aos meus colegas do Núcleo Controle de Qualidade da Universidade Federal de Alfenas. Obrigado pela compreensão e apoio, que se mostraram indispensáveis ao longo desse período.

À Universidade Federal de Alfenas, em especial à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan e à Dra. Daniela Vieira pelas colaborações prestadas no exame de qualificação.

Aos colegas discentes Marilene, Thiago, Lilian, Milena, Jennifer, Edeílson, Carolina Marques e Caroline Rosa. Poder contar com vocês ao longo dessa caminhada fez toda a diferença.

## RESUMO

Os antibióticos macrolídeos formam um grupo de antimicrobianos bastante seguros, extremamente úteis devido à atividade contra *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Bordetella*, pneumococos, estreptococos e outros patógenos importantes. A comercialização do antibiótico macrolídeo roxitromicina está autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Saneitária (ANVISA). Contudo, atualmente nenhum laboratório farmacêutico disponibiliza este medicamento no mercado brasileiro, estando a roxitromicina disponível apenas para manipulação em farmácias magistrais. A literatura registra o desenvolvimento de metodologias de análise e quantificação da roxitromicina. Contudo, nenhum deles aplicáveis à forma farmacêutica cápsulas. Neste trabalho, foram desenvolvidas e validadas metodologias analíticas para análise da roxitromicina na forma farmacêutica cápsulas: Método microbiológico por difusão em ágar, utilizando sistema de bicamada e cepas de *Micrococcus luteus* – INCQS 011 como microorganismo revelador; Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo a líquido com detector UV/Vís e coluna cromatográfica do tipo C18; e perfil de dissolução, utilizando aparelho dissolutor, aparato pá, rotação de 100 RPM e 900 mL de meio de dissolução por cuba. Os métodos foram validados de acordo com o que dispõe a RDC ANVISA nº 899 de 2003. O método microbiológico mostrou-se linear ( $r = 0,9985$ ), preciso (DPR= 1,53%), exato, seletivo e robusto. Da mesma maneira, o método cromatográfico demonstrou ser linear ( $r = 0,9995$ ), preciso (DPR = 1,08%), exato (100,85%), seletivo e robusto. O método cromatográfico foi empregado no desenvolvimento e validação do perfil de dissolução, o qual demonstrou ser seletivo, preciso (DPR =1,96%), robusto e exato. Os métodos propostos foram aplicados e apresentaram resultados satisfatórios na análise quantitativa de roxitromicina cápsulas, além de se apresentarem como alternativas de baixo custo e fácil introdução na rotina de laboratórios analíticos.

Palavras-Chave: Roxitromicina, Método Microbiológico por Difusão em Ágar. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Perfil de Dissolução de Fármacos. Validação de métodos analíticos.

## ABSTRACT

Macrolide antibiotics are a very safe group of antimicrobials, extremely useful against *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Bordetella* and other important pathogens. The commercialization of the macrolide antibiotic roxithromycin is authorized by the Brazilian health regulatory agency ANVISA. However, currently no pharmaceutical company makes this drug available on the Brazilian market, and roxithromycin has been commercially available as capsules by compounding pharmacies. The literature reports the development of methodologies for the analysis and quantification of roxithromycin. However, none of them apply to pharmaceutical capsules. In this work, analytical methodologies for the analysis of roxithromycin in the pharmaceutical form capsules were developed and validated: Agar Diffusion Bioassay, using bilayer system and *Micrococcus luteus* strains - INCQS 011 as a revealing microorganism; Method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using liquid chromatograph with UV / Vis detector and C18 type chromatographic column; And dissolution profile using dissolver apparatus, paddle apparatus, rotation of 100 RPM and 900 mL of dissolution medium per vessel. The methods were validated according to the provisions of the Brazilian validation guide. The microbiological method was linear ( $r = 0.9985$ ), precise (RSD = 1.53%), exact, selective and robust. In the same way, the chromatographic method showed to be linear ( $r = 0.9995$ ), accurate (RSD = 1.08%), exact (100.85%), selective and robust. The chromatographic method was used in the development and validation of the dissolution profile, which proved to be selective, precise (RSD = 1.96%), robust and accurate. The proposed methods were applied and presented satisfactory results in the quantitative analysis of roxithromycin capsules, in addition to being presented as low cost alternatives and easy to introduce into routine analytical laboratories.

**Key Words:** Roxithromycin. Agar Diffusion Bioassay. High Performance Liquid Chromatography. Dissolution Profile. Validation of Analytical Methods.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular do antibiótico macrolídeo Roxitromicina.....   | 11 |
| Figura 2 - Disposição dos cilindros de aço inoxidável no ensaio microbiológico por difusão em ágar.....   | 14 |
| Figura 3 - Suscetibilidade do microrganismo teste à solução de roxitromicina 250 µg/mL.....   | 27 |
| Figura 4 - Zonas de inibição do crescimento causadas pela Roxitromicina em cultura de <i>Micrococcus luteus</i> .....   | 29 |
| Figura 5 - Curva Analítica do Método Microbiológico por Difusão em Ágar para roxitromicina.....   | 41 |
| Figura 6 - Varredura espectral para roxitromicina em tampão fosfato pH 6,8.....   | 48 |
| Figura 7 - Tempos de retenção da roxitromicina em fases móveis formadas por acetonitrila – tampão fosfato de amônio nas proporções 4:6 (1) e 35:65 (2).....       | 49 |
| Figura 8 - Curva analítica obtida para o método cromatográfico.....   | 50 |
| Figura 9 - Cromatograma comparativo entre roxitromicina e seu produto de degradação ácida.....  | 52 |
| Figura 10- Cromatograma da solução de excipientes (a) e da solução 1:10 de tampão pH 6,8 e fase móvel (b).....  | 53 |
| Figura 11- Gráfico comparativo da solubilidade da roxitromicina em diferentes meios de dissolução.....  | 58 |
| Figura 12- Cromatograma Comparativo da roxitromicina Ácido Clorídrico 0,1M pH 1,2 (a) e em tampão acetato de sódio pH 4,5 (b).....                                | 59 |
| Figura 13- Formação de grumo com aspecto gelatinoso a partir de formulações contendo Roxitromicina 300mg em solução tampão utilizando-se diferentes aparatos..... | 60 |
| Figura 14- Variação da solubilidade da roxitromicina em função do pH.....   | 61 |
| Figura 15- Dissolução de roxitromicina cápsulas 300 mg em tampão fosfato (esquerda) e água purificada (direita).....  | 61 |
| Figura 16- Dissolução de roxitromicina cápsulas 300 mg em tampão fosfato (esquerda) e água purificada (direita).....  | 62 |



|   |    |
|---|----|
| Figura 17- Gráfico comparativo da dissolução de roxitromicina cápsulas 300mg utilizando-se pá e cesto em três diferentes rotações.....  | 63 |
| Figura 18- Perfil de dissolução (n=6) de cápsulas de roxitromicina 300mg de das formulações 1, 2, 3 e 4, respectivamente.....   | 64 |
| Figura 19- Cromatogramas de seletividade do ensaio de perfil de dissolução: a) cápsula gastrorresistente; b) cápsula azul e branca; c) excipiente 2 dissolvido em meio de dissolução; d) excipiente 3 dissolvido em meio de dissolução..... | 65 |
| Figura 20- Apresentação das cápsulas gastrorresistentes em tampão fosfato pH 6,8.....   | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1-  | Composição das Formulações empregadas na manipulação de cápsulas de roxitromicina 300mg.....   | 24 |
| Tabela 2-  | Composição de meios de cultura empregados no método microbiológico por difusão em ágar.....  | 26 |
| Tabela 3-  | Avaliação de microrganismos utilizados como reveladores para o método microbiológico por difusão em ágar.....  | 27 |
| Tabela 4-  | Volumes dos meios de dissolução testados durante a etapa de desenvolvimento do perfil de dissolução.....   | 38 |
| Tabela 5-  | Valores obtidos na variação de peso de cápsulas de roxitromicina de 300mg da formulação 1.....   | 42 |
| Tabela 6-  | Valores obtidos de médias dos diâmetros dos halos de inibição, produzidos pela solução padrão, obtidos no ensaio microbiológico para avaliação de roxitromicina..... | 43 |
| Tabela 7-  | Valores de precisão intra e interdias do método microbiológico por difusão em ágar para forma farmacêutica cápsula contendo roxitromicina 300g.....                  | 44 |
| Tabela 8-  | Avaliação da seletividade do método microbiológico por difusão em ágar para roxitromicina.....   | 45 |
| Tabela 9-  | Valores obtidos para avaliação da robustez do método microbiológico por difusão em ágar para roxitromicina.....  | 46 |
| Tabela 10- | Valores obtidos na determinação de exatidão do método microbiológico por difusão em ágar.....  | 47 |
| Tabela 11- | Valores obtidos na determinação do limite de detecção do método Microbiológico por difusão em ágar.....  | 48 |
| Tabela 12- | Valores obtidos na precisão do método cromatográfico para forma farmacêutica cápsula contendo roxitromicina 300mg.....   | 51 |
| Tabela 13- | Valores obtidos na exatidão do método cromatográfico para roxitromicina.....   | 53 |
| Tabela 14- | Valores obtidos na determinação de robustez do método cromatográfico para roxitromicina.....   | 54 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 15- | Valores obtidos na determinação do limite de quantificação do Método Físico-Químico para roxitromicina.....                                       | 55 |
| Tabela 16- | Valores obtidos no estudo de estabilidade de roxitromicina após 72 horas de exposição à luz ambiente.....   | 56 |
| Tabela 17- | Valores obtidos na determinação de teor para roxitromicina cápsulas 300 mg pelos métodos cromatográfico e microbiológico por difusão em ágar..... | 57 |
| Tabela 18- | Precisão do Perfil de Dissolução do Fármaco Roxitromicina 300mg Cápsulas.....   | 66 |
| Tabela 19- | Exatidão do perfil de dissolução.....   | 67 |

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                      | <b>10</b> |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                           | <b>13</b> |
| 2.1          | ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR.....              | 13        |
| 2.2          | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....               | 14        |
| 2.3          | PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FÁRMACOS.....                       | 15        |
| 2.4          | VALIDAÇÃO DE ENSAIOS ANALÍTICOS.....                        | 16        |
| <b>2.4.1</b> | <b>Seletividade.....</b>                                    | <b>17</b> |
| <b>2.4.2</b> | <b>Linearidade.....</b>                                     | <b>18</b> |
| <b>2.4.3</b> | <b>Precisão.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.4.4</b> | <b>Exatidão.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.4.5</b> | <b>Robustez.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.4.6</b> | <b>Limites de Detecção e Quantificação.....</b>             | <b>19</b> |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b>                                       | <b>21</b> |
| 3.1          | OBJETIVOS GERAIS.....                                       | 21        |
| 3.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                  | 21        |
| <b>4</b>     | <b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>                              | <b>22</b> |
| 4.1          | MATERIAL.....   | 22        |
| 4.2          | EQUIPAMENTOS.....   | 23        |
| 4.3          | MÉTODOS.....  | 24        |
| <b>4.3.1</b> | <b>Preparo das Amostras de Roxitromicina Cápsulas.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4.3.2</b> | <b>Ensaio Microbiológico por Difusão em Ágar.....</b>       | <b>25</b> |
| 4.3.2.1      | Microrganismo e Inóculo.....                                | 25        |
| 4.3.2.2      | Preparo da Solução Padrão de Roxitromicina.....             | 28        |
| 4.3.2.3      | Preparo da Solução Amostra de Roxitromicina.....            | 28        |
| 4.3.2.4      | Execução do Ensaio Microbiológico por Difusão em Ágar.....  | 28        |
| 4.3.2.5      | Validação do Método Microbiológico por Difusão em Ágar..... | 30        |
| 4.3.2.5.1    | <i>Linearidade.....</i>                                     | 30        |
| 4.3.2.5.2    | <i>Precisão.....</i>  | 30        |
| 4.3.2.5.3    | <i>Seletividade.....</i>                                    | 30        |
| 4.3.2.5.4    | <i>Robustez.....</i>  | 31        |
| 4.3.2.5.5    | <i>Exatidão.....</i>  | 31        |
| 4.3.2.5.6    | <i>Limite de Detecção.....</i>                              | 32        |
| <b>4.3.3</b> | <b>Método Cromatográfico.....</b>                           | <b>32</b> |
| 4.3.3.1      | Condições Experimentais.....                                | 32        |
| 4.3.3.2      | Preparo das Soluções Padrão de Roxitromicina.....           | 33        |
| 4.3.3.3      | Preparo das Soluções Amostra de Roxitromicina.....          | 33        |
| 4.3.3.4      | Validação do Método Cromatográfico.....                     | 34        |
| 4.3.3.4.1    | <i>Linearidade.....</i>                                     | 34        |
| 4.3.3.4.2    | <i>Precisão.....</i>  | 34        |
| 4.3.3.4.3    | <i>Seletividade.....</i>                                    | 34        |
| 4.3.3.4.4    | <i>Exatidão.....</i>  | 35        |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 4.3.3.4.5    | <i>Robustez</i> .....  | 35        |
| 4.3.3.4.6    | <i>Limites de Detecção e Quantificação</i> .....                   | 35        |
| 4.3.3.4.7    | <i>Estabilidade</i> .....  | 36        |
| <b>4.3.4</b> | <b>Doseamento</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>4.3.5</b> | <b>Perfil de Dissolução</b> .....                                  | <b>36</b> |
| 4.3.5.1      | Preparo da Solução Padrão de Roxitromicina.....                    | 37        |
| 4.3.5.2      | Estudo de Solubilidade em Equilíbrio.....                          | 37        |
| 4.3.5.3      | Desenvolvimento do Perfil de Dissolução.....                       | 37        |
| 4.3.5.4      | Validação do Perfil de Dissolução.....                             | 38        |
| 4.3.5.4.1    | <i>Seletividade</i> .....  | 39        |
| 4.3.5.4.2    | <i>Precisão</i> .....  | 39        |
| 4.3.5.4.3    | <i>Robustez</i> .....  | 39        |
| 4.3.5.4.4    | <i>Exatidão</i> .....  | 39        |
| <b>4.3.6</b> | <b>Estudo de Desintegração de Cápsula Gastroresistente</b> .....   | <b>40</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                | <b>41</b> |
| 5.1          | DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO.....                              | 41        |
| 5.2          | ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR.....                     | 42        |
| <b>5.2.1</b> | <b>Linearidade</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>5.2.2</b> | <b>Precisão</b> .....  | <b>44</b> |
| <b>5.2.3</b> | <b>Seletividade</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>5.2.4</b> | <b>Robustez</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>5.2.5</b> | <b>Exatidão</b> .....  | <b>46</b> |
| <b>5.2.6</b> | <b>Limite de Detecção</b> .....                                    | <b>47</b> |
| 5.3          | MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....   | 48        |
| <b>5.3.1</b> | <b>Linearidade</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>5.3.2</b> | <b>Precisão</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>5.3.3</b> | <b>Seletividade</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>5.3.4</b> | <b>Exatidão</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>5.3.5</b> | <b>Robustez</b> .....  | <b>54</b> |
| <b>5.3.6</b> | <b>Limites de Detecção e Quantificação</b> .....                   | <b>54</b> |
| <b>5.3.7</b> | <b>Estabilidade</b> .....  | <b>55</b> |
| 5.4          | DOSEAMENTO.....  | 56        |
| 5.5          | PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....  | 57        |
| <b>5.5.1</b> | <b>Estudo de Solubilidade em Equilíbrio</b> .....                  | <b>57</b> |
| <b>5.5.2</b> | <b>Desenvolvimento do Perfil de Dissolução</b> .....               | <b>59</b> |
| <b>5.5.3</b> | <b>Validação do Perfil de Dissolução</b> .....                     | <b>64</b> |
| 5.5.3.1      | Seletividade.....  | 65        |
| 5.5.3.2      | Precisão.....  | 66        |
| 5.5.3.3      | Robustez.....  | 66        |
| 5.5.3.4      | Exatidão.....  | 67        |
| <b>5.5.4</b> | <b>Estudo de Desintegração de Cápsulas Gastroresistentes</b> ..... | <b>67</b> |
| <b>6</b>     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | <b>68</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>71</b> |
|              | <b>ANEXO</b> .....   | <b>78</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Qualidade e segurança na saúde pública formam um binômio a ser alcançado e que deve ser mantido, independente de fatores econômicos, operacionais e/ou regionais. O medicamento se configura como instrumento fundamental para garantia do direito de acesso à saúde e, nesta vertente, surge o medicamento manipulado em farmácias, e sua qualidade deve ser assegurada pelos estabelecimentos fabricantes como direito de acesso da população ao medicamento (BERTOLLO, 2008).

A qualidade do medicamento se constitui no grau com que este cumpre com as características estabelecidas, sendo tais características incorporadas desde a fase de pesquisa da molécula ativa, a gênese da matéria-prima em escala industrial e sua distribuição, todo processo envolvido na fabricação do medicamento até o momento de sua utilização e acompanhamento pós-registro. São elas, boa apresentação da forma farmacêutica de modo a ter confiabilidade e aceitabilidade pelo paciente, conformidade com os parâmetros farmacopeicos, biodisponibilidade, eficácia clínica e segurança (GOMES; REIS, 2000).

Apesar das inúmeras vantagens que o medicamento manipulado oferece em relação ao industrializado, que vão desde a facilidade posológica até a econômica, são inúmeros os obstáculos que o setor se depara. O maior destes está na falta de credibilidade do produto manipulado pela “suposta” ausência de um controle de qualidade efetivo das matérias-primas e produtos acabados, ausência de controle de processo e sua reprodutibilidade (FERREIRA, 2002).

Nesse sentido, o antibiótico roxitromicina, fármaco semissintético da classe dos macrolídeos, merece especial atenção. A comercialização do referido antibiótico está autorizada em território nacional de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 20, de 5 de maio de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011). Contudo, atualmente nenhum laboratório farmacêutico disponibiliza este medicamento no mercado brasileiro, estando a roxitromicina disponível apenas para manipulação em farmácias magistrais. Soma-se a isso que não há descrição do referido fármaco na Farmacopéia Brasileira 5ª edição, restringindo-se sua descrição a compêndios internacionais que abordam apenas a matéria-prima, não englobando o produto acabado (BRASIL, 2010, 2011; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015).

A literatura registra metodologias analíticas abordando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para matéria-prima (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015).

Mahmoudi et al. (2015) desenvolveram e validaram método microbiológico por difusão em ágar para antibióticos macrolídeos, dentre estes a roxitromicina. Contudo, o método aplica-se à forma farmacêutica comprimido. Em compêndios oficiais, não há descrição de metodologia aplicável a roxitromicina na forma farmacêutica cápsula. (BRASIL, 2010; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015). Também foram encontrados na literatura o teste de dissolução para roxitromicina na forma farmacêutica comprimido (JAGTAP et al., 2013; MILNE; LIEBENBERG; AUCAMP, 2016; OSTROWSKI; WILKOVSKA; BACZEC, 2010).

Os antibióticos macrolídeos formam um grupo de antimicrobianos bastante seguros, extremamente úteis devido à atividade contra *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Bordetella*, pneumococos, estreptococos e outros patógenos importantes. Em geral, e principalmente a azitromicina, apresentam efeito anti-inflamatório em processos crônicos, como na colonização pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (BARROS et al., 2008).

Esta classe farmacológica se caracteriza por apresentar diversos anéis lactônicos aos quais se ligam um ou mais desoxi-açúcares (Figura 1). Atuam pela inibição da síntese proteica bacteriana ligando-se à subunidade 50S ribossomal, impedindo o crescimento da cadeia peptídica em microrganismos sensíveis (SILVA, 2006).

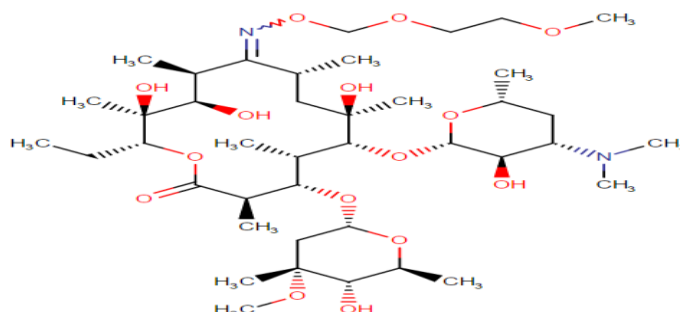


Figura 1- Estrutura molecular do antibiótico macrolídeo Roxitromicina.  
Fonte: drugbank.ca

A roxitromicina é utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório, urinário e de tecidos moles ocasionadas por diversos patógenos (DING et al., 2015; KOUSOLOS et al., 2008). Assim como outros antibióticos da classe dos macrolídeos, a roxitromicina possui destacada ação contra *Mycoplasma* e *Chlamydia*. Apesar de seu uso demonstrar bom desempenho na prática clínica durante a gestação. Quin et al. (2016) realizaram um estudo comparativo do metabolismo e farmacocinética da roxitromicina no plasma e no líquido amniótico, constatando que a área sob a curva (AUC) e o tempo de meia-vida encontram-se

aumentados no líquido amniótico. Em um estudo sobre resistência de micorganismos isolados em infecções do trato genitourinário, He et al. (2016) observaram que cepas de *U. urealyticum* e *M. hominis* demonstraram altas taxas de resistência à roxitromicina, bem como a seu precursor, a eritromicina.

A estrutura molecular da roxitromicina é constituída de um anel lactona de 14 átomos e dois resíduos de açúcar: Cladinose e Dosamina. Em relação à eritromicina, a estrutura química da roxitromicina confere maior estabilidade em condições de pH baixo, como as encontradas no trato gastrointestinal. Isso se deve à presença do grupo oxima na molécula do fármaco, o qual substitui um grupo cetona presente na molécula de eritromicina (HOLSTEIN et al., 2009; JAGTAP et al., 2013; OSTROWSK; WILKOVSKA; BACZEC, 2010). Contudo, é preciso destacar a baixa estabilidade deste fármaco em meio ácido. É o que se pode observar por Ostrowsk (2010) que realizou um estudo de dissolução da roxitromicina, tendo constatado formação de produtos e completa degradação deste antibiótico em pH 1, 2. Maior estabilidade tem sido observada em estudos de dissolução em pH próximo de 6,0 (JAGTAP et al., 2013; OSTROWSK; WILKOVSKA; BACZEC, 2010).

Outra característica importante do fármaco em estudo é a sua baixa solubilidade em água (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015). Tal característica resulta em fármaco de baixa biodisponibilidade e potência quando ingerido por via oral (DURAN et al., 2009; NIEKERK, 2011). De acordo com Bown et al. (2004) caracterizar o mecanismo de liberação do fármaco por metodologia de dissolução *in vitro* mostra-se particularmente importante para medir o desempenho do fármaco constituído por substâncias pouco solúveis.

Considerando a roxitromicina um antibiótico de pronunciado prognóstico no tratamento de diversas infecções e que vem sendo manipulada na forma farmacêutica cápsula, que apresenta desempenho diferente no organismo das demais, temos por interesse o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas aplicáveis a este fármaco. Para tanto, este trabalho será desenvolvido em três etapas: - desenvolvimento e validação de método microbiológico por difusão em ágar, - desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência e - desenvolvimento e validação de perfil de dissolução para roxitromicina na forma farmacêutica cápsulas.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente trabalho dedicou-se ao desenvolvimento e validação de metodologias analíticas capazes de quantificar o antibiótico roxitromicina em cápsulas farmacêuticas. Para tanto, lançou mão de técnicas descritas em compêndios oficiais e amplamente relatadas na literatura pertinente. Para uma melhor compreensão das metodologias aplicadas, segue o referencial teórico.

### 2.1 ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR

O ensaio microbiológico por difusão em ágar trata-se de um método físico-químico, no qual um microorganismo é usado como revelador. O método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de mono ou bicamada, através do qual a substância teste se difunde. É essencial que se trabalhe com réplicas, de forma a compensar os desvios inerentes ao ensaio, sendo que na Farmacopeia Brasileira 5ª edição esse método é preconizado para 46 antibióticos (BRASIL, 2010; PINTO, 2010).

Em comparação com métodos físico-químicos tradicionais, o ensaio microbiológico por difusão em ágar apresenta as vantagens de ter baixo custo, baixa toxicidade dos reagentes, não demandar etapas de extração/separação, operacionalização mais simples e não requerer mão-de-obra e equipamentos especializados (LOURENÇO, 2006; MANFIO et al. 2013).

O ensaio por difusão em ágar começa pelo preparo do microrganismo que deve ser repicado em caldo de enriquecimento e incubado. Após o período de incubação, o caldo deve ser diluído de modo a se obter uma suspensão de 25%  $\pm$  2 de Transmitância. A suspensão de microrganismo deve então ser inoculada em meio de cultura que permita o isolamento de microrganismos heterotróficos. O método pode ser desenvolvido com apenas uma camada de meio de cultura (monocamada) ou com duas camadas de meio de cultura (bicamada), sendo uma camada mais volumosa, chamada de camada base, e outra menos volumosa, chamada de camada de superfície, na qual é inoculada a suspensão de microrganismo. As camadas devem ser vertidas, separadamente, em placas de Petri, sendo que a camada mais volumosa deve ser vertida primeiro e a menos volumosa vertida sobre esta após sua solidificação. Deve-se aguardar a completa solidificação do meio de cultura que está sendo empregado no ensaio antes do procedimento das etapas seguintes. A solução teste deve ser aplicada sobre a superfície deste meio em uma área específica delimitada por cilindros ou pelo *template* de aço

inoxidável. Da mesma forma deve-se proceder com a solução padrão. O ensaio de Difusão em Ágar pode ser realizado nos delineamentos 2x2 e 3x3, alternando soluções amostra e padrão, e no delineamento 5x1, no qual não há a aplicação de solução. Assim, procede-se a incubação da placa por tempo adequado ao método e mede-se o tamanho dos halos de inibição obtidos (ALÉSSIO, 2011; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; MAHMOUDI et al., 2015; PAIM et al., 2010; PINTO, 2010).

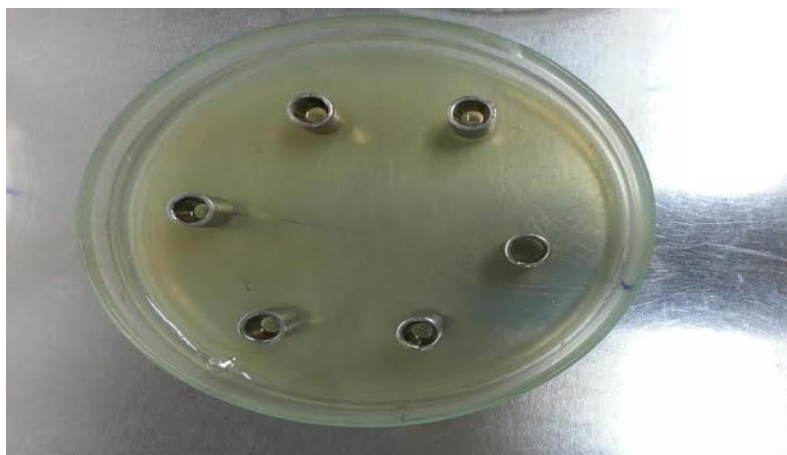


Figura 2- Disposição dos cilindros de aço inoxidável no ensaio microbiológico por difusão em ágar.

Fonte: Do Autor

Antibióticos macrolídeos têm sido alvo de estudos visando a desenvolver métodos analíticos que aplicam o ensaio microbiológico por difusão em ágar, utilizando cepas de *Micrococcus luteus* como microrganismo revelador (BREIER et al., 2002; MAHMOUDI et al., 2015; VITAL et al., 2004;). Na Farmacopeia Brasileira, este ensaio é preconizado para a eritromicina e para a azitromicina, tanto matéria-prima quanto produto acabado (BRASIL, 2010).

## 2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usa pressões elevadas para forçar a passagem de um solvente através de colunas fechadas que contêm partículas muito finas, capazes de proporcionar separações muito eficientes entre os componentes de uma mistura. No desenvolvimento de um método analítico, os objetivos são de obter uma separação adequada em um tempo razoável (HARRIS, 2012).

Segundo Lanças (2008), a CLAE teve seu desenvolvimento favorecido pelo interesse nas análises de compostos os quais não eram amenos à cromatografia gasosa. O desenvolvimento de fases quimicamente ligadas ampliou ainda mais o espectro de aplicações da técnica de CLAE, especialmente as fases reversas baseadas em grupos octadecil e octil (C18 e C8) quimicamente ligados à sílica.

A cromatografia de fase reversa geralmente é adequada para separar misturas de compostos orgânicos, neutros ou carregados de baixa massa molecular. Como condições para o método cromatográfico por fase reversa, sugere-se fase estacionária formada por coluna quimicamente ligada dos tipos C18 e C8 e coluna cromatográfica de 0,21 x 15 cm para partículas de 5 µm, dentre outras condições, dependendo-se das propriedades do analito. (HARRIS, 2012)

A análise quantitativa de compostos presentes em misturas foi viabilizada, em CLAE, pelo acoplamento de detectores aos cromatógrafos. Os detectores utilizam Uv-Vis, espalhamento de luz, fluorescência, dentre outros que, aliados a softwares, permitem a análise de componentes das misturas em concentrações extremamente baixas. (LANÇAS, 2009)

A CLAE tem sido amplamente empregada para análise quantitativa de antibióticos macrolídeos em métodos analíticos ou bioanalíticos. Em sua maior parte, os autores utilizam fase móvel a base de acetonitrila e tampão fosfato de amônio e coluna cromatográfica do tipo C18. (BALAJI; NISHA, 2016; DING et al., 2015; KOUSOLOS et al., 2008; MILNE; LIEBENBERG; AUCAMP, 2016; OSTROWSKI; WILKOVSKA; BACZEC, 2010; QUIN et al., 2016 TORAÑO; GUCHELLAR, 1998).

### 2.3 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE FÁRMACOS

O ensaio de dissolução de fármacos é uma ferramenta utilizada para se analisar o perfil de liberação de fármacos em produtos farmacêuticos, geralmente sólidos e para ingestão oral, como cápsulas e comprimidos. O teste se mostra significativo pelo fato de que o fármaco presente em um produto farmacêutico precisa ser liberado dos demais componentes da formulação e se dissolver nos fluidos do trato gastrointestinal (QURESHI, 2006). Segundo Wang (2006), o teste de dissolução é comumente empregado na indústria farmacêutica visando nortear o desenvolvimento de formulações e o controle de qualidade do produto.

A uniformização dos procedimentos e das condições dos ensaios são atualmente uma das principais preocupações, com as entidades reguladoras sugerindo procedimentos de

calibração rigorosos e bem definidos. Pretende-se assim aumentar a credibilidade e a validade dos resultados obtidos nos ensaios de dissolução corretamente delineados e executados (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

O aparelho de dissolução consiste em um sistema formado por três componentes: cubas, recipientes abertos de forma cilíndrica em vidro de borossilicato, plástico ou outro material transparente ou inerte, imersos em banho de água termostaticado, nos quais serão introduzidos os meios de dissolução empregados no ensaio; hastes em aço inoxidável, responsáveis por promover a agitação do meio, podendo apresentar-se nas formas de cestas ou pás; e um motor que possibilita ajustar a velocidade de rotação da haste aos parâmetros do método. (BRASIL, 2010)

Sempre que possível, o teste de dissolução deve ser conduzido sob condições *sink*, que, segundo Emmanuel (2012), são definidas como o volume de meio pelo menos três vezes maior do que o necessário para se obter uma solução saturada do fármaco, visando manter o gradiente de concentração definido. A concentração de saturação do fármaco pode ser definida pelo ensaio de solubilidade em equilíbrio.

O referido ensaio de solubilidade em equilíbrio é também utilizado na definição do meio de dissolução a ser empregado no teste. No Brasil, a ANVISA, através da RDC 37/2011, para estudos de solubilidade, preconiza realizar o estudo em no mínimo três condições de pH do meio de dissolução (1,2; 4,5 e 6,8), utilizando-se no mínimo 3 replicatas para cada condição, devendo o coeficiente de variação ser menor que 5 %. O ensaio de solubilidade em equilíbrio pode ser realizado pela metodologia de shake-flash, utilizando soluções saturadas, conforme descrito por Jagtap et al. (2013) e Santos (2016).

## 2.4 VALIDAÇÃO DE ENSAIOS ANALÍTICOS

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos, que necessitam de métodos analíticos para sua determinação quantitativa em produtos farmacêuticos (SILVA, 2012). Após o desenvolvimento do método, uma atividade fundamental que tradicionalmente deve ser realizada é a validação analítica. (SANTOS, 2011)

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).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos. (SANTOS, 2011)

No âmbito da ANVISA, a validação de métodos analíticos está normatizada por meio das RDC's 899 de 29 de maio de 2003 e 27 de 17 de maio de 2012. Enquanto aquela tem o objetivo de apresentar as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos, a outra tem o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos empregados para estudos de registro e pós-registro de medicamentos no Brasil (BRASIL, 2003, 2012). Em suma, a RDC 27 de 2012 atualiza a RDC 899 de 2003 no que se refere à validação de métodos bioanalíticos, os quais são definidos como métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas (BRASIL, 2012).

É valioso destacar que foi realizada a consulta pública 129/2016, a qual visa atualizar a RDC 899 de 2003. Através da referida consulta, o órgão regulador buscou obter colaborações sobre validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para determinação de impurezas, ensaio limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequado à análise (BRASIL, 2003).

#### **2.4.1 Seletividade**

A seletividade é a capacidade que o método possui para medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação, solventes e componentes da matriz (BRASIL, 2003; SANTOS, 2011). Estudos forçados de degradação devem ser realizados, a fim de demonstrar a capacidade do procedimento analítico de não sofrer interferências de moléculas de estrutura semelhante à do analito.

### 2.4.2 Linearidade

Segundo Silva (2012), a linearidade corresponde à capacidade do método analítico para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes, tendo como critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,99 (BRASIL, 2003).

Devemos destacar que, devido a suas peculiaridades, o método microbiológico teve a linearidade avaliada com três concentrações, sendo estas as doses empregadas na execução do método.

### 2.4.3 Precisão

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medições de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, ou de múltiplas alíquotas de uma mesma fonte de matriz biológica, podendo ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003, 2012; SANTOS, 2011).

A repetibilidade é verificada por no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, avaliando-se três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada, ou um mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Já a reprodutibilidade é a concordância obtida entre os resultados de análises realizadas em laboratórios diferentes (BRASIL, 2003).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo da série de medidas e pode ser calculada pela fórmula,

$$DPR = DP/CMD \times 100$$

em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. Não se admite para fins de validação de método analítico desvios padrão superiores a 5% (BRASIL, 2003).

#### **2.4.4 Exatidão**

A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação ou em solução da amostra de produto farmacêutico (SILVA, 2012). Ou ainda, aplicando-se a metodologia analítica na análise de uma substância de pureza conhecida (BRASIL, 2003).

A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida de analito presente na amostra e deve ser determinada após estabelecimento da linearidade, intervalo linear e especificidade do método. A exatidão deve ser verificada por meio da análise de três réplicas de três concentrações (baixa, média e alta) que contemplem o intervalo linear do método (BRASIL, 2003).

#### **2.4.5 Robustez**

A Robustez do método é a medida da capacidade que o método apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas, modificações em seus parâmetros, e fornecer indicações de segurança durante o uso normal (VIEIRA, 2010).

Para Silva (2012), a robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico frente a pequenas variações nas condições experimentais.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez, constatando-se a suscetibilidade do método a variações das condições analíticas estabelecidas. As variações propostas deverão ser controladas e precauções deverão ser incluídas no procedimento. Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência devem considerar fatores como pH da fase móvel, vazão de fase móvel, lotes e fabricantes de colunas cromatográficas, temperatura e composição da fase móvel. Métodos espectrofotométricos devem considerar variação do pH da solução, temperatura e diferentes fabricantes de solventes. (BRASIL, 2003).

#### **2.4.6 Limites de Quantificação e Detecção**

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais

estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, percentagem p/p ou p/v, parte por milhão) na amostra. O limite de detecção é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectada porém não quantificada. (BRASIL, 2003).



### 3 OBJETIVOS

Seguem abaixo os objetivos a que se pretende alcançar com a execução deste projeto de mestrado.

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento e validação de método microbiológico por difusão em ágar e por cromatografia líquida de alta eficiência e perfil de dissolução de roxitromicina na forma farmacêutica cápsulas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e avaliar as características de desempenho do método microbiológico por difusão em ágar;
- b) Desenvolver e avaliar as características de desempenho do método por cromatografia líquida de alta eficiência;
- c) Comparar estatisticamente os métodos desenvolvidos;
- d) Desenvolver e validar perfil de dissolução;
- e) Disponibilizar as metodologias analíticas para o fármaco.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do presente projeto, foram utilizados materiais com grau analítico e adquiridos comercialmente junto a fornecedores devidamente certificados. Quanto aos equipamentos, todos passam por procedimentos de manutenção e calibração periódicos. Além disso, foram empregadas vidrarias e equipamentos de medição devidamente calibrados.

### 4.1 MATERIAL

- a) Acetonitrila para HPLC – Lote SHBG7762V da SIGMA-ALDRICH;
- b) Ácido Clorídrico P.A – Lote 30.267 DA PRODIMOL;
- c) Ágar Caseína-Soja – Lote 081814205 da KASVI;
- d) Caldo Infuso de Cérebro e Coração - Lote 105393B da PRODIMOL;
- e) Cápsula gelatinosa Azul/Branca – N 0;
- f) Cápsula gelatinosa gastrorresistente DR CAPS – N 0, distribuído pela FAGRON;
- g) Excipiente Padrão 1, constituído pela mistura de Aerosil (0,5%), Lauril sulfato de Sódio (2%), Celulose (25%) e Amido de Milho (QSP 100%);
- h) Excipiente Padrão 2, constituído pela mistura de Aerosil (0,5%), Lauril Sulfato de Sódio (2%) Amido Glicolato (5%) Lactose (25%) e Amido de Milho (QSP 100%);
- i) Excipiente Padrão 3, constituído pela mistura de Aerosil (0,5%), Lauril Sulfato de Sódio (2%) Croscarmelose Sódica (10%) Talco Farmacêutico (15%) e Celulose Microcristalina (QSP 100%);
- j) Excipiente Padrão 4, constituído pela mistura de Aerosil (0,5%), Lauril Sulfato de Sódio (2%), Amido Glicolato (5%), Talco Farmacêutico (20%) Celulose Microcristalina (QSP 100%);
- k) Matéria-prima roxitromicina Lote 14052337A da SHIXING PHARMACEUTIC – CHINA. Val: fevereiro de 2017. Distribuído no Brasil pela FAGRON;
- l) Padrão Farmacopéia Européia de Roxitromicina - Lote R1500000 – Teor 96,70 %;
- m) Roxitromicina 300 mg, cápsulas, manipulado no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Alfenas;
- n) Solução Tampão Acetato de sódio pH 4,5, preparado diluindo-se 2,8 mL de ácido acético glacial em 1000 mL de água purificada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010);

- o) Solução tampão Fosfato pH 6,0, preparado misturando-se 50 mL de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e 5,7 mL de hidróxido de sódio 0,2 M. QSP 200 mL de água purificada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010);
- p) Solução tampão pH 6,8, constituída de mistura de 400 mL de solução fosfato de sódio dibásico 0,235 M pH 10,3 e 600 mL HCl 0,1 mol/L pH 1,2, com pH final de 6,8;
- q) Solução Tampão Fosfato pH 6,8 preparada misturando-se 510 mL de Fosfato de Potássio Monobásico 27,2 g/L e 490 mL de Fosfato de Sódio Dibásico 71,6 g/L (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015);
- r) Solução Tampão Fosfato de Potássio pH 8,1 preparada pesando-se 16,73g de fosfato de potássio dibásico e 0,523g de fosfato de potássio monobásico em qsp 1000mL (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

## 4.2 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados, além de instrumentos de medição, os seguintes equipamentos:

- a) Aparelho de ultrassom USC 1400 (UNIQUE);
- b) Autoclave vertical Q190-24 (QUIMIS);
- c) Autoclave vertical CS (PRISMATEC);
- d) Balança analítica CP225D (SARTORIUS);
- e) Cromatógrafo a líquido série LC-10A (SHIMADZU);
- f) Desintegrador de comprimidos e cápsulas 301-3 (NOVA ÉTICA);
- g) Dissolutor TDT-081 (ELECTROLAB);
- h) Dissolutor G 850 (QUIMIS);
- i) Espectrofotômetro UV-1601 PC (SHIMADZU);
- j) Estufa bacteriológica Q 316M (QUIMIS);
- k) Gabinete de fluxo laminar Purifier Class II (LABCONCO);
- l) Medidor de pH PA 200 (MARCONI);
- m) Mesa Agitadora MA420 (MARCONI);
- n) Paquímetro Digital (MARBERG);
- o) Sistema de purificação de água Direct Q-5 (MILLIPORE).

### 4.3 MÉTODOS

Os métodos empregados no presente projeto foram desenvolvidos baseados na literatura e legislação pertinentes, em artigos científicos e nos compêndios oficiais. Os ensaios foram realizados nos laboratórios do Núcleo Controle de Qualidade e no laboratório de Tecnologia Farmacêutica, todos da Universidade Federal de Alfenas.

#### 4.3.1 Preparo das Amostras de roxitromicina cápsulas de 300 mg

Inicialmente, foram manipuladas 80 cápsulas contendo roxitromicina 300 mg no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Alfenas. Para manipulação foram utilizados roxitromicina matéria-prima Lote 14052337A da SHIXING PHARMACEUTIC – CHINA e excipiente padrão 1, conforme descrito no item 4.1. A Tabela 1 apresenta a composição das formulações empregadas na manipulação de cápsulas de roxitromicina 300mg.

Duas amostragens deste lote, contendo dez cápsulas cada um, foram analisadas quanto à uniformidade de conteúdo. As cápsulas foram abertas e esvaziadas, tendo as massas das cápsulas cheia e vazia sido registradas conforme procedimento da Farmacopéia Brasileira.

Tabela 1- Composição das Formulações empregadas na manipulação de cápsulas de roxitromicina 300mg.

|  | Formulação 1 | Formulação 2 | Formulação 3 | Formulação 4 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Adjuvantes</b>                        |              |              |              |              |
| Aerosil                                  | 0,50%        | 0,50%        | 0,50%        | 0,50%        |
| Amido de Milho                           | QSP 100%     | QSP 100%     | -            | -            |
| Amido Glicolato                          | -            | 5%           | -            | 5%           |
| Cápsula Gastrorresistente tamanho 0      | -            | -            | -            | √            |
| Cápsula Gelatinosa Azul/Branca Tamanho 0 | √            | √            | √            | -            |
| Celulose                                 | 25%          | -            | -            | -            |
| Celulose Microcristalina                 | -            | -            | QSP 100%     | QSP 100%     |
| Croscarmelose Sódica                     | -            | -            | 10%          | -            |
| Lactose                                  | -            | 25%          | -            | -            |
| Lauril Sulfato de Sódio                  | 2%           | 2%           | 2%           | 2%           |
| Talco Farmacêutico                       | -            | -            | 15%          | 20%          |

Fonte: Do autor.

### **4.3.2 Ensaio Microbiológico por Difusão em Ágar**

As etapas cruciais do desenvolvimento e validação do ensaio microbiológico por difusão em ágar consistem na definição do microrganismo revelador, da solução tampão a ser utilizada como solvente, da concentração do fármaco dissolvido na solução tampão, dos meios de cultura utilizados na recuperação e manutenção do microrganismo e do sistema de camadas de meio de cultura, que pode ser de mono ou bicamada.

#### **4.3.2.1 Microrganismo e inóculo**

Os microrganismos empregados no método microbiológico por difusão em ágar foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As cepas foram recebidas em material liofilizado, tendo sido reidratadas e cultivadas com Caldo Infuso de Cérebro e Coração (PRODIMOL 105393B) por período de 24 horas em estufa bacteriológica (QUIMIS Q316M) a temperatura entre 32 e 35 °C. Após o período de incubação, através de alçada do caldo, foi realizada a inoculação em tubos contendo Ágar Caseína Soja (KASVI 081814205). Os tubos foram incubados por 24 horas a temperatura entre 32 e 35°C, de modo a se obter o desenvolvimento de colônias em meio sólido. Os meios de cultura utilizados para o método microbiológico foram adquiridos comercialmente na forma desidratada, tendo sido preparados no laboratório com água ultra-purificada conforme as orientações do fabricante. A composição dos meios de cultura encontra-se detalhada na tabela 2.

Tabela 2- Composição de meios de cultura empregados no método microbiológico por difusão em ágar.

| Ingredientes                        | Caldo Infuso de Cérebro e<br>Coração. |  | Ágar Caseína Soja |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------|
|                                     | Composição g/L                        |  |                   |
| Ágar                                | -                                     |  | 15                |
| Cloreto de sódio                    | 5                                     |  | 5                 |
| Dextrose                            | 2                                     |  | -                 |
| Digestão papaica de farinha de soja | -                                     |  | 5                 |
| Fosfato dissódico                   | 2,5                                   |  | -                 |
| Infusão de cérebro de bezerro       | 200                                   |  | -                 |
| Infusão de músculo cardíaco         | 250                                   |  | -                 |
| Peptona de caseína                  | -                                     |  | 15                |
| Peptona proteose                    | 10                                    |  | -                 |

Fonte: Do autor.

Após a reativação das cepas liofilizadas, colônias foram coletadas a partir de meio sólido e transferidas para caldo de enriquecimento Infuso de Cérebro e Coração. O caldo com material das cepas foi incubado por 18 horas em estufa bacteriológica em temperatura variando de 32 a 35 °C. O caldo obtido após o período de incubação foi diluído em caldo não inoculado, visando obter solução com 25 %  $\pm$  2 % de transmitância, em comprimento de onda de 580 nm, que foi analisada por espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800. Por meio de pipeta volumétrica, alíquota de 3 mL dessa suspensão de microrganismo foi vertida em qsp 150 mL de Ágar Caseína Soja à temperatura entre 43 °C e 46 °C, de modo a se obter a camada inoculada com concentração de 2 %.

Visando a definir o microrganismo revelador e considerando o espectro de ação dos antibióticos macrolídeos, foram testadas bactérias gram-positivas. Dessa forma, dois integrantes do gênero *Staphylococcus* (*S. epidermides* – INCQS 016 e *S. aureus* – INCQS 013) e a espécie *Micrococcus luteus* – INCQS 011, todos membros da família *Micrococcaceae*, foram testados. Para a escolha do microrganismo revelador, uma solução de roxitromicina 250 µg/mL foi preparada diluindo-se 2,5 mg de matéria-prima roxitromicina Lote 14052337A da SHIXING PHARMACEUTIC – CHINA em solução tampão fosfato de potássio pH 8,1 estéril por meio de balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, executou-se ensaio qualitativo em placas de petri preparadas conforme descrito no item 4.3.2.4, tendo sido preparadas três tipos de camadas inoculadas, cada uma com cepas de uma das espécies acima

citadas conforme apresentados na tabela 3. A suscetibilidade do microrganismo *Micrococcus luteus* está demonstrada na figura 3.

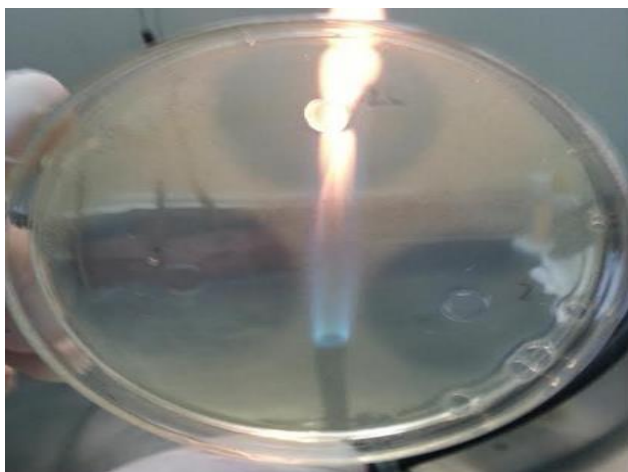


Figura 3- Suscetibilidade do microrganismo teste à solução de roxitromicina 250 µg/mL

Fonte: Do autor.

Tabela 3- Avaliação de microrganismos utilizados como reveladores para o método microbiológico por difusão em ágar.

| Microrganismo Testado             | Desenvolvimento de                            |   | Formação de halos de Inibição |
|-----------------------------------|---|---|-------------------------------|
|                                   | Turvação em Caldo Infuso de Cérebro e Coração | Crescimento Satisfatório em ágar Caseína Soja |                               |
| <i>Micrococcus luteus</i>         | SIM   | SIM   | SIM                           |
| <i>Staphylococcus epidermides</i> | SIM   | SIM   | SIM                           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | SIM   | SIM   | SIM                           |

Fonte: Do autor.

Tendo os microrganismos testados respondido satisfatoriamente aos testes realizados, optamos pelo uso de cepas de *Micrococcus luteus*, as quais são utilizadas em métodos descritos na Farmacopeia Brasileira para outros antibióticos da classe dos macrolídeos (BRASIL, 2010).

#### 4.3.2.2 Preparo da solução padrão de roxitromicina

Para o preparo da solução estoque de padrão de referência, inicialmente foi preparada a solução tampão fosfato de potássio estéril pesando-se 16,73g de fosfato de potássio dibásico e 0,523g de fosfato de potássio monobásico em qsp 1000mL de água purificada por osmose reversa por meio de balão volumétrico. O pH foi ajustado para 8,1 com ácido fosfórico 6 M. Em seguida, foram pesados o equivalente a 10 mg do padrão de roxitromicina SQR (Farmacopéia Européia, Lote R1500000), que foram dissolvidos em 2 mL de metanol e completando-se o volume com solução de tampão fosfato de potássio 0,1 M estéril pH 8,1 em balão volumétrico de 10 mL (1000  $\mu$ /mL). As soluções de trabalho do padrão de referência foram obtidas diluindo-se a solução estoque com tampão fosfato de potássio 0,1 M estéril pH 8,1, de modo a se obter as concentrações de 3  $\mu$ g/mL (S1), 6  $\mu$ g/mL (S2) e 12  $\mu$ g/mL (S3).

#### 4.3.2.3 Preparo das soluções amostra de roxitromicina

Para o preparo da solução estoque, dez cápsulas de roxitromicina 300 mg lote 1 foram abertas e seu conteúdo foi pesado. Posteriormente, o equivalente a 10 mg de roxitromicina foram pesados e homogeneizados com 2 mL de metanol, completando-se o volume com solução tampão fosfato de potássio 0,1 M estéril pH 8,1, em balão volumétrico de 10 mL de forma a obter solução com 1000  $\mu$ g/mL. As soluções testes foram obtidas diluindo-se a solução estoque com tampão fosfato de potássio 0,1 M estéril pH 8,1, de modo a se obter as concentrações de 3  $\mu$ g/mL (T1), 6  $\mu$ g/mL (T2) e 12  $\mu$ g/mL (T3).

#### 4.3.2.4 Execução do ensaio microbiológico por difusão em ágar

Os meios de cultura, placas e cilindros utilizados foram autoclavados em temperatura de 121 °C por tempo de 15 minutos em autoclave (QUIMIS) e todos os procedimentos foram executados em gabinete de fluxo laminar (LABCONCO). Para o referido método, é comum que sejam empregadas placas de petri de 100 mm de diâmetro e 20 mm de profundidade (BREIER, 2002; DAFALE, 2014; MANFIO et al., 2013; PAIM et al., 2010; SALGADO; LOPES; LUCHESI, 2006; SCHIMIDT, 2009; VITAL et al., 2004). Contudo, empregamos placas de 100 mm x 15 mm, as quais proporcionam maior facilidade de distribuição da camada inoculada sobre a placa de petri, reduzindo erros de execução do analista. Utilizamos,



também, papel do tipo Kraft para recobrir a parte interna da tampa da placa de Petri, visando evitar que gotículas de condensação prejudiquem o ensaio. Aplicou-se sobre as placas de Petri uma camada de 20 mL de meio de cultura Ágar Caseína Soja (KASVI 081814205) e, após resfriamento, aplicou-se 5 mL da camada inoculada, conforme descrita em 4.3.2.1.

Foram dispostos sobre a superfície da camada inoculada seis cilindros de aço inoxidável que foram esterilizados em autoclave e distribuídos de modo a formarem entre si ângulos de aproximadamente 60 °, sendo que em três cilindros foram introduzidos 200 µL das soluções padrão de roxitromicina (S1, S2 e S3) e nos demais 200 µL de solução teste (T1, T2 e T3), dispostos conforme a figura 4.

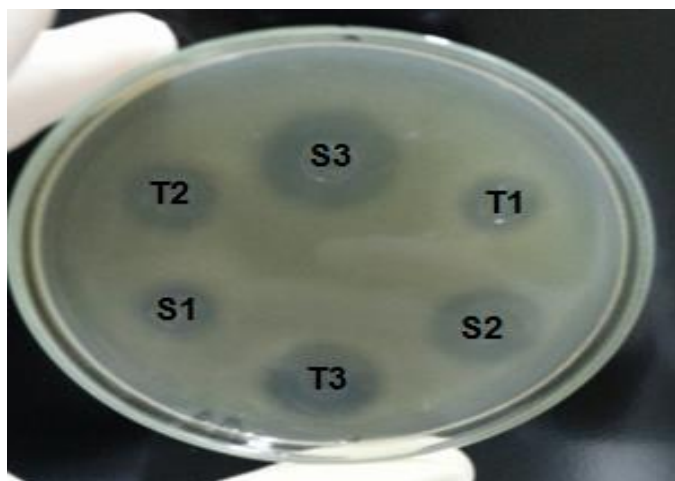


Figura 4- Zonas de inibição do crescimento causadas pela Roxitromicina em cultura de *Micrococcus luteus*.  
Fonte: Do autor.

O período de incubação foi de 18 horas em estufa bacteriológica na temperatura de 33 ° C. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição formados pelo antibiótico foram cuidadosamente medidos utilizando-se paquímetro digital (MARBERG) e todo material utilizado foi descontaminado em autoclave a 121°C por período de 20 minutos. O cálculo da potência foi obtido por meio da equação de Hewitt:

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

$$M = F/b \quad b = E/I$$

em que:

$$F = 1/3 [(\bar{T}1 + \bar{T}2 + \bar{T}3) - (\bar{S}1 + \bar{S}2 + \bar{S}3)]$$

I = logaritmo da razão das doses

$$E = 1/4 [(T\bar{3} + S\bar{3}) - (T\bar{1} + S\bar{1})].$$

#### 4.3.2.5 Validação do Método Microbiológico por Difusão em Ágar

A validação dos métodos de quantificação e do ensaio de dissolução foi conduzida, por meio de estudos experimentais, através dos parâmetros de linearidade, intervalo, precisão, seletividade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

##### 4.3.2.5.1 Linearidade

Para construção da curva analítica foram realizados nove ensaios independentes em três dias consecutivos conforme Paim et al. (2010). Cada ensaio realizado foi constituído de seis placas (conforme item 4.3.2.4), totalizando 54 medições por dose. Consideraram-se para fins de obtenção da curva analítica as médias dos halos de inibição do crescimento obtidas pelas soluções padrão de referência (S1, S2 e S3) em função do logaritmo da dose utilizada. A linearidade foi avaliada pela regressão linear e análise dos desvios.

##### 4.3.2.5.2 Precisão

A precisão do método foi determinada pela medição dos halos de inibição produzidos pela solução padrão de roxitromicina, avaliada pela repetibilidade, e expressa através de desvio padrão relativo. A repetibilidade foi avaliada realizando-se três ensaios por dia (Intradia) em três dias consecutivos (Interdias), por um mesmo analista e sobre as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada pela variação dos resultados obtidos durante os três dias de análise.

##### 4.3.2.5.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada com base na formação de produtos de degradação forçada. Para a formação de produtos de degradação ácida, o equivalente a 10 mg de roxitromicina foi pesado a partir do volume contido em 10 cápsulas de roxitromicina 300 mg e homogeneizados com 2 mL de metanol, completando-se o volume com HCl 0,1 M em balão volumétrico de 10 mL. Após 1 hora em repouso, essa solução foi neutralizada com igual

volume de NaOH 0,1 M e diluída com tampão fosfato de potássio pH 8,1 em soluções de trabalho com concentrações de 3, 6 e 12 µg/mL, respectivamente. Para a formação de produtos de degradação básica, o equivalente a 10 mg de roxitromicina foi pesado a partir do volume contido em 10 cápsulas de roxitromicina 300 mg e homogeneizados com 2 mL de metanol, completando-se o volume com NaOH 0,1M em balão volumétrico de 10 mL. Após 4 horas em repouso, essa solução foi neutralizada com igual volume de HCl 0,1M e diluída com tampão fosfato de potássio pH 8,1 em soluções de trabalho com concentrações de 3, 6 e 12 µg/mL, respectivamente.

Uma solução contendo os excipientes utilizados no preparo das cápsulas, diluído em solução tampão fosfato de potássio pH 8,1, com obtenção de concentração de 12 µg/mL foi analisada para avaliar a interferência dos excipientes. Ainda, solução de HCl 0,1M e NaOH 0,1M 1:1 diluída em tampão fosfato de potássio pH 8,1 foi utilizada como branco.

#### *4.3.2.5.4 Robustez*

Para análise da robustez, os ensaios foram realizados, analisando-se solução teste, variando-se os parâmetros tempo de incubação, pH da solução tampão e substituição da solução tampão por água purificada.

#### *4.3.2.5.5 Exatidão*

Para análise da exatidão do método microbiológico, foi empregada a técnica de placebo contaminado. Foram preparadas, em tampão fosfato de potássio pH 8,1, duas soluções estoque na concentração de 1000 µg/mL, sendo uma solução padrão de roxitromicina e a outra solução da mistura de excipientes (placebo) utilizada na manipulação das cápsulas. Em seguida, a solução de excipientes foi diluída de modo a se obter a concentração de 1,2 µg/mL. Essa solução foi utilizada para diluir a solução estoque do padrão de roxitromicina, de modo a se obter as concentrações de 3, 6 e 12 µg/mL, respectivamente. As soluções de roxitromicina adicionadas ao placebo foram aplicadas ao método conforme descrito e os halos de inibição de crescimento medidos por meio de paquímetro digital após o período de incubação. Os ensaios foram realizados em dois dias consecutivos, tendo sido feito um total de 6 medições por dose em cada dia. As médias dos tamanhos dos halos foram

aplicadas na equação da curva analítica e os resultados comparados à concentração teórica (dose) da solução.

#### 4.3.2.5.6 Limite de Detecção

Para determinação do limite de detecção, foram realizadas análises de soluções, preparadas conforme a padronização do método, em concentrações decrescentes. Quatro soluções foram preparadas diluindo-se o padrão de roxitromicina em solução tampão fosfato de potássio pH 8,1 de modo a se obter as concentrações de 0,6, 0,5, 0,4 e 0,3 µg/mL, respectivamente. As soluções foram aplicadas em cilindros de aço inoxidável dispostos em placas de Petri e contendo camadas base e inoculada, conforme descrito no ítem 4.3.2.4, perfazendo um total de 12 aplicações por concentração. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por período de 18 horas na temperatura de 33 +/- 2 °C.

O limite de detecção foi definido como a menor concentração capaz de gerar halos de inibição do crescimento nas condições estabelecidas para o método.

### 4.3.3 Método Cromatográfico

Considerando-se o espectro de absorção na região do ultravioleta/visível da roxitromicina, com máxima absorção em comprimento de onda de 205 nm, mostrou-se imperioso desenvolver o método de quantificação deste fármaco para a forma farmacêutica cápsulas utilizando-se de método cromatográfico. Uma vez que as técnicas empregadas em cromatografia propiciam a separação do analito dos demais componentes da amostra, os inconvenientes oriundos da absorção em um comprimento de onda pouco seletivo e de baixa estabilidade restam contornados.

#### 4.3.3.1 Condições Experimentais

Inicialmente, 10 mg de roxitromicina padrão primário foram dissolvidos, com uso de balão volumétrico de 10 mL, em 2 mL de metanol, completando-se o volume com solução tampão pH 6,8. Posteriormente, 1,5 mL desta solução foi novamente diluída em solução tampão pH 6,8 por meio de balão volumétrico de 10 mL. Esta solução foi analisada em

espectrofotômetro uv/vis para verificar o comprimento de onda de máxima absorção do fármaco através de varredura espectral.

Posteriormente, estudos para estabelecer as condições de adequabilidade do sistema por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizados empregando coluna PROMOSIL C18 4,6 x 150 mm da AGELA TECHNOLOGIES, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 25°C e detector ultravioleta/visível. A composição da fase móvel foi definida como uma mistura de acetonitrila (LICHrosulu – MERCK I770730517) e tampão fosfato de amônio (49,1g de fosfato de amônio monobásico em 1000 mL de água purificada, ajustando-se para pH 5,3 com NaOH 2 M), tendo sido otimizada para a proporção de 35:65 v/v, baseando-se no tempo de retenção do pico cromatográfico. O pH final da fase móvel foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 2M. Em seguida, a fase móvel foi filtrada por filtração a vácuo com membrana de nitrocelulose.

#### 4.3.3.2 Preparo das Soluções Padrão de roxitromicina

Para o preparo da solução estoque na concentração de 1000 µg/mL, foram pesados, exatamente, 10 mg do padrão de roxitromicina SQR (Farmacopéia Européia Lote R1500000) e diluídos em balão volumétrico de 10 mL em solução tampão pH 6,8 constituído de HCl e Fosfato de Sódio. As soluções de trabalho do padrão de referência foram obtidas diluindo-se a solução estoque, por meio de pipeta automática de volume ajustável e de balões volumétricos, em fase móvel, de modo a obter soluções com concentrações de 30, 70, 90, 130 e 180 µg/mL, respectivamente.

#### 4.3.3.3 Preparo da solução amostra de roxitromicina

Para o preparo da solução estoque teste foram pesados, exatamente, 10 mg de roxitromicina a partir da roxitromicina cápsulas 300 mg e dissolvidos em solução tampão pH 6,8 constituído de HCl e Fosfato de Sódio em balão volumétrico de 10 mL para obtenção de solução com concentração de 1000 µg/mL. As soluções testes foram obtidas diluindo-se a solução estoque com fase móvel, de modo a se obter a concentração de trabalho de 100 µg/mL.

#### 4.3.3.4 Validação do Método Cromatográfico

A validação do método cromatográfico seguiu a normatização da RDC 899/2003, tendo sido avaliados os parâmetros Linearidade, Seletividade, Precisão, Exatidão, Robustez e Limites de Detecção e Quantificação. Ainda, foram realizados testes de estabilidade, os quais foram avaliados por meio do método cromatográfico desenvolvido.

##### 4.3.3.4.1 Linearidade

Para construção da curva analítica, foram preparadas soluções nas concentrações de 30, 70, 90, 130 e 180 µg/mL, respectivamente, conforme item 4.3.3.2, em triplicata. As análises foram realizadas em três dias consecutivos. A curva analítica foi determinada através da equação  $y = ax + b$ , em que  $a$  corresponde ao coeficiente de correlação linear, e  $b$  corresponde à intersecção da reta no eixo  $y$ . O coeficiente de correlação ( $r$ ) foi determinado a partir do ajuste dos dados à reta.

##### 4.3.3.4.2 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade, e expressa através de desvio padrão relativo. A repetibilidade foi avaliada por meio das áreas dos picos cromatográficos obtidas pela análise de soluções nas concentrações de 30, 70, 90, 130 e 180 µg/mL, respectivamente, preparadas conforme ítem 4.3.3.2, realizando-se três ensaios por dia (Intradia) em três dias consecutivos (Interdias), por um mesmo analista e sobre as mesmas condições experimentais.

##### 4.3.3.4.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada com base na formação de produtos de degradação forçada. Para a formação de produtos de degradação ácida, 1,5 mL da solução estoque de amostra de roxitromicina foi diluída em HCl 0,1 mol/L por meio de balão volumétrico de 10 mL. Após uma hora, a solução foi neutralizada com tampão pH 6,8 e analisada nas condições estabelecidas.

Foram analisados, ainda, uma solução de excipientes (placebo) na concentração de 100 µg/mL, preparada pesando-se 10 mg de placebo e transferindo para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com tampão fosfato pH 6,8. Em seguida, alíquota de 1 mL dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e diluída em fase móvel. Solução constituída de 1 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 e qsp 10 mL de fase móvel, também, foi analisada para averiguação da interferência do solvente.

#### *4.3.3.4.4 Exatidão*

A exatidão do método foi avaliada obtendo-se as áreas dos picos cromatográficos de três concentrações distintas das soluções testes nas concentrações 30, 90 e 180 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi analisada em triplicata e o procedimento executado em três dias consecutivos. As áreas obtidas nos picos cromatográficos foram aplicadas na equação da curva analítica e os resultados comparados à concentração teórica da solução.

#### *4.3.3.4.5 Robustez*

Para análise da robustez, os ensaios foram realizados analisando-se a solução teste conforme descrito no ítem 4.3.3.3, variando-se os parâmetros pH da fase móvel, comprimento de onda, lote da coluna cromatográfica e temperatura do forno.

#### *4.3.3.4.6 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)*

O LD e LQ foram determinados experimentalmente a partir da análise de soluções padrão de roxitromicina com concentrações decrescentes. O limite de detecção foi determinado como as menores quantidades detectadas nas condições cromatográficas estabelecidas, e o LQ determinado como a menor concentração determinada com precisão e exatidão.

#### 4.3.3.4.7 Estabilidade

As estabilidades das soluções de padrão e teste foram determinadas após 72 horas. Para isso, as soluções foram mantidas em repouso sob a bancada, sem qualquer proteção e expostas à luz e posteriormente analisadas nas condições cromatográficas estabelecidas.

#### 4.3.4 Doseamento

As metodologias validadas para os ensaios microbiológico e físico-químico foram aplicadas na determinação de teor do fármaco na forma farmacêutica cápsula contendo roxitromicina 300 mg. Foram utilizados roxitromicina SQR e roxitromicina 300 mg cápsulas. O doseamento pelo método cromatográfico foi realizado em duplicata em dois dias consecutivos, empregando-se dois lotes diferentes da coluna cromatográfica PROMOSIL C18 4,6 x 150 mm da AGELA TECHNOLOGIES, sendo que cada análise foi constituída de 3 corridas do padrão e 5 corridas da amostra, sendo o teor obtido por meio das áreas dos picos cromatográficos através da fórmula:

$$\frac{\text{MÉDIA DAS ÁREAS DA AMOSTRA} * 100}{\text{MÉDIA DAS ÁREAS DO PADRÃO}}$$

O doseamento pelo método microbiológico foi realizado em triplicata em três dias consecutivos, comparando-se as médias dos halos das soluções padrão e teste por meio da equação de Hewitt.

#### 4.3.5 Perfil de Dissolução

O perfil de Dissolução foi desenvolvido, tendo sido precedido pelo estudo de solubilidade em equilíbrio, conforme determina a legislação vigente (BRASIL, 2011). Diferentes formulações contendo roxitromicina 300mg foram testadas em diferentes meios de dissolução e, também, em diferentes aparatos.



#### 4.3.5.1 Preparo da Solução Padrão de Roxitromicina.

Para o preparo da solução estoque na concentração de 1000 µg/mL, foram pesados, exatamente, 10 mg do padrão de roxitromicina SQR (Farmacopéia Européia Lote R1500000) e diluídos em balão volumétrico de 10 mL no meio de dissolução. As soluções de trabalho do padrão de referência foram obtidas diluindo-se a solução estoque, por meio de pipeta automática de volume ajustável e de balões volumétricos, em solução tampão, de modo a obter soluções com concentrações de 166,7 µg/mL.

#### 4.3.5.2 Estudo de Solubilidade em Equilíbrio.

O teste de solubilidade para roxitromicina foi realizado pelo método de equilíbrio, empregando a técnica *shake-flask*. Para realização deste ensaio, foi utilizada roxitromicina lote 14052337A da SHIXING PHARMACEUTIC – CHINA. Um excesso de sólido foi adicionado a 10 mL dos meios testados, até a formação de corpo de fundo. Os béquers contendo os meios foram submetidos a agitação de 150 RPM por 24 horas em mesa agitadora (MARCONI). O estudo foi realizado em triplicata em cada meio. Foram feitas coletas em períodos de 12 e 24 horas de agitação e o material coletado foi filtrado em filtro PTFE 0, 45µm, diluídas em fase móvel e quantificadas por meio do método cromatográfico validado. Os meios testados no estudo de solubilidade em equilíbrio foram água, ácido clorídrico 0,1M pH1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 6,8, respectivamente.

#### 4.3.5.3 Desenvolvimento do Perfil de Dissolução.

O perfil de dissolução foi realizado em Dissolutor TDT-081 (ELECTROLAB). Os volumes dos meios de dissolução empregados na etapa de desenvolvimento foram definidos com base no teste de solubilidade em equilíbrio de modo a se obter em todos os meios as condições *sink*. Foram preparados quatro lotes de cápsulas de roxitromicina 300 mg, cada lote preparado com um tipo diferente de excipiente. Os quatro lotes foram testados nos diferentes meios de dissolução visando serem analisados problemas de formulação. Os meios empregados durante a etapa de desenvolvimento e seus respectivos volumes estão descritos na tabela 4.

Tabela 4- Volumes de meios de dissolução testados para avaliação do perfil de dissolução para roxitromicina cápsula 300mg.

| Meio de Dissolução   | Volume de Meio (mL) |
|--|---------------------|
| Água Purificada  | 1000                |
| Tampão Fosfato pH 6,0 - Farmacopéia Brasileira 5ª edição.          | 900                 |
| Tampão Fosfato pH 6,0 diluído 1:10                                 | 900                 |
| Tampão Fosfato pH 6,0 diluído 1:100 (pH final 6,8)                 | 900                 |
| Tampão Fosfato pH 6,8 - Farmacopéia Européia 8.0                   | 900                 |
| Tampão Fosfato pH 6,8 - HCl 0,1M mais Fosfato de Potássio Dibásico | 900                 |

Fonte: Do autor.

Para definição dos parâmetros do perfil de dissolução, cápsulas de roxitromicina 300 mg da Formulação 2 foram introduzidas nas cubas do dissolutor e analisadas nas rotações de 100, 75 e 50 RPM, respectivamente, e com os aparatos Pá e Cesta. Foram utilizados sinkers, visando a evitar a flutuação das cápsulas. Em cada cuba do dissolutor, foram coletados 10 mL do meio de dissolução nos tempos de 15, 30 e 45 minutos, respectivamente, com reposição do meio. O volume coletado foi filtrado em filtro tipo PTFE 0,45µm. Em seguida, alíquota de 5 mL do filtrado foi misturado em fase móvel na proporção 1:1 e analisado por meio do método cromatográfico. Cada combinação rotação/aparato foi analisada em duplicata. A temperatura do aparelho dissolutor foi estabelecida em 37,5 °C.

As áreas dos picos cromatográficos obtidas foram usadas como parâmetro para definição da rotação e do aparato a ser empregado no método.

#### 4.3.5.4 Validação do Perfil de Dissolução

O perfil de dissolução foi validado com base nos parâmetros seletividade, precisão, exatidão e robustez. Os parâmetros linearidade e limite de detecção e quantificação foram validados durante a validação do método cromatográfico de quantificação. Para os ensaios de validação, foi utilizada a formulação 2.

#### 4.3.5.4.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, a solução tampão empregada no perfil de dissolução, foi analisada, através de várias injeções no sistema cromatográfico. Da mesma maneira, foram analisadas amostras de placebo e de cápsulas vazias dissolvidas em solução tampão, submetendo-as às condições do ensaio de dissolução.

#### 4.3.5.4.2 Precisão

As análises foram realizadas em três dias consecutivos. A precisão foi determinada pela dissolução de seis cápsulas ( $n = 6$ ) em 30 minutos em rotação de 100 RPM utilizando-se o aparato pá. Após o tempo preconizado, foram coletados 10 mL do meio de dissolução. O volume coletado foi filtrado em filtro tipo PTFE 0,45 $\mu$ m. Em seguida, alíquota de 5 mL do filtrado foi diluída em fase móvel na proporção 1:1 e analisada por meio do método cromatográfico. As concentrações foram obtidas através da equação:

$$\frac{\text{ÁREA DA AMOSTRA} * 100}{\text{MÉDIA DAS ÁREAS DO PADRÃO}}$$

A variação das medidas foi analisada através do desvio padrão relativo (DPR) no ensaio de dissolução das cápsulas.

#### 4.3.5.4.3 Robustez

A robustez do ensaio de dissolução foi realizada substituindo-se o aparelho dissolutor empregado e a marca dos filtros utilizada. Os resultados obtidos com as alterações empregadas foram comparados àqueles obtidos durante a etapa de precisão.

#### 4.3.5.4.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de ensaio de recuperação. Roxitromicina matéria-prima, nas quantidades de 20, 100 e 120 %, respectivamente, da dose unitária teórica, foram adicionadas nas quantidades proporcionais de placebo das cápsulas (formulação 2). As misturas de placebo e roxitromicina foram adicionadas às cubas do dissolutor contendo

900 mL de meio de dissolução e submetidas às condições padronizadas para o ensaio por tempo de 30 minutos. Alíquotas de 10 mL foram coletadas das cubas do dissolutor e filtradas em filtro tipo PTFE 0,45µm. Em seguida, alíquota de 5 mL do filtrado foi diluído em fase móvel na proporção 1:1 e quantificados por CLAE.

Cada concentração foi analisada em triplicata em dois dias consecutivos.

#### **4.3.6 Estudo de Desintegração de Cápsula Gastrorresistente**

Considerando-se a intensa degradação do fármaco roxitromicina em meio ácido, foram realizados testes envolvendo cápsulas gastrorresistentes. O revestimento é uma técnica usada para garantir que as cápsulas resistam, sem alteração, à ação do suco gástrico, devendo, porém, desagregar-se rapidamente no suco intestinal. O revestimento consiste em envolver a cápsula com filme de material gastrorresistente de natureza geralmente polimérica (OLIVEIRA et al., 2016).

Foram realizados ensaios no aparelho DESINTEGRADOR (NOVA ÉTICA). O volume da cuba do desintegrador foi preenchido com 500 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L, estando o banho a 37 °C. Em seguida, três cápsulas da formulação 4, a qual foi manipulada com o uso de cápsula gastrorresistente, foram submetidas ao equipamento. O tempo necessário para abertura da cápsula foi observado.

Da mesma maneira, foi analisado o comportamento das cápsulas em meio neutro. Para tanto, a cuba do desintegrador foi preenchida com tampão pH 6,8 constituído de HCl e Fosfato de Sódio. Em seguida, três cápsulas de roxitromicina (formulação 4) foram submetidas ao ensaio no equipamento. O tempo necessário para abertura da cápsula em meio neutro também foi observado.

Foi realizada, ainda, no aparelho dissolutor, uma etapa ácida. Utilizando-se a formulação 4, seis cápsulas de roxitromicina foram submetidas ao aparelho dissolutor, utilizando-se como meio de dissolução 500 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L, aparato pá, rotação de 100 RPM e temperatura do banho de 37 °C. Após 30 minutos de ensaio, 10 mL do conteúdo da cuba foram coletados e filtrados por meio de filtro PTFE 0,45µm. Em seguida, alíquota de 5 mL do volume filtrado foi dissolvida em tampão fosfato de sódio dibásico pH 10,3 na proporção 1:1 e analisada pelo método cromatográfico, previamente validado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela execução dos ensaios analíticos foram tratados em softwares adequados, os quais sejam editores de planilhas ou especializados em estatística, que permitiram a organização dos dados e a correta interpretação dos eventos observados.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PESO

A Tabela 5 apresenta os valores correspondentes à variação de peso das cápsulas de roxitromicina 300mg para a formulação 1. Conforme apresentado, a média dos valores e o desvio padrão relativo DRP correspondente a 0,74 %, estão em conformidade com o preconizado na Farmacopéia Brasileira 5ª edição, que estipula um limite de variação máximo de 7,5% para cápsulas com pesagem superior a 300mg.

Tabela 5- Valores obtidos na variação de peso das cápsulas de roxitromicina 300mg da formulação 1.

|            | Capsula Cheia<br>(g) | DPR<br>(%) | Cápsula Vazia<br>(g) | DPR<br>(%) | Volume Encapsulado<br>(g) | DPR<br>(%) |
|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|---------------------------|------------|
| Alíquota 1 | 0,74549              |            | 0,12933              |            | 0,61616                   |            |
|            | 0,74795              |            | 0,12803              |            | 0,61992                   |            |
|            | 0,74543              |            | 0,12440              |            | 0,62103                   |            |
|            | 0,75204              |            | 0,12546              |            | 0,62658                   |            |
|            | 0,75186              |            | 0,12372              |            | 0,62814                   |            |
|            | 0,74352              |            | 0,12456              |            | 0,61896                   |            |
|            | 0,74970              |            | 0,12561              |            | 0,62409                   |            |
|            | 0,75070              |            | 0,12712              |            | 0,62358                   |            |
|            | 0,75366              |            | 0,12610              |            | 0,62756                   |            |
|            | 0,74543              | 0,47       | 0,12440              | 1,43       | 0,62103                   | 0,64       |
| Alíquota 2 | 0,75337              |            | 0,12641              |            | 0,62696                   |            |
|            | 0,75661              |            | 0,12685              |            | 0,62976                   |            |
|            | 0,75306              |            | 0,12165              |            | 0,63141                   |            |
|            | 0,74383              |            | 0,12346              |            | 0,62037                   |            |
|            | 0,74860              |            | 0,12562              |            | 0,62298                   |            |
|            | 0,74388              |            | 0,12272              |            | 0,62116                   |            |
|            | 0,74105              |            | 0,12833              |            | 0,61272                   |            |
|            | 0,75091              |            | 0,12993              |            | 0,62098                   |            |
|            | 0,74684              |            | 0,12615              |            | 0,62069                   |            |
|            | 0,75100              | 0,66       | 0,12723              | 2,04       | 0,62377                   | 0,86       |
|            |                      |            |                      |            | DPR (%) Inter-dias        | 0,74       |

Fonte: Do autor

## 5.2 ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR

O microrganismo *Micrococcus Luteus* mostrou-se adequado ao desenvolvimento do método uma vez que apresentou crescimento nos meios de cultura utilizados (Ágar Caseína Soja e Infuso de Cérebro e Coração) bem como por ser susceptível ao antibiótico roxitromicina, formando halos de inibição de crescimento bem definidos dentro da faixa de concentração proposta para o método.

Destaca-se, também, que os volumes de meio de cultura utilizados nas camadas base (20 mL) e inoculada (5mL) mostraram-se muito adequados ao método desenvolvido em placas de tamanho 15 mm x 100 mm, uma vez que a relação entre os referidos volumes e as

placas de petri utilizadas facilita a execução do método e evita má distribuição dos meios de cultura na placa por erro do analista.

### 5.2.1 Linearidade

Os valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos, em cada ensaio, durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de roxitromicina solução padrão estão apresentados na Tabela 6.

A curva analítica foi obtida plotando-se o logaritmo da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus a média dos diâmetros dos halos (mm). As correspondentes zonas de inibição foram de 18,21mm (DPR = 1,85%), 15,25mm (DPR = 2,49%) e 11,68mm (DPR= 0,77%), respectivamente, para as concentrações de 12, 6 e 3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A equação da reta obtida foi  $y = 10,846x + 6,6068$ , sendo x o logaritmo da concentração e y o diâmetro dos halos de inibição, conforme figura 5.

Tabela 6- Valores de médias obtidos, dos diâmetros dos halos de inibição, para o método microbiológico para roxitromicina solução padrão.

|  | Diâmetro dos Halos de Inibição (mm) <sup>a</sup> |       |       |       |       |       |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|
|  | S1   | DPR   | S2    | DPR   | S3    | DPR   |
| Dia 1                                  | 11,66  |       | 14,86 |       | 18,26 |       |
|  | 11,78  | 0,98% | 14,91 | 0,89% | 17,9  | 1,08% |
|  | 11,89  |       | 14,66 |       | 18,21 |       |
| Diâmetro médio (Intradia) <sup>b</sup> | 11,78  |       | 14,81 |       | 18,12 |       |
| Dia 2                                  | 11,46  |       | 15,22 |       | 17,8  |       |
|  | 11,75  | 1,25% | 15,85 | 2,07% | 18,05 | 0,70% |
|  | 11,59  |       | 15,43 |       | 17,91 |       |
| Diâmetro médio (Intradia) <sup>b</sup> | 11,6   |       | 15,5  |       | 17,92 |       |
| Dia 3                                  | 10,82  |       | 15,08 |       | 18,47 |       |
|  | 12,02  | 6,26% | 15,8  | 2,34% | 18,66 | 0,52% |
|  | 12,14  |       | 15,41 |       | 18,6  |       |
| Diâmetro médio (Intradia) <sup>b</sup> | 11,66  |       | 15,43 |       | 18,58 |       |
| Diâmetro Médio (Interdias)             | 11,68  |       | 15,25 |       | 18,21 |       |
| DPR <sup>c</sup> (Interdias)           | 0,77%  |       | 2,49% |       | 1,85% |       |

<sup>a</sup> média de seis determinações

<sup>b</sup> média de 18 determinações

<sup>c</sup> desvio padrão relativo.

Fonte: Do autor.

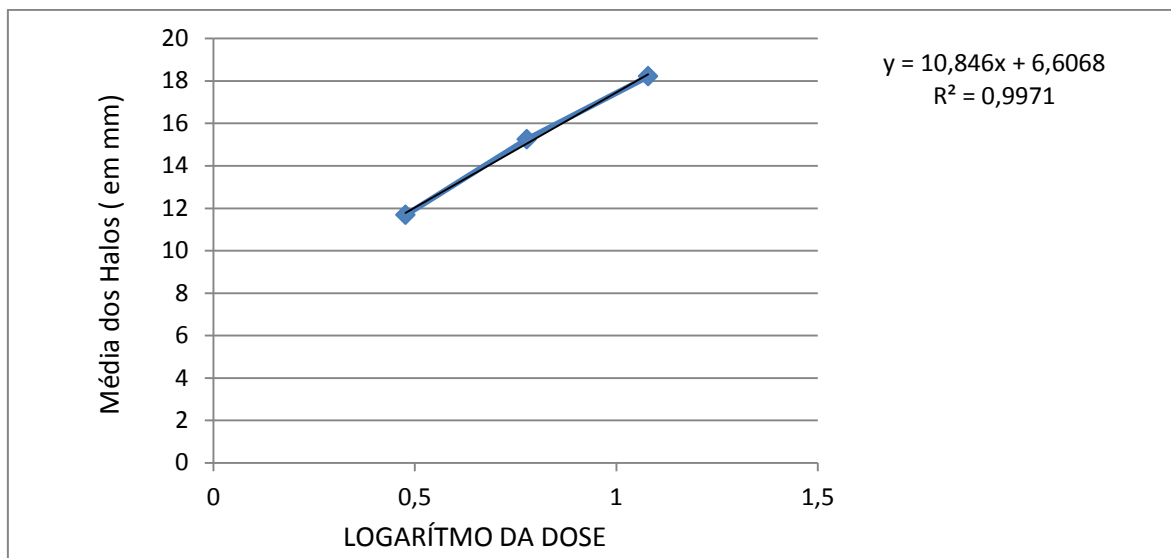


Figura 5- Curva analítica do método microbiológico por difusão em ágar para roxitromicina.

Fonte: Do autor

O método apresentou boa linearidade dentro da faixa de concentração analisada. O coeficiente de correlação ( $r = 0,9985$ ) demonstra haver correlação entre as concentrações lidas e as medidas dos halos de inibição de crescimento do microrganismo.

### 5.2.2 Precisão

A precisão do método foi demonstrada por meio do cálculo da potência da forma farmacêutica cápsula contendo roxitromicina 300 mg. Os valores estão representados na Tabela 7.

Tabela 7- Valores de precisão intra e interdias do método microbiológico por difusão em ágar para forma farmacêutica cápsula contendo roxitromicina.

| Ensaio    | Dia | Potência*(%) | DPR (%) |
|-----------|-----|--------------|---------|
| 1         | 1   | 92,87        | 1,99    |
| 2         |     | 90,18        |         |
| 3         |     | <b>89,43</b> |         |
| 4         | 2   | 89,90        | 1,91    |
| 5         |     | 92,00        |         |
| 6         |     | <b>93,38</b> |         |
| 7         | 3   | 92,25        | 0,99    |
| 8         |     | 90,79        |         |
| 9         |     | 90,59        |         |
| Interdias |     | 91,26        | 1,53    |

\*Média de 6 determinações

Fonte: Do autor.



Os resultados obtidos demonstram valores de DPR inferiores a 2 %, tanto nos ensaios intradia quanto interdias, indicando boa precisão.

A precisão do método, por meio dos halos de inibição de crescimento, com os respectivos desvios padrão relativos dos resultados dos ensaios intra e interdias estão apresentados, também, na Tabela 6.

### 5.2.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada através de produtos de degradação forçada para solução teste de roxitromicina. A seletividade também foi avaliada quanto apresentar resposta aos excipientes utilizados na manipulação das cápsulas e utilização de solução tampão nas diluições.

Tabela 8: Avaliação da seletividade do método microbiológico por difusão em ágar para roxitromicina.

| <b>Condições Analisadas</b>        | <b>Esperado</b>                | <b>Observado</b>               |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Análise de Excipientes             | Ausência de zonas de inibição  | Ausência de zonas de inibição  |
| Exposição a HCl 0,1 M, durante 1h  | Perda de Potência              | Potência de 38,4%              |
| Exposição a NaOH 0,1 M, durante 4h | Perda de Potência              | Potência de 80,8%              |
| Análise de Solução tampão          | Ausência de Zonas de Inibição. | Ausência de Zonas de Inibição. |

Fonte: Do autor.

O método demonstrou não sofrer interferências dos excipientes utilizados na formulação das cápsulas e da solução tampão. A degradação, sob as condições ácidas, demonstrou perda de potência de 52,86 % quando comparada à potência obtida na precisão do método. A degradação, sob as condições básicas, demonstrou perda de potência de 10,46 % quando comparada à potência obtida na precisão do método.

### 5.2.4 Robustez

A robustez foi avaliada através de alterações no tempo de incubação, pH da solução tampão e substituição da solução tampão por água purificada. Na execução do procedimento, sob os parâmetros alterados, os valores obtidos não apresentaram diferença significativa e o desvio padrão relativo foi de 1,09 %, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9- Valores obtidos para avaliação da robustez do método microbiológico por difusão em ágar para roxitromicina.

| <b>Condições</b>                        | <b>Potência (%)</b> | <b>DPR (%)</b> |
|---|---------------------|----------------|
| Condições Estabelecidas <sup>(a)</sup>  | 91,26               |                |
| Água como Solução Tampão <sup>(b)</sup> | 91,00               |                |
| 24 horas de incubação <sup>(b)</sup>    | 92,61               | 1,09           |
| pH da Solução Tampão 7,9 <sup>(b)</sup> | 91,06               |                |
| pH da Solução Tampão 8,3 <sup>(b)</sup> | 89,81               |                |

(a média de nove ensaios).

(b média de dois ensaios).

Fonte: Do autor.

### 5.2.5 Exatidão

Para avaliação da exatidão, empregamos a técnica do placebo contaminado. As médias dos halos de inibição obtidas foram aplicadas na equação da curva analítica e a percentagem de recuperação foi calculada por meio da equação:

$$\frac{\text{CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL} * 100}{\text{CONCENTRAÇÃO TEÓRICA}}$$

Os ensaios foram realizados em dois dias consecutivos, tendo sido feito um total de 6 medições por dose em cada dia. A tabela 10 apresenta os valores obtidos na determinação da exatidão.

Tabela 10- Valores obtidos na determinação de exatidão do método microbiológico por difusão em ágar.

| Concentração<br>(µg/mL) | Dia 1                    |            |                          | Dia 2                    |            |                          |
|-------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|
|                         | Halo de Inibição<br>(mm) | DPR<br>(%) | Recuperação<br>Média (%) | Halo de Inibição<br>(mm) | DPR<br>(%) | Recuperação<br>Média (%) |
| 3                       | 11,58                    | 1,49       | 98,21                    | 11,38                    | 3,48       | 100,93                   |
|                         | 11,49                    |            |                          | 12,09                    |            |                          |
|                         | 11,60                    |            |                          | 11,56                    |            |                          |
|                         | 11,95                    |            |                          | 11,39                    |            |                          |
|                         | 11,71                    |            |                          | 12,19                    |            |                          |
|                         | 11,85                    |            |                          | 12,26                    |            |                          |
| 6                       | 14,32                    | 2,83       | 101,32                   | 14,78                    | 1,87       | 100,53                   |
|                         | 15,08                    |            |                          | 14,77                    |            |                          |
|                         | 15,41                    |            |                          | 15,45                    |            |                          |
|                         | 15,55                    |            |                          | 15,02                    |            |                          |
|                         | 15,20                    |            |                          | 15,06                    |            |                          |
|                         | 15,09                    |            |                          | 15,35                    |            |                          |
| 12                      | 18,27                    | 1,68       | 99,12                    | 18,38                    | 1,01       | 100,07                   |
|                         | 17,91                    |            |                          | 18,54                    |            |                          |
|                         | 18,09                    |            |                          | 18,40                    |            |                          |
|                         | 18,73                    |            |                          | 18,14                    |            |                          |
|                         | 18,53                    |            |                          | 18,04                    |            |                          |
|                         | 18,09                    |            |                          | 18,39                    |            |                          |

Fonte: Do autor.

Os resultados observados aplicando-se as médias dos tamanhos dos halos na equação da curva analítica são todos próximos a 100 % demonstrando que o método apresenta boa exatidão.

### 5.2.6 Limite de Detecção

O limite de detecção foi estabelecido pela análise de soluções do antibiótico em concentrações decrescentes. Os resultados obtidos estão listados na tabela 11.

Tabela 11- Valores obtidos na determinação do limite de detecção do método microbiológico por difusão em ágar para roxitromicina.

| Concentração<br>µg/mL | Ausência de<br>zonas de<br>inibição | Discreta<br>Inibição | Zonas de<br>Inibição<br>Mensuráveis | Total de<br>Aplicações |
|-----------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 0,3                   | 12                                  | Não Houve            | Não Houve                           | 12                     |
| 0,4                   | 12                                  | Não Houve            | Não Houve                           | 12                     |
| 0,5                   | 9                                   | 3                    | Não Houve                           | 12                     |
| 0,6                   | Não Houve                           | 2                    | 10                                  | 12                     |

Fonte: Do autor.

Definiu-se, assim, a concentração de 0,5 µg/mL como sendo o limite de detecção do método microbiológico por difusão em ágar.

### 5.3 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A figura 6 apresenta a varredura espectral da solução de roxitromicina, utilizando solução tampão pH 6,8 como solvente, confirmando experimentalmente o comprimento de onda de máxima absorção, em 205 nm, conforme relatado na monografia para roxitromicina matéria-prima na Farmacopéia Européia 8.0.

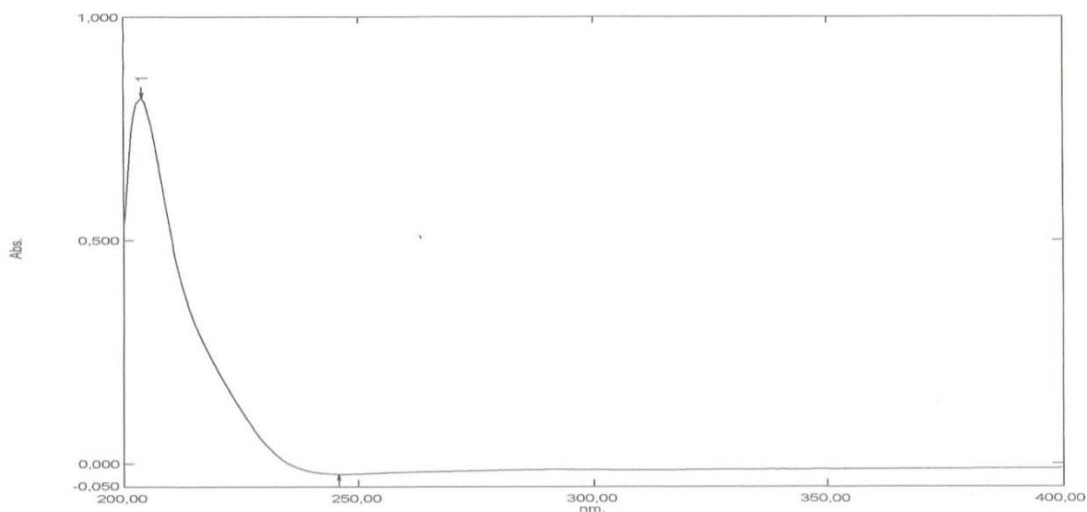


Figura 6- Varredura espectral para roxitromicina em tampão fosfato pH 6,8.

Fonte: Do autor

A figura 7 apresenta o perfil cromatográfico para roxitromicina utilizando fase móvel constituída por acetonitrila – tampão fosfato de amônio nas proporções 4:6 (1) e 35:65 (2). Os parâmetros de pratos teóricos (3409,08 - 5297,23), de assimetria (1,20 – 1,29), fator de retenção (1,3 – 3,68), atendem aos valores de referência (Número de pratos da coluna:  $N > 2000$ , Resolução:  $> 2$ , Fator de cauda ou assimetria:  $\leq 2$ , Fator de retenção:  $k > 2$ ).

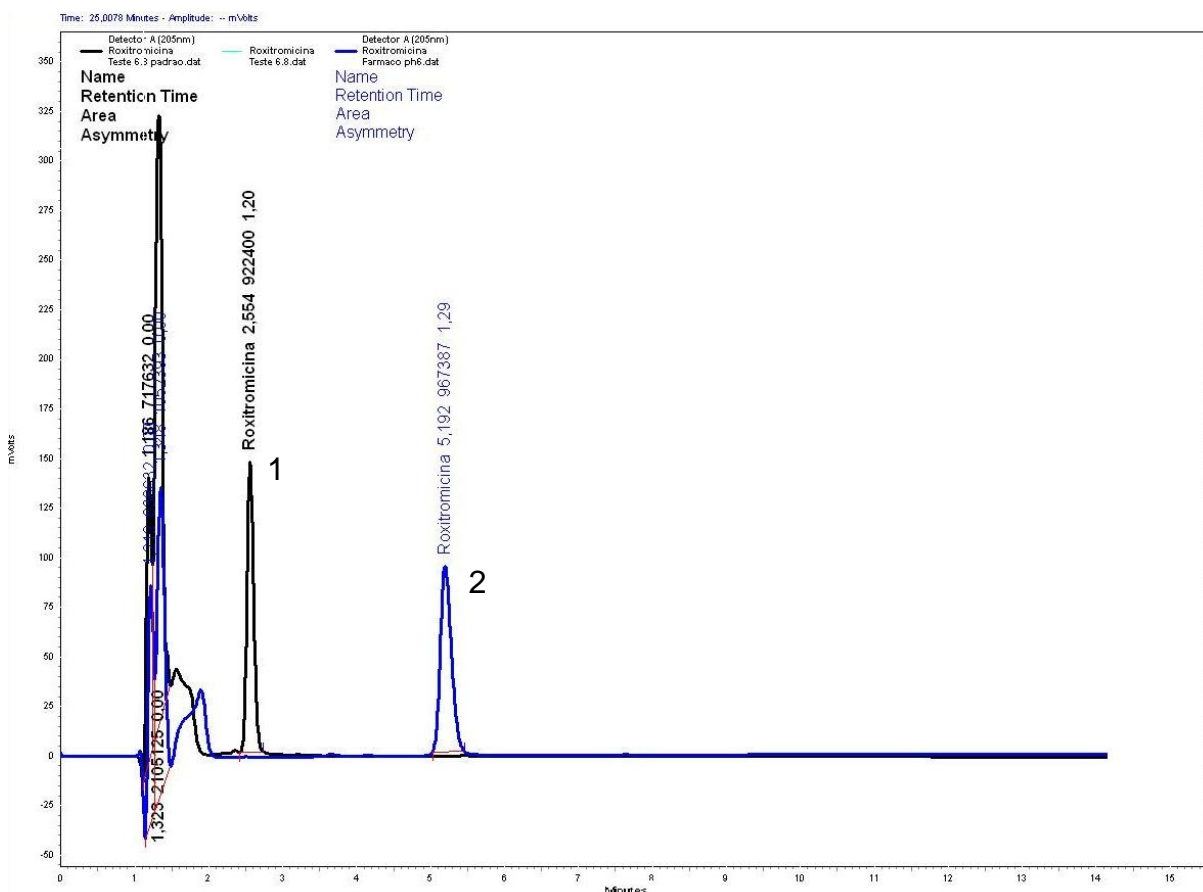


Figura 7- Valores de tempos de retenção para roxitromicina utilizando fase móvel constituída por acetonitrila – tampão fosfato de amônio nas proporções 4:6 (1) e 35:65 (2)

Fonte: Do autor

### 5.3.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparadas soluções de padrão de roxitromicina nas concentrações de 30, 70, 90, 130 e 180  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os valores obtidos das áreas dos picos cromatográficos em função da concentração das soluções de roxitromicina encontram-se representados na tabela 12.

A curva analítica (figura 8) foi obtida plotando-se a concentração das soluções ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus áreas dos picos cromatográficos. Foram realizadas nove medições por concentração da solução de roxitromicina em três dias consecutivos. Foram analisadas as concentrações de 30 (DPR = 1,07 %), 70 (DPR = 0,66 %), 90 (DPR = 0,69 %), 130 (DPR = 1 %) e 180  $\mu\text{g/mL}$  (DPR = 0,73 %), respectivamente. A equação da reta obtida foi  $y = 6110,2x + 11098$ , sendo x a concentração da solução e y a área do pico cromatográfico.

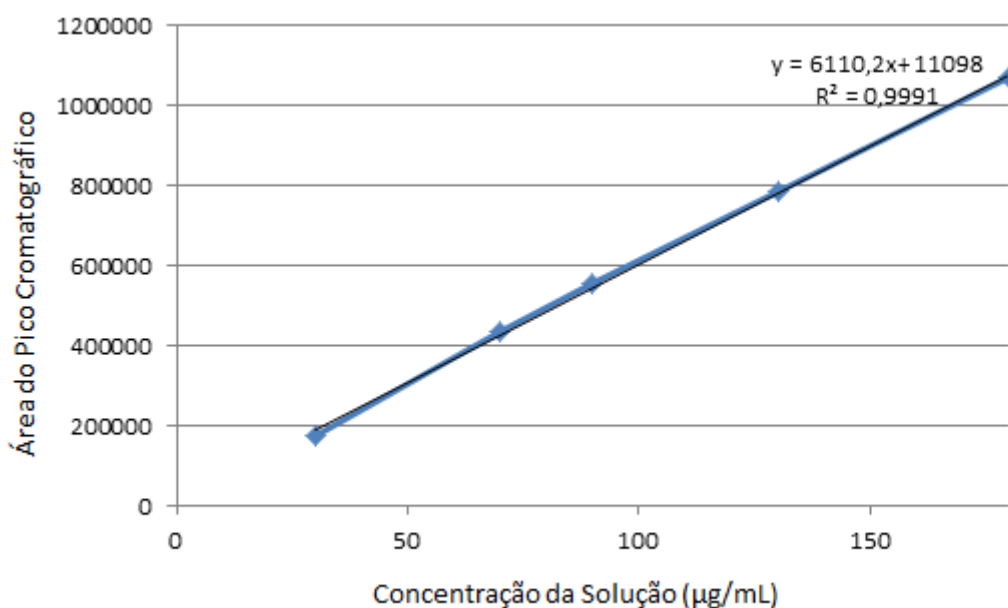


Figura 8- Curva analítica obtida para o método cromatográfico para roxitromicina, utilizando fase móvel constituída por acetonitrila – tampão fosfato de amônio nas proporções 35:65.

Fonte: do autor.

O método demonstrou boa linearidade dentro da faixa de concentração analisada. O coeficiente de correlação ( $r = 0,9995$ ) apresenta boa correlação entre as concentrações lidas e as áreas de pico.

### 5.3.2 Precisão

A precisão do método foi demonstrada por meio da repetibilidade, e expressa através do desvio padrão relativo (DPR). Os resultados obtidos para o ensaio de precisão estão apresentados na Tabela 12.

Os resultados obtidos demonstram valores de DPR inferiores a 2%, tanto nos ensaios intradia quanto interdias, indicando boa precisão.

Tabela 12- Valores obtidos na precisão do método cromatográfico para roxitromicina cápsula 300mg.

| Concentração<br>(µg/mL) | Dia 1           |            | Dia 2           |            | Dia 3           |            | DPR<br>interdias<br>(%) |
|-------------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-------------------------|
|                         | Área do<br>Pico | DPR<br>(%) | Área do<br>Pico | DPR<br>(%) | Área do<br>Pico | DPR<br>(%) |                         |
| 30                      | 176885          |            | 176957          |            | 176499          |            |                         |
|                         | 178271          | 1,08%      | 177405          | 1,19%      | 176471          | 1,26%      |                         |
|                         | 174508          |            | 173564          |            | 172654          |            | 1,07%                   |
| 70                      | 436519          |            | 434642          |            | 433192          |            |                         |
|                         | 439153          | 0,36%      | 434872          | 0,03%      | 432140          | 0,26%      |                         |
|                         | 439369          |            | 434748          |            | 430928          |            | 0,66%                   |
| 90                      | 557353          |            | 553123          |            | 550851          |            |                         |
|                         | 561606          | 0,48%      | 552641          | 0,05%      | 549765          | 0,15%      |                         |
|                         | 556693          |            | 552640          |            | 551339          |            | 0,69%                   |
| 130                     | 796816          |            | 787356          |            | 785886          |            |                         |
|                         | 798152          | 1,28%      | 786660          | 0,27%      | 786584          | 1,03%      |                         |
|                         | 780021          |            | 783396          |            | 772331          |            | 1,00%                   |
| 180                     | 1075907         |            | 1064065         |            | 1064080         |            |                         |
|                         | 1078257         | 0,19%      | 1063941         | 0,82%      | 1062830         | 0,06%      |                         |
|                         | 1080069         |            | 1079275         |            | 1063814         |            | 0,73%                   |

Fonte: Do autor.

### 5.3.3 Seletividade

A seletividade foi demonstrada por meio da formação de produtos de degradação ácida da roxitromicina. O fármaco mostrou-se altamente instável em pH ácido, formando produto de degradação com menor tempo de retenção que a molécula original. A figura 9 apresenta o cromatograma correspondente a seletividade do método.

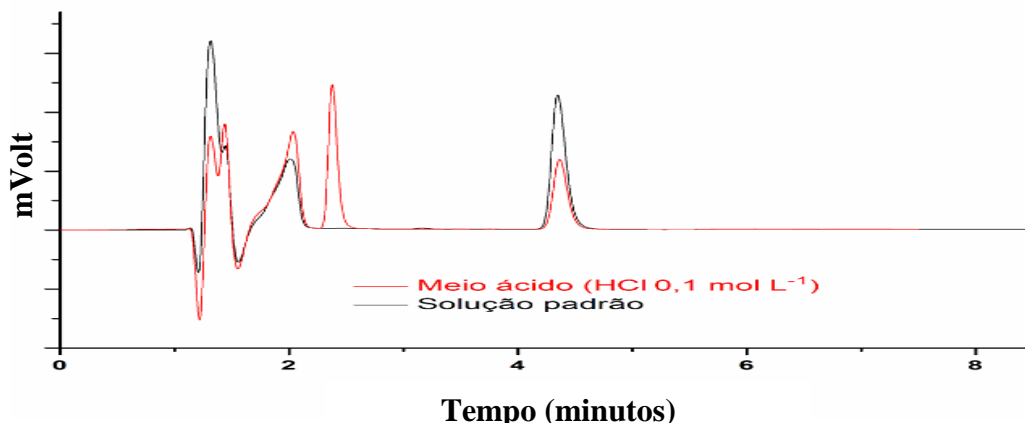


Figura 9- Cromatograma de roxitromicina e seu produto de degradação ácida.  
Fonte: Do autor

Considerando a coluna cromatográfica utilizada (PROMOSIL C18 - 5 $\mu$ M x 115mm), de caráter apolar, e o tempo de retenção obtido, observa-se a formação de um produto de degradação mais polar que a molécula original. Da mesma maneira, OSTROWSKI (2010), utilizando coluna cromatográfica (C18) e fase móvel semelhante à utilizada neste projeto, encontrou um produto de degradação de roxitromicina com tempo de retenção reduzido em relação ao do padrão.

Desta forma, sugerimos que a instabilidade em meio ácido da roxitromicina, que foi acentuadamente assinalada pelos métodos microbiológico e cromatográfico desenvolvidos, ocorra pela hidrólise ácida das ligações glicosídicas, bem como pela hidrólise ácida do éster cíclico presente no anel de lactona de 14 átomos.

Analisamos, ainda, os cromatogramas obtidos por meio da injeção de solução 100  $\mu$ g/mL de excipientes e os obtidos por meio da injeção de solução tampão pH 6,8 e fase móvel, com tempo de corrida de 20 minutos. As análises foram realizadas em duplicata. Observou-se que a linha de base permaneceu inalterada durante o tempo de corrida, não tendo sido observados picos cromatográficos gerados pelas soluções injetadas, demonstrando que os excipientes e a solução tampão não interferem nas áreas dos picos cromatográficos do analito em estudo, conforme apresentado na figura 10.



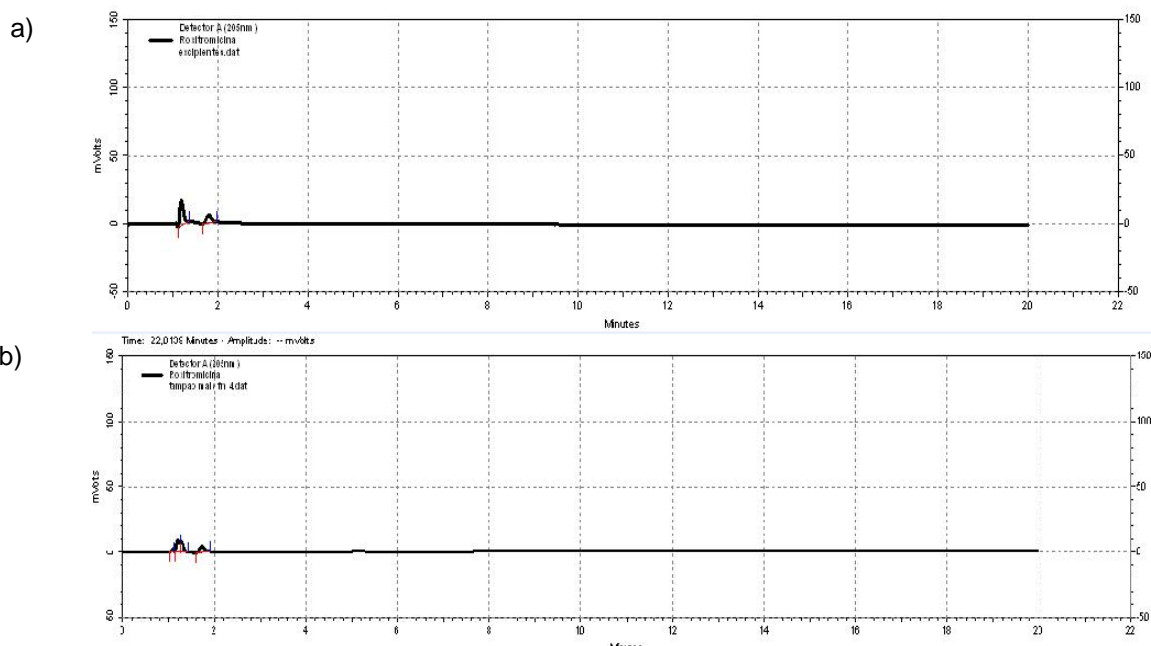


Figura 10- Cromatograma da solução de excipientes (a) e da solução 1:10 de tampão pH 6,8 e fase móvel (b).

Fonte: Do autor

### 5.3.4 Exatidão

A exatidão foi demonstrada por meio da aplicação das áreas dos picos obtidas na equação da curva analítica. Os dados obtidos estão demonstrados na tabela 13.

Tabela 13 - Valores obtidos na exatidão do método cromatográfico para roxitromicina.

| Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Dia 1        |                 | Dia 2        |                 | Dia 3        |                 |
|--------------------------------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
|                                      | Área do Pico | Recuperação (%) | Área do Pico | Recuperação (%) | Área do Pico | Recuperação (%) |
| 30                                   | 189380       | 100,58          | 186617       | 99,02           | 189946       | 100,90          |
|                                      | 190446       | 101,18          | 190056       | 100,96          | 190074       | 100,97          |
|                                      | 190180       | 101,03          | 189530       | 100,66          | 189263       | 100,51          |
| 90                                   | 551066       | 101,54          | 551319       | 101,59          | 549629       | 101,27          |
|                                      | 552114       | 101,74          | 551524       | 101,63          | 550088       | <b>101,36</b>   |
|                                      | 551916       | 101,70          | 551150       | 101,56          | 548413       | 101,04          |
| 180                                  | 1079388      | 100,45          | 1074893      | 100,02          | 106719       | 99,30           |
|                                      | 1080069      | 100,51          | 1079275      | 100,44          | 106776       | 99,35           |
|                                      | 1076229      | 100,15          | 1076220      | 100,15          | 106753       | <b>99,33</b>    |

Fonte: Do autor.

Os valores de recuperação entre 99,3 e 101,36 %, demonstram proximidades às concentrações teóricas.

### 5.3.5 Robustez

A robustez do método foi analisada por meio de aplicação dos ensaios com variações das condições estabelecidas. Os resultados estão demonstrados na tabela 14.

Tabela 14 - Valores obtidos na determinação de robustez do método cromatográfico para roxitromicina.

| Condições                             | Teor (%) |          |
|---------------------------------------|----------|----------|
|                                       | Ensaio 1 | Ensaio 2 |
| Condições Estabelecidas               | 93,93    | 93,98    |
| Vazão de 1,1 mL por minuto            | 93,96    | 93,26    |
| Comprimento de onda de 206 nm         | 94,2     | 94,11    |
| Comprimento de onda de 204 nm         | 93,67    | 94,32    |
| Temperatura do forno de 26° C         | 94,1     | 94,18    |
| Vazão de 0,9mL por minuto             | 95,37    | 95,72    |
| pH da fase móvel de 5,8               | 93,7     | 93,51    |
| Substituição da Coluna Cromatográfica | 94,1     | 94,38    |
|                                       | DPR (%)  | 0,66%    |

Fonte: Do autor.

### 5.3.6 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi obtido avaliando, em dois dias consecutivos, amostras de padrão de roxitromicina nas concentrações de 30, 20, 15, 10 e 5 µg/mL, respectivamente. Foram realizadas cinco análises por dia para cada concentração. O LQ foi determinado como a menor concentração determinada com precisão e exatidão, tendo sido definida a concentração de 5 µg/mL. Os dados obtidos estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15- Valores obtidos na determinação do limite de quantificação do método cromatográfico para roxitromicina.

|           | Áreas dos Picos Cromatográficos |       |       |        |        | Índice de Correlação | DPR (%) |
|-----------|---------------------------------|-------|-------|--------|--------|----------------------|---------|
|           | 5                               | 10    | 15    | 20     | 30     |                      |         |
|           | µg/mL                           | µg/mL | µg/mL | µg/mL  | µg/mL  |                      |         |
| Dia 1     | 27656                           | 55093 | 86641 | 115905 | 176238 | 0,99988              | 0,00437 |
|           | 27277                           | 55329 | 87251 | 115850 | 176029 | 0,99990              |         |
|           | 27417                           | 55530 | 87376 | 115518 | 175841 | 0,99989              |         |
|           | 26554                           | 55821 | 86475 | 115482 | 175635 | 0,99998              |         |
|           | 26781                           | 55031 | 87166 | 115151 | 175454 | 0,99987              |         |
| Dia 2     | 27885                           | 55875 | 86959 | 115271 | 175063 | 0,99992              | 0,00322 |
|           | 27760                           | 55492 | 86957 | 115295 | 175438 | 0,99989              |         |
|           | 27712                           | 55332 | 86779 | 114426 | 175232 | 0,99984              |         |
|           | 27654                           | 55474 | 86626 | 114798 | 174929 | 0,99990              |         |
|           | 27613                           | 55546 | 86793 | 115058 | 174841 | 0,99991              |         |
| Interdias |                                 |       |       |        |        |                      | 0,00365 |

Fonte: Do autor.

O limite de detecção foi determinado como as menores quantidades detectadas nas condições cromatográficas estabelecidas, tendo sido observada experimentalmente a concentração de 1,405 µg/mL.

### 5.3.7 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada por meio de análise da solução padrão após 72 horas de repouso sobre a bancada. As áreas dos picos obtidas nas corridas realizadas com zero hora de exposição foram contrastadas com as áreas obtidas após 72 horas de repouso. O método demonstrou boa estabilidade, sendo de 98,47 % a menor relação entre as áreas dos picos de 72 h e de 0 h. Os resultados obtidos são demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16- Valores obtidos no estudo de estabilidade de roxitromicina pelo método cromatográfico, após 72 horas de exposição à luz ambiente.

| Concentração<br>(µg/mL) | Áreas dos Picos |         | Teor<br>% | DPR  |
|-------------------------|-----------------|---------|-----------|------|
|                         | 0 h             | 72 h    |           |      |
| 30                      | 171311          | 170452  | 99,50     | 0,16 |
|                         | 171952          | 171547  | 99,76     |      |
|                         | 173564          | 172654  | 99,48     |      |
| 70                      | 417922          | 411507  | 98,47     | 0,69 |
|                         | 413790          | 412725  | 99,74     |      |
|                         | 417622          | 411936  | 98,64     |      |
| 90                      | 536509          | 532279  | 99,21     | 0,16 |
|                         | 533908          | 531201  | 99,49     |      |
|                         | 533386          | 530684  | 99,49     |      |
| 130                     | 783396          | 771970  | 98,54     | 0,26 |
|                         | 783358          | 772200  | 98,58     |      |
|                         | 780021          | 772331  | 99,01     |      |
| 180                     | 1074893         | 1067198 | 99,28     | 0,21 |
|                         | 1079275         | 1067762 | 98,93     |      |
|                         | 1079388         | 1067535 | 98,90     |      |

Fonte: Do autor.

#### 5.4 Doseamento

O desvio padrão é a definição mais útil para a dispersão dos dados experimentais e serve para definir a precisão de uma metodologia analítica. Assim, muitas vezes, ele é utilizado para comparar valores de dados obtidos por duas técnicas diferentes (GIL, 2010).

Os resultados obtidos na determinação de teor para roxitromicina estão demonstrados na Tabela 17. Os métodos não apresentam diferenças significativas entre si.

Tabela 17- Valores obtidos na determinação de teor para roxitromicina cápsulas 300 mg pelos métodos cromatográfico e microbiológico por difusão em ágar.

|       | Método               |                    | DRP (%) |
|-------|----------------------|--------------------|---------|
|       | Físico – Químico (a) | Microbiológico (b) |         |
| Dia 1 | 93,95%               | 90,83%             | 1,8%    |
| Dia 2 | 94,24%               | 91,76%             |         |

(a média de dois ensaios)

(b média de três ensaios)

Fonte: Do autor.

Analizamos, ainda, a variação dos dados obtidos nos dois métodos por meio do teste *T-Student*. Este recurso estatístico é um teste de significância que serve para comparar dois valores de médias. A análise de certa amostra por duas técnicas diferentes é um caso para utilização do teste *t* pareado. O valor de *t* calculado por meio de software especializado foi de 4,1903 para 3 graus de liberdade, para um valor de *t* tabelado de 5,84 para 99% de confiança. Sendo assim, concluímos que não há diferenças significativas entre as metodologias empregadas.

## 5.5 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

O perfil de dissolução foi desenvolvido no aparelho dissolutor TDT 081 (ELECTROLAB). Todo o procedimento foi submetido a etapas de otimização das condições do ensaio, que passaram pela definição dos meios de dissolução e seus respectivos volumes, além dos aparatos cesto e pá, tendo início pelo estudo de solubilidade em equilíbrio.

### 5.5.1 Estudo de Solubilidade em Equilíbrio

O estudo de solubilidade em equilíbrio foi realizado efetuando-se coletas em períodos de 12 e 24 horas. Os resultados obtidos nos diferentes meios estão apresentados na figura 11.

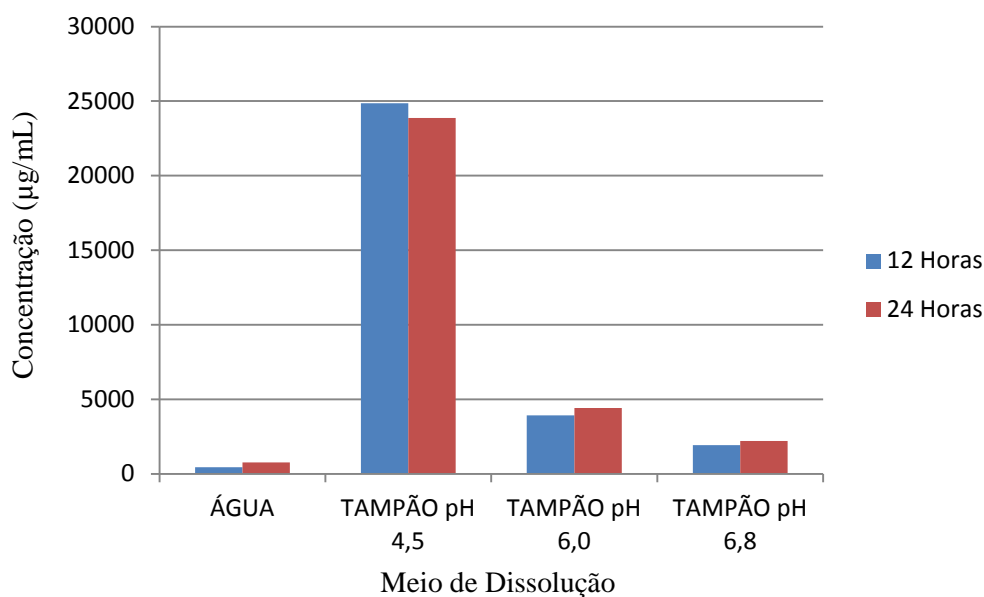


Figura 11- Gráfico comparativo da solubilidade da roxitromicina em diferentes meios de dissolução. Fonte: Do autor.

Observou-se completa degradação da roxitromicina em meio pH 1,2, com a formação de pico com tempo de retenção menor que o do fármaco em estudo e completa ausência de pico no tempo de retenção típico do fármaco. Com relação ao pH 4,5, observou-se degradação ácida, o que pode ser demonstrado pela formação de picos com tempo de retenção inferior ao do fármaco bem como pela perda de concentração quando comparadas as análises de 12 e 24 horas. Após o tempo de equilíbrio (24 horas) observou-se a emulsificação do tampão pH 6,0. O tampão pH 6,8 não apresentou quaisquer inconvenientes. A figura 12 apresenta o cromatograma comparativo da dissolução de roxitromicina ácido clorídrico 0,1M pH 1,2 (a) e em tampão acetato de sódio pH 4,5 (b) após 24 horas de análise.

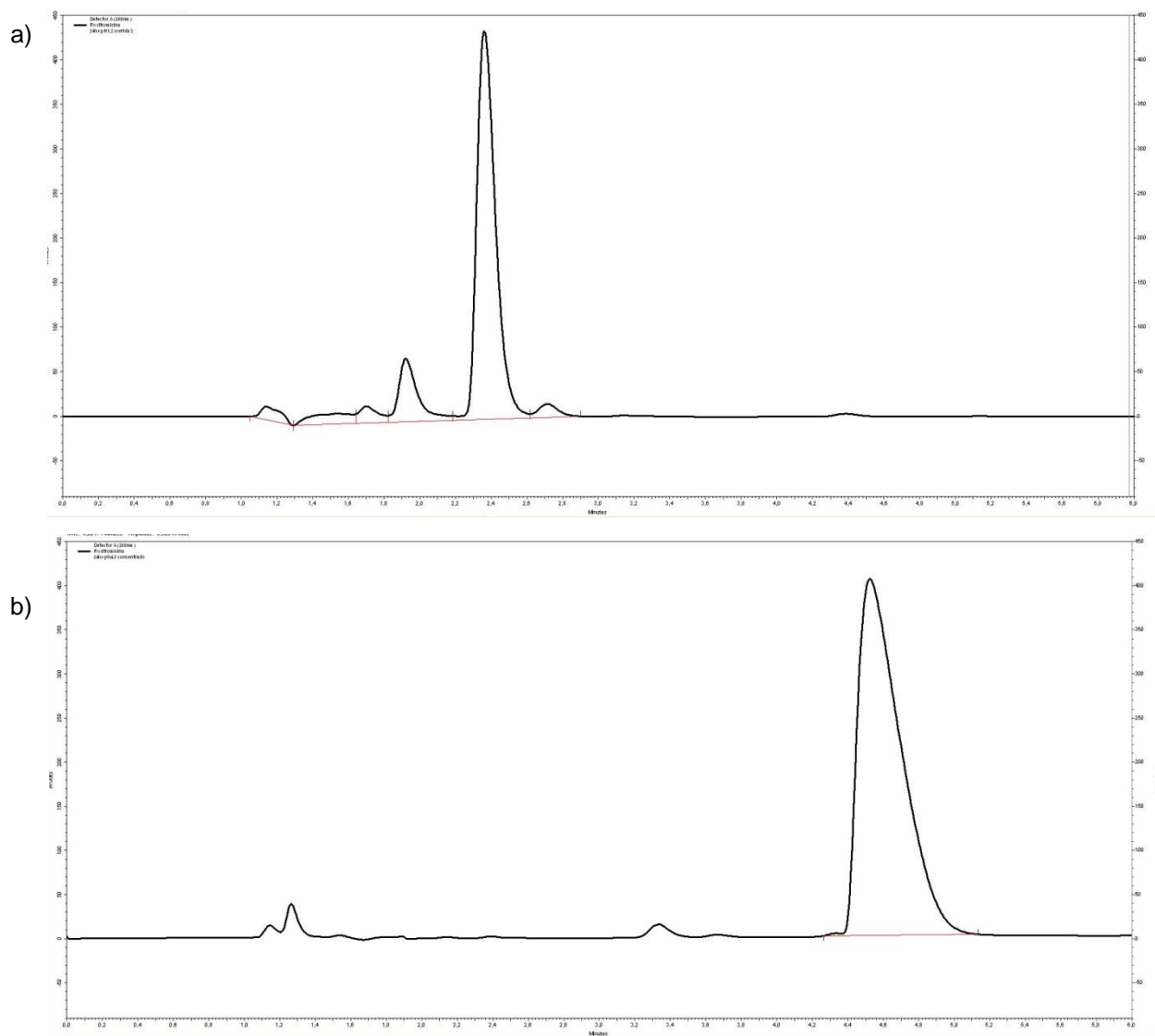


Figura 12 - Cromatograma Comparativo da dissolução de roxitromicina Ácido Clorídrico 0,1M pH 1,2 (a) e em tampão acetato de sódio pH 4,5 (b) após 24 horas de análise.

Fonte: Do autor.

### 5.5.2 Desenvolvimento do Perfil de Dissolução

Esperava-se, inicialmente, que o meio de dissolução fosse definido com base nos resultados do ensaio de solubilidade em equilíbrio. Contudo, as três formulações preparadas apresentaram inesperada formação de um produto de aspecto gelatinoso quando em contato com as soluções tampão empregadas neste estudo. Tal fato ocorre independente de se alterar a rotação empregada. Como se pode observar na Figura 13, o produto formado permanece com o formato da cápsula mesmo após duas horas no aparelho dissolutor.



Figura 13- Apresentação da formação de grumo com aspecto gelatinoso a partir de formulações contendo roxitromicina 300mg em solução tampão utilizando-se diferentes aparatos.

Fonte: Do autor.

Destacamos que a formação ocorreu em todos os tampões citados no ítem 4.3.5.3, inclusive no tampão fosfato pH 6,0 diluído 1:10, o qual possui reduzida força iônica em relação aos demais. Observou-se que em água purificada não ocorria tal formação de grumos. Neste meio, houve completa dispersão do material da cápsula.

Milne e seus colaboradores (2015) desenvolveram perfil de dissolução do fármaco roxitromicina em água, aplicável à forma comprimidos. Contudo, é imperioso destacar a baixa solubilidade deste antibiótico macrolídeo em água, além da variação de sua solubilidade na faixa de pH típica da água purificada, ou seja, entre 5 e 7. A figura 14 demonstra o gráfico (obtido por meio do software *Chemisketch*) de variação da solubilidade da roxitromicina em função do pH. Quanto maior o log de D, menor a solubilidade em solução aquosa.



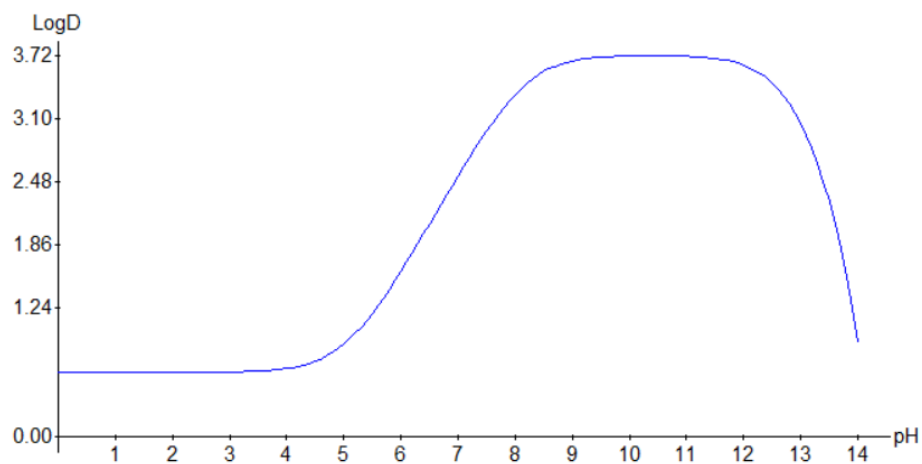


Figura 14 - Variação da solubilidade da roxitromicina em função do pH.  
Fonte: Do autor

As figuras 15 e 16, demonstram o aparelho de dissolução em que, na cuba da esquerda, a roxitromicina é dissolvida em tampão fosfato e na cuba da direita, em água purificada. Observa-se dispersão do material da cápsula apenas em água purificada.



Figura 15 - Dissolução de roxitromicina cápsulas 300 mg em tampão fosfato pH 6,0 (esquerda) e água purificada (direita).

Fonte: Do autor.

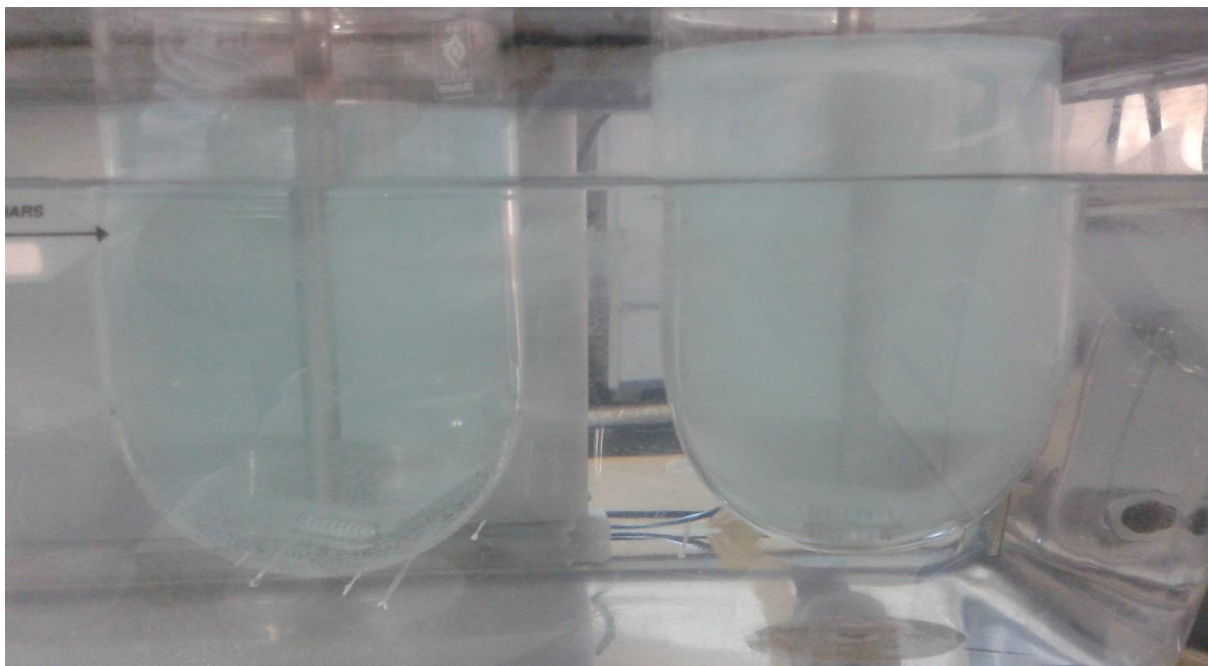


Figura 16 - Dissolução de roxitromicina cápsulas 300 mg em tampão fosfato pH 6,8 (esquerda) e água purificada (direita).

Fonte: Do autor.

Dessa forma, testamos o tampão fosfato pH 6,0 recomendado na Farmacopeia Brasileira diluído 1:100 cujo pH final da solução após a diluição foi ajustado para 6,8. Observou-se que houve dispersão do material da cápsula no meio e boa dissolução da roxitromicina. Sugerimos que a formação de grumos observada se dê pela força iônica dos tampões interagindo com o fármaco macrolídeo.

A definição da rotação e do aparato foi realizada com base nas áreas dos picos cromatográficos, sendo eleitos a rotação e o aparato que demonstrasse maior solubilização do fármaco no tempo analisado. Observou-se que, em uma mesma rotação, as áreas do aparato pá são maiores que as do aparato cesto, com exceção da rotação 50 RPM. Quanto à rotação, mostraram-se maiores áreas dos picos cromatográficos a rotação de 100 RPM, quando comparada a um mesmo tempo de coleta em outra rotação.

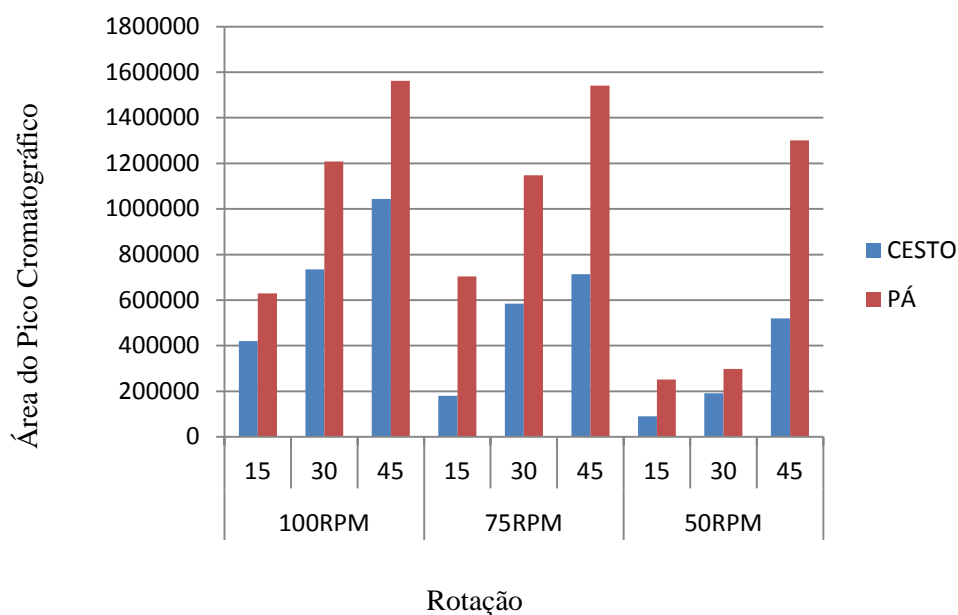


Figura 17 - Gráfico comparativo da dissolução de roxitromicina cápsulas 300mg utilizando-se os aparatos pá e cesto em três diferentes rotações.

Fonte: Do autor.

Assim, as condições estabelecidas para avaliação do perfil de dissolução de roxitromicina foram:

- Rotação 100 RPM;
- Aparato Pá;
- Temperatura do banho de 37,5 °C;
- Meio de dissolução tampão fosfato pH 6,0 diluído 1:100;
- Volume de 900 mL de meio de dissolução por cuba;
- Tempos de coleta em 5,10, 15, 20, 30, 45 minutos;
- Volume de coleta e reposição de 10 mL.

As quatro formulações desenvolvidas no projeto foram submetidas ao ensaio de dissolução. Os perfís de dissolução das diferentes formulações estão demonstrados na figura 18.

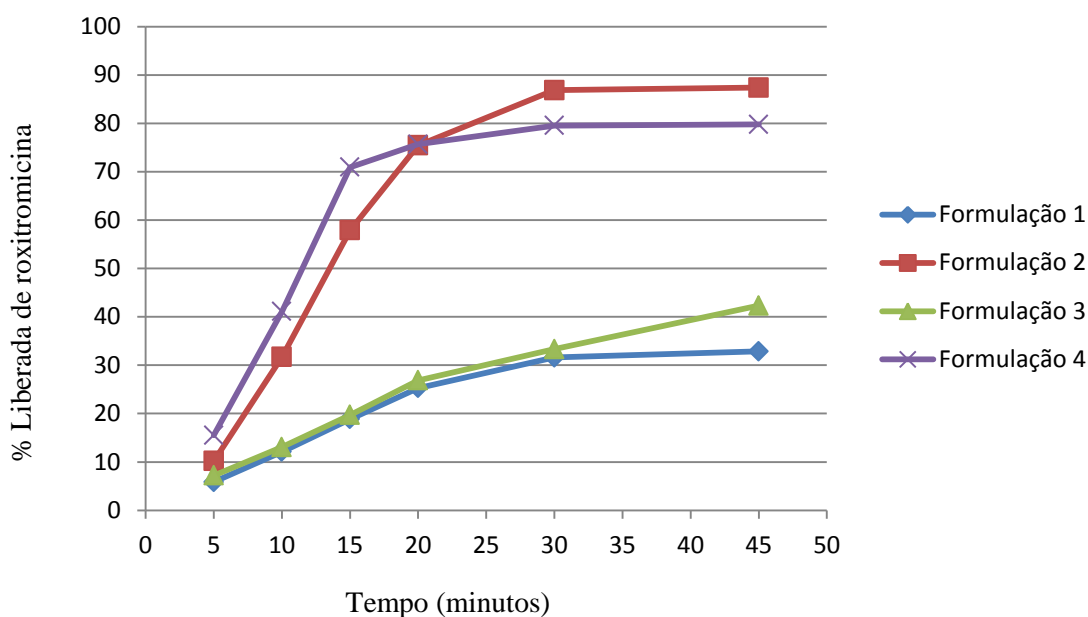


Figura 18 - Perfil de dissolução (n=6) de roxitromicina cápsulas 300mg das formulações 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Fonte: Do autor.

Através da figura 18 pode-se observar que a formulação 2 foi a que apresentou maior liberação do fármaco ao final do tempo preconizado, seguida da formulação 4. Considerando que as formulações 3 e 4 diferem entre si apenas pelo agente dispersante, sendo que naquela empregou-se croscarmelose sódica e nesta, amido glicolato, sugerimos a importância deste agente na liberação do antibiótico roxitromicina da formulação. Ainda, destacamos que o agente dispersante amido glicolato é constituinte da formulação 2, a qual apresentou maior liberação do fármaco.

Segundo Muniz (2012), o desintegrante amido glicolato de sódio, também denominado superdesintegrante, foi introduzido em substituição ao amido, para ruptura do cilindro de pó em cápsulas dura. Os superdesintegrantes podem intumescer por absorção de água, aumentando várias vezes o seu volume original, o que favorece a liberação bem como a dissolução do fármaco. Amaral et. al (2016) destacaram a importância do uso de desintegrantes em formulações contendo fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade.

### 5.5.3 Validação do Perfil de Dissolução

O ensaio de perfil de dissolução foi validado por meio dos parâmetros Seletividade, Exatidão, Robustez e Precisão.

### 5.5.3.1 Seletividade

A seletividade do ensaio de dissolução foi analisada por meio da resposta do equipamento aos insumos inertes utilizados na manipulação das cápsulas. Deste modo, foram analisadas soluções dos excipientes e das cápsulas, dissolvidas no meio de dissolução empregado no método.

Observa-se pelos cromatogramas (figura 19) que nenhum dos insumos gerou picos cromatográficos próximos ao pico gerado pela roxitromicina, o que demonstra a seletividade do método empregado.

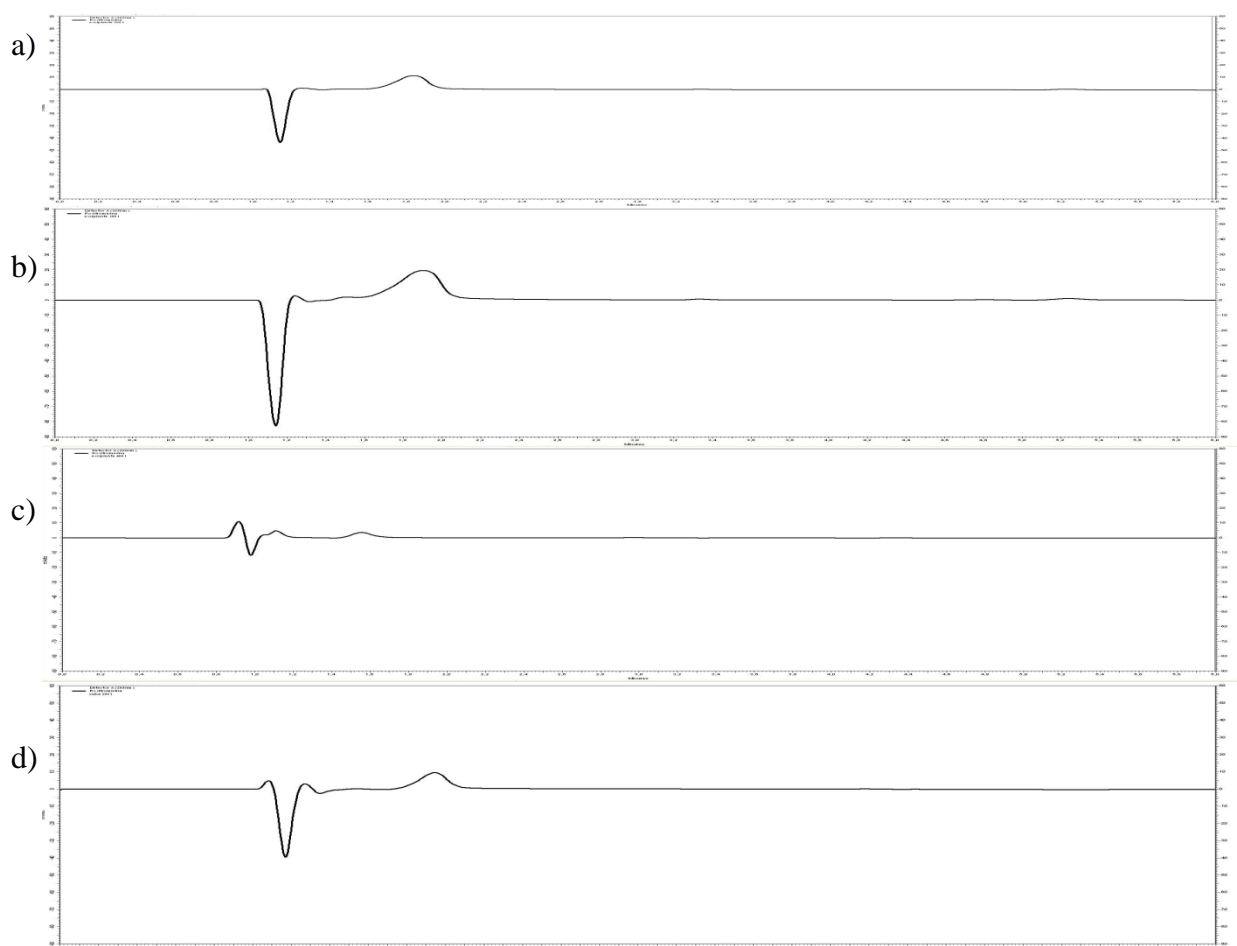


Figura 19 - Cromatogramas de seletividade do ensaio de perfil de dissolução: a) cápsula gastrorresistente; b) cápsula azul e branca; c) excipiente 2 dissolvido em meio de dissolução; d) excipiente 3 dissolvido em meio de dissolução.

Fonte: Do autor.

### 5.5.3.2 Precisão

A precisão do perfil de dissolução foi analisada pelo desvio padrão relativo, tendo sido analisadas seis cápsulas por dia em três dias de análises. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 18.

Tabela 18 - Valores obtidos na precisão do ensaio de perfil de dissolução de roxitromicina 300mg cápsulas.

| <b>Dia 1</b> | <b>Dia 2</b> | <b>Dia 3</b> | <b>Inter-dias</b> |
|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| DPR (%)      |              |              |                   |
| 1,59         | 1,63         | 1,13         | 1,96              |

Fonte: Do autor.

Analisando a variação da dissolução das cápsulas em seis cubas do aparelho dissolutor, observou-se DPR inferior a 2 % tanto nos ensaios intra quanto interdias, demonstrando boa precisão do método.

### 5.5.3.3 Robustez

Utilizando-se o mesmo procedimento empregado na etapa de precisão, foi avaliada a robustez do ensaio. Contudo, o ensaio foi realizado em outro laboratório, empregando-se aparelho dissolutor e filtro PTFE diversos dos empregados na etapa de precisão. O desvio padrão relativo do ensaio realizado empregando-se condições diversas foi de 1,67 %. Quando comparado aos resultados obtidos na etapa de precisão, o desvio padrão relativo foi de 1,87 %, demonstrando que as alterações empregadas não causaram diferenças importantes nos resultados obtidos, com valores de DPR inferiores a 2 %.

#### 5.5.3.4 Exatidão

Os valores das recuperações de roxitromicina estão demonstrados na tabela 19, estando todos próximos das quantidades adicionadas ao placebo, o que demonstra boa exatidão do método. Após análise por CLAE, a recuperação foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{MÉDIA DAS ÁREAS DAS AMOSTRAS} * 100}{\text{MÉDIAS DAS ÁREAS DO PADRÃO}}$$

Tabela 19 - Valores obtidos na determinação da exatidão do ensaio de perfil de dissolução de roxitromicina 300 mg cápsulas.

| DIA 1        |                   | DIA 2        |                   |
|--------------|-------------------|--------------|-------------------|
| Concentração | Recuperação Média | Concentração | Recuperação Média |
| 100%         | 100,69            | 100%         | 99,86             |
| 120%         | 121,81            | 120%         | 119,25            |
| 20%          | 21,07             | 20%          | 20,11             |

Fonte: Do autor.

#### 5.5.4 Estudo de Desintegração de Cápsula Gastrorresistente

Foram analisadas cápsulas da formulação 4, as quais foram manipuladas com cápsulas elaboradas com hidroxipropil metilcelulose, o qual confere gastrorresistência. Em meio ácido, as cápsulas submetidas ao desintegrador permaneceram íntegras e devidamente fechadas até o final do período de observação, que foi de 66 minutos. Por outro lado, quando utilizado meio básico nas cubas do desintegrador, as três cápsulas analisadas se romperam, liberando o conteúdo da formulação no meio. Os tempos necessários para rompimento das cápsulas foram de 2 minutos e 20 segundos, 2 minutos e 35 segundos e 7 minutos e 12 segundos, respectivamente. A figura 20 apresenta as cápsulas gastrorresistentes sendo desintegradas em meio tampão fosfato pH 6.8.



Figura 20: Apresentação das cápsulas gastrorresistentes em tampão fosfato pH 6.8

Fonte: Do autor.

As cápsulas da formulação 4 foram submetidas, ainda, à ação de meio ácido no aparelho dissolutor. Após a coleta, filtração e neutralização, o conteúdo da cuba foi quantificado pelo método cromatográfico. Após o tempo de corrida, nenhum pico de roxitromicina ou de seu produto de degradação foi visualizado, o que demonstra a integridade da formulação.



## 6 CONCLUSÕES

O método microbiológico por difusão em ágar foi desenvolvido e validado considerando ser uma opção de baixo custo e de fácil execução, além de ser facilmente integrado à rotina de laboratórios de controle de qualidade. Os meios de cultura utilizados são facilmente disponíveis nos laboratórios, uma vez que são amplamente empregados na rotina de ensaios microbiológicos. Além disso, o uso de placas de Petri menores em relação ao tamanho convencional reduz a ocorrência de erros em relação à execução do método, sem que prejudique a medição dos halos de inibição.

O microrganismo empregado, *Micrococcus luteus*, demonstrou sensibilidade ao antibiótico roxitromicina e bom desenvolvimento nos meios de cultura empregados, tanto o meio sólido (Ágar Caseína Soja) quanto o caldo de enriquecimento (Infuso de Cérebro e Coração). Tais características permitiram a formação de halos de inibição de crescimento bem definidos e, por isso, facilmente mensuráveis. Além disso, métodos biológicos são vantajosos pois o parâmetro medido e a atividade terapêutica do fármaco são os mesmos (PAIM et al., 2010).

Os parâmetros de validação do método microbiológico por difusão em ágar mostraram correlação linear, com coeficiente de determinação de 0,9985, que foi satisfatório para um ensaio biológico que, segundo Silva (2012), possui conhecida variabilidade inerente. A legislação reconhece tal variabilidade, como se pode constatar na RDC 899/2003 ao definir que suas informações aplicam-se a testes imunológicos e microbiológicos, desde que observado o grau de variabilidade usualmente associado a essas técnicas. A precisão do método, determinada por meio da variação das potências calculadas nos nove ensaios realizados em três dias consecutivos, mostrou valores de DPR inferiores a 2 %, quando correlacionados os ensaios intra e interdias, demonstrando satisfatória precisão para o método. A precisão analisada pelo desvio padrão relativo das médias dos halos obtidos mostrou resultados diferentes entre as soluções de concentrações. Assim, a quantificação de dois ou mais ensaios independentes podem ser estatisticamente semelhantes ainda que os halos de inibição obtidos nos ensaios sejam significativamente diferentes. O DPR de 1,09 % nas condições estabelecidas demonstrou a robustez do método. A seletividade foi comprovada pela perda de potência observada pela realização dos ensaios após a exposição às condições de degradação, além da completa ausência de sensibilidade à análise de soluções isentas do antibiótico.

A validação para o método cromatográfico mostrou que o método é seletivo e linear com índice de correlação de 0,9995 e, também, apresentou precisão com valores de DPR inferiores a 2 %, tanto nos ensaios intradia quanto interdias, exatidão entre 99,3 e 101,36 %, baixos limites de LQ e LD, e estabilidade. O método cromatográfico, também mostrou-se aplicável à quantificação do fármaco no ensaio de perfil de dissolução.

Os métodos físico-químico e microbiológico por difusão em ágar mostraram-se satisfatórios para identificar e quantificar o fármaco roxitromicina na forma farmacêutica cápsulas. A diferença entre os métodos foi verificada por testes estatísticos, que demonstraram não haver diferenças significativas entre eles.

Ambos os métodos acusaram muito preponderantemente os efeitos da degradação ácida da roxitromicina. Sendo assim, entendemos necessária, na farmácia magistral, a manipulação deste antibiótico em cápsulas gastrorresistentes, visando a promover a liberação do fármaco no trato intestinal.

O ensaio de perfil de dissolução mostrou-se aplicável à rotina de laboratórios analíticos pois apresenta custos razoáveis, uma vez que emprega meio de dissolução bastante diluído dado a grande quantidade de meio utilizada no ensaio. Uma vez que o fármaco roxitromicina apresenta alto nível de interação com os meios de dissolução, a utilização do meio diluído mostrou-se uma opção vantajosa para aplicação do perfil de dissolução. Como principal desvantagem, cita-se o fato de que o meio de dissolução pode apresentar reduzida capacidade tamponante.

O ensaio de perfil de dissolução demonstrou relevância, chamando atenção para correta manipulação do fármaco na farmácia magistral. Observamos que as formulações que continham amido glicolato de sódio apresentaram maior dissolução da roxitromicina quando comparadas às que não tinham. Sendo assim, sugerimos a utilização da formulação 2 proposta neste projeto, encapsulada em cápsulas revestidas de material gastrorresistente, na manipulação de cápsulas de roxitromicina.

Os parâmetros estudados para validação dos métodos, microbiológico por difusão em ágar, cromatográfico e perfil de dissolução atenderam os conceitos sobre validação, comprovando sua aplicabilidade na análise de roxitromicina na forma farmacêutica cápsulas.

## REFERÊNCIAS

- ALÉSSIO, P.V. – **Análise Químico-Farmacêutica de Preparações Injetáveis de Ceftriaxona Sódica**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- AMARAL, P. A.; FEDERICI, M.R.; SANT’ANNA, J.L.U.C. – Análise de excipientes utilizados em cápsulas preparadas em farmácias magistrais. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 47-57, 2016.
- AMIDON, G. L et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, Arlington, v. 12, p. 413-420, 1995.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2005.
- BALAJI, J.; NISHA SHRI, C. Development and validation of RP-HPLC method for determination of thermal degradation impurity in macrolide immunosuppressant substance and drug product. **Research & Reviews: A journal of Drug Formulation, Development and Production**, Noida, v. 3, n. 1, p. 14-19, 2016.
- BARROS, E. et al. **Antimicrobianos: consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 591p.
- BERTOLLO, G. M. **O processo magistral em farmácias do estado do ESPÍRITO SANTO**, 2008, 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Minas Gerais.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 67, de 08 de outubro de 2007. D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 09 de outubro de 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010. D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 28 de outubro de 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 20, de 05 de maio de 2011. D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 09 de junho de 2011.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº37, de 3 de agosto de 2011. “Dispõe sobre o guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de agosto de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 45, de 9 de agosto de 2012. D.O.U. – **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 10 de agosto de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012. D.O.U. – **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 22 de maio de 2012.

BREIER, A.R. et al. - Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations – **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Arlington, v. 29, n.1, p. 957-962, 2002.

BROWN, C.K. et. al. – Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds – **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, dez, 2004, disponível em: <[http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco\\_images/pharma/2014/08/22/faaad4a-fe7a-4d38-a0e1-14036446b064/article-137424.pdf](http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/faaad4a-fe7a-4d38-a0e1-14036446b064/article-137424.pdf)>. Acesso em: 07 jun. 2016.

BRUNTON, Laurence L (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hill, 2006. 1821 p.

DEFALE, N.A. et. al– Development and validation of microbial bioassay for quantification of levofloxacin in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n.1, p. 18-26, 2015, disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.07.007>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

DING, J. et al. – Determination of Roxithromycin from plasma samples based on magnetic surface molecularly imprinted polymers followed by liquid chromatography-tandem mass spectromer. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, n. 1, p. 221-228, 2015, disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.08.001>>. Acesso em: 09 out. 2016.

DURÁN, N.; et. al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, nº 1, 151-158, 2010, disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/202486>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

EMMANUEL, S. **Predictive in vitro dissolution tools : application during formulation development**. 2010. 201f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Clermont-Ferrand I, 2010, disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.593.6170&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

ESMERINO, L.T. et al. – Método Microbiológico para a Determinação de Potência de Antimicrobianos – **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.1, p. 53-60, 2004, disponível em: <<http://177.101.17.124/index.php/biologica/article/view/382>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 8. ed. Strasbourg: **Council of Europe**; 2015. v. 1, p. 3185.

FALLER, B. Artificial membrane assays to assess permeability. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 9, p. 886-892, 2008, disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138920008786485227>>. Acesso em: 17 jul. 2016.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2010. v.1, 264p.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 2. ed. Juiz de Fora, 2002, p.2, 17, 444.

GIL, Eric de Souza (Org.). **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511 p.

GOMES, M.J.V.M; REIS, A.M.M. **Ciências Farmacêuticas. Uma Abordagem em Farmácia Hospitalar**. 1. ed. Atheneu, São Paulo, 2000, p.251, 257, 258.

HE, M. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Mycoplasmas* and *Chlamidiae* in patients with genital tract infections in Shanghai, China. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 22, n. 1, p. 548-552, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.05.007>>. Acesso em: 14 set. 2016.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2012. xvii, 898 p.

HOLSTEIN, J.J. et al. – Validation of experimental charges densities: refinement of the macrolide antibiotic roxithromycin. **Acta Crystallographica Section B**. v.66, n. 1, p. 568-577, 2010, Disponível em: <<https://doi.org/10.1107/S0108768110026480>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

JAGTAP, S. et al. - In vitro new dissolution method for the evaluation of roxithromycin using pH 6.0 phosphate buffer and determination of its content by validated UV spectrophotometric method. **Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**. v. 5, n.5, p. 277-281, 2013, disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Shrikrishna\\_Baokar/publication/258705780\\_In\\_Vitro\\_New\\_Dissolution\\_Method\\_for\\_the\\_Evaluation\\_of\\_Roxithromycin\\_using\\_pH\\_60\\_Phosphate\\_Buffer\\_and\\_Determination\\_of\\_its\\_Content\\_by\\_Validated\\_UV\\_Spectrophotometric\\_Method/links/00463528ddc1a4c6bf000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Shrikrishna_Baokar/publication/258705780_In_Vitro_New_Dissolution_Method_for_the_Evaluation_of_Roxithromycin_using_pH_60_Phosphate_Buffer_and_Determination_of_its_Content_by_Validated_UV_Spectrophotometric_Method/links/00463528ddc1a4c6bf000000.pdf)>. Acesso em: 21 ago. 2016.

JATWANI, S. et al. - An overview on solubility enhancement techniques for poorly soluble drugs and solid dispersion as an eminent strategic approach. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 4, p. 942-956, 2012, disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.278.7720&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 16 set. 2016.

KOROLKOVAS, Andrejus. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2000.

KOUSOLOS, C. et al. – Validation of a fully automated high throughput liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for roxithromycin quantification in human plasma. Application to a bioequivalence study. **Biomedical Chromatography**. v. 22, n.1, p. 494-501, 2008, disponível em: <<https://10.1002/bmc.958>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

LANÇAS, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v.0, n.0, 2008. Disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v0n0/v0n0a1.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2016.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente compatíveis. **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, 2009, disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v1n2/v1n2a4.pdf>>; Acesso em: 29 set. 2016.

LOURENÇO, F.R. – **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em ágar – proposta de delineamento experimental**. 2006. 200f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-28032007-142656/en.php>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

MAHMOUDI, A. et al. – Microbiological assay for the analysis of certain macrolides in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 491, n.1, p. 285 – 291, 2015, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315005475>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

MALESUIK, M.D. et al. Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsula magistrais contendo anlodipino. **Revista de Ciências Farmacêuticas. Básica e Aplicada**. v. 27, n.1, p. 37-49, 2006, disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nxtAction=lnk&exprSearch=458666&indexSearch=ID>> Acesso em: 29 set. 2016.

MANADAS, R.; PINA, M.N.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 4, p. 375-379, 2002, disponível em: <<http://www.journals.usp.br/rbcf/article/view/43812>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

MANFIO, L.M. et al. – A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.49, n.4, p. 753-761, 2013, disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-82502013000400015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-82502013000400015&script=sci_arttext)>. Acesso em: 10 ago. 2015.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**. n. 42, p. 620-643, 2002, disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12043951>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

MARTINDALE: **The Complet Drug Reference**. 33 ed. Massachusets, 2003.

MILNE, M.; LIEBENBERG, W.; AUCAMP, M.E. Different amorphous solid-state forms of roxithromycin: a thermodynamic and morphological study. **International Journal of Pharmaceutics**. n. 498, v.1, p. 304-315, 2016, disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.035>>. Acesso em: 09 out. 2016.

MUNIZ, G. S. O.; OLIVEIRA JR, A. Z.; GARCIA, M. T. J. Cápsulas gelatinosas duras de nimesulida: a importância do amido glicolato de sódio, e sua concentração, na dissolução do fármaco. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 3, p. 361-371, 2012, disponível em: <[http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/view/2095/1256](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/2095/1256)>. Acesso em: 15 jan. 2017.

NICOLINI, P. et al. – Fatores Relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.13, n.1, p.689-696, 2008, disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Jorge\\_Nascimento2/publication/51659955\\_Factors\\_related\\_to\\_prescriptions\\_of\\_antibiotics\\_in\\_a\\_public\\_pharmacy\\_in\\_the\\_Western\\_region\\_of\\_the\\_city\\_of\\_Sao\\_Paulo/links/543bd8650cf204cab1db4095.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Nascimento2/publication/51659955_Factors_related_to_prescriptions_of_antibiotics_in_a_public_pharmacy_in_the_Western_region_of_the_city_of_Sao_Paulo/links/543bd8650cf204cab1db4095.pdf). Acesso em: 14 abr. 2015.

NIEKERK, E. - **Roxithromycin – a solubility and stability studie**. North-West University. 2011, disponível em: <[https://repository.nwu.ac.za/bitstream/handle/10394/8390/Van\\_Niekerk\\_E.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.nwu.ac.za/bitstream/handle/10394/8390/Van_Niekerk_E.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 19 abr. 2015.

OLIVEIRA, C. G. et al. - Avaliação do revestimento gastrorresistente de cápsulas manipuladas em farmácias magistrais. **JCBS**. v. 1, n.3, p. 68-72. 2016, disponível em: <<http://publicacoes.factus.edu.br/index.php/saude/article/view/33>>. Acesso em: 14 jan. 2017.

OSTROWSCK, M.; WILKOVSKA, E.; BACZEC, T. - Impact of pharmaceutical dosage form on stability and dissolution of roxithromycin. **Central European Journal of Medicine**. V. 5, n.1, p 83-90, 2010, disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2478/s11536-009-0113-7>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

PAIM, C.S et al. – Gemifloxacin mesylate stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. **Talanta**. v. 83, p. 1774-1779, 2010, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010009495>>. Acesso em: 15 set. 2014.

PEIXOTO, M.M et al.. – Avaliação de Comprimidos de Captopril dispensados em Feira de Santana – BA. **Infarma**. v. 16, n. 13-14, p. 69-73, 2005, disponível em: <<http://cebrim.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/72/i04-infavaliacaoqual.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 780 p.

QURESHI, S.A. Developing discriminatory drug dissolution tests and profiles: some thoughts for consideration on the concept and its interpretation. **Dissolution Technologies**. p. 18-23, 2006, disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Saeed\\_Qureshi2/publication/237814162\\_Developing\\_Discriminatory\\_Drug\\_Dissolution\\_Tests\\_and\\_Profiles\\_Some\\_Thoughts\\_for\\_Consideration\\_o](https://www.researchgate.net/profile/Saeed_Qureshi2/publication/237814162_Developing_Discriminatory_Drug_Dissolution_Tests_and_Profiles_Some_Thoughts_for_Consideration_o)>

[n the Concept and Its Interpretation/links/00b7d5298c5111daf3000000.pdf](#)>. Acesso em: 06 jun. 2016.

QUIN, Y et al. . – Comparasion of pharmakokinetics and tissue distribution kinetics of roxithromycin and expression of CYP 31A1 between pregnant mice and fetuses. **Basic & Clinical Pharmacology and toxicology**. v. 120, n. 2, p.146-151, 2016, disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcpt.12668/full>>. Acesso em: 14 set. 2016.

SACHER, F. et al. – Pharmaceuticals in graundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **Journal of Cromatography A**, v. 938, n. 1, p.199-210, 2001, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301012663>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

SALGADO, H.R.N; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. – Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 40, n.1, p. 443-446, 2006, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708505005017>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

SANTOS, O.M.M. – **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de finasterida cápsulas**. 2011. 97f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas.

SANTOS, O.M.M. et al.- Structure, Solubility and stability of orbifloxacin crystals forms: hemihydratate versus anhydratate. **Molecules**. v. 21, n. 328, p. 1-19, 2016, disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/3/328/htm>>. Acesso em: 12 out. 2016.

SCHELLACK, G. – **Farmacologia: Uma Abordagem Didática**. São Paulo: Fundamento, 2005, 190 p.

SHCIMIDT, C.A et al.- Devolopment adn validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. **Journal of Microbiological Methods**. v. 77, n.1, p. 308-315, 2009, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701209000931>>. Acesso em: 25 out. 2015.

SILVA, Penildon. **Farmacologia**. 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006, 1369 p.

SILVA, L.M. – **Doseamento e validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade de tigecilina em produto farmacêutico**. 2012. 186f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

TANINAKA, C. et al. – Determination of erythromicyn, clarithromicyn, roxithromicyn and azithromicyn in plasma by high-performed liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Cromatography B**, v.738, n. 1, p.405-411, 2000, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434799005125>>. Acesso em: 29 set. 2015.



TERNES, T. A. – Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p.419-434, 2001, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993601000784>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

TORAÑO, J.S.; GUCHELAAR, H.-J.; Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**. v. 720, n. 1, p.89-97, 2001, disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434798004563>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

VIEIRA, D. C. M. – **Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade de cefuroxima sódica injetável**. 2010. 228f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

VITAL, T.M. et al. – Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.40, n.2, p.219-227. 2004, disponível em: <<http://www.periodicos.usp.br/rbcf/article/view/43954>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

WANG, Q.; MA, D.; HIGGINS, J.P. – Analytical Method Selection for Drug Product Dissolution Testing. **Dissolution Technologies**. p. 6-13, agosto, 2006, disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/2e3a/677daa0b73716143dfac66c0e131a841a132.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

## ANEXO

## ANEXO A - PROPOSTA DE MONOGRAFIA FARMACOPEICA PARA CÁPSULAS

## CÁPSULAS DE ROXITROMICINA

Contém, no mínimo, 90 % e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de roxitromicina  $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ .

## IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico do cromatograma da Solução amostra, obtida em Doseamento, corresponde àquele do pico principal da Solução padrão.

## CARACTERÍSTICAS

**Determinação de Peso (5.1.1).** Cumpre o teste.

**Teste de Desintegração (5.1.4.1).** Cumpre o teste.

**Uniformidade de doses unitárias (5.1.6)** Cumpre o teste.

## TESTE DE DISSOLUÇÃO

*Meio de dissolução:* Tampão fosfato de potássio pH 6,0, diluído em água purificada na proporção 1:100, com pH final da solução de 6,8, (900mL)

*Aparelhagem:* pá

*Velocidade de agitação:* 100 rpm

*Tempo:* 30 minutos.

Procedimento: Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir 2.5mL do filtrado, com meio de dissolução q.s.p 5mL. Preparar solução padrão estoque em meio de dissolução na concentração de 1000 µg/mL, em seguida, preparar uma solução intermediária com meio de dissolução na concentração de 167 µg/mL. Injetar, separadamente, 20 µL das Soluções padrão e amostra, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos, utilizando o mesmo método descrito em Doseamento por CLAE. Calcular a quantidade

de  $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$  dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

*Tolerância:* não menos que 85% da quantidade declarada de  $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$  se dissolvem em 30 minutos.

## TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

**Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2).** Cumpre o teste.

**Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3).** Cumpre o teste.

## DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Ensaio microbiológico de antibióticos* (5.5.3.3.1) pelo método de difusão em ágar utilizando cilindros.

*Micro-organismo:* *Micrococcus luteus* INCQS 011.

*Meios de Cultura:* Caldo infuso de cérebro e coração, para manutenção do micro-organismo e Ágar Caseína-Soja para padronização do inóculo e camada base.

*Solução Amostra:* Pesar 10 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. Transferir quantidade de pó equivalente a 10 mg de roxitromicina para balão volumétrico de 10 mL contendo 2mL de metanol. Completar o volume com tampão fosfato de potássio 0,1 M estéril pH 8,1. Diluir sucessivamente a solução resultante, em tampão fosfato de potássio 0,1 M estéril, pH 8,1 de modo a obter soluções nas concentrações de 3, 6 e 12  $\mu\text{g/mL}$ .

*Solução padrão:* Pesar exatamente 10 mg de roxitromicina SQR e dissolver em 2 mL de metanol. Em seguida, transferir o conteúdo para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,1. Diluir sucessivamente a solução resultante em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 8,1 de modo a obter soluções nas concentrações de 3, 6 e 12  $\mu\text{g/mL}$ .

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 205 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a

grupo octadecilsilano (5 $\mu$ m), mantida a temperatura de 25°C; Fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min.

*Fase móvel:* mistura de acetonitrila e tampão fosfato de amônio (49,1g de fosfato de amônio monobásico em 1000 mL de água purificada, ajustando-se para pH 5,3 com NaOH 2 M), na proporção de 35:65 v/v.

*Solução Amostra:* Pesar 10 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. Transferir quantidade de pó equivalente a 10 mg de roxitromicina para balão volumétrico de 10 mL contendo 2mL de metanol. Completar o volume com solução tampão pH 6,8, constituída de mistura de 400 mL de solução fosfato de sódio dibásico pH 10,3 e 600 mL HCl 0,1 mol/L pH 1,2, com pH final de 6,8. Em seguida, diluir a solução resultante com fase móvel de modo a se obter a concentração de trabalho de 100  $\mu$ g/mL.

*Solução padrão:* transferir 10 mg de roxitromicina SQR para balão volumétrico de 10 mL e acrescentar 2 mL de metanol. Completar o volume com solução tampão pH 6,8, constituída de mistura de 400 mL de solução fosfato de sódio dibásico pH 10,3 e 600 mL HCl 0,1 mol/L pH 1,2, com pH final de 6,8. Em seguida, diluir a solução resultante com fase móvel de modo a se obter a concentração de trabalho de 100  $\mu$ g/mL.

*Procedimento:* Injetar, separadamente, 20  $\mu$ L das Soluções padrão e amostra, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos, utilizando o mesmo método descrito em Doseamento por CLAE. Calcular a quantidade de C<sub>41</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub> a partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

## ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.