

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ENROFLOXACINO: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E
PERFIL DE DISSOLUÇÃO BASEADO EM DADOS *IN VIVO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gabriela Ribas Foresti

Uruguaiiana, RS, Brasil. 2015

GABRIELA RIBAS FORESTI

**ENROFLOXACINO: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E
PERFIL DE DISSOLUÇÃO BASEADO EM DADOS *IN VIVO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

Uruguaiiana, 2015

Gabriela Ribas Foresti

**ENROFLOXACINO: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E
PERFIL DE DISSOLUÇÃO BASEADO EM DADOS *IN VIVO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Dissertação defendida e aprovada em 26 de junho de 2015.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

Orientadora

Prof. Dra. Andréa Inês Horn Adams

UFSM

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim

UNIPAMPA

F718e Foresti, Gabriela Ribas Foresti
ENROFLOXACINO: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E
PERFIL DE DISSOLUÇÃO BASEADO EM DADOS IN VIVO / Gabriela Ribas
Foresti Foresti.
120 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2015.

"Orientação: Fabiana Ernestina Barcellos da Silva Silva".

1. Enrofloxacino. 2. Medicamento Veterinário. 3. Controle
de Qualidade. 4. Dissolução. 5. Correlação in vivo-in vitro.
I. Título.

RESUMO

O enrofloxacino é um fármaco antibacteriano exclusivamente utilizado na clínica veterinária. Até o momento, não existem monografias oficiais para o controle de qualidade deste fármaco em suas formas farmacêuticas. No presente trabalho, métodos analíticos para determinação quantitativa do enrofloxacino contido em comprimidos palatáveis foram desenvolvidos e validados por: (a) espectrofotometria UV utilizando tampão fosfato de pH 7,4: etanol (95:5, v / v) como solvente, em 273 nm com faixa de concentração de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (b) CLAE com detecção detector de arranjo de diodos a 278 nm, fase móvel composta por tampão fosfato 0,04 M (pH 2,7 e 0,3% de trietilamina) e acetonitrila 75% (75:25, v/v), faixa de concentração de 20,0 a 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e tempo de retenção médio de 6 minutos; E (c) método de dissolução baseado em dados *in vivo* empregando-se 400ml de meio contendo HCl, pepsina e lecitina de soja, aparato pá, velocidade de 75 rpm e quantificação do fármaco por espectrofotometria no UV visível. A validação de todos os métodos desenvolvidos foi realizada através da análise dos parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, conforme estabelecido para medicamentos de uso veterinário pelo VICH e todos os resultados obtidos confirmaram que os métodos desenvolvidos são úteis para o controle de qualidade de rotina de enrofloxacino em comprimidos palatáveis.

Palavras-chave: enrofloxacino, dissolução, CLAE, UV, desenvolvimento e validação de método

ABSTRACT

The enrofloxacin is an antibacterial drug used exclusively in veterinary clinic. To date, there are no official papers for the quality control of this drug in its pharmaceutical forms. In the present work, analytical methods for quantitative determination of enrofloxacin contained in palatable tablets were developed and validated by: (a) UV spectrophotometry using pH 7.4 phosphate buffer: ethanol (95: 5, v / v) as solvent, 273 nm with a concentration range from 0.5 to 8.0 ug. ml⁻¹. (B) HPLC detection at 278 nm with a diode array detector, a mobile phase consisting of 0.04 M phosphate buffer (pH 2.7 and 0.3% of triethylamine) and 75% acetonitrile (75:25, v / v), concentration range from 20.0 to 80.0 ug ml⁻¹ and average retention time of 6 minutes; And (c) dissolution method based on in vivo data using up 400ml of medium containing HCl and pepsin soy lecithin, paddle apparatus, 75 rpm speed and quantification of the drug by UV visible spectrophotometry. Validation of all developed methods was performed by analysis of parameters: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness, as provided for medicines for veterinary use by VICH and all results confirmed that the developed methods are useful for the control enrofloxacin routine quality in palatable tablets.

Keywords: enrofloxacin, dissolution, HPLC, UV, development and method validation

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais fluoroquinolonas de uso veterinário comercializadas mundialmente.....	22
Tabela 2. Solventes utilizados no desenvolvimento do método analítico para doseamento de ENRO comprimidos palatáveis por UV.	43
Tabela 3. Excipientes utilizados na amostra simulada de excipientes.	45
Tabela 4. Dados referentes a linearidade do método por UV.....	49
Tabela 5. Análise de variância da curva de calibração de ENRO comprimidos palatáveis.	49
Tabela 6. Resultado do ensaio de repetibilidade e precisão intermediária do ENRO em comprimidos palatáveis por UV.....	50
Tabela 7. Resultados do teste de exatidão obtido para o doseamento de ENRO em comprimidos palatáveis por UV.....	51
Tabela 8. Resultados obtidos para avaliação da robustez do doseamento de ENRO em comprimidos palatáveis por UV.....	52
Tabela 9. Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento de método por CLAE para a quantificação de ENRO comprimidos palatáveis.....	58
Tabela 10. Valores experimentais dos parâmetros cromatográficos obtidos com as condições analíticas testadas.	67
Tabela 11. Parâmetros referentes a linearidade do método para a análise de ENRO por CLAE.	78
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade do método de quantificação de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE.	79
Tabela 13. Resultados obtidos na quantificação de ENRO comprimidos palatáveis para a avaliação da repetibilidade e precisão intermediária por CLAE.	80
Tabela 14. Resultados da porcentagem de recuperação para determinação da exatidão do método de doseamento de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE.....	81
Tabela 15. Resultados obtidos para a avaliação da robustez do doseamento de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE.	82
Tabela 16. Condições experimentais para determinação dos perfis de dissolução.	88
Tabela 17. Diferentes condições testadas no ensaio de dissolução.	93
Tabela 18. Teste da solubilidade de meios propostos para dissolução.....	96
Tabela 19. Valores de ED% para as condições de dissolução avaliadas (Grupo A).....	98
Tabela 20. Valores de ED% para as condições de dissolução avaliadas (Grupo B).	99

Tabela 21. Linearização dos perfis de dissolução obtidos com as diferentes condições.....	100
Tabela 22. Análise de regressão para CIVIV usando fator de correção.....	103
Tabela 23. Validação interna da correlação usando a fração absorvida predita.....	104
Tabela 24. Avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do teste de dissolução para ENRO comprimidos palatáveis empregando-se analistas diferentes.	106
Tabela 25. Exatidão do método de dissolução de ENRO em comprimidos palatáveis.....	107
Tabela 26. Resultados da dissolução comparando meio desaerado e não desaerado.....	108

Lista de figuras

Figura 1. Estruturas químicas das fluorquinolonas citadas.	21
Figura 2. Estruturas e equilíbrio de ionização do enrofloxacino.	23
Figura 3. Síntese do DNA bacteriano e atuação de algumas classes de antibacterianos (WEBSTER, 2005).	25
Figura 4. Trato gastrointestinal canino e felino (REECE & SWENSON, 1996).	27
Figura 5. Gráfico demonstrando as alterações do pH gástrico canino pré e pós prandial (NASSIF et al., 2003).	29
Figura 6. Esquema de aplicações do estudo de dissolução na indústria farmacêutica (FONSECA, 2006).	31
Figura 7. (a) Aparato da cesta; (b) Aparato da pá; (c) Aparato de cilindros recíprocos; (d) Aparato de fluxo contínuo, modelo grande. *Reproduzido da Farmacopéia Brasileira 4a ed. **Reproduzido da USP 24.	33
Figura 8. Espectro do ENRO 5 µg mL ⁻¹ (a) e Amostra simulada de excipientes (b).	48
Figura 9. Cromatogramas obtidos com as condições analíticas testadas.	68
Figura 10. Cromatogramas representativos das soluções (a) ENRO SQR, (b) amostra de ENRO comprimidos palatáveis e (c) amostra simulada de excipientes.	71
Figura 11. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à hidrólise ácida em HCl 2 mol. L ⁻¹ em refluxo a 80° C; (a) Tempo zero e (b) após 4 horas.	73
Figura 12. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à hidrólise básica em NaOH 2mol.L ⁻¹ em refluxo a 80° C; (a) Tempo zero e (b) após 4 horas.	74
Figura 13. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à oxidação por H ₂ O ₂ 30% por 24 horas(a) Tempo zero e (b) após 24 horas.	75
Figura 14. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à degradação térmica por a 80o C por 48 horas(a) Tempo zero e (b) após 24 horas.	76
Figura 15. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à exposição de radiação UV a 254 nm; (a) Tempo zero e (b) após 4 horas de exposição.	77
Figura 16. Perfis de dissolução do ENRO nos diferentes condições testados (Grupo A).	97
Figura 17. Fração dissolvida vs. tempo para ENRO utilizando o método de Wagner-Nelson.	102
Figura 18. Tempo para dissolução in vivo vs. tempo de dissolução in vitro.	102
Figura 19. Fração dissolvida vs. fração absorvida.	104

Figura 20. Especificidade do enrofloxacino frente aos excipientes e constituintes do meio de dissolução (a) Enro (b) Meio de dissolução (c) Amostra simulada de excipientes. 105

Lista de abreviaturas

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CIVIV - Correlação in vitro-in vivo

DAD - Detector de arranjo de diodos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPR - Desvio padrão relativo

ENRO - Enrofloxacino

FDA - Food and Drug Administration

HCl - Ácido clorídrico

VICH - International Conference on Harmonisation

SCB - Sistema de classificação biofarmacêutica

SQR – Substância química de referência

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2.OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Quinolonas.....	19
3.2 Enrofloxacino	23
3.2.1 Propriedades Físico-químicas.....	23
3.2.2 Mecanismo de ação	24
3.2.3 Farmacocinética.....	25
3.3. Fisiologia gastrintestinal canina e felina	26
3.3.1 Anatomia	26
3.3.2 Secreção gástrica em caninos e felinos.....	27
3.3.3 Regulação da secreção de ácido	28
3.4 Dissolução de formas farmacêuticas sólidas orais de uso veterinário.....	30
3.4.1 Aparatos previstos em compêndios oficiais	31
3.4.3 Comparação de perfis de dissolução	34
3.4.2 Meios de dissolução biorrelevantes.....	35
3.5 Sistema de classificação biofarmacêutica para medicamentos de uso veterinário.....	35
3.6 Correlação <i>In Vivo</i> – <i>In Vitro</i>	36
3.8 Métodos Analíticos Para Controle De Qualidade De Enrofloxacino.....	37
4. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ENRO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS POR UV	39
4.1 Introdução.....	40
4.2 Material e métodos	41
4.2.1 Material.....	41

4.2.1.1 Equipamentos e acessórios	41
4.2.1.2 Reagentes.....	41
4.2.1.3 Matéria-prima e produtos farmacêuticos	42
4.2.2 Métodos	43
4.2.2.1 Desenvolvimento de método para a quantificação de enro em comprimidos palatáveis por UV	43
4.2.2.2 Validação do método de quantificação de enro em comprimidos palatáveis por UV.	44
4.2.2.2.1 Especificidade.....	45
4.2.2.2.2 Linearidade	46
4.2.2.2.3 Precisão.....	46
4.2.2.2.4 Exatidão	46
4.2.2.2.5 Robustez	47
4.3 Resultados e discussão	47
4.3.2 Validação do método de quantificação de enro em comprimidos palatáveis por UV....	47
4.3.2.1 Especificidade.....	48
4.3.2.2 Linearidade	49
4.3.2.3 Precisão.....	50
4.3.2.4 Exatidão	51
4.3.2.5 Robustez	52
4.4 Considerações Finais	53
5. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ENRO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS POR CLAE	54
5.Introdução.....	55
5.2 Material e métodos	56
5.2.1 Material.....	56
5.2.1.1 Equipamentos e acessórios	56
5.2.1.2 Reagentes.....	56

5.2.1.2 Matéria-prima e produtos farmacêuticos	57
5.2.2 Métodos	57
5.2.2.1 Desenvolvimento de método para a quantificação de enro em comprimidos palatáveis por CLAE	57
5.2.2.2 Validação do método de quantificação de enro em comprimidos palatáveis por CLAE	59
5.2.2.2.1 Especificidade.....	60
5.2.2.2.2 Linearidade	64
5.2.2.2.3 Precisão.....	65
5.2.2.2.4 Exatidão	65
5.2.2.2.5 Robustez	65
5.3 Resultados e discussão	66
5.3.1 Desenvolvimento de método para a quantificação de enro em comprimidos palatáveis por CLAE	66
5.3.2 Validação do método de quantificação de enro comprimidos palatáveis por CLAE.....	69
5.3.2.1 Especificidade.....	70
5.3.2.2 Linearidade	78
5.3.2.3 Precisão.....	79
5.3.2.4 Exatidão	80
5.3.2.5 Robustez	81
5.4 Considerações finais	82
6. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA ENRO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS E CORRELAÇÃO COM DADOS <i>IN VIVO</i>	83
6.1 Introdução.....	84
6.2 Materiais e métodos.....	86
6.2.1 Materiais	86
6.2.1.1 Matéria prima e produtos farmacêuticos	86

6.2.1.2 Equipamentos e acessórios	86
6.2.1.2 Reagentes.....	86
6.2.2 Métodos	87
6.2.2.1 Determinação da solubilidade em diferentes meios	87
6.2.2.2 Condições do método de dissolução.....	88
6.2.2.3 Validação do método de dissolução de Enro por UV	89
6.2.2.3.1 Especificidade.....	89
6.2.2.3.2 Linearidade	89
6.2.2.3.3. Precisão.....	90
6.2.2.3.4. Exatidão.....	90
6.2.2.3.5. Robustez	91
6.2.2.4 Estudo de correlação <i>In Vitro - In Vivo</i>	91
6.2.2.5 Comparação dos perfis de dissolução.....	92
6.3 Resultados e discussão	94
6.3.1 Estudos de solubilidade e condição <i>Sink</i>	94
6.3.2 Desenvolvimento do método de dissolução	96
6.3.3 Comparação dos perfis de dissolução.....	98
6.3.4 Correlação <i>In Vitro – In Vivo</i>	101
6.3.5 Validação do método de quantificação de Enro em comprimidos palatáveis por UV .	105
6.3.5.1 Especificidade.....	105
6.3.5.2 Linearidade	105
6.3.5.3 Precisão.....	106
6.3.5.4 Exatidão	107
6.3.5.5. Robustez	108
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1.INTRODUÇÃO

A garantia de qualidade é uma das áreas em desenvolvimento na indústria farmacêutica que visa assegurar as características do produto, de modo que o mesmo esteja de acordo com especificações pré-estabelecidas. Dessa forma, a implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) para medicamentos de uso humano assegura que os produtos sejam produzidos com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido (BRASIL, 2010). Um dos aspectos referentes à implantação da Garantia de Qualidade em uma indústria farmacêutica diz respeito ao desenvolvimento e validação de metodologias que irão atestar a qualidade do produto final. Entre as metodologias a serem desenvolvidas para controle de qualidade podemos citar aquelas aplicadas à matéria-prima como identificação, pureza, presença de substâncias relacionadas e àquelas referentes ao controle de qualidade do produto final como determinação do teor e ensaios de dissolução.

A indústria farmacêutica de produtos veterinários no Brasil possui normativa sobre as BPF estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mundialmente, um dos setores que regulamenta e orienta a produção e controle de qualidade de medicamentos de uso veterinário é o VICH (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products) (VICH, 2006). Entretanto, a descrição das monografias dos insumos e produtos acabados em farmacopéias, como as existentes para medicamentos de uso humano, ainda são indisponíveis no Brasil. Por este motivo, estudos envolvendo o controle de qualidade deste tipo de medicamento podem contribuir para a implantação de guias, normatizando as metodologias a serem empregadas para tal.

O enrofloxacino é um antimicrobiano de uso veterinário pertencente à classe das fluorquinolonas. Vem sendo utilizado na prática veterinária com sucesso no tratamento de doenças respiratórias e infecções, entretanto são encontrados poucos relatos na literatura sobre métodos para controle de qualidade deste medicamento.

Estudos envolvendo a avaliação de perfis de dissolução aplicados aos medicamentos veterinários podem ser úteis nos processos de desenvolvimento de formulações, na

identificação de variáveis críticas na produção, no controle de qualidade final, no estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e como parte do estudo de equivalência farmacêutica. Características específicas referentes aos medicamentos veterinários com o pH do trânsito gastrointestinal da espécie, bem como o uso de excipientes palatilizantes são alguns dos aspectos que podem influenciar fortemente a dissolução do fármaco tornando-a uma ferramenta útil no desenvolvimento de formulações e, ainda, na comparação dos perfis visando o estabelecimento da equivalência farmacêutica.

Em especial para comprimidos de enrofloxacino, o desenvolvimento de metodologias que possam ser aplicadas para avaliação da dissolução é particularmente útil já que, devido à insolubilidade deste fármaco em meio aquoso, a dissolução pode ser o passo limitante da disponibilidade *in vivo*. Devido aos escassos estudos envolvendo o controle de qualidade de formulações de uso veterinário (FAHMY et al., 2002; et al.; CÓZAR-BERNAL et al., 2010), e a inexistência de metodologia analítica para a avaliação do perfil de dissolução do enrofloxacino baseado em dados *in vivo*, este estudo tem como objetivo o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica por CLAE e UV para quantificação de enrofloxacino em comprimidos palatáveis, assim como o estudo do perfil de dissolução, simulando o estado de jejum em cães correlacionando os dados *in vivo*.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação do teor e perfil de dissolução de enrofloxacino na forma farmacêutica comprimido palatável.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico para a determinação quantitativa de enrofloxacino, na forma farmacêutica comprimido, empregando a espectrofotometria na região do ultravioleta.

- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade para a determinação quantitativa de enrofloxacino, na forma farmacêutica comprimido, empregando a cromatografia a líquido de alta eficiência.

- Desenvolver e validar ensaio de dissolução para comprimidos contendo enrofloxacino, levando em consideração as características fisiológicas dos cães, no estado de jejum, sugerindo uma correlação *in vitro in vivo*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quinolonas

As quinolonas contemplam uma grande classe de antibióticos sintéticos utilizados amplamente para uso humano e veterinário, importantes no combate a organismos Gram (-) e Gram (+), sendo as últimas gerações igualmente efetivas contra bactérias anaeróbicas. (GOODMAN & GILMAN, 2007).

As fluorquinolonas ou quinolonas de segunda geração, obtidas a partir da adição de um átomo de flúor na posição 6 do núcleo das quinolonas, deram origem a moléculas com considerável aumento de atividade. Os primeiros compostos desta nova classe surgiram na década de 80, com alterações na posição 6 (átomo de flúor) e 7 (grupo piperazinil), como o norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino e enrofloxacin (Figura 1). Este último de uso exclusivo na clínica veterinária (MARTINEZ et al., 2006). Estas alterações levaram a um aumento da capacidade das quinolonas de penetrarem na parede bacteriana e com isso, uma melhor atividade contra bactérias Gram (-) foi obtida, passando a abranger não somente Gram (-), mas algumas espécies Gram (+), permitindo um melhor perfil farmacocinético e uma atividade antibacteriana 1000 vezes superior em comparação ao ácido nalidíxico, primeiro composto antibiótico pertencente a classe das quinolonas (DE SOUSA et al., 2007; DA SILVA & HOLLENBACH, 2010).

Os antibacterianos quinolônicos de terceira geração apresentam espectro de atividade balanceado, sendo indicados basicamente no tratamento de infecções respiratórias como levofloxacino e gemifloxacino. A maior atividade contra patógenos Gram (-) é encontrada na quarta geração, estes ainda apresentam atividade aumentada contra Gram (+) e patógenos do trato respiratório. Como exemplos podem ser citados o moxifloxacino e sitafloxacino (Figura 1).

De modo geral, as fluorquinolonas tornaram-se, na última década, uma classe dominante de agentes antimicrobianos, com crescimento elevado se comparado com as demais classes,

despertando assim, um grande interesse e rápida aceitação tanto na clínica humana quanto na veterinária (COX, 2007).

Para uso em animais, a primeira fluorquinolona autorizada foi o enrofloxacino, aprovado no final dos anos 80. Desde então, cinco outras fluoquinolonas (danofloxacino, orbifloxacino, difloxacino, sarafloxacino e marbofloxacino) têm sido comercializadas para uso em animais nos Estados Unidos, com outras atualmente sob investigação (SÁRKÖZY, 2001; BOOTHE et al., 2006; MARTINEZ et al., 2006).

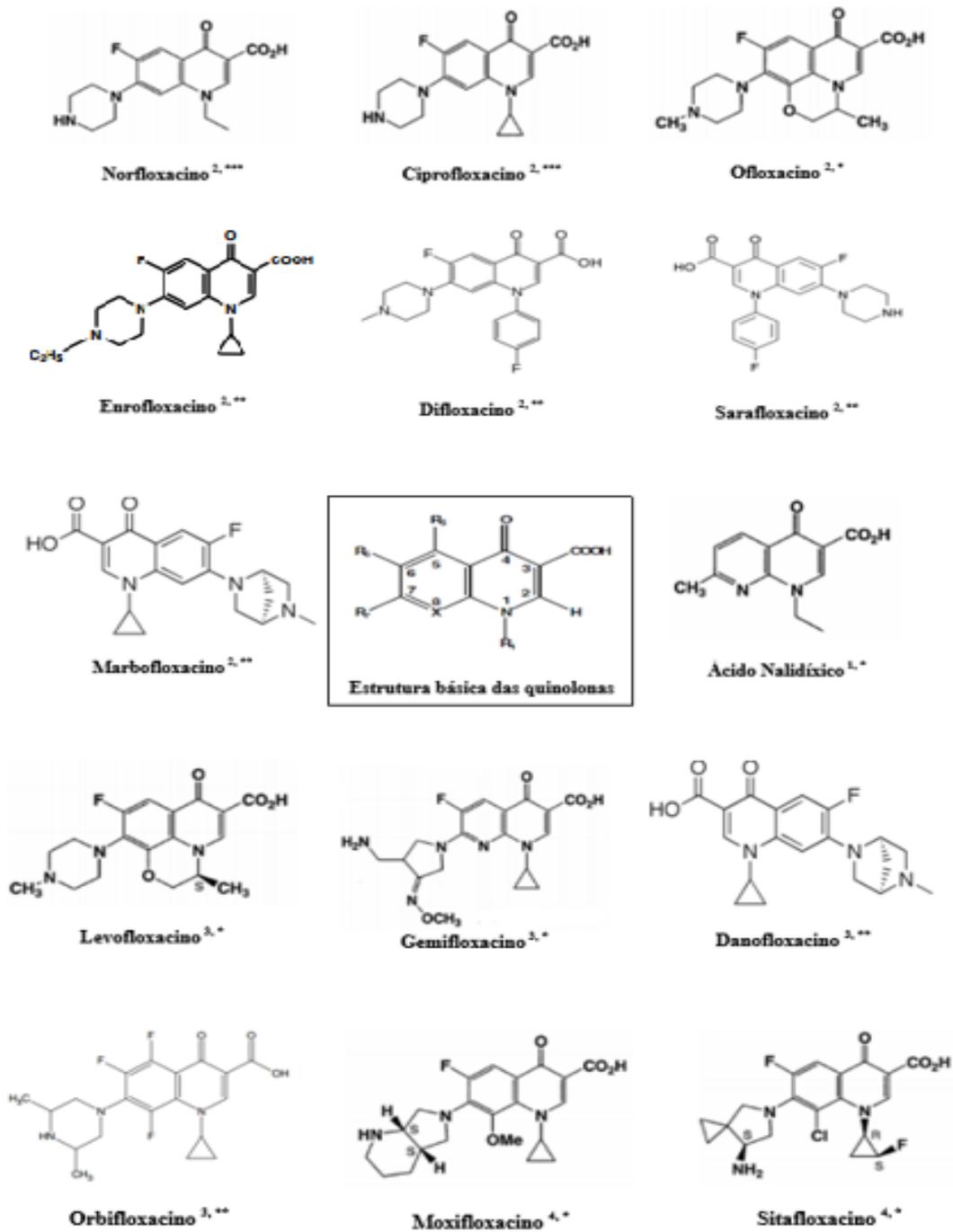


Figura 1. Estruturas químicas das fluorquinolonas citadas.

Fluorquinolonas indicadas para uso humano com potencial interesse veterinário mais comumente utilizadas incluem ciprofloxacino e norfloxacino (IHRKE *et al.*, 1999). Na Tabela 1, estão descritas as formas farmacêuticas disponíveis das fluorquinolonas de uso veterinário utilizadas mundialmente, assim como a quais animais se destinam.

Tabela 1. Principais fluoroquinolonas de uso veterinário comercializadas mundialmente.

Fluorquinolona	Forma Farmacêutica	Espécie animal
Enrofloxacino	Solução Oral	
	Suspensão Oral	
	Solução Injetável	Cães, Gatos, Aves, Suínos,
	Comprimidos	Bovinos, Caprinos,
	Pó Solúvel	Ovinos, Roedores
	Pré mistura para alimento medicamentoso	
Danofloxacino	Solução Injetável	Bovinos, Suínos, Frango
	Pó Oral	
Marbofloxacino	Solução Injetável	Cães, Gatos, Suínos,
	Comprimidos	Bovinos
	Dispositivo Intrarruminal	
Orbifloxacino	Solução Oral	Cães, Gatos
	Comprimidos	
Difloxacino	Solução Oral	Aves

3.2 Enrofloxacin

O enrofloxacin foi a primeira fluorquinolona desenvolvida especialmente para a clínica veterinária e utilizada com sucesso desde 1989, abrangendo grande número de espécies animais e produzida em diferentes formas farmacêuticas. Entretanto são poucos os relatos na literatura no que diz respeito ao controle de qualidade deste fármaco.

3.2.1 Propriedades físico-químicas

O enrofloxacin (1-ciclopropil-7-[4-etil-1-piperazinil]-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-3-quinolino-ácido carboxílico) (figura 1) é um fármaco com baixa solubilidade em água e pHs ácido. O principal metabólito ativo do enrofloxacin é o ciprofloxacino, ambos possuem caráter anfótero, com valores de pK_{a1} entre 5,5 e 6,0 e pK_{a2} entre 7,7 e 8,7. O equilíbrio de ionização para o enrofloxacin é apresentado na Figura 2 e é válido para outras fluorquinolonas com grupos piperanzila em sua estrutura (TURIEL *et al.*, 2003).

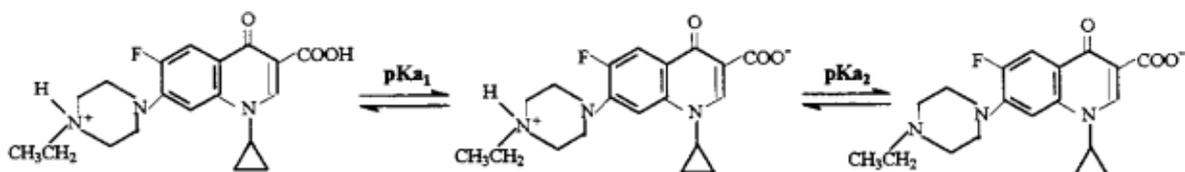


Figura 2. Estruturas e equilíbrio de ionização do enrofloxacin.

Dependendo do pH em que se encontra o meio, as fluorquinolonas podem existir sob as formas catiônica, aniônica, neutra ou zwitteriônica (do germânico *zwitter*, que significa ambivalente contendo duas metades ionizáveis). Em pH 7,4 (fisiológico) as fluorquinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma

zwitteriônica podendo, porém, coexistir com as formas aniônica e catiônica (DE SOUSA, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2006). As fluoquinolonas possuem alta permeabilidade, fato que pode ser explicado pela sua estrutura química (substituinte na posição *para* do anel piperazínico) que confere ao mesmo maior lipofilicidade, aumentando a partir disso a permeação nos tecidos. No entanto possui baixa solubilidade em água e pH ácido, o que na prática clínica pode resultar em formação de cristais no trato urinário e lesões renais (DE SOUSA, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2009).

3.2.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação do enrofloxacino é característico da classe das fluorquinolonas. Ocorre interferência na síntese do DNA bacteriano, através da inibição de 2 enzimas: DNA-girase e Topoisomerase IV, que tem como função o controle do processo de divisão a reunião de novas cadeias o enovelamento do novo DNA durante a replicação (RANG *et al.*, 2004; BARREIRO & FRAGA, 2008). A Figura 3 mostra o ciclo da síntese do DNA bacteriano e alguns grupos de antibacterianos atuantes, incluindo as fluorquinolonas.

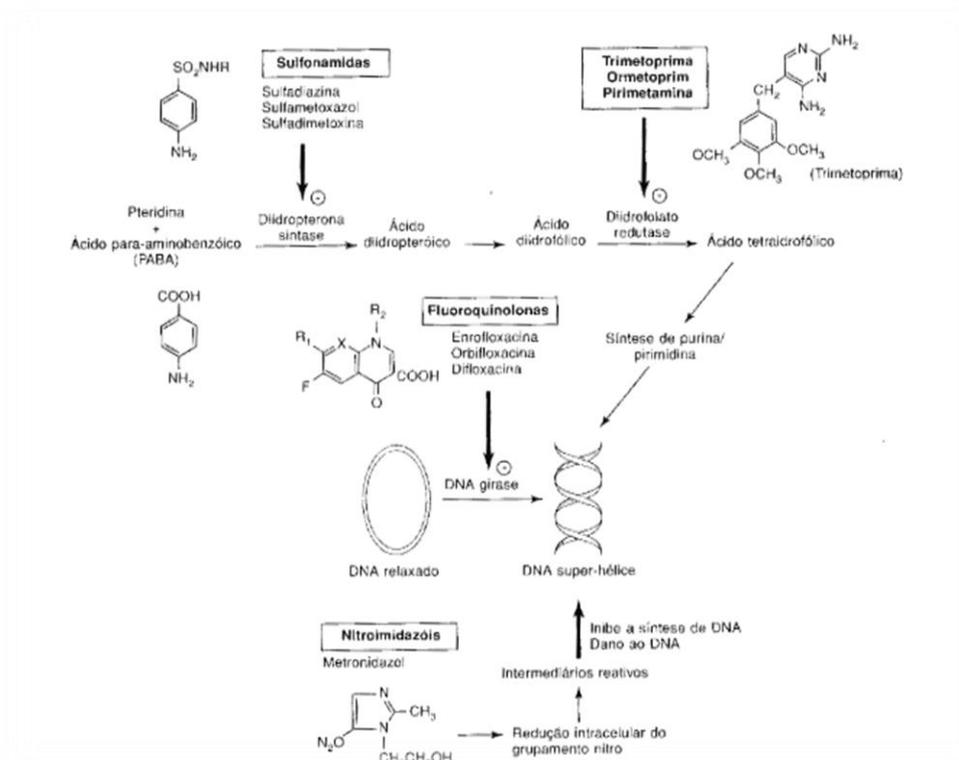


Figura 3. Síntese do DNA bacteriano e atuação de algumas classes de antibacterianos (WEBSTER, 2005).

3.2.3 Farmacocinética

O enrofloxacino é bem absorvido e distribuído a nível tissular quando administrado por via oral, sendo excretado pela urina e pelas fezes em altas concentrações. Sua biotransformação no organismo ocorre por N-desalquilação fazendo com que o enrofloxacino converta-se em ciprofloxacino (SPINOSA *et al.*, 2011), que é farmacologicamente ativo e utilizado também na medicina humana. O volume de distribuição do enrofloxacino é alto na maioria das espécies animais, sendo muito maior que o atingido pelos betalactâmicos e aminoglicosídeos. Concentra-se, sobretudo na saliva, secreção nasal, mucosas, epitélio e secreção bronquial, assim como no fígado e no trato urinário. Transpõe efetivamente o tecido pulmonar, fluido de revestimento e macrófagos alveolares, resultando assim em concentrações maiores que as séricas (PRESCOTT, 2000; EMEA, 1998; WU *et al.*, 2006).

O pico máximo de concentração sérica das fluorquinolonas varia conforme a espécie animal. Após a administração por via oral, as fluorquinolonas são rapidamente absorvidas por animais monogástricos e pré-ruminantes. No caso de aves pode ser difícil estabelecer concentrações medicamentosas eficazes, pela incerteza da dose administrada (para o caso de formulações solúveis em água) e também porque elas excretam muito rapidamente a maioria dos fármacos. No entanto o enrofloxacino tem se mostrado altamente ativo contra a maioria das bactérias Gram (-).

Para animais domésticos como cães e gatos o enrofloxacino é preferencialmente administrado em comprimidos por via oral e é rapidamente absorvido com uma biodisponibilidade de cerca de 83% em cães e 92% em gatos (SPINOSA et al., 2011). Por fatores ainda desconhecidos, em gatos, a degeneração retiniana tem sido associada ao uso de enrofloxacino por infusão intravenosa. Sugere-se que existam alguns fatores predisponentes como: altas doses do fármaco ou altas concentrações no plasma e acúmulo do fármaco devido ao seu metabolismo alterado ou eliminação reduzida (CAVALCANTE et al., 2009).

3.3. Fisiologia gastrintestinal canina e felina

3.3.1 Anatomia

De forma semelhante ao organismo humano e muito semelhantes entre si, o sistema digestório canino e felino é constituído de um tubo que vai da boca ao ânus, sendo relativamente simples nos cães e gatos como representado na Figura 4.

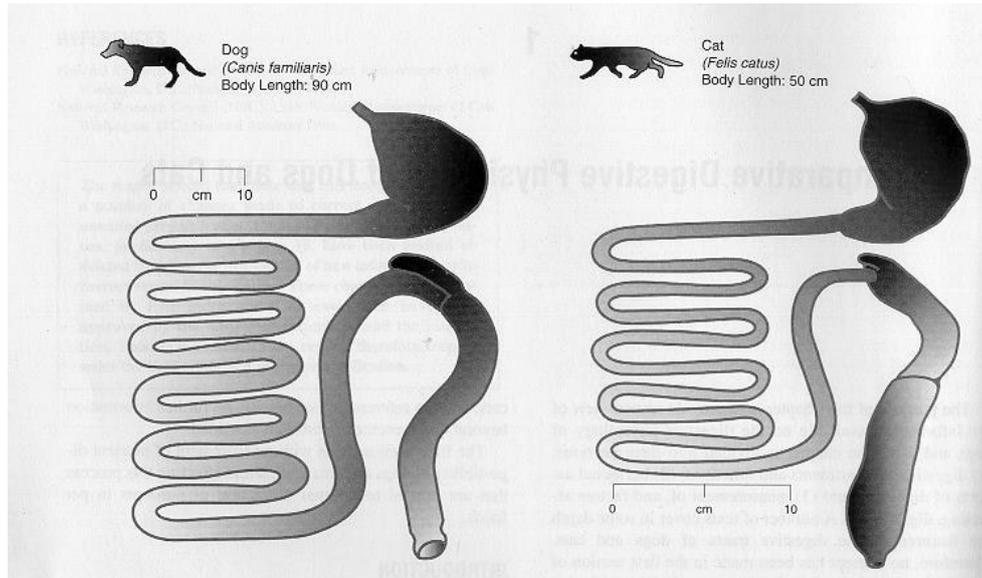


Figura 4. Trato gastrointestinal canino e felino (REECE & SWENSON, 1996).

O canal digestório compreende os seguintes segmentos: boca e anexos (dentes, língua e glândulas salivares), esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, colón e reto) e ânus. Também devem ser considerados o fígado e o pâncreas como órgãos anexos ligados aos processos de digestão (ARAÚJO & BLAZQUEZ, 2007)

De modo geral, a diferença mais significativa entre o trato gastrointestinal de cães e gatos, no aspecto anatômico, está ligada ao tamanho. Enquanto os cães têm em média 90 cm em sua extensão gastrointestinal, os gatos têm praticamente a metade (REECE & SWENSON, 1996).

3.3.2 Secreção gástrica em caninos e felinos

Em relação a secreção gástrica, semelhante ao organismo humano, as células parietais de cães e gatos estão preparadas para a produção de ácido clorídrico, secretando íons hidrogênio, por meio da bomba $H^+/K^+-ATPase$ e íons cloro, em combinação com íons potássio, para fora da célula. Os íons hidrogênio resultam da dissociação de ácido carbônico dentro da

célula, que por sua vez surgiu da combinação de água e dióxido de carbono, por meio da anidrase carbônica. Os íons cloro entram na célula em troca de íons bicarbonato, que migram para a circulação sanguínea. Assim, durante a digestão ocorre um fenômeno conhecido como “maré alcalina”, devido a intensificação da secreção ácida.

As células parietais são estimuladas à produção de ácido clorídrico pela acetilcolina (libertada pelas fibras parassimpáticas). As células G libertam gastrina em resposta a acetilcolina, incentivando adicionalmente as células parietais a produzir ácido clorídrico. Quando o estômago distende, com a entrada de comida, ocorre uma estimulação nervosa direta sobre as células G e células parietais, continuando a produção de ácido. Para além disso, o alimento funciona como um tampão que ameniza o pH gástrico, evitando o cessar da secreção pelas células G (HERDT, 2004).

3.3.3 Regulação da Secreção de Ácido

Embora sejam inconstantes e pouco estudadas as informações que dizem respeito as diferentes enzimas e como as mesmas mantêm o pH gástrico de cães e gatos, sabe-se que o mesmo atinge valores inferiores, se comparado ao restante do trato gastrintestinal em função da secreção de HCl. No entanto, esse pH é elevado se comparado ao organismo humano (GUYTON & HALL, 2006; RECEE & SWENSON , 1996).

Nassif e colaboradores (2003) ao avaliarem a motilidade gástrica de 20 cães sem raça definida constataram que, em média, no estado de jejum o pH do estômago de cães se aproxima de 2,0. Após a ingestão de alimento, o mesmo atua como um agente tamponante que não só eleva o pH estomacal como o mantém constante durante o processo de digestão mesmo com a constante secreção de HCl durante o processo. Na Figura 5 esse processo é ilustrado.

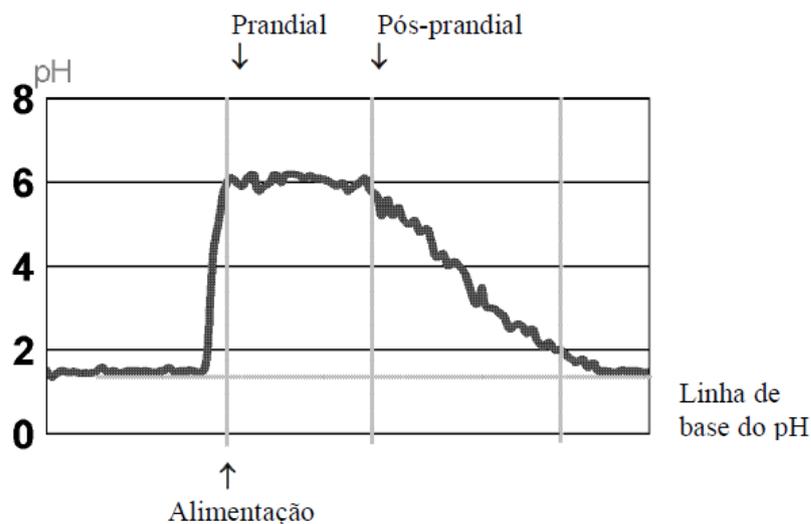


Figura 5. Gráfico demonstrando as alterações do pH gástrico canino pré e pós prandial (NASSIF et al., 2003).

Arndt e colaboradores (2013) com o intuito de desenvolverem meios de dissolução biorrelevantes que simulassem o estado de jejum em cães, constataram através da análise de aspirados de suco gástrico de 4 cães sem raça definida em jejum, um pH médio de $2,53 \pm 0,19$.

Em estudos semelhantes, Akimoto e colaboradores (2000) obtiveram um pH médio de $6,8 \pm 0,2$ em cães Beagle, enquanto o pH gástrico nos estudos de Mori e Kondo (2006) foi constatado na faixa de 3,7 e 7,8, em condições semelhantes aos estudos de Arndt e colaboradores (2013). Da mesma forma, Polentarutti (2010) informou um valor de pH inicial médio de aproximadamente 5,8 antes da administração de solução tampão em experimentos utilizando cães Labradores (AKIMOTO *et al.*, 2000; MORRI & KONDO, 2006; POLENTARUTTI *et al.*, 2010).

Em humanos, o pH estomacal no estado de jejum é de cerca de 1,5 (GUYTON & HALL, 2006). Dessa forma, embora os valores de pH constatados em estudos anteriores tenham alta discrepância, podemos afirmar que em relação aos humanos, o pH gástrico de cães em jejum apresenta-se de fato relativamente maior, cerca de 2,5 no mínimo. Um fato que exemplifica essa diferença de pH entre humanos e cães é a administração de pentagastrina que deve ser feita aos cães antes de qualquer procedimento, quando estes são utilizados como cobais em estudos pré-clínicos para posterior aprovação de fármacos em humanos. A pentagastrina atua no estômago dos cães fazendo com que o pH do mesmo diminua e assim melhor se

assemelhe fisiologicamente ao dos humanos. Tanto em cães quanto em gatos, sabe-se que os sucos gástricos contêm enzimas secretadas, tais como a pepsina e a lipase (HERDT, 2004).

Em relação aos felinos, estudos específicos quanto a fisiologia gastrointestinal são escassos, no entanto sabe-se que são deficientes em conjugar ácido glicurônico (fato que explicaria a sensibilidade dos gatos a maioria dos fármacos) e apresentam metabolismo acelerado para a maioria dos fármacos administrados incluindo o enrofloxacino, mesmo por via oral (ARAUJO & BLAZQUEZ, 2000). Devido a essas características peculiares e escassez de informações, torna-se difícil simular uma condição *in vitro* que possa ser correlacionada com dados *in vivo* no caso de gatos.

3.4 Dissolução de formas farmacêuticas sólidas orais de uso veterinário

O teste de dissolução é uma ferramenta útil para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas orais de uso humano e é possível utilizá-lo na avaliação de produtos veterinários observando algumas características individuais que variam em relação a espécie animal como motilidade e pH, por exemplo.

Para que os fármacos contidos em formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral se tornem biodisponíveis, é indispensável que ocorra liberação, dissolução ou solubilização em condições fisiológicas e permeação através do trato gastrointestinal. Qualquer fator que altere os processos pertinentes a essas condições, afeta diretamente a velocidade do processo de absorção e a quantidade de fármaco absorvido. Dessa forma, os testes de dissolução *in vitro* constituem uma das ferramentas fundamentais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações (BRASIL, 2003b).

Os ensaios de dissolução podem ser aplicados em diversas formas farmacêuticas com o objetivo de garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações (BRASIL, 2003b).

Na indústria farmacêutica, o teste de dissolução tem se tornado a cada dia mais importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas e semissólidas, pois prevê o comportamento de liberação do ativo. Além disso, é uma ferramenta no controle de qualidade de produtos, pois testes como identificação, pureza, teor e estabilidade não são suficientes para assegurar a qualidade do medicamento, dentre outras aplicações (FONSECA, 2006). Algumas das aplicações do estudo de dissolução encontram-se expressas na Figura 6.

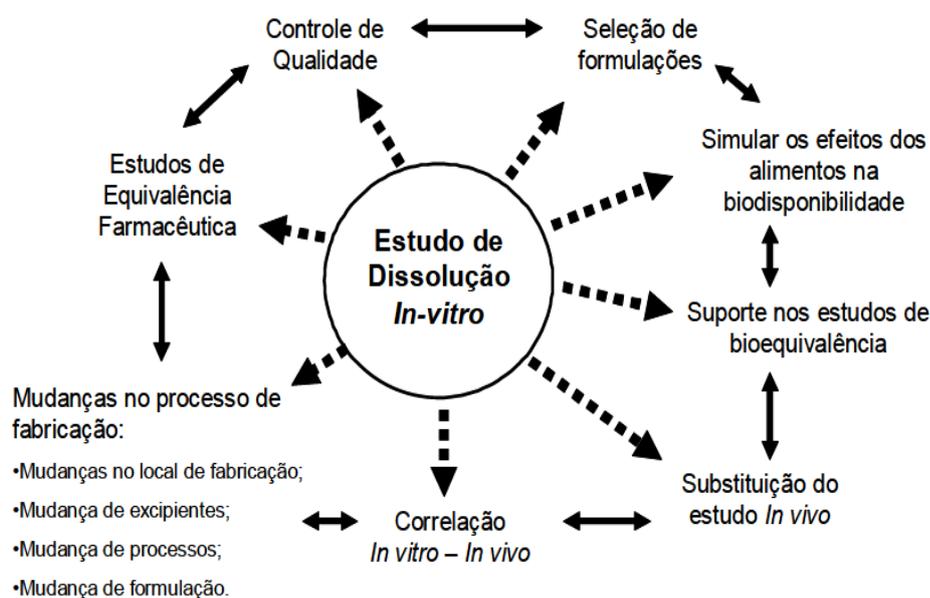


Figura 6. Esquema de aplicações do estudo de dissolução na indústria farmacêutica (FONSECA, 2006).

3.4.1 Aparatos previstos em compêndios oficiais

No ano de 1970 a Farmacopéia Americana publicou o primeiro teste de dissolução e com ele as especificações do aparato 1 (cesto rotatório), posteriormente o aparato 2 (pá) também veio a ser oficializado, sendo esses, até o presente momento, os equipamentos mais utilizados para testes de dissolução de formas farmacêuticas sólidas, principalmente os de liberação imediata (MARCOLONGO, 2003).

A partir da década de 90, em razão do crescente estudo sobre dissolução e desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, outros equipamentos foram desenvolvidos. Atualmente, na Farmacopeia Americana (USP 36, 2013) são descritos sete equipamentos de dissolução oficiais. Além dos dois primeiros aparatos, 1 - cesto rotatório e 2 - pás (Figuras 7a e 7b, respectivamente) recomendados nos compêndios oficiais como primeira escolha para os ensaios de dissolução *in vitro* de formulações de liberação imediata ou modificada, foram adicionados: O aparato 3 cilindros recíprocos (Figura 7c), que funciona de forma semelhante ao aparelho de desintegração no qual a forma farmacêutica fica suspensa em um tubo que se move através do meio e o aparato 4- Célula de fluxo (Figura 7d) que consiste em um sistema no qual o meio de dissolução é impulsionado para cima passando pela forma farmacêutica presa em uma célula. Ainda, como mencionado, são descritos na Farmacopeia Americana os aparatos 5, 6 e 7, no entanto estes destinam-se a formas transdérmicas de liberação. A Farmacopeia Brasileira considera como oficiais os aparatos (1) cestas, (2) pás e (3) cilindros alternantes (FB 5, 2010).

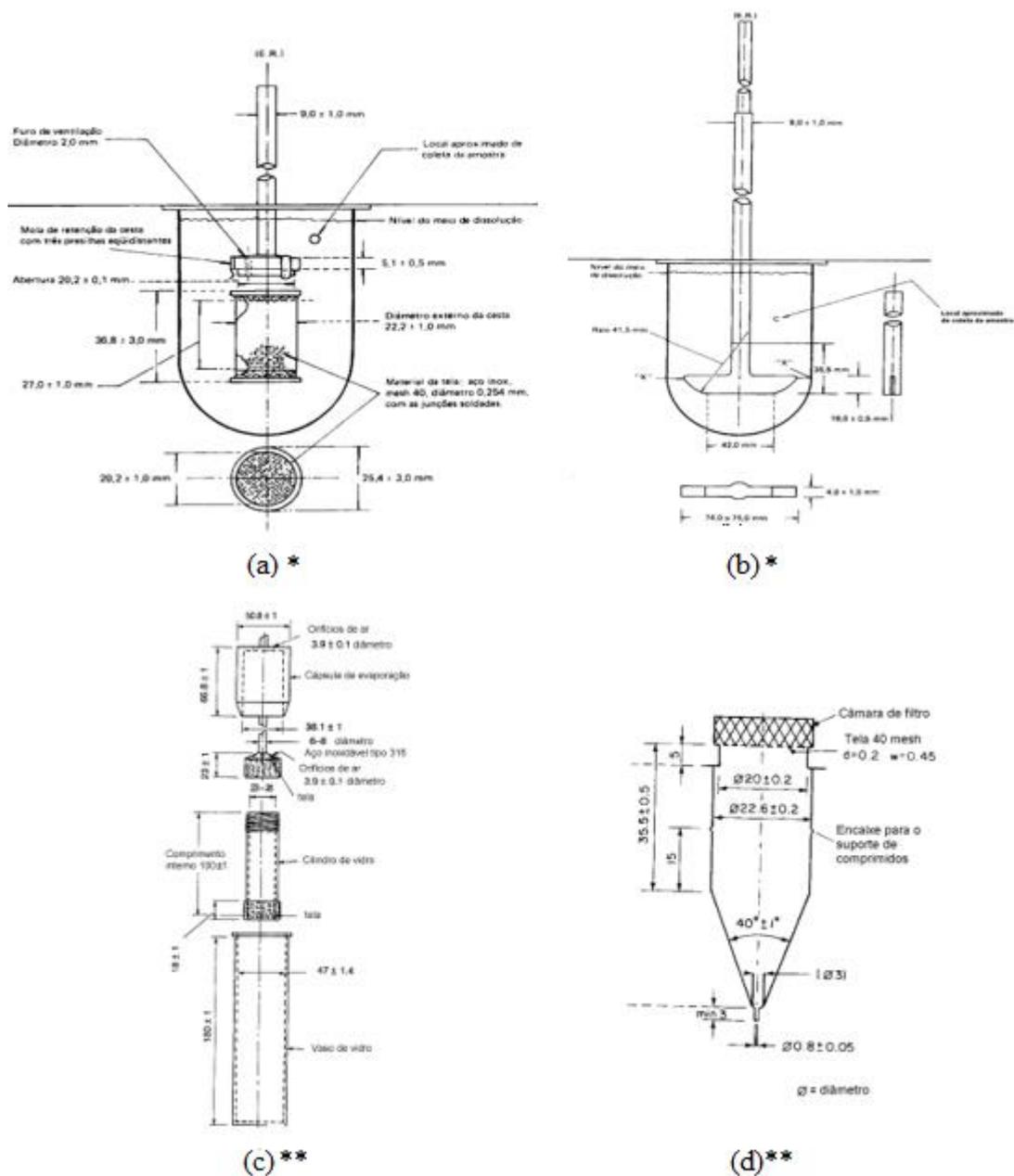


Figura 7. (a) Aparato da cesta; (b) Aparato da pá; (c) Aparato de cilindros recíprocos; (d) Aparato de fluxo contínuo, modelo grande. *Reproduzido da Farmacopéia Brasileira 4a ed. **Reproduzido da USP 24.

Embora exista um número considerável de aparatos descritos destinados a diferentes formas farmacêuticas é importante ressaltar que todos foram planejados com o intuito de mimetizar características fisiológicas humanas que, apesar de semelhantes no aspecto fisiológico em relação a enzimas e ácidos excretados, não se igualam nem tão pouco se

assemelham anatomicamente (forma e tamanho dos órgãos dos animais) (REECE & SWENSON, 1996).

3.4.3 Comparação de perfis de dissolução

Os métodos propostos para a realização da comparação de perfis de dissolução podem ser classificados em três categorias: (a) método baseado na análise de variância (ANOVA); (b) método modelo independente; (c) método modelo dependente. (YUKSEL *et al.*, 2000).

Os modelos baseados na ANOVA utilizam os dados de dissolução na sua forma original ou como uma transformação simples e sua análise é capaz de mostrar diferenças estatísticas.

Dentre os métodos designados de modelo independente o mais comumente utilizado é o f_2 (fator de similaridade), que compara diretamente a semelhança entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência.

Os exemplos mais comuns encontrados na literatura de modelos dependentes são: ordem zero, primeira ordem, Hixon-Crowell, Higushi, Weibull, entre outros (POLLI, 1996; O'HARA *et al.*, 1998). Estes são baseados em funções matemáticas distintas que, após seleção de uma função adequada, permitem a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Além dos modelos cinéticos traçados a partir do perfil de dissolução, a eficiência de dissolução (ED%) sugerida inicialmente por Khan e Rhodes (1975) pode ser incluída como um importante parâmetro de cinética de dissolução. Este termo pode ser definido como a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo. A ED% permite a comparação mais fidedigna entre dois produtos (SKOUG *et al.*, 1997; OFOEFULE *et al.*, 2001).

De modo geral, acredita-se que os métodos estatísticos baseados na ANOVA, apesar de terem aplicação mais complexa, fornecem os melhores resultados (YUKSEL, 2000).

3.4.2 Meios de dissolução biorrelevantes

A busca por meios de dissolução mais adequados não é recente. Esta preocupação surgiu pelo fato de que muitos fármacos mostram baixa solubilidade em água, bem como em tampões e em meios compendiais propostos nas farmacopeias para execução de testes de dissolução (GALIA *et al.*, 1998).

No ano de 1998, Galia e colaboradores propuseram alguns meios de dissolução biorrelevantes para o trato gastrointestinal proximal humano que consideravam inúmeros fatores fisiológicos tais como: pH, capacidade tamponante, osmolaridade e concentração de sais biliares e fosfolipídeos (GALIA *et al.*, 1998).

Em 2008, Jantratid e colaboradores completaram o conjunto de meios biorrelevantes para simular o trato gastrointestinal proximal humano, desenvolvendo um meio que simulava o estado alimentado e propondo algumas alterações nos meios em jejum anteriormente descritos (JANTRATID *et al.*, 2008).

Os cães geralmente são utilizados em testes pré-clínicos como ferramenta para que se tenha uma base do comportamento do fármaco no organismo humano. No entanto, inúmeros fatores são diferentes na fisiologia canina e precisam ser adaptados (ARNDT *et al.*, 2013). Um exemplo clássico é a administração de pentagastrina que deve ser feita aos cães antes de qualquer teste pré-clínico. A pentagastrina atua no estômago dos cães fazendo com que o pH do mesmo diminua e assim melhor se assemelhe fisiologicamente ao dos humanos.

Levando em consideração a distinção do organismo animal e humano, a criação de um meio de dissolução que leve em conta tais diferenças para avaliar o comportamento de medicamentos em animais seria uma ferramenta sofisticada que uma vez validada, pouparia recursos em estudos *in vivo*.

3.6 Correlação *in vivo* – *in vitro*

Segundo o FDA, a correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV) é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma propriedade *in vitro* de uma formulação e uma resposta relevante *in vivo*.

A CIVIV, comumente, é estabelecida para formulações de liberação modificada e para fármacos cuja solubilidade é fator limitante para a absorção (Classe II – SCB). Desse modo, as correlações estabelecidas são lineares e definidas como de nível A, B ou C. Esses três níveis de correlação podem ser definidos e classificados em ordem decrescente de importância. O conceito de correlação é baseado na habilidade desta em refletir o perfil completo de concentração plasmática versus tempo, obtido após a administração da forma farmacêutica (ANVISA, 2002).

A correlação de nível A representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica, e a velocidade de entrada do mesmo no organismo *in vivo*. Neste nível de correlação, as curvas de dissolução *in vitro* e *in vivo* são diretamente sobreponíveis, ou podem ser sobrepostas utilizando-se uma constante (fator de escala). A descrição matemática de ambas é a mesma. Esta relação é mais facilmente obtida para formas farmacêuticas de liberação modificada, que possuem liberação *in vitro* essencialmente independente do meio de dissolução comumente utilizado nos testes (ANVISA, 2002).

Diferentemente dos outros níveis, uma correlação ponto a ponto é desenvolvida, utilizando cada concentração plasmática e cada porcentual de dissolução obtido *in vitro*, refletindo inteiramente, deste modo, a curva de níveis plasmáticos. Como resultado, o perfil de dissolução *in vitro* pode servir como um substituto do desempenho do fármaco *in vivo* (ANVISA, 2002).

A correlação de nível B utiliza os princípios da análise de momento estatístico. A média do tempo de dissolução *in vitro* é comparada ao tempo de residência médio ou ao tempo de dissolução médio *in vivo* (ANVISA, 2002).

Da mesma forma que o nível A, o nível B utiliza todos os dados *in vitro* e *in vivo*, mas não é considerada uma correlação ponto a ponto, porque não reflete inteiramente a curva de nível plasmático, uma vez que uma série de diferentes curvas *in vivo* podem produzir valores similares de tempo de residência médio (ANVISA, 2002).

A correlação de nível C relaciona um ponto de dissolução (ex: t50%, t90%, etc.) a um parâmetro farmacocinético tal como ASC, C_{max} ou T_{max}. Representa uma correlação de um único ponto. Não reflete o formato completo da curva de concentração plasmática versus tempo, sendo assim, este tipo de correlação não permite prever o real desempenho do produto *in vivo*, sendo útil somente como orientação no desenvolvimento de formulações ou como um método de controle de qualidade da rotina de produção do medicamento (ANVISA, 2002).

Estudos de correlação *in vivo* – *in vitro* são inexistentes para medicamentos de uso veterinário, entretanto dois trabalhos recentes realizados por Rossi e colaboradores (2011) e Paim e colaboradores (2014) fazem uso de tal ferramenta utilizando dados *in vivo* dos fármacos fosamprenavir e mesilato de gemifloxacino, respectivamente, disponíveis na literatura para a sugestão de correlação com os dados *in vitro*.

3.8 Métodos analíticos para controle de qualidade de enrofloxacino.

O grande interesse na classe das fluorquinolonas levou ao desenvolvimento de vários métodos analíticos que determinam enrofloxacino em diferentes matrizes (fluidos biológicos e alimentos de origem animal). Dentre os métodos instrumentais revelantes descritos para tais determinações encontram-se a espectrofluorimetria e CLAE com diferentes modos de detecção.

Cinquina e colaboradores (2003) desenvolveram metodologia por CLAE para quantificação de enrofloxacino em leite de vaca.

Horie e colaboradores (1994), Sunderland e colaboradores (2004) e Bimazubute e colaboradores (2008) desenvolveram metodologias de análise semelhantes por CLAE para quantificação de enrofloxacino em tecido animal, fezes de porco e secreção e plasma de porco respectivamente, com diferentes formas de extração.

Uslu e colaboradores (2008) realizaram um estudo afim de determinar enrofloxacino e ciprofloxacino em matrizes de solo. A análise foi realizada por CLAE com detecção por fluorescência.

Herranz e colaboradores (2007) desenvolveram um método analítico para determinar enrofloxacino, ciprofloxacino e sarafloxacino em ovos, aplicando extração por líquido pressurizado e CLAE com detecção por fluorescência.

Outro método que utiliza CLAE com detecção por fluorescência com DAD foi desenvolvido por Moreno-Bondi e colaboradores (2004) para determinação de resíduos de ciprofloxacino, enrofloxacino, marbofloxacino, donofloxacino e sarafloxacino em amostra de leite usando a norfloxacino como padrão interno.

Em relação a análise de enrofloxacino contido em formas farmacêuticas, são escassos os estudos existentes.

Ascal e colaboradores (2007) avaliaram o uso de N-bromosuccinimida como um reagente analítico para determinação espectrofotométrica de 11 fluorquinolonas, incluindo o enrofloxacino (solução oral). Mostafa e colaboradores (2002) desenvolveram um método analítico semelhante para determinação de enrofloxacino, ciprofloxacino e pefloxacina em solução oral baseado na reação com três diferentes reagentes receptores.

Souza e colaboradores (2002) desenvolveram um método de análise por CLAE de enrofloxacino na forma farmacêutica de pó para solução injetável.

Para comprimidos palatáveis, o único estudo desenvolvido em relação a quantificação foi publicado recentemente por Chakravarthy e colaboradores (2015).

Além da escassez de estudos, não há metodologias descritas para nenhuma forma farmacêutica de enrofloxacino em compêndios oficiais, apenas para a matéria prima, que está na Farmacopeia Europeia de 2010, USP 32 e Farmacopéia britânica.

4. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ENRO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS POR UV

4.1 Introdução

A espectrometria de absorção no visível ultravioleta é um método analítico comumente utilizado para determinações em diversas áreas, incluindo a identificação de substâncias ativas em medicamentos. O espectro eletromagnético que este método abrange vai de 160 a 780 nm. A espectroscopia de absorção molecular baseia-se na medida da transmitância (T) ou da absorbância (A) de uma solução que se encontra em uma célula transparente com caminho óptico de (b) cm. Normalmente a concentração (c) de um analito absorvente está relacionada linearmente com a absorbância, como expresso na equação representada matematicamente pela Lei de Lambert-Beer (HOLLER et al., 2009).

$$A = - \log T = \epsilon bc \qquad \text{Eq. (1)}$$

Por ter extensa aplicabilidade, alta sensibilidade, moderada seletividade, boa exatidão e principalmente pela facilidade de uso, os métodos espectrofotométricos são ferramentas úteis disponíveis para análises quantitativas, incluindo as empregadas nos testes de dissolução de rotina para quantificação de fármacos em solução (MARCOLONGO, 2003; HOLLER et al., 2009).

Não são encontradas na literatura métodos para quantificação de enrofloxacino, por esse motivo e pela facilidade de uso, este capítulo descreve o desenvolvimento de um método simples, rápido, de baixo custo para a quantificação de enrofloxacino em comprimidos palatáveis e além disso o método é uma alternativa para a quantificação do teor do fármaco dissolvido nos testes de dissolução.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

4.2.1.1 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Shimadzu®, modelo AY220;
- Espectrofotômetro UV-Vis Perkin Elmer®, modelo Lambda 35;
- Banho Ultra-Sônico Unique®, modelo USC 2850;
- Potenciômetro HANNA®, modelo 2220;

4.2.1.2 Reagentes

- Água destilada;
- Acetato de sódio triidratado p.a - Synth;
- Ácido clorídrico p.a - Vetec;
- Álcool etílico p.a - Qhemis;
- Cloreto de sódio p.a - Vetec;
- Fosfato de potássio monobásico anidro p.a - Nuclear;
- Hidróxido de sódio p. a - Vetec;
- Excipientes: Amido, Lactose, Celulose Microcristalina, Estearato de Magnésio, Povidona, Aerosil®, Palatabilizante sabor Carne (Pharma Nostra LTDA).

4.2.1.3 Matéria-prima e produtos farmacêuticos

-A matéria-prima com teor declarado de 99,98%, de fabricação 27/12/2011 e validade 26/12/2015 foi adquirida na empresa VetPharma (Porto Alegre – RS) e analisada de acordo com a monografia da USP 32. Testes complementares como espectrometria no ultravioleta, espectrometria no infravermelho médio e espectrometria de massas foram utilizados para identificação da amostra (dados não mostrados). Após estas análises, a matéria-prima foi utilizada como substância química de referência (SQR).

-Medicamento referência (FDA): Baytril Flavour ® 50 mg comprimidos palatáveis, fabricado pela Bayer Farmacêutica. Fabricação: 11/2012; Validade: 10/2015. Lote: 003/14 Excipientes: Amido, Lactose, Celulose Microcristalina, Estearato de Magnésio, Povidona, Aerosil®, Flavour Carne.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Desenvolvimento de método para a quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por UV

Para a identificação do pico de máxima absorção foram realizadas varreduras espectrais nas faixas de absorção entre 200 a 400, de solução de ENRO $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando os solventes descritos na tabela 2.

Tabela 2. Solventes utilizados no desenvolvimento do método analítico para doseamento de ENRO comprimidos palatáveis por UV.

Solvente	Composição em 100 mL (v:v)
HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	100
HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: etanol	90:10
HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: etanol	80:20
HCl $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	100
Água destilada	100
Tampão fosfato pH 5,8*: etanol	95:5
Tampão fosfato pH 6,6*: etanol	95:5
Tampão fosfato pH 7,4*: etanol	95:5

*Preparado conforme USP 32.

-Preparo da solução padrão

Uma solução padrão contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada solubilizando-se 10 mg de ENRO em um balão volumétrico (BV) de 100 ml com 5 ml de etanol 95%. Após breve agitação, a solução foi submetida a 15 minutos de sonicação e o volume completado com tampão fosfato pH 7,4. Uma alíquota de 500 μL foi retirada e adicionada em um BV de 10 mL e o volume completado com o mesmo solvente (tampão fosfato pH 7,4: etanol 95:5, v:v).

-Preparo da amostra

Após determinação do peso médio, os comprimidos de ENRO foram triturados em gral até formação de um pó fino. Uma amostra deste material foi adicionada em um balão volumétrico de 100 ml, juntamente com o solvente de escolha e posteriormente submetida a banho ultrassônico (Unique modelo USC-5000) por 15 minutos. A amostra foi filtrada e uma alíquota foi retirada para obtenção da concentração de trabalho ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.2.2.2 Validação do método de quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por UV

Para validação do método para quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis, foram consideradas as diretrizes do VICH, desta forma foram determinados os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão. Além destes fatores, foi ainda avaliada a robustez do método (VICH, 1998).

4.2.2.2.1 Especificidade

Para o ensaio de especificidade foi utilizada uma amostra simulada de excipientes conforme descrito na Tabela 3. As concentrações dos excipientes foram estimadas a partir do peso médio e de acordo com o usual para comprimidos de liberação imediata acrescida de excipiente palatilizante (sabor carne), conforme Tabela 3. O método foi considerado específico para interferência da amostra simulada não superior a 2% em relação à absorvância do fármaco em 273 nm (KIBBE, 2002).

Tabela 3. Excipientes utilizados na amostra simulada de excipientes.

Excipientes	Concentração (%)
Amido	18%
Celulose Microcristalina	20%
Estearato de Magnésio	1%
Lactose	50%
Povidona	5%
Aerosil [®]	5%
Palatilizante Carne	1%

4.2.2.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi estabelecida pela construção de uma curva de calibração nas concentrações de 0,5 - 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada concentração foi preparada em triplicata, com posterior leitura das soluções em 273 nm. A linearidade foi avaliada através da determinação do coeficiente de correlação linear (r). Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) com o objetivo de avaliar desvios de linearidade (BRASIL, 2003a).

4.2.2.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Para cálculo da repetibilidade foi considerado o desvio padrão relativo (DPR) da quantificação de seis amostras de ENRO ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em um único ensaio. Para o cálculo da precisão intermediária foi considerado o DPR da comparação entre seis amostras de ENRO ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) medidas por um analista diferente em dia diferente. Os resultados foram considerados precisos para DPR não superiores a 2% (BRASIL, 2003a).

4.2.2.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio do teste de recuperação, que consiste em adicionar quantidades conhecidas do fármaco (obtida a partir de uma solução padrão) na amostra simulada de excipientes ou em amostra proveniente de uma tomada de ensaio a partir da forma farmacêutica e, após a quantificação, calcular o percentual de recuperação. As amostras foram

preparadas em triplicata, por adição do fármaco nas concentrações de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em uma solução proveniente da forma farmacêutica contendo 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de recuperação (expressos em porcentagem) foram determinados a partir das respostas analíticas obtidas em função da quantidade teórica de padrão adicionado. A metodologia foi considerada exata para resultados do teste de recuperação obtidos na faixa de 90 – 107% (MAPA/ACS, 2011).

4.2.2.2.5 Robustez

A robustez foi avaliada a partir da verificação da influencia da mudança do equipamento sobre a resposta analítica. A metodologia foi considerada robusta para diferença de valores estatisticamente não significativos ($p < 0,05$), considerando ensaios em dois espectrofotômetros (marcas Perkin Elmer[®] e Shimadzu[®]) para uma solução de enrofloxacino 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Brasil, 2003a).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.2 Validação do método de quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por UV

Como descrito anteriormente o ENRO é um fármaco anfotérico sendo considerado de alta lipofilia (LIZONDO *et al.*, 1997). Devido a esta característica, possui uma maior dificuldade de dissolução em solventes aquosos quando comparado ao seu principal metabólito, o ciprofloxacino. Esta característica de solubilidade é um importante aspecto a ser avaliado na escolha do solvente para determinações por espectrofotometria, já que o soluto deve estar

solubilizado em uma ampla faixa de concentração. Além disso, na espectrofotometria por UV, o pH da solução em análise é um dos fatores que pode mudar a intensidade e posição da banda de absorção, tornando os resultados muito variáveis. Portanto os sistemas tamponados são os mais indicados e confiáveis para a análise por esta técnica.

Segundo SEEDHER & AGARVAL (2009), a solubilidade do ENRO pode ser aumentada em meio tampão fosfato (pH 7,4). Desta forma foram testados solventes de alta à média polaridade e em diferentes faixas de pH (Tabela 2). Os meios tamponados com pH na faixa de 5 -7 se mostraram mais adequados para a validação do método. Analisando os espectros, escolheu-se o meio tampão fosfato pH 7,4:etanol (95:5,v:v), pois o mesmo apresentou resultados reprodutíveis.

4.3.2.1 Especificidade

O método foi considerado específico para a avaliação frente à amostra simulada de excipientes, já que não foi observada absorção maior do que 2% em relação à solução de ENRO ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) no comprimento de onda de 273 nm, conforme observado na Figura 8.

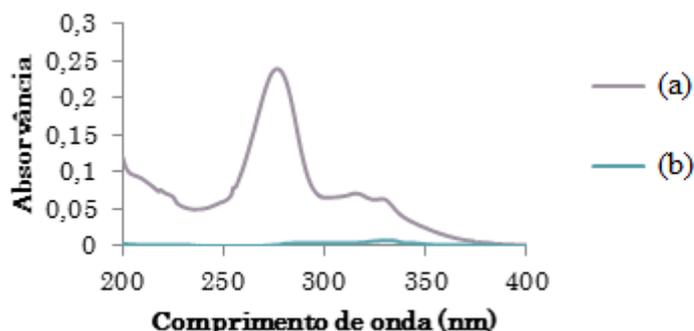


Figura 8. Espectro do ENRO $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a) e Amostra simulada de excipientes (b).

4.3.2.2 Linearidade

A faixa de concentração de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação (r) de 0,9995, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Dados referentes a linearidade do método por UV.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,5 – 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Coeficiente angular (a)	0,1115
Coeficiente linear (b)	0,0026
Coeficiente de correlação (r)	0,9995

A análise de variância (ANOVA) indicou que os dados apresentaram regressão linear significativa ($p < 0,05$), sem desvio de linearidade (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância da curva de calibração de ENRO comprimidos palatáveis.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F(calc)	p(5%)
Entre concentrações	4	0,4	0,1	898,06	3,48
Regressão Linear	1	0,3723	0,3723	3582	4,96
Desvio da Linearidade	3	0,0011	0,0004	3,406	3,71
Dentro (resíduo)	10	0,0010	0,00010		
Total	14	0,4			

4.3.2.3 Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas pela análise de seis soluções da amostra de ENRO comprimidos palatáveis no mesmo dia e em dia diferente, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 6 e demonstram que o método foi preciso, com valores de DPR máximo de 1,71%.

Tabela 6. Resultado do ensaio de repetibilidade e precisão intermediária do ENRO em comprimidos palatáveis por UV.

Amostras	Dia 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão Intermediária
1	5,13	4,99	
2	4,90	4,98	
3	5,02	4,89	
4	5,08	5,00	
5	5,08	4,99	
6	5,13	4,96	
Média \pm DP	5,05 \pm 0,08	4,96 \pm 0,04	5,00 \pm 0,06
DPR%	1,71	0,82	1,27

Os resultados obtidos são considerados adequados de acordo com a USP (USP 32, 2009) que preconiza desvios inferiores a 2% para estes ensaios.

4.3.2.4 Exatidão

O método demonstrou ser exato, com recuperação média de 100,6% da substância ativa, conforme Tabela 7. Este resultado encontra-se dentro do preconizado pelo MAPA (90 – 107% (MAPA/ACS, 2011)).

Tabela 7. Resultados do teste de exatidão obtido para o doseamento de ENRO em comprimidos palatáveis por UV.

ENRO (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade adicionada*	Quantidade Recuperada	Recuperação (%)
Solução 1	1,00	1,02	101
Solução 2	2,00	1,92	98,0
Solução 3	3,00	3,09	101,8
Solução 4	4,00	4,12	102,0
			Média \pm DPR%: 100,6 \pm 1,84

* em $\mu\text{g mL}^{-1}$

4.3.2.5 Robustez

O método foi considerado robusto para avaliação da resposta analítica a partir da determinação da concentração das soluções utilizando dois equipamentos diferentes. O DPR% não apresentou valores acima de 2%, conforme mostra a tabela 8. Além disso um teste t foi aplicado demonstrando não haver diferença significativa entre os resultados obtidos ($p > 0,05\%$), o que caracteriza a precisão dos dados, independente do equipamento escolhido.

Tabela 8. Resultados obtidos para avaliação da robustez do doseamento de ENRO em comprimidos palatáveis por UV.

Solução	Equipamento 1	Equipamento 2
1	5,13	5,02
2	4,95	5,01
3	5,03	4,98
4	5,01	5,05
5	4,98	5,03
6	5,07	4,99
Média ± DP	5,03±0,06	5,01±0,02
DPR%	1,19	0,45

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à facilidade das análises bem como rapidez e custo relativamente baixo da espectrofotometria UV este método se mostra uma alternativa viável para quantificação de ENRO em comprimidos. No método proposto não foram verificadas influências devido aos excipientes comumente encontrados em formulações sólidas, demonstrando que o mesmo é específico frente a este fator. A linearidade do método foi satisfatória, assim como os demais parâmetros de validação estudados (precisão, exatidão e robustez). Desta forma, a metodologia proposta pode ser utilizada na rotina de controle de qualidade, sendo útil na determinação do teor e avaliação do perfil de liberação de ENRO em comprimidos de uso veterinário. Além disso, este estudo pode contribuir para a criação de monografias de insumos e produtos acabados de uso veterinário e a sua inclusão em farmacopéias exclusivamente dedicadas a estes tipos de medicamentos.

5. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ENRO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS POR CLAE

5.INTRODUÇÃO

A cromatografia a líquido de alta eficiência é um método de análise que domina as técnicas analíticas atualmente em uma gama de determinações, incluindo principalmente os medicamentos. As Farmacopeias Americana e Britânica (BP, 2011; USP, 2009) dedicam a esta técnica a análise da maior parte de fármacos em produtos com monografias nestes compêndios. Atualmente, tem-se como prioridade a análise de produtos farmacêuticos por CLAE, em razão da especificidade e seletividade relacionadas à utilização desta técnica. Uma das limitações da utilização de CLAE é o custo da análise, comparado a métodos espectroscópicos e a utilização de solventes orgânicos de alta pureza admitidos para uso e padrões de referências. No entanto, por ser uma técnica altamente específica, muitas vezes torna-se a técnica de escolha.

Existem atualmente vários métodos de análise para enrofloxacino por CLAE, no entanto a maioria trata de ensaios para determinação de enrofloxacino e seu metabólito primário em fluidos biológicos, fezes e tecidos de animais (HORIE et al., 1994; CINQUINA et al., 2003; SUNDERLAND et al., 2004; BIMAZUBUTE et al., 2008) ou determinação de enrofloxacino na forma farmacêutica de solução oral ou solução injetável (SOUZA et al., 2002; ULU et al., 2009). No entanto são raras as publicações que tratam da quantificação de enrofloxacino por método indicativo de estabilidade para formas farmacêuticas em comprimidos (CHAKRAVARTHY et al., 2015)

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

5.2.1.1 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Shimadzu[®], modelo AY220;
- Coluna Cromatográfica Nucleodur[®] 100-5 C18 4,0 x 150 mm;
- Cromatógrafo líquido Prominence Shimadzu[®], equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, detector PDA SPD-20AT, forno de coluna CTO-20A e *software* LC Solution V. 1.24 SP1;
- Cromatógrafo líquido Prominence Shimadzu UFLC[®], equipado com bomba LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC HT, detector DAD SPD-M20A, forno de coluna CTO-20AC e *software* LC Solution V. 1.24 SP1;
- Banho Ultra-Sônica Unique[®], modelo USC 2850;
- Potenciômetro HANNA[®], modelo 2220;
- Sistema Milli-Q Millipore[®] de purificação de água;

5.2.1.2 Reagentes

- Água ultrapura;
- Acetonitrila grau HPLC - Merck[®];
- Ácido ortofosfórico 85% - Merck[®];
- Álcool etílico p.a - Qhemis[®];
- Fosfato de potássio monobásico anidro p.a - Nuclear[®];
- Trietilamina – Vetec[®]

-Excipientes: Amido, Lactose, Celulose Microcristalina, Estearato de Magnésio, Povidona, Aerosil[®], Palatabilizante Sabor Carne Carne (Pharma Nostra[®] LTDA).

5.2.1.2 Matéria-prima e produtos farmacêuticos

Conforme informado no item 4.2.1.3

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Desenvolvimento de método para a quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por CLAE

Na etapa do desenvolvimento do método por CLAE para a quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis foram testadas as condições cromatográficas descritas na Tabela 9. Essas condições foram baseadas no método desenvolvido por Souza et al. (2002) que analisa o fármaco em solução injetável.

Para a análise utilizou-se CLAE equipado com detector por arranjos de diodos (DAD) contendo desgaseificador e injetor automático. A aquisição dos dados foi realizada através do *software* LC Solution. As fases móveis foram filtradas, sob vácuo, em membrana de *nylon* de diâmetro do poro de 0,45 µm e desgaseificadas em banho de ultrassom por 30 minutos. As análises foram realizadas em temperatura ambiente. Para todas as condições testadas o comprimento de onda mais adequado foi determinado a partir da realização de varredura nos comprimentos de ondas de 200 a 400 nm. Os parâmetros cromatográficos para o ENRO como

tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos e fator de capacidade foram avaliados e levados em consideração para a escolha do método analítico mais adequado.

Tabela 9. Condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento de método por CLAE para a quantificação de ENRO comprimidos palatáveis.

	Composição (Tampão Fosfato 0,04 mol. L ⁻¹ : ACN)	pH
1	60:40	2,7
2	60:40	2,7
3	60:40	4,2
4	70:30	2,7
5	80:20	2,7
6	75:25	2,7
7	75:25	4,2

Para todas as condições testadas foi utilizada coluna Nucleodur[®] (C18 5 μ m 4,0 x 150 mm), vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 μ L e comprimento de onda de 278 nm. Para as condições 2 - 7 foi adicionado à fase móvel trietilamina (0,3% v/v). Nas condições 6 e 7 foi utilizada ACN (75:25 v/v) (diferente das demais condições no qual foi utilizada ACN p.a.).

5.2.2.2 Validação do método de quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por CLAE

Na validação de métodos analíticos para produtos veterinários devem-se cumprir os parâmetros estabelecidos para especificidade, linearidade, precisão e exatidão (VICH, 1998). Considerando estas diretrizes, os parâmetros acima citados foram avaliados juntamente com o ensaio de robustez.

- Preparo da solução contendo SQR de ENRO

Pesou-se cerca de 25,0 mg de ENRO SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se cerca de 5 mL de etanol e completou-se o volume com tampão fosfato 0,04 mol . L⁻¹ (com pH ajustado em 3,0 com ácido ortofosfórico 85%). Essa solução foi levada ao banho de ultrassom por 15 minutos, uma alíquota de 400 µL foi retirada e adicionada a um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com tampão fosfato, obtendo-se uma solução de 40 µg mL⁻¹ de ENRO. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 µm antes das injeções.

- Preparo da solução contendo ENRO comprimidos palatáveis

Após a verificação do peso médio dos comprimidos, procedeu-se a pulverização de 20 unidades do lote adquirido para este estudo. Pesou-se 60,6 mg (o equivalente a 25 mg da substância ativa em relação ao peso médio) e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com etanol e o mesmo foi submetido a banho ultrassônico por

15 minutos. Após, com a finalidade de separar os constituintes da amostra simulada de excipientes não solubilizados e facilitar a filtração, a solução foi transferida para tubo de ensaio e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Foram pipetados 400 µL e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com tampão fosfato obtendo-se uma solução de 40 µg mL⁻¹ de ENRO, sendo que a mesma foi filtrada antes das injeções.

5.2.2.2.1 Especificidade

A capacidade de um método em detectar um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, é definida como especificidade (BRASIL, 2003 a).

A especificidade foi determinada através da avaliação da possível interferência dos excipientes e de potenciais produtos de degradação na detecção e quantificação do ENRO.

- Preparo da amostra simulada de excipientes

Para o seu preparo, foram utilizados os excipientes descritos na bula do medicamento referência. As concentrações utilizadas foram com base na especificação máxima de cada excipiente, obtida na literatura e estimadas a partir do peso médio dos comprimidos (KIBBE *et al.*, 2002). Os excipientes utilizados foram: Amido, Lactose, Celulose Microcristalina, Estearato de Magnésio, Povidona, Aerosil[®] e palatabilizante sabor carne.

- Preparo da solução contendo amostra simulada de excipiente

Pesou-se cerca de 35 mg da amostra simulada de excipientes (referentes ao contido nos comprimidos em relação ao peso médio) e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com etanol e submetido a banho ultrassônico por 15 minutos. Após, a solução foi transferida para tubo de ensaio e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Foram pipetados 400 μL e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com tampão fosfato. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 μm antes das injeções.

Para a avaliação da interferência de potenciais produtos de degradação soluções de ENRO foram submetidas a condições de hidrólise ácida e básica, oxidação, degradação térmica e fotólise, com o intuito de formar produtos de degradação e avaliar prováveis interferências na determinação e quantificação por CLAE. O preparo das soluções está descrito a seguir:

- Solução estoque de ENRO

Foram pesados 25 mg de ENRO SQR em balão volumétrico de 25 mL e adicionados 5 mL de etanol. Esta solução foi levada ao banho ultrassônico por 15 minutos e o volume foi completado com tampão fosfato 0,04 mol.L⁻¹ (1 mg mL⁻¹).

- Hidrólise ácida

Pipetou-se 4,0 mL da solução estoque de ENRO para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com HCl 2 mol.L⁻¹. Esta solução foi levada ao refluxo a 80° C, por 4 horas (400 µg mL⁻¹). Após este período, pipetou-se 1,0 mL para balão volumétrico de 10,0 mL e neutralizou-se a solução com 1,0 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹, completando-se o volume com tampão fosfato, obtendo-se uma solução de concentração de 40 µg mL⁻¹. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 µm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em duplicata.

- Hidrólise básica

Pipetou-se 4,0 mL da solução estoque de ENRO para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com NaOH 2 mol.L⁻¹. Esta solução foi levada ao refluxo a 80°C, por 4 horas. Após este período, pipetou-se 1,0 mL para balão de 10 mL, neutralizou-se com 1,0 mL de HCl 2 mol.L⁻¹ e completou-se o volume com tampão fosfato, obtendo-se uma solução de concentração de 40 µg mL⁻¹ de ENRO. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de 0,45 µm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em duplicata.

- Oxidação com peróxido de hidrogênio

Pipetou-se 4,0 mL da solução estoque de ENRO em balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio 30%. Esta solução foi deixada em repouso por 24 horas ao abrigo da luz. Após este período, pipetou-se 1,0 mL em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com tampão fosfato obtendo-se uma solução de concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ENRO. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de $0,45 \mu\text{m}$ antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em duplicata.

- Degradação térmica

Pipetou-se 4,0 mL da solução estoque de ENRO em balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com fase móvel. Esta solução foi mantida em repouso por 48 horas, em estufa pré-aquecida a 80°C . Após este período, pipetou-se 1,0 mL em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com tampão fosfato, obtendo-se uma solução de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ENRO. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de $0,45 \mu\text{m}$ antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero.

- Fotólise

Pipetou-se 4,0 mL da solução estoque de ENRO para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com fase móvel. A solução foi transferida para cubeta de quartzo e

mantida em câmara horizontal de vidro espelhada internamente (80 x 25 x 35cm) com lâmpada TUV 30W/G30 T8, 254 nm, Starlux®, por 4 horas. Após este período, alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com tampão fosfato, obtendo-se uma solução de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ENRO. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de *nylon* de $0,45 \mu\text{m}$ antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero, sob as mesmas condições e protegidas da luz. As soluções foram preparadas em duplicata.

5.2.2.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada por meio do preparo de curva padrão de calibração com cinco níveis de concentração, em triplicata. Para o preparo da curva, pesou-se o equivalente a 25,0 mg de ENRO SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 5 mL de etanol e levou-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Completou-se o volume com tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, obtendo-se solução de concentração de 1 mg mL^{-1} . Transferiu-se para balão de 10 mL alíquotas de 200, 300, 400, 600 e 800 μL . Os volumes foram completados com tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, obtendo-se soluções com concentrações de 20,0; 30,0; 40,0; 60,0 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As soluções foram filtradas em filtro de membrana de *nylon* de $0,45 \mu\text{m}$ antes das injeções.

A curva de calibração padrão foi obtida relacionando-se os valores da área do pico em função da concentração de ENRO SQR nas soluções correspondentes. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, por meio da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95% ($p < 0,05$) com auxílio do *software* Microsoft® Excel 2010.

5.2.2.2.3 Precisão

Avaliou-se a repetibilidade e a precisão intermediária do método por meio do preparo de seis soluções da amostra do medicamento referência de ENRO comprimidos palatáveis na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, em três dias consecutivos. O desvio padrão relativo (DPR) dos resultados foi calculado e o método foi considerado preciso para valores dos DPR inferiores a 2,0% (USP 36, 2013).

5.2.2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, o qual relaciona a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003). As amostras foram preparadas em triplicata por adição de ENRO nas concentrações de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ em uma solução proveniente da forma farmacêutica contendo $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de recuperação (expressos em porcentagem) foram determinados a partir das respostas analíticas obtidas em função da quantidade teórica de padrão adicionado. A metodologia foi considerada exata para resultados obtidos na faixa de 90-107% (MAPA/ACS 2011).

5.2.2.2.5 Robustez

A robustez foi avaliada a partir da verificação da influencia da mudança do equipamento sobre a resposta analítica. A metodologia foi considerada robusta para $\text{DPR}\% < 2$, considerando ensaios em cromatografos de modelos diferentes para seis soluções de enrofloxacino $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Brasil, 2003a).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Desenvolvimento de método para a quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por CLAE

Com a finalidade de desenvolver um método analítico adequado para a quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis, diferentes condições foram testadas. A condição foi selecionada de acordo com o desempenho do método, através dos valores obtidos para os parâmetros do pico cromatográfico, como tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos, fator de capacidade e resolução (Tabela 10). Na figura 9 encontram-se também os cromatogramas referentes a cada condição testada.

As condições apresentadas na tabela 10 foram testadas na mesma ordem em que estão dispostas. Em um primeiro momento, com o intuito de tentar reproduzir o método validado por Souza e colaboradores (2002) foi utilizada a mesma fase móvel descrita pelos autores, composta basicamente por acetonitrila e tampão fosfato na proporção de 40:60 v/v, com vazão de 1 mL por minuto. No entanto, apesar do método reproduzir o tempo de retenção de cerca de 1 minuto, os demais parâmetros tiveram resultados abaixo do aceitável (como demonstrado na Tabela 10). Dessa forma a **Condição 1** foi descartada.

Tabela 10. Valores experimentais dos parâmetros cromatográficos obtidos com as condições analíticas testadas.

	Fator de Cauda	Tempo de Retenção	Fator Capacidade	Pratos Teóricos	Precisão de Injeção
Valor Recomendado	$\leq 2^*$	-	$>2^*$	$>2000^*$	$< 2^{**}$
Condição 1	1,178	1,0	0,392	228,130	0,91
Condição 2	1,238	1,2	0,749	1142,106	0,95
Condição 3	1,824	1,5	0,402	1177,656	0,72
Condição 4	1,649	1,5	0,435	1669,575	0,87
Condição 5	1,402	2,8	1,681	2098,630	0,92
Condição 6	1,338	6,0	3,258	3076,847	0,79
Condição 7	1,453	6,0	2,082	2725,801	0,74

*Valor recomendado (SHABIR, 2003).

** DPR % (média de 5 injeções) Valor recomendado (USP, 2013).

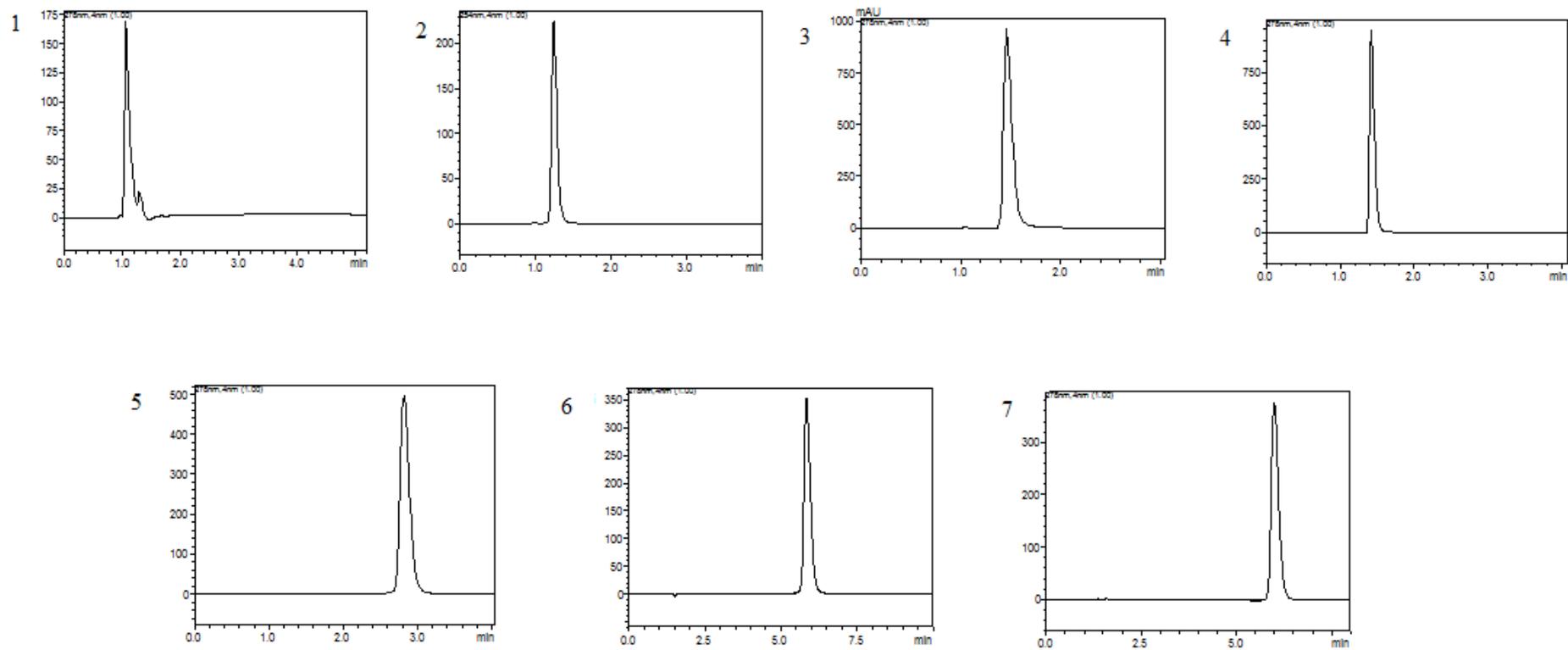


Figura 9. Cromatogramas obtidos com as condições analíticas testadas.

Para as **Condições 2 e 3**, foi testada a adição de 0,3% de trietilamina, com o intuito de evitar a formação de cauda, que é fator característico da interação de fluorquinolonas com a sílica contida na coluna (CHO et al., 2011), e para obter parâmetros melhorados em relação a Condição 1. Ainda na **Condição 3**, foi testado um pH mais elevado. Como o esperado houve uma melhora nos parâmetros avaliados (Tabela 10). Contudo, comparando as condições 2 e 3, foi possível verificar a influência do pH já que a Condição 2 (pH 2,7) apresentou resultados melhores em relação a Condição 3 (pH 4,2). No entanto ambas, resultaram em tempo de retenção rápido (Figura 9).

Com o objetivo de retardar o tempo de retenção e obter melhora nos parâmetros cromatográficos foram elaboradas as **Condições 4 e 5** (contendo 0,3% de trietilamina), variando a proporção da fase móvel. Comparando os resultados de ambas as condições, foi possível verificar a melhora dos parâmetros cromatográficos em relação as anteriores. A Condição 5 além de ter os parâmetros melhores em relação a Condição 4, também apresentou um tempo de retenção maior, cerca de 3 minutos (Figura 9). Ainda que com resultados mais satisfatórios em relação aos anteriores, a Condição 5 não atendeu aos valores recomendados dos parâmetros cromatográficos.

Na sequência foram testadas as condições 6 e 7. Para a **Condição 6** os valores para o fator de cauda, fator de capacidade e pratos teóricos, encontraram-se dentro do recomendado, com precisão de injeção adequada (USP 36, 2013). Além disso a mesma permitiu a identificação do ENRO em aproximadamente 5 minutos (figura 9). Já a Condição 7, apesar de apresentar um tempo de retenção semelhante a Condição 6 (figura 9), não teve resultados adequados em relação aos demais parâmetros, o que reforça a hipótese da influência negativa do pH na fase móvel para análise de enrofloxacino por CLAE (CHO *et al.*, 2011).

Com base nesses resultados a **Condição 6** foi eleita para posterior validação do método.

5.3.2 Validação do método de quantificação de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE

A validação de método analítico tem a finalidade de assegurar a confiabilidade dos resultados gerados a partir do método, fornecendo evidências que este é adequado à finalidade pretendida (BRASIL, 2003a; USP 36, 2013). Com o objetivo de garantir a confiabilidade do

método analítico desenvolvido neste trabalho foram avaliados os parâmetros de validação: Especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

5.3.2.1 Especificidade

A especificidade do método para a quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por CLAE foi avaliada frente aos excipientes presentes na formulação e aos potenciais produtos de degradação do fármaco.

A interferência dos excipientes da formulação na quantificação de ENRO foi avaliada através da análise da solução de ENRO SQR, amostra comercial de ENRO em comprimidos palatáveis e amostra simulada de excipientes. Os cromatogramas das respectivas soluções estão apresentados na Figura 10.

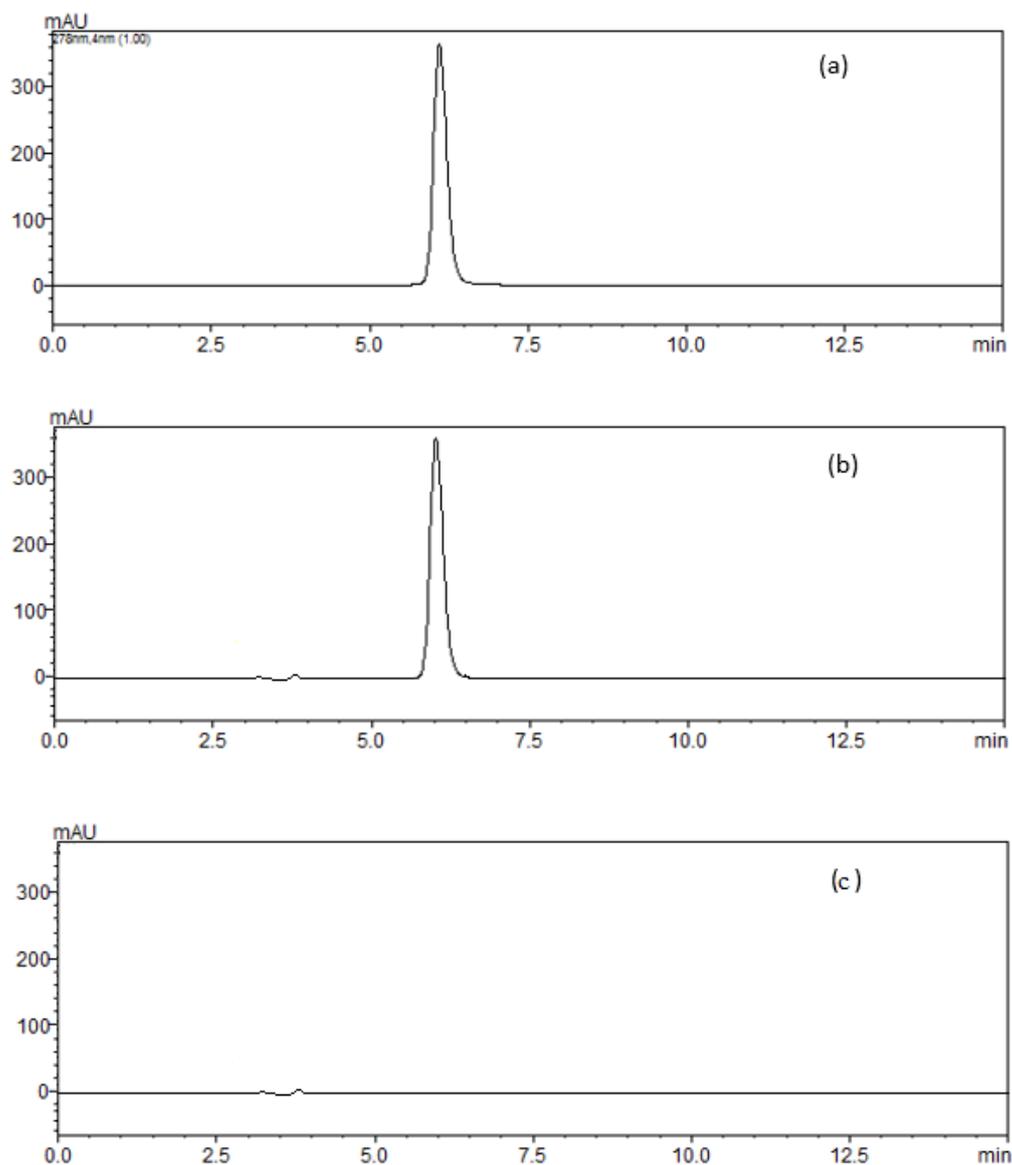


Figura 10. Cromatogramas representativos das soluções (a) ENRO SQR, (b) amostra de ENRO comprimidos palatáveis e (c) amostra simulada de excipientes.

De acordo com o observado nos cromatogramas verifica-se a ausência de picos interferentes referentes aos excipientes, no mesmo tempo de retenção do ENRO.

A especificidade do método por CLAE para a quantificação de ENRO, também, foi avaliada pelo estudo de degradação forçada da SQR. O fármaco foi submetido às seguintes condições de estresse: hidrólise ácida e básica, oxidação, degradação térmica e fotólise. A

degradação teve como finalidade induzir a formação de possíveis produtos de degradação e avaliar a interferência desses sobre a quantificação de ENRO. As condições envolvendo hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação, foram mais drásticas que o usual para degradação forçada pois em condições mais brandas não houve a degradação do fármaco. Os cromatogramas obtidos para cada condição avaliada estão expostos a seguir.

- Hidrólise ácida

A Figura 11 mostra o cromatograma obtido para o ENRO SQR no tempo zero e após ser submetido à hidrólise ácida ($\text{HCl } 2 \text{ mol.L}^{-1}$) em refluxo a 80°C , durante 4 horas. Verificou-se o aparecimento de três potenciais produtos de degradação e uma degradação do fármaco de 24,3%. Os picos formados não interferiram na quantificação do ENRO e a pureza do pico foi de 1,0000.

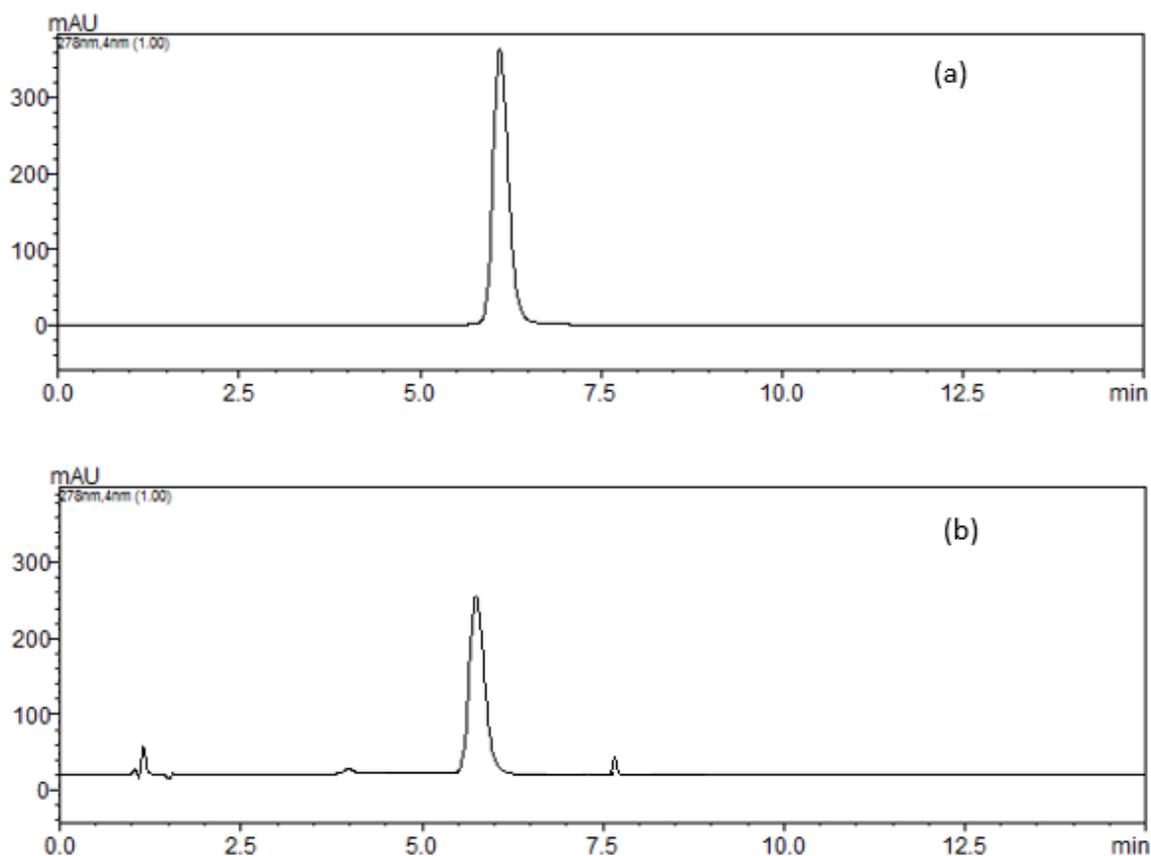


Figura 11. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à hidrólise ácida em $\text{HCl } 2 \text{ mol. L}^{-1}$ em refluxo a 80°C ; (a) Tempo zero e (b) após 4 horas.

- Hidrólise básica

Os cromatogramas do ENRO SQR no tempo zero e após ser submetido por 4 horas à hidrólise básica em $\text{NaOH } 2 \text{ mol.L}^{-1}$ sob refluxo a 80°C , estão apresentados na Figura 12. Os resultados demonstram a formação de produto de degradação e a diminuição do teor do fármaco em 28,5%. Os picos formados não interferiram na quantificação de ENRO e a pureza do pico foi de 1,0000.

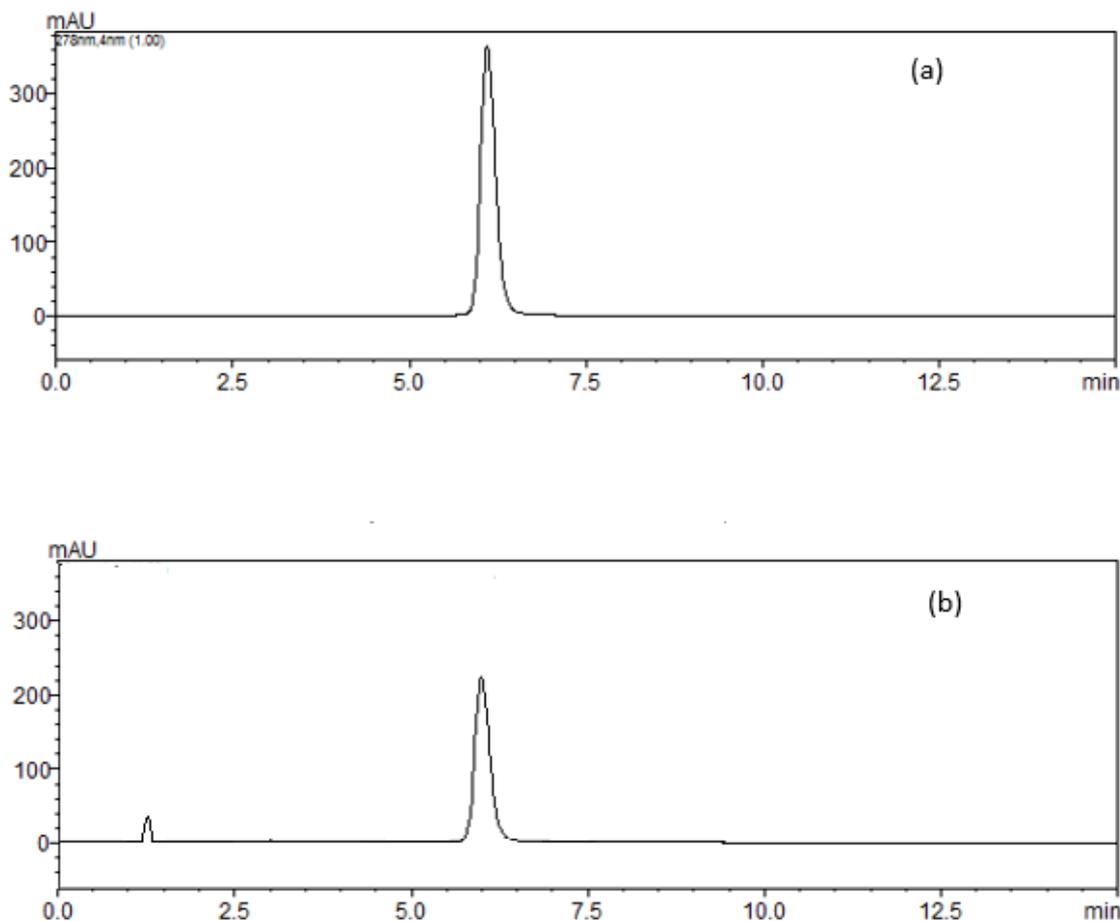


Figura 12. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à hidrólise básica em NaOH 2mol.L⁻¹ em refluxo a 80° C; (a) Tempo zero e (b) após 4 horas.

-Oxidação com peróxido de hidrogênio

A Figura 13 apresenta os cromatogramas obtidos para o ENRO SQR no tempo zero e após ser submetido à oxidação com H₂O₂ 30%, por 24 horas. Observou-se um pico, em aproximadamente 1,0 minuto, presente nos cromatogramas da solução no tempo zero e após 24 horas de degradação, referente ao estabilizante do H₂O₂. Foi observado após as 24 horas de degradação, o aparecimento de um pico adicional, o fármaco demonstrou percentual de degradação de 20,8% e pureza de pico de 0,9999 .

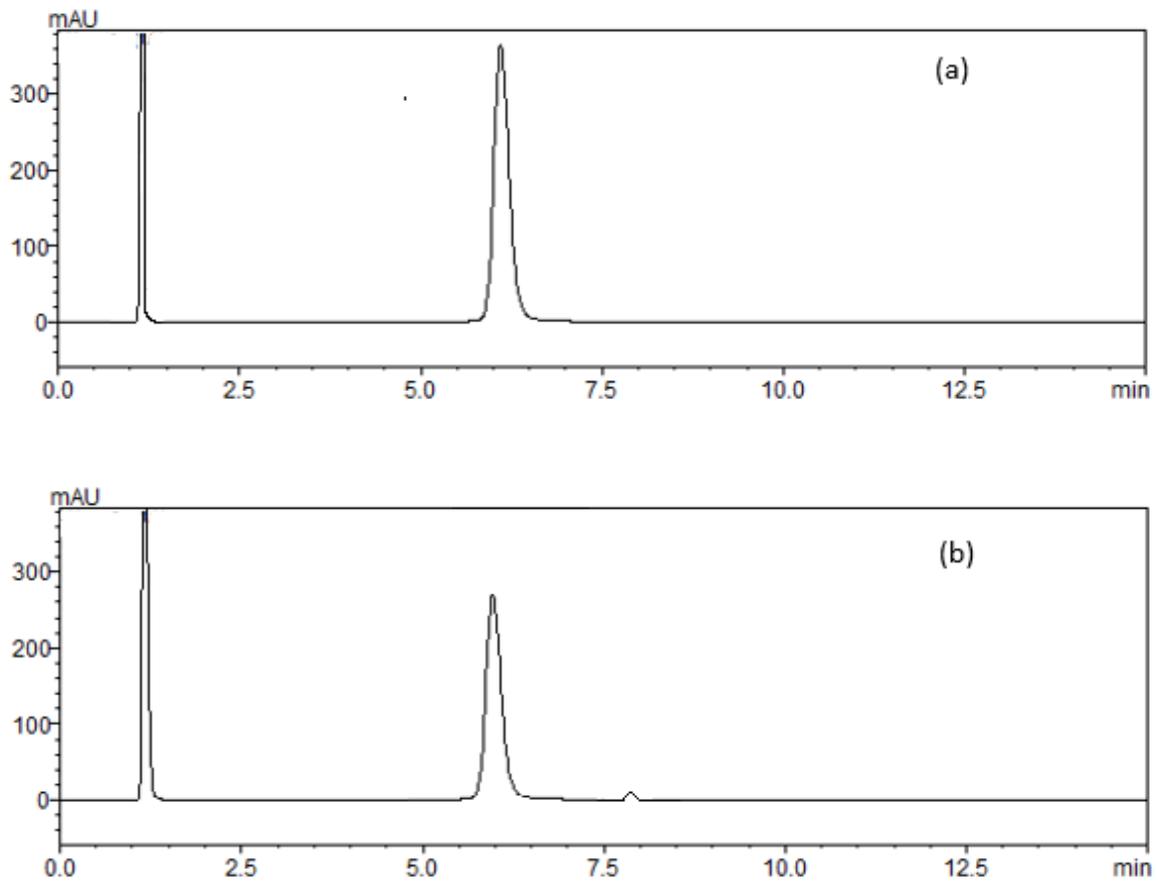


Figura 13. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à oxidação por H₂O₂ 30% por 24 horas (a) Tempo zero e (b) após 24 horas.

-Degradação térmica

A degradação térmica do ENRO SQR a 80° C, por 48 horas, produziu o aparecimento de um pequeno pico em torno de 7,5 minutos, como pode ser observado na Figura 14 (b). O percentual de degradação do fármaco foi de 14,8% e pureza de pico de 1,0000.

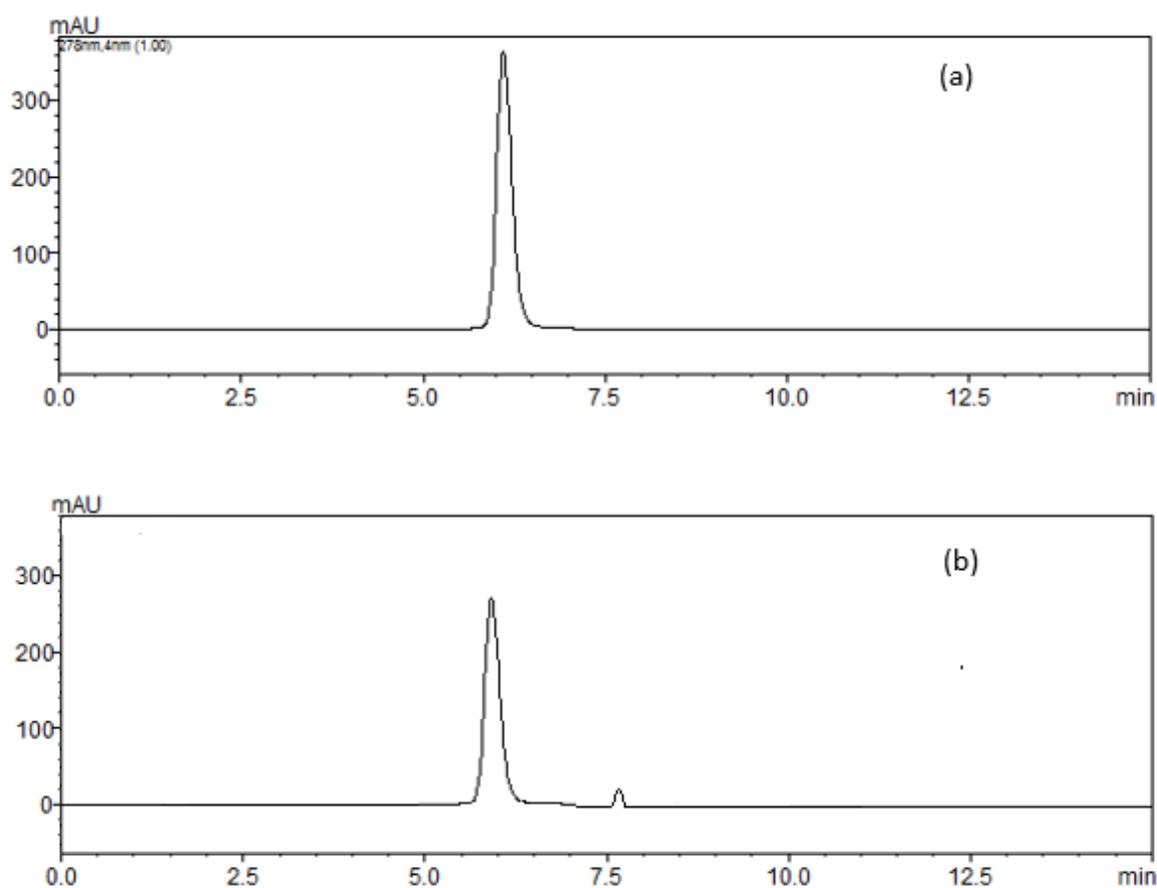


Figura 14. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à degradação térmica por a 80° C por 48 horas(a) Tempo zero e (b) após 24 horas.

-Fotólise

A Figura 15 apresenta os cromatogramas obtidos para o ENRO no tempo zero e após ser submetido à radiação UVC-254 nm, por 4 horas. A incidência de radiação produziu o aparecimento de dois pequenos picos adicionais e diminuição de teor do fármaco em 13,21% com pureza de pico 0,9999 .

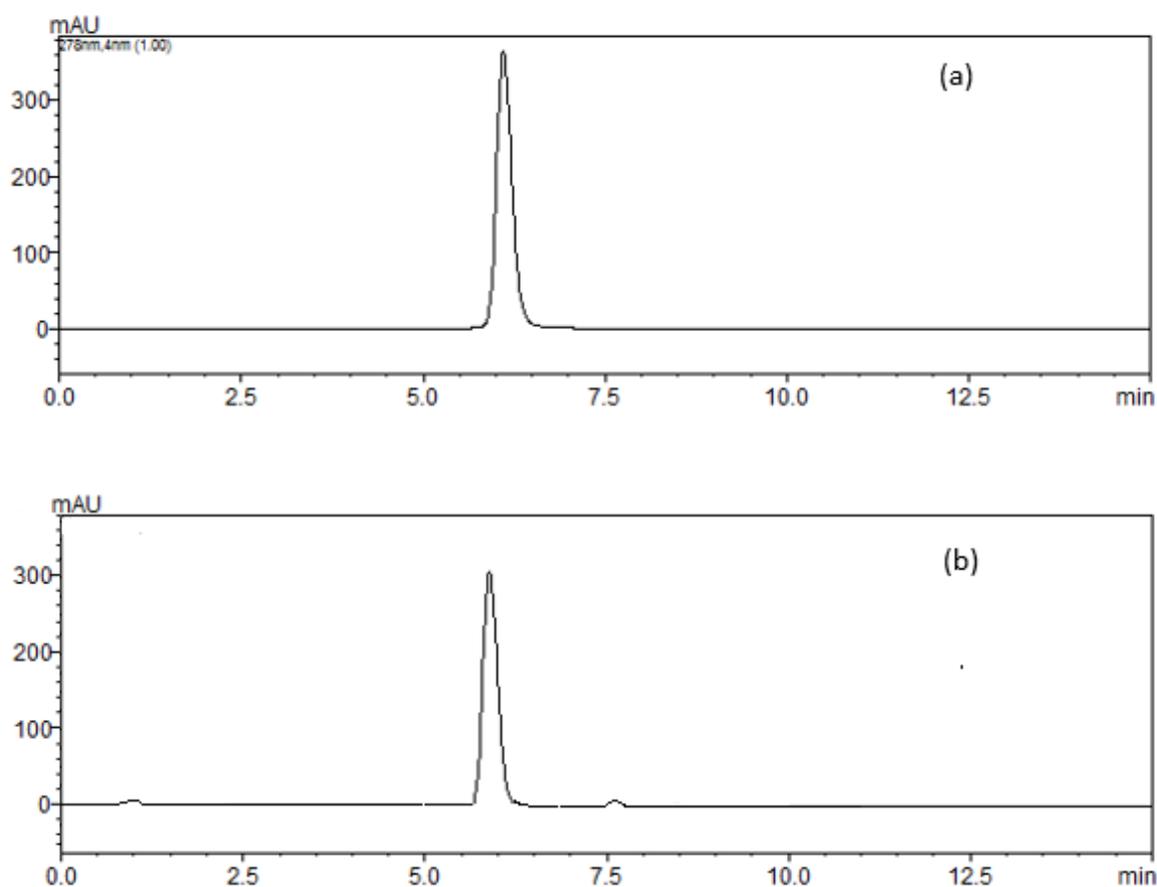


Figura 15. Cromatogramas da degradação forçada do ENRO SQR após ser submetido à exposição de radiação UV a 254 nm; (a) Tempo zero e (b) após 4 horas de exposição.

5.3.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada por meio da construção de curva de calibração padrão de ENRO. O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 20,0-80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A curva média ($n=3$), a equação da reta e o coeficiente de correlação estão representados na Tabela 11. O coeficiente de correlação linear (r) obtido de 0,9997 demonstra alta correlação e indica que os resultados obtidos estão diretamente proporcionais à concentração do fármaco. Para comprovar a linearidade do método, foi realizada análise estatística da regressão linear através da ANOVA, conforme exposto na Tabela 12. Os resultados obtidos apresentam valor para F calculado superior ao valor do F tabelado para a regressão linear. Para o desvio da linearidade o valor de F calculado foi menor que o valor tabelado, o que comprova com 95% de confiança que houve regressão linear sem haver desvio da linearidade.

Tabela 11. Parâmetros referentes a linearidade do método para a análise de ENRO por CLAE.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	20 – 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Coefficiente angular (a)	136688
Coefficiente linear (b)	- 89436
Coefficiente de correlação (r)	0,9997

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da linearidade do método de quantificação de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	127641640188696,0	31910410047174,1	15599,56	3,48
Regressão Linear	1	127622734014400,0000	127622734014400,0000	62389	4,96
Desvio da Linearidade	3	18906174296,6665	6302058098,8888	3,1	3,71
Dentro (resíduo)	10	20455968489,3750	2045596848,93750		
Total	14	127662096157186,0			

5.3.2.3 Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas pela análise de seis soluções da amostra de ENRO comprimidos palatáveis no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 13 e demonstram que o método foi preciso, com valores de DPR máximo de 0,38%.

Tabela 13. Resultados obtidos na quantificação de ENRO comprimidos palatáveis para a avaliação da repetibilidade e precisão intermediária por CLAE.

Amostras	REPETIBILIDADE			PRECISÃO
	Dia 1 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Dia 2 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Dia 3 *	INTERMEDIÁRIA
1	39,72	40,12	39,28	
2	39,8	40,44	39,64	
3	39,97	39,99	39,48	
4	39,69	39,48	39,2	
5	39,68	39,61	39,56	
6	39,75	40,28	39,18	
Média	39,76	39,98	39,39	39,71
DP	0,107	0,376	0,195	0,137
DPR %	0,108	0,38	0,196	0,138

*analista diferente

5.3.2.4 Exatidão

A exatidão do método analítico foi comprovada por meio da determinação da porcentagem de recuperação avaliada através da adição de quantidades conhecidas da solução de ENRO SQR, na solução amostra simulada de excipientes. Os resultados podem ser observados na Tabela 14, com porcentagem de recuperação média das quantidades adicionadas, entre 100,75 % e 102,33 %, demonstrando a exatidão do método.

Tabela 14. Resultados da porcentagem de recuperação para determinação da exatidão do método de doseamento de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE

ENRO	Quantidade	Concentração	Concentração	Recuperação	Média	DPR
20	Adicionada	Teórica	Experimental	(%)	(%)	(%)
$\mu\text{g ml}^{-1}$	$(\mu\text{g ml}^{-1})$	$(\mu\text{g ml}^{-1})$	$(\mu\text{g ml}^{-1})$			
			32,7	102,18		
Solução	12	32,0	32,1	100,31	101,35	0,94
1			32,5	101,56		
			41,2	103,00		
Solução	20	40,0	40,9	102,25	102,33	0,61
2			40,7	101,75		
			48,1	100,20		
Solução	28	48,0	48,7	101,45	100,75	0,63
3			48,3	100,62		

5.3.2.5 Robustez

O método foi considerado robusto a partir da avaliação da resposta analítica utilizando cromatógrafos de modelos diferentes. O DPR% não apresentou valores acima de 2% (tabela 15). Além disso um teste t foi aplicado demonstrando não haver diferença significativa entre os resultados obtidos ($p > 0,05\%$), o que caracteriza a precisão dos dados, independente do equipamento escolhido.

Tabela 15. Resultados obtidos para a avaliação da robustez do doseamento de ENRO comprimidos palatáveis por CLAE.

Solução	Equipamento 1	Equipamento 2
1	40,09	39,94
2	40,37	40,50
3	40,8	40,30
4	39,8	40,60
5	40,3	39,70
6	39,7	39,09
Média ± DP	40,17±0,4	40,2±0,56
DPR %	1,0	1,42

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de quantificação de ENRO desenvolvido por CLAE para a determinação de ENRO na forma farmacêutica comprimidos palatáveis apresentou especificidade frente aos excipientes e frente aos produtos de degradação, o que o caracteriza como indicativo de estabilidade. Além disto, mostrou-se linear, preciso, exato e robusto, sendo útil na quantificação de enrofloxacino em comprimidos palatáveis.

**6. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE
DISSOLUÇÃO PARA ENRO EM COMPRIMIDOS PALATÁVEIS E
CORRELAÇÃO COM DADOS *IN VIVO***

6.1 INTRODUÇÃO

A dissolução é uma ferramenta que possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, em condições experimentais descritas ou desenvolvidas (FB 5, 2010).

Existem três categorias de testes de dissolução: (a) O teste de dissolução de ponto único que é utilizado na análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade, para a avaliação da qualidade de formas farmacêuticas de liberação imediata assim como para verificar a estabilidade durante o prazo de validade; (b) O teste de dissolução de dois pontos onde as especificações podem ser requeridas para fármacos pouco solúveis em água e formas farmacêuticas de dissolução lenta, e (c) os perfis de dissolução, que são obtidos a partir da porcentagem dissolvida de fármaco em diferentes tempos de amostragem, sendo úteis durante o processo de pesquisa e desenvolvimento farmacotécnico, para avaliar o efeito de determinadas alterações em produtos já em comercialização e para estabelecer a semelhança entre formulações (STORPIRTIS *et al.*, 2009; MARCOLONGO, 2003).

O ensaio de perfil de dissolução permite também a obtenção de parâmetros cinéticos importantes na correlação com características biofarmacotécnicas de determinada formulação e com possibilidade de prever a disponibilidade do fármaco *in vivo*. Desta forma, é possível, por exemplo, eliminar estudos de bioequivalência para dosagens menores de um mesmo produto (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Em relação às fluorquinolonas de uso humano, inúmeras são as referências, compendiais e não compendiais, que utilizam ou indicam alguma das três categorias de testes de dissolução como forma de controle de qualidade dos medicamentos pertencentes a esta classe. O ácido nalidíxico, norfloxacino e o ciprofloxacino, por exemplo, possuem monografias nas Farmacopeias Brasileira e Americana, onde o teste de dissolução de único ponto é descrito para uso no controle de qualidade destes fármacos em suas formas farmacêuticas (comprimidos de liberação imediata) (USP 36, 2013; FB 5, 2010). Entretanto, poucos estudos são dedicados ao estabelecimento de correlações *in vivo in vitro* utilizando dados de dissolução com o objetivo de descrever a condição que melhor se assemelhe ao observado em estudos *in vivo*.

Recentemente, Paim e colaboradores (2014) desenvolveram e validaram um teste de dissolução para comprimidos de gemifloxacino simulando o comportamento *in vivo*. O

gemifloxacino é uma fluorquinolona de uso humano de 3^a geração e a aplicabilidade da correlação *in vivo in vitro* foi útil, neste caso, para definir as condições de dissolução mais adequadas e que se assemelhassem ao comportamento fisiológico.

Em relação aos medicamentos de uso veterinário, geralmente são mais frequentes os estudos de análise em fluidos biológicos ou mesmo de resíduos destes medicamentos em produtos alimentícios de origem animal. Contudo, recentemente um estudo de dissolução de comprimidos de orbifloxacino, uma fluorquinolona de uso exclusivo na clínica veterinária, foi realizado por Cazedey e colaboradores (2014). No entanto, as características fisiológicas pertinentes a cães, a qual este medicamento se destina, não foram observadas. Estudo semelhante foi realizado por Foresti e colaboradores (2015) que desenvolveram um método de dissolução discriminativo para ENRO em comprimidos palatáveis frente a diferentes formulações do mercado. Da mesma forma que o anterior, este estudo não estabeleceu uma correlação IVIV para as diferentes condições testadas.

Levando em consideração a importância dos ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas com liberação imediata, a necessidade do controle de qualidade de medicamentos de uso veterinário e a inexistência de estudos que relacionem dados farmacocinéticos com disponibilidade *in vitro*, este capítulo apresentará o desenvolvimento e validação de um ensaio de dissolução para comprimidos contendo enrofloxacino, levando em consideração as características fisiológicas dos cães em estado de jejum, através do estabelecimento de correlações *in vitro in vivo*.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 MATERIAIS

6.2.1.1 Matéria prima e produtos farmacêuticos

Conforme informado no item 4.2.1.3

6.2.1.2 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Shimadzu®, modelo AY220;
- Espectrofotômetro UV-Vis Perkin Elmer®, modelo Lambda 35;
- Lavadora Ultra-Sônica Unique®, modelo USC 2850;
- Potenciômetro HANNA®, modelo 2220;
- Dissolutor Varian® VK 7000, com monitor VK 750D
- Termômetro Químico para laboratório HG®
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm
- Papel filtro quantitativo faixa preta (Quanty® - JP41)

6.2.1.2 Reagentes

- Água destilada;
- Acetato de sódio triidratado p.a - Synth®;

- Ácido clorídrico p.a - Vetec[®];
- Álcool etílico p.a - Qhemis[®];
- Cloreto de sódio p.a - Vetec[®];
- Fosfato de potássio monobásico anidro p.a - Nuclear[®];
- Hidróxido de sódio p. a - Vetec[®];
- Excipientes: Amido, Lactose, Celulose Microcristalina, Estearato de Magnésio, Povidona, Aerosil[®], palatabilizante sabor carne.

6.2.2 MÉTODOS

6.2.2.1 Determinação da solubilidade em diferentes meios

A solubilidade foi determinada pelo método *shake flask* (ANVISA, 2013). Em um erlemeyer de 500 mL, pesou-se aproximadamente 75 mg de ENRO SQR e adicionou-se 200 mL de cada meio de dissolução avaliado. As soluções foram mantidas por 2 horas, em agitador magnético a 100 rpm e temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Após as soluções foram filtradas e do filtrado pipetou-se 0,5 mL para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com tampão fosfato pH 7,4 9 (Concentração teórica final $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras foram analisadas por espectrometria no UV a 273 nm. A solubilidade em cada meio foi determinada em triplicata. A condição *sink* calculada como C_s/C_d , onde C_s representa a solubilidade de saturação do ENRO em 400 mL do meio e, C_d representa a dose de ENRO no comprimido (50mg). Meios de dissolução com C_s/C_d de, aproximadamente, 3 foram considerados adequados e utilizados para o desenvolvimento do método. O volume de meio de dissolução utilizado (400 mL) refere-se ao volume descrito na literatura para a fisiologia gastrointestinal de cães (HERDT, 2004).

6.2.2.2 Condições do método de dissolução

A fim de promover a dissolução dos comprimidos de enrofloxacino foi desenvolvido método em aparelho de dissolução, equipado com oito cubas. Foram testadas diferentes condições, variando-se os meios utilizados, tendo como prioridade a mimetização da fisiologia gástrica canina descrita na literatura. Todos os meios testados foram levados a banho ultrassônico por 20 minutos para desgaseificação (BONFILIO *et al.*, 2010). As diferentes condições empregadas estão descritas na Tabela 16.

Tabela 16. Condições experimentais para determinação dos perfis de dissolução.

Temperatura (°C)	37
Sistema de agitação	pá
Velocidade (rpm)	50 e 75 rpm
Meios de dissolução*	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 1,5
	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 2,5
	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 3,5
	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 1,5
	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 2,5
	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 3,5
Volume do meio (mL)	400
Alíquota amostrada (mL)	5
Tempo de amostragem (min)**	10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60
Deteção	UV (273 nm)

* O ajuste do pH foi realizado com HCl 0,5 mol.L⁻¹ ** Reposição do meio (5 mL) efetuada após cada coleta.

A estabilidade da amostra nos meios de dissolução testados foi avaliada por quantificação do fármaco após 24 h de armazenamento da solução obtida no tempo de amostragem de 60 min, em temperatura ambiente (T_{amb}).

6.2.2.3 Validação do método de dissolução de ENRO por UV

6.2.2.3.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada por meio da preparação de amostras simulada de excipientes. A amostra simulada consistiu dos excipientes declarados na formulação de ENRO comprimidos palatáveis. As concentrações foram estimadas a partir do peso médio dos comprimidos e de acordo com o usual para formulações sólidas de liberação imediata (KIBBE *et al.*, 2000). A amostra simulada de excipientes foi transferida para seis cubas, e o teste executado de acordo com a condição selecionada (composição do meio e velocidade de rotação). Uma alíquota de 10 ml foi retirada no tempo de 60 minutos e diluída até concentração teórica de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Além disso o meio de dissolução também foi analisado. O método foi considerado específico para interferência da amostra simulada e do meio de dissolução não superior a 2% em 273 nm.

6.2.2.3.2 Linearidade

Uma solução foi preparada adicionando-se 10 mg de ENRO SQR em um balão de 100 ml e 5 ml de etanol 95%. Após breve agitação, o volume foi completado e a solução foi

submetida a 15 minutos de banho ultrassônico. A partir dessa solução, alíquotas ente 50 e 800 µl foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, completados com o mesmo solvente, obtendo-se soluções com concentrações entre 0,5 - 8 µg mL⁻¹ em triplicata. Procedeu-se à leitura das soluções em 273 nm. A linearidade foi avaliada através da determinação do coeficiente de correlação linear (r) e da equação da reta de calibração. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) com o objetivo de avaliar a presença de regressão linear e ausência de desvios de linearidade.

6.2.2.3.3. Precisão

O parâmetro da precisão foi avaliado por meio da realização do teste de dissolução com comprimidos de ENRO comprimidos palatáveis. O teste teve tempo total de 60 minutos, sendo as alíquotas retiradas nos tempos 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A porcentagem de fármaco dissolvida foi determinada por UV após filtração das amostras e diluição das mesmas com tampão fosfato pH 7,4 até a concentração teórica de 5 µg mL⁻¹. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Para cálculo da repetibilidade foi considerado o DPR de uma amostra (para cada tempo) em três ensaios de dissolução e para cálculo da precisão intermediária foi considerado o DPR de uma amostra (para cada tempo) em três ensaios de dissolução com analista diferente em dia diferente. Os resultados foram considerados precisos para DPR não superiores a 2%.

6.2.2.3.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação, que consiste em adicionar quantidades conhecidas do fármaco na amostra simulada de excipientes e, após o ensaio,

calcular o percentual de recuperação. As amostras foram preparadas em triplicata, por adição do fármaco nas concentrações de 80, 100 e 120% do valor teórico. Os valores de recuperação (expressos em porcentagem) foram determinados a partir das respostas analíticas obtidas em função da quantidade teórica de padrão adicionado. A metodologia foi considerada exata para resultados do teste de recuperação obtidos na faixa de 90,0 – 107,0% (MAPA/ACS, 2011).

6.2.2.3.5. Robustez

A robustez foi avaliada a partir da verificação da influência da desaeração do meio sobre o perfil de dissolução da amostra. A metodologia foi considerada robusta para diferença de valores de percentual de dissolução (em 60 minutos) com DPR% inferior a 2%, considerando ensaios com meio aerado e desaerado.

6.2.2.4 Estudo de correlação *in vitro* - *in vivo*.

Com a finalidade de selecionar o meio que refletisse as características fisiológicas caninas de maneira mais fidedigna possível, foi realizado um estudo de correlação entre os perfis de dissolução obtidos com os meios formulados e os dados farmacocinéticos disponibilizados pelo FDA para o Baytril® 50mg em cães (FDA, 1990).

Foi utilizado modelo de um compartimento aberto, descrito pela equação 2 e a fração absorvida da dose (FA) foi calculada utilizando o método de Wagner-Nelson, de acordo com a equação 3.

$$C = \frac{F.D.Ka}{Vd.(Ka - Ke)} \cdot (e^{-Ke.t} - e^{-Ka.t}) \quad \text{Eq. 2}$$

$$FA = \frac{C + k \cdot [ASC]_0^t}{k \cdot [ASC]_0^\infty} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

C = Concentração plasmática

F = Biodisponibilidade

D = Dose

Ka = Constante de absorção

Ke = Constante de eliminação

Vd = Volume de distribuição

ASC = Área sob a curva

Os valores de fração de fármaco dissolvido obtidos nos ensaios de dissolução foram plotados com os dados de fração de fármaco absorvido com o intuito de estabelecer uma correlação linear de nível A para as condições de dissolução em estudo. Os dados foram avaliados por regressão linear simples. Nesta etapa, foram excluídos os perfis de dissolução que não apresentaram dissolução completa (no mínimo 80% em 60 min).

6.2.2.5 Comparação dos Perfis de Dissolução

Os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições testadas foram comparados de acordo com os valores de Eficiência de Dissolução (ED%). ED% foi calculado utilizando a

área sob a curva (AUC) do perfil de dissolução a 60 min, aplicando o método trapezoidal. Os valores de ED% foram comparados por ANOVA e Teste de Tuckey *pos hoc* ($p > 0,05$).

A cinética de dissolução foi também utilizada no sentido de comparar as diferentes condições testadas. Para tanto, os dados dos perfis de dissolução nas diferentes condições foram linearizados utilizando os modelos matemáticos de Zero Ordem, Primeira Ordem, Higuchi e Hixson-Crowel. O modelo cinético mais adequado para descrever o perfil de dissolução foi selecionado baseado no coeficiente de correlação (r^2). Para fins de comparação, foram observadas as condições de paralelismo das retas (PASQUALOTO *et al.*, 2005). As condições estudadas estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17. Diferentes condições testadas no ensaio de dissolução.

Grupo	Condição	Meio de dissolução	pH	Velocidade de rotação
A	C1	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL.	1,5	50
	C2	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL.	1,5	75
	C3	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL.	2,5	50
	C4	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL.	2,5	75
	C5	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL.	3,5	50
	C6	NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL.	3,5	75
B	C7	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL.	1,5	50
	C8	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL.	1,5	75
	C9	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL.	2,5	50
	C10	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL.	2,5	75
	C11	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL.	3,5	50
	C12	NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL.	3,5	75

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Estudos de solubilidade e condição *sink*

A seleção do meio de dissolução é baseada na solubilidade do fármaco em relação à dose do medicamento, e é requerido que este proporcione, dentro do possível, a condição *sink*, sem ser necessário que se envolva um grande volume de meio ou um mecanismo de substituição constante. A condição *sink* define-se pelo distanciamento da condição de saturação do meio com o fármaco podendo ser alcançada quando o volume de meio utilizado é 3 vezes superior a concentração de saturação do fármaco. Portanto, seu objetivo é garantir que a velocidade de dissolução não seja diminuída por causa da aproximação com a concentração de saturação (FONSECA, 2006; BAPTISTA, 2005).

O enrofloxacino é um fármaco anfotérico com $pK_{a1} = 5,94$, correspondente ao grupo carboxil e $pK_{a2} = 8,70$, correspondente ao grupo piperazinil (ponto isoelétrico em $pH = 7,32$). O coeficiente de partição, medido em um sistema octanol/tampão aquoso é de 3,48 em $pH 7,0$, sendo considerado um fármaco de alta lipofilia (LISONDO et al, 1997). Segundo Seedher e Agarwal (2009), a solubilidade em água do enrofloxacino é de $146 \mu\text{g ml}^{-1}$ e classificado como pobremente solúvel, baseado em critérios farmacopêicos. Em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ($pH 7,4$) a solubilidade do enrofloxacino aumenta de $146 \mu\text{g ml}^{-1}$ para $182 \mu\text{g ml}^{-1}$. O enrofloxacino tem estrutura química semelhante ao ciprofloxacino (seu principal metabólito), diferindo apenas na acetilação do grupo piperazinil. Desta forma, pode-se inferir que o enrofloxacino, devido a esta característica mais lipofílica, apresente uma maior dificuldade de dissolução em solventes aquosos e fluidos gastrintestinais quando comparado ao ciprofloxacino.

Segundo a USP, para estudos de dissolução/permeabilidade de medicamentos de uso humano, a solubilidade deve ser baseada na maior dose aprovada para uso (em mg). Entretanto, no caso de medicamentos de uso veterinário, a dose de uma formulação para uso oral é administrada baseada em uma relação mg/Kg de peso animal. Por este motivo, na determinação da solubilidade de um medicamento veterinário deve ser considerada a posologia, ou seja, a

quantidade (em mg) por peso do animal (kg) por dia e o volume gástrico (APLEY, 2012). Desta forma, a USP propõe a classificação da solubilidade de um medicamento veterinário baseado na estimativa D_0 (*dose number*), conforme equação abaixo (Apley, 2012):

$$D_0 = (M/V)/C$$

Onde

D_0 = *dose number* ou número de dose

M = quantidade de fármaco declarada no comprimido ou cápsula

V = volume administrado. Segundo o FDA, o valor sugerido situa-se na faixa entre 6 mL e 35 ml, equivalente ao volume gástrico em cães de pequeno a médio porte.

C = solubilidade do fármaco, em mg ml^{-1} .

Para valores de D_0 maiores que 1, o fármaco é considerado de baixa solubilidade. O enrofloxacino apresenta $D_0 = 9,78$ (considerando o volume gástrico de cães de médio porte e solubilidade do fármaco em água), sendo classificado como de baixa solubilidade.

Considerando o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) o enrofloxacino pode ser classificado como Classe II (baixa solubilidade/alta permeabilidade). Para esta classificação a dissolução é a etapa limitante da absorção e correlações com dados *in vivo* podem ser estabelecidas. Para tanto é necessário, além da classificação em relação à solubilidade, determinar se, nas condições estabelecidas para o ensaio de dissolução, a condição *sink* é cumprida. A tabela 18 apresenta os resultados obtidos após o teste de solubilidade nos diferentes meios propostos.

Tabela 18. Teste da solubilidade de meios propostos para dissolução.

Meio de dissolução	Solubilidade (mg mL ⁻¹)	Cs/Cd
NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 1,5	0,371	(+) 2,96
NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 2,5	0,368	(+) 2,94
NaCl 2g; Pepsina 3,2 g; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 3,5	0,374	(+)2,98
NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 1,5	0,370	(+)2,95
NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 2,5	0,373	(+) 2,97
NaCl 300 mg; Pepsina 100 mg; Lecitina de Soja 1%; água destilada q.s.p 1000 mL. pH 3,5	0,370	(+)2,95

A solubilidade aumentada do ENRO nos meios testados quando comparada aos dados da literatura (meio aquoso) pode ser atribuída à composição dos mesmos. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que todos os meios propostos atendem a condição *sink* e, portanto foram utilizados no decorrer do estudo.

6.3.2 Desenvolvimento do método de dissolução

Os resultados dos perfis obtidos para as condições propostas encontram-se na Figura 16. Os dados são expressos em porcentagem de ENRO dissolvido *versus* tempo. Os meios de dissolução das condições 1 a 6 tiveram sua composição baseada no meio em estado de jejum indicado para humanos proposto pela USP 36 (2013), com o pH adaptado para a fisiologia do trato gastrointestinal de cães. Os meios referentes às condições 7 a 12 foram baseados naqueles propostos por Arndt et al (2012), com adaptações.

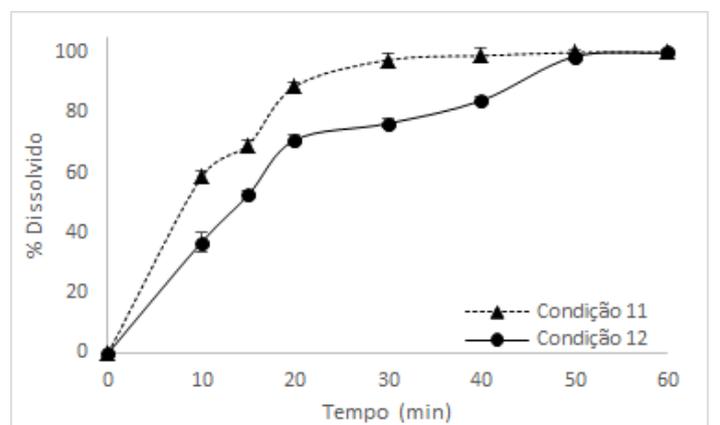
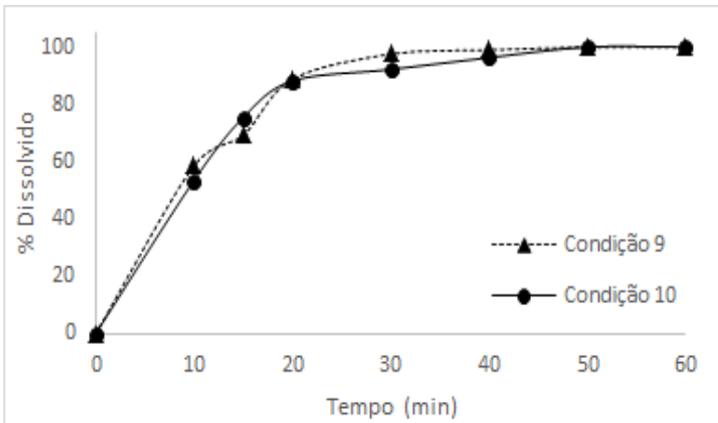
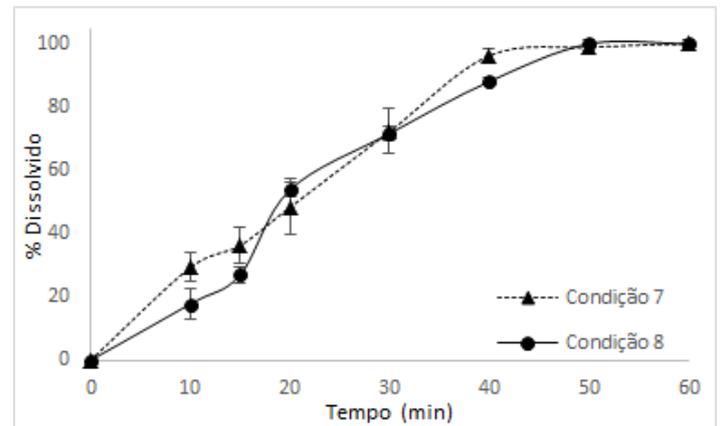
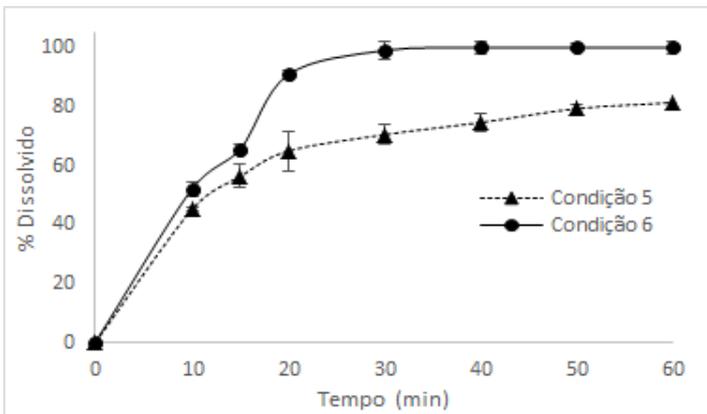
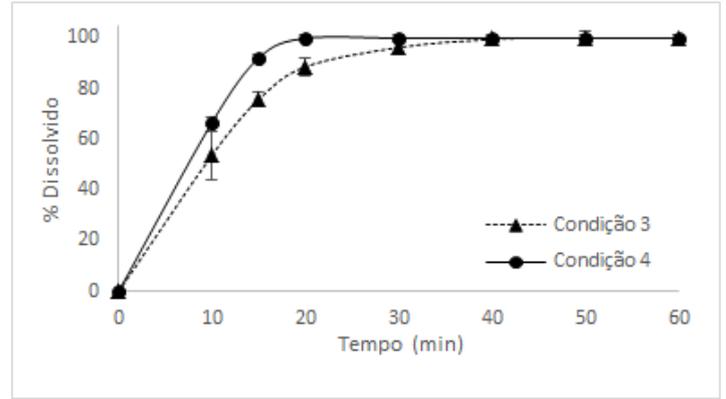
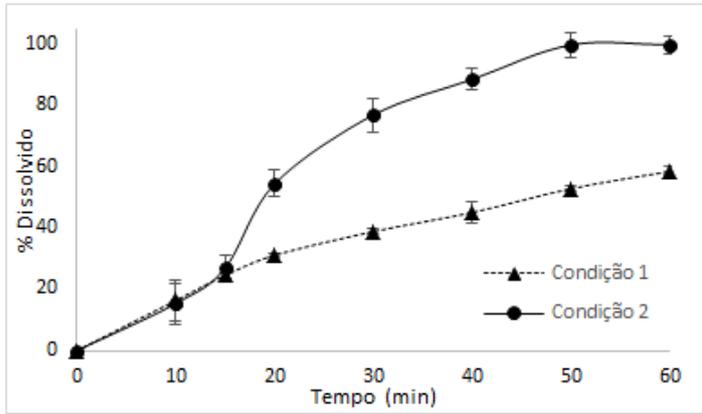


Figura 16. Perfis de dissolução do ENRO nos diferentes condições testados (Grupo A).

6.3.3 Comparação dos Perfis de Dissolução

A eficiência de dissolução (ED%) vem sendo comumente utilizada como um parâmetro de confiança na avaliação da equivalência farmacêutica entre formulações. Contudo, neste trabalho, foi utilizada com o intuito de verificar as possíveis diferenças entre as condições de dissolução testadas (que contém modificações em relação ao pH, velocidade de rotação e composição do meio). As condições estudadas foram separadas em dois grandes grupos: Grupo A – meios sem tensoativo (C1:C6) e grupo B - meios com tensoativo (C7:C12). Desta forma, procedeu-se a avaliação estatística dos valores de ED% para as condições de dissolução avaliadas (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19. Valores de ED% para as condições de dissolução avaliadas (Grupo A).

Condição	ED % *	Grupo de diferenças
C1	32,7	C2
C2	47,8	C1
C3	57,0	C4, C5
C4	59,6	C3, C5, C6
C5	46,9	C3, C4, C6
C6	56,7	C4, C5

*Média de seis repetições

As condições 1 e 2, embora tenham em sua composição os mesmos constituintes e contenham o mesmo pH, diferem na velocidade de rotação, o que ocasionou uma diferença significativa no valor de ED%. Para a condição 1 não foi observado 100% de dissolução ao final de 60 min, conforme demonstrado na Figura 16.

Para as condições 3 e 4 houve diferença significativa nos valores de ED% devido a diferença na velocidade de rotação. Entretanto, para as duas condições ocorreu dissolução completa do fármaco no tempo estudado (Figura 16).

Nas condições 5 e 6 houve diferença significativa dos valores de ED% e dissolução incompleta do fármaco para a condição de menor velocidade (condição 5) (Tabela 17).

Desta forma, é possível inferir que a velocidade de rotação do aparato influencia na cinética de dissolução do fármaco para o meio testado. Em relação ao pH, não é possível fazer a mesma inferência, pois os perfis apresentaram valores de ED% semelhantes para diferentes valores de pH.

Os perfis com dissolução incompleta (condições 1 e 5) não foram utilizados no estabelecimento da correlação IVIV.

Para o grupo B (Tabela 20), não foi observada diferença significativa nos valores de ED% quando comparadas diferentes velocidades de rotação (C7 semelhante a C8; C9 semelhante a C10 e C11 semelhante a C12). Em relação ao pH, não é possível fazer a mesma inferência, pois os perfis apresentaram valores de ED% diferentes para diferentes valores de pH.

Tabela 20. Valores de ED% para as condições de dissolução avaliadas (Grupo B).

Condição	ED % *	Grupo de diferenças
C7	49,31	C11
C8	47,5	C11
C9	57,2	C11, C12
C10	56,3	C11, C12
C11	33,6	C10
C12	50,8	C9, C10

*Média de seis repetições

A influência da velocidade de rotação nos valores de ED% pode ser explicada pela presença de agente tensoativo no grupo B, o qual aumenta a velocidade de dissolução sem necessariamente depender da velocidade de rotação (MARCOLONGO, 2003). Esta informação pode ser útil em estudos futuros, onde haja a necessidade de aumentar a cinética de dissolução, mantendo baixas velocidades de rotação a fim de mimetizar a motilidade gástrica do animal em estudo. Entretanto, esta característica poderia limitar estudos envolvendo o desenvolvimento de métodos discriminativos que observem diferenças farmacotécnicas entre formulações.

Além da comparação utilizando o valor de ED%, os perfis de dissolução nas diferentes condições testadas foram linearizados e comparados em relação ao paralelismo das retas dos perfis com velocidades de rotação diferentes. Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 21.

Tabela 21. Linearização dos perfis de dissolução obtidos com as diferentes condições.

Condição	Higuchi $Q_t = K_H t^{1/2}$
C1	y=8,9873x -10,25 R2=0,985
C2	y=15,207x -14,673 R2=0,959
C3	y=13,185x +13,967 R2=0,883
C4	y=12,4x +23,32 R2=0,768
C5	y=10,947x +7,612 R2=0,958
C6	y=13,557x +11,308 R2=0,887
C7	y=14,607x -9,688 R2=0,944
C8	y=14,817x -12,857 R2=0,986
C9	y=13,16x +13,94 R2=0,895
C10	y=12,989x +13,985 R2=0,891
C11	y=13,196x +13,902 R2=0,891
C12	y=13,458x +0,658 R2=0,977

O modelo que melhor representa os perfis de dissolução é o Modelo de Higuchi. Sendo assim, procedeu-se a comparação entre os perfis utilizando-se este modelo e avaliando-se o

paralelismo das retas que o representam (PASQUALOTO et al., 2005). Para os perfis do grupo A (C1 x C2; C3 x C4 e C5 x C6) não foi observado paralelismo das retas. Já para os perfis do grupo B (C7 x C8; C9 x C10 e C11 x C12) foi observado o paralelismo (demonstrado pelos valores próximos de coeficiente angular), corroborando os resultados de ED%, o qual demonstra que a alteração da velocidade de rotação influencia a velocidade de dissolução, para os meios que não contém tensoativo.

6.3.4 Correlação *In Vitro* – *In Vivo*

O principal objetivo de se estabelecer uma correlação IVIV é identificar as condições ótimas do ensaio de dissolução que descrevam a absorção *in vivo*. Este procedimento tem como principal aplicabilidade o estabelecimento de ensaios de dissolução com características biorrelevantes, contribuindo em estudos de bioequivalência e registro de medicamentos genéricos.

Em medicamentos de uso veterinário, esta correlação pode ser obtida por comparação dos dados farmacocinéticos de diferentes espécies e ensaios de dissolução. Entretanto, poucos dados na literatura sobre a dissolução *in vitro* de medicamentos de uso veterinário estão disponíveis, o que restringe o estabelecimento destas correlações, mesmo que para dados de perfil farmacocinético buscados na literatura. Além disso, o desenvolvimento do método de dissolução incluindo a escolha do meio, a velocidade, o volume do meio e o aparato devem estar de acordo com as características fisiológicas da espécie para qual o medicamento se destina.

Para o ENRO, poucos relatos na literatura descrevem o comportamento farmacocinético quando administrado por via oral em cães. Desta forma, foi atribuído um modelo farmacocinético de um compartimento aberto para os dados de perfil plasmático, conforme dados disponibilizados pelo FDA para fins de registro do Baytril®. Os dados de perfil plasmático vs. tempo foram transformados em fração da dose absorvida (FA) usando o método de Wagner-Nelson, conforme demonstrado na Figura 17.

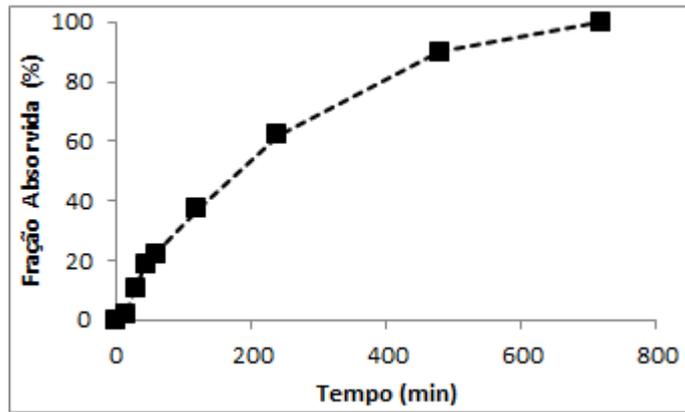


Figura 17. Fração dissolvida vs. tempo para ENRO utilizando o método de Wagner-Nelson.

Um perfil de dissolução mais rápido em comparação com a fração absorvida foi obtido para todas as condições testadas. Por este motivo, foi aplicado um fator de correção (*time scaling*) (CARDOT & DAVIT, 2012). O fator de correção é determinado pela plotagem do gráfico tempo para dissolução *in vitro* vs. tempo para absorção *in vivo*. Após o estabelecimento de uma regressão linear com ajuste na origem, a inclinação da reta obtida pode ser usada como fator de correção no estabelecimento da CIVIV (MACHADO *et al.* 2014). Os dados obtidos para determinação do fator de correção para uma das condições testadas estão demonstrados como exemplo na Figura 18. Para esta condição um fator de correção (Fc) de 14,38 min deve ser utilizado para o ajuste dos dados *in vivo*.

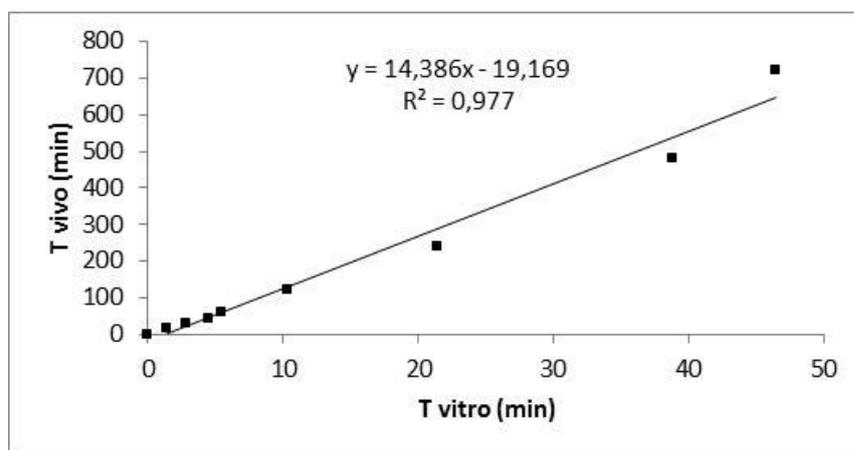


Figura 18. Tempo para dissolução *in vivo* vs. tempo de dissolução *in vitro*.

Para as demais condições testadas foram calculados os fatores de correção (*time scaling*) e o ajuste foi realizado anteriormente ao cálculo relativo ao estabelecimento da CIVIV.

A Tabela 22 mostra a regressão linear obtida no estabelecimento da CIVIV para as diferentes condições testadas.

Tabela 22. Análise de regressão para CIVIV usando fator de correção.

Condição	Coefficiente angular	Intercepto	R ²
C2	0,9587	2,7341	0,990
C3	1,1196	-17,627	0,9462
C6	1,1138	-15,902	0,9532
C7	0,9945-	1,4261	0,9898
C8	0,9692	4,3509	0,9878
C9	1,1215	-17,639	0,9431
C10	1,1046	-17,193	0,9463
C11	1,1212	-17,604	0,9433
C12	0,9112	8,5615	0,978

As condições 2, 7 e 8 apresentaram um modelo linear de correlação nível A entre as frações absorvidas *in vivo* e as frações dissolvidas *in vitro* (Tabela 22). Para estas condições foram obtidas regressões lineares satisfatórias e coeficientes angulares próximos da unidade.

Cabe ressaltar que as três condições possuem mesmo pH e que, para duas delas, a velocidade de rotação é de 75 rpm. Neste sentido, foi escolhida a **condição 8** para dar continuidade ao estudo, pois a mesma engloba mais parâmetros comuns as condições que apresentaram correlação. Além disso, a mesma reproduz adequadamente as condições fisiológicas do trato gastrintestinal onde o ENRO é absorvido (CAVALCANTE, 2009).

Na figura 19 é possível observar o perfil *in vitro* comparado ao perfil *in vivo* para a condição 8. Para esta correlação o fator de correção aplicado foi de 14,38 min.

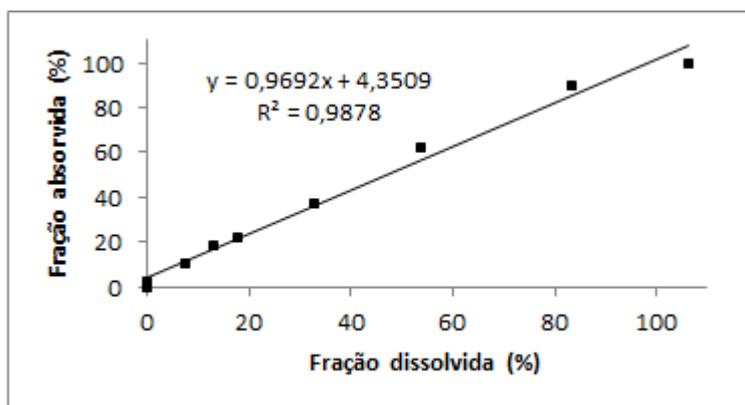


Figura 19. Fração dissolvida vs. fração absorvida.

O resultado da correlação foi usado para recalcular a fração absorvida predita e o erro de predição, com o objetivo de avaliar a exatidão do modelo proposto (Tabela 23). Segundo o FDA (1997), o erro deve estar abaixo de 10%, indicando que os dados de dissolução podem ser utilizados como alternativa para estudos *in vivo*.

Tabela 23. Validação interna da correlação usando a fração absorvida predita.

Fração dissolvida	Fração absorvida simulada	Fração absorvida predita	Erro (%)
7,33	10,955	11,45	4,56
13,03	18,699	16,96	- 9,29
17,80	22,476	21,60	- 3,89
32,70	37,584	36,04	- 4,10
53,70	62,021	56,39	-6,04
83,41	89,830	85,19	-5,16
106,20	100	107,27	-7,27

6.3.5 Validação do método de quantificação de ENRO em comprimidos palatáveis por UV

6.3.5.1 Especificidade

O método demonstrou ser específico para determinação do fármaco na presença dos componentes da amostra simulada de excipientes e dos constituintes do meio de dissolução, uma vez que não houve interferência no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco (273nm) como demonstrado na figura 20.

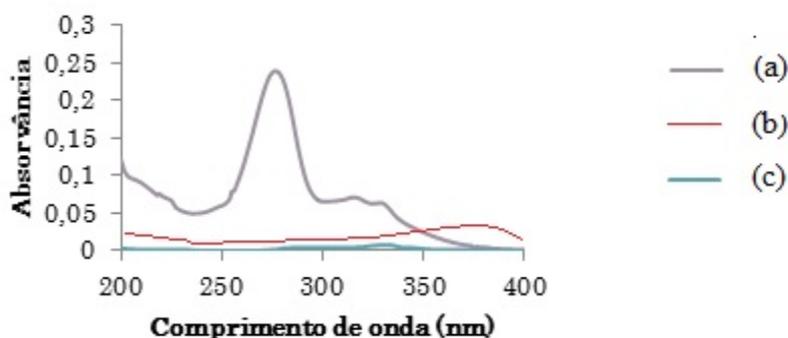


Figura 20. Especificidade do enrofloxacino frente aos excipientes e constituintes do meio de dissolução (a) Enro (b) Meio de dissolução (c) Amostra simulada de excipientes.

6.3.5.2 Linearidade

A faixa de concentração de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação (r) de 0,9997. A análise de variância (ANOVA) dos resultados

obtidos indica que a curva padrão apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade.

6.3.5.3 Precisão

A repetibilidade foi avaliada pela confirmação dos resultados a partir da repetição do experimento (seis repetições), a precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos dos testes de dissolução com analistas diferentes. Os DPR entre os analistas diferentes e a repetibilidade foram calculados e apresentaram valores inferiores a 2%, conforme demonstrado na Tabela 24. Um teste T foi aplicado aos dados e o mesmo revelou não haver diferença significativa com uma confiabilidade de 99%, o que demonstra a precisão satisfatória dos métodos desenvolvidos (USP 32, 2009).

Tabela 24. Avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do teste de dissolução para ENRO comprimidos palatáveis empregando-se analistas diferentes.

Tempo (min)	Analista 1 Média* \pm DPR	Analista 2 Média* \pm DPR	DPR
10	17,3 \pm 1,13	16,9.1 \pm 1.3	1,72
15	27,7 \pm 1,6	27,1 \pm 1,03	1,10
20	53,7 \pm 1,8	52,3 \pm 0,95	1,89
30	71,1 \pm 0,39	72,4 \pm 0,19	1,20
40	88,7 \pm 1,09	87,9 \pm 1,18	0,97
50	100,0 \pm 0.93	99.2 \pm 0,52	1,91
60	100,0 \pm 0.12	100.1 \pm 0,53	1,27

*Cada valor é média de três determinações

6.3.5.4 Exatidão

O método demonstrou ser exato devido à recuperação média do fármaco em diferentes concentrações na amostra simulada de excipientes, analisadas em triplicata após 60 minutos de dissolução. Os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Exatidão do método de dissolução de ENRO em comprimidos palatáveis.

	Concentração Teórica ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
80%	4	4,07	101,75	100,6	1,01
		3,99	99,75		
		4,02	100,5		
100%	5	5,30	100,6	100,3	0,64
		5,40	100,8		
		4,98	99,6		
120%	6	6,03	100,6	99,5	0,93
		5,95	99,16		
		5,93	98,83		

A faixa de recuperação encontra-se dentro da recomendada pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* entre 98 – 102% (BRITO *et al.*, 2003). Através destes resultados pode-se concluir que o método é exato.

6.3.5.5. Robustez

A presença de bolhas de ar no meio de dissolução pode afetar o processo, já que as mesmas podem aderir às formas farmacêuticas antes da desintegração, reduzir a área superficial exposta ao solvente ou mesmo ocupar o espaço a ser preenchido pelo meio na cuba, levando a uma diminuição na quantidade de solvente e, conseqüentemente, uma menor eficiência de dissolução. Por este motivo, a desaeração do meio pode ser utilizada como um parâmetro para avaliar a robustez de métodos de dissolução.

Os valores resultantes do ensaio de dissolução sem a prévia desaeração do meio, quando comparados com os resultados do ensaio de dissolução com desaeração demonstraram a robustez do método. Um teste t foi aplicado demonstrando não haver diferença significativa entre os resultados obtidos ($p > 0,05\%$), para todos os tempos de coleta, o que caracteriza a precisão dos dados, independente do equipamento escolhido. Além disso, obteve-se um DPR menor que 2 para todos os tempo de coleta (Tabela 26) (BRASIL, 2003b).

Tabela 26. Resultados da dissolução comparando meio desaerado e não desaerado.

Tempo (min)	Meio desaerado* (Média±DPR)	Meio não desaerado*(Média±DPR)	DPR
10	17,3±1,13	16,8±0,97	1,12
15	27,7±1,60	26,3±1,93	1,9
20	53,7±1,80	53,1,1±1,70	1,8
30	71,1±0,39	69,9±1,32	1,91
40	88,7±1,09	88,1±1,97	1,58
50	100,0±0,93	99,6±1,45	1,98
60	100,0±0,12	100,1±0,99	1,12

*Cada valor é média de seis determinações

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de dissolução desenvolvido mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de enrofloxacino em comprimidos, sendo um método simples, relativamente barato, de fácil execução apresentando a praticidade necessária para a rotina dos laboratórios de controle de qualidade. Além disso, sugere-se que a condição de dissolução validada simula o comportamento *in vivo* do fármaco a partir de dados na literatura, desta forma pode-se afirmar que o método de dissolução desenvolvido e validado pode vir a contribuir com a garantia da segurança e eficácia terapêutica dos comprimidos de enrofloxacino.

7. CONCLUSÕES

- O método para doseamento de ENRO por UV foi validado, demonstrou-se simples, de baixo custo e com o mínimo uso de solventes orgânicos sendo adequado para a análise de ENRO em comprimidos palatáveis
- O método indicativo de estabilidade por CLAE foi validado, demonstrou-se adequado para análise quantitativa de ENRO e pode ser utilizado para o controle de qualidade de rotina de comprimidos palatáveis.
- O método de dissolução desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria na região do UV para determinação da quantidade dissolvida de ENRO mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de ENRO em comprimidos palatáveis.
- Sugere-se que a condição de dissolução validada simula o comportamento *in vivo* do fármaco a partir de dados na literatura, desta forma pode-se afirmar que o método de dissolução desenvolvido e validado pode vir a contribuir com a garantia da segurança e eficácia terapêutica dos comprimidos de enrofloxacino.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOTO, M.; NAGAHATA, N.; FURUYA, A.; FUKUSHIMA, K.; HIGUCHI, S.; SUWA, T. **Gastric pH profiles of beagle dogs and their use as an alternative to human testing.** *Eur J Phar Biopharm*, v.49, p. 99-102, 2000.

APLEY, M.; CRIST, B.; GONZALEZ, M. A.; HUNTER, R. P.; MARTINEZ, M. N.; MODRIC, S.; PAPICH, M. G. PARR, A. F.; RIVIERE, J. E. MARQUES, M. R. C. **Solubility Criteria for Veterinary Drugs. Stimuli to the Revision Process USP, 2012.** Disponível em: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/s200600.pdf. Acessado em: 29/06/2014.

ARAÚJO, K. P. C.; BLAZQUEZ, F. J. H.; **Anatomia microvascular do estômago canino e lesão gástrica provocada por antiinflamatórios não esteroides.** *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 44, p. 14-18, 2007.

ARNDT, M.; CHOKSHI, H.; TANG, K.; PARROTT, N. J.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. **Dissolution media simulating the proximal canine gastrointestinal tract in the fasted state.** *Eur J Pharm Biopharm*, v. 84, p. 33-41, 2013.

ARIAS, J.L.; LÓPEZ-VIOTA, M.; CLARES, B.; RUIZ, M.A.; **Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use: Correlation between zeta potential and sedimentation.** *Eur. J. Pharm. Sci*, v. 34, p. 257-262, 2008.

ASKAL, H.; REFAAT, I.; DARWISH, I., **Evaluation of N-Bromosuccinimide as a New Analytical Reagent for the Spectrophotometric Determination of Fluoroquinolone Antibiotics.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, p. 1551-1556, 2007.

AZEVEDO, R. C. P.; RIBEIRO, G. P.; ARAÚJO, M. B. **Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, 2008.

BAPTISTA, E. B. **Estudo da Correlação in vivo/in vitro empregando comprimidos de glibenclamida não bioequivalentes.** Dissertação (mestrado) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Editora Artmed, Porto Alegre, 2ª ed., 2008.

BIMAZUBUTE, M.; CAMBIER, C.; BAERT, K.; VANBELLE, S.; CHIAP, P.; ALBERT, A.; DELPORTE, J. P.; GUSTIN, P. **Penetration of enrofloxacin in to the nasal secretions and relation ship between nasal secretions and plasma enrofloxacin concentrations after intramuscular administration in healthy pigs.** *J Vet Pharmacol Ther*, v. 33, p. 183-188, 2010.

BITTENCOURT, C.F.; MORSCH, L.M.; SOUZA, M.J. **LC determination of enrofloxacin.** *J Pharm Biomed Anal*, v. 6, p.15-28, 2002.

BONFILIO, R.; MENDONÇA, T. F.; PEREIRA, G. R.; de ARAÚJO, M. B.; TARLEY, C. R. **T. Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using HPLC and UV spectrophotometry.** *Química Nova, São Paulo*, v.33, 2010.

BOOTHE, D. M.; BOECKH, A.; SIMPSON, R. B.; DUBOSE, K. **Comparison of pharmacodynamic and pharmacokinetic indices of efficacy for 5 fluoroquinolones toward pathogens of dogs and cats.** *J. Vet. Intern. Med.*, v.20, p.1297–1306, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 901, de 19 de maio de 2003. **Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI).** Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003b.

BREIERO, A. R. **Fexofenadina: Validação e métodos analíticos de fotoestabilidade.** Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de farmácia. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre – 2008

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2011.

BRITO, N; AMARANTE, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. **Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão.** *Pesticidas. R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v.13, p. 129 – 146, 2003.

CAVALCANTE, L. F. H.; GOUVÊA, A. S.; MARQUES, J. M. V. **Degeneração retiniana em gatos associada ao uso de enrofloxacin – artigo de revisão.** *Acta Veterinaria Brasílica*, v.3, p.62-68, 2009.

CARDOT, J. M.; DAVIT, B. M. **In vivo-in vitro correlation: Tricks and Traps.** *The AAPS Journal*, v. 14, p. 491-499, 2012.

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

CHAKRAVARTHY, V. A.; SAILAJA, B. B. V.; KUMAR, A. P. **Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Enrofloxacin and its Degradation Products in the Table Dosage Forms.** *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 15, p. 1-11, 2015.

CHO, H. J.; YI, H.; LEE, D.G.; SHIM, J.H.; LEE, S.H.; JEONG, J.Y.; SHIN, H.C. **Single-step extraction followed by LC for determination of (fluoro)quinolone drug residues in muscle, eggs, and milk.** *J Sep Sci*, v. 33, p.1034-43, 2011.

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

COX, S.K. **Allometric scaling of marbofloxacin, moxifloxacin, danofloxacin and difloxacin pharmacokinetics: a retrospective analysis.** *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, v.30, p.381–386, 2007.

CÓZAR-BERNAL, M. J.; GALLARDO, V.; SÁEZ-FERNANDEZ, E.; HOLGADO, M. A.; ÁLVAREZ-FUENTES, J.; FERNÁNDEZ-ARÉVALO, M.; ARIAS, J. L; **Role of the electrokinetic properties on the stability of mebendazole suspensions for veterinary applications.** *Int. J. Pharm*, v. 393, p. 161-166, 2010.

DA SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B. **Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária.** *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.77, p.363-369, 2010.

DE SOUSA, I. C. S. C. **Interacção da Enrofloxacina com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas.** Dissertação (Mestrado) Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007

EMA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation, 1998. Disponível em: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014142.pdf.

FAHMY, R.; MARNANE, B.; BENSLEY, D.; HOLLENBECK, R. G.; **Dissolution test development for complex veterinary dosage forms: oral boluses.** *AAPS PharmSci*, v.4, p. 137-144, 2002.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, extended release solid oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations, 1997.

FDA. NADA 140-913 Baytril® Antibacterial Injectable Solution - original approval, 1990. Disponível em: www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm054854.htm

FONSECA, L. B. **Desenvolvimento e Validação de Método de Dissolução Aplicado a Suspensões Oraís de Nimesulida.** Dissertação (mestrado) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2006.

FORESTI, G. R.; BECKER, N.; SILVA, A. S.; ALMEIDA, W. W. W.; MALESUIK, M. D.; HASS, S. E.; SILVA, F. E. B. **An Alternative method for the dissolution of enrofloxacin tablets.** *Dissolution Thehnologies*, v. 22, p. 23-27, 2015.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HÖRTER, D.; LÖBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J.B. **Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs.** *Pharm Res*, v. 15, p. 698-705, 1998.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, Editora Mac Graw Hill, 11^a ed., 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HERDT, T. **Fisiologia gastrintestinal e metabolismo.** In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D., **Development of a New Sampe Pretreatment Procedure Based on Pressurized Liquid Extration for the Determination of Fluoroquinolones Residues in Table Eggs.** *Journal of Chromatography*, v. 1140, p. 63-70, 2007.

HOLLER, J. F.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios em Análise Instrumental**, 6^a ed., Editora Bookman, Porto Alegre, 2009.

HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N.; NAKAZAWA, H. **Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high-performance liquid chromatography.** *J Chromatogr B Biomed Appl*, v. 18, p. 69-76, 1994.

IHRKE, P. J.; PAPICH, M. G.; DEMANUELLE, T. C. **The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology.** *Vet. Dermatol.*, v.10, p.193–204, 1999.

JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J.B. **Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update.** *Pharm Res*, v. 25, p. 1663-76, 2008.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. **The concept of dissolution efficiency.** *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.27, p. 48-49, 1975.

KIBBE, A. H.; WADE, A.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3^o ed, Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, p. 665, 2000.

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

MACHADO, J. C.; LANGE A. D.; TODESCHINI, V.; VOLPATO, N. M. **Development and Validation of a Discriminative Dissolution Method for Atorvastatin Calcium Tablets using in vivo Data by LC and UV Methods.** *Pharm Sci Tech*, v.15, p.189–197, 2014.

MARCOLONGO, R. Dissolução de Medicamentos: **Fundamentos, Aplicações, Aspectos Regulatórios e Perspectivas na Área Farmacêutica.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

MARTINEZ, M.; AUGSBURGER, L.; JOHNSTON, T.; JONES, W. W. **Applying the Biopharmaceutics Classification System to veterinary pharmaceutical products: Part I: Biopharmaceutics and formulation considerations.** *Adv. Drug Deliv. Rev*, v. 54, p. 805-824, 2002a.

MARTINEZ, M.; AMIDON, G.; CLARKE, L. JONES, W. W.; MITRA, A.; RIVIERE, J. **Applying the Biopharmaceutics Classification System to veterinary pharmaceutical products: Part II: Physiological considerations.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 54, p. 825-850, 2002b.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. **Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals.** *The Veterinary Journal, London*, v. 172, p. 10–28, 2006.

MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D.; **Multiresidue Determination of Fluoroquinolones in Milk by Column Liquid Chromatography with Fluorescenc and Ultraviolet Absorbance Detection.** *Journal of Chromatography A*, v. 1034, p. 25-32, 2004.

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

NASSIF, P. A. N.; KARL-HERMANN FUCHS, K. H.; HEIMBUCHER, J.; MALAFAIA, O.; CZECHKO, N. G.; FILHO, J. M. R.; THIEDE, A.; DIETZ, U. A. **Alterações da Motilidade Antroduodenal e do pH Gástrico Após Receção Gástrica Parcial Incluindo a Área Correspondente ao Marcapasso do Estômago de Cães.** *Rev Assoc Med Bras*, v. 49, p. 196-202, 2003.

OFOEFULE, S.I.; UDEOGARANYA, P.O; OKONTA, J.M. **Prediction of in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE).** *Boll. Chim. Farm.*, Milano, v. 140, n.3, p. 187-191, 2001.

O'HARA, T.; DUNNE, A; BUTLER, J.; DENAVE, J. **A review of methods used to compare dissolution profile data.***Pharm. Sci. Technol. Today*, Cambridge, v.1, n. 5, 214-223, 1998.

PAIM, C. S.; ARAÚJO, B. V.; VOLPATO, N. M. ; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. **Gemifloxacin mesylate (GFM): dissolution test based on in vivo data.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. p. 1-6, 2014.

PASQUALOTO, K. F. M.; FUNCK, J. A. B.; SILVA, F. E. B.; KRATZ, C. P. **Development and Evaluation of Amoxicillin Formulations by Direct Compression: Influence of the Adjuvants on Physicomechanical and Biopharmaceutical Properties of the Tablets.** *Acta Farm. Bonaerense*, v. 24, p. 39-47, 2005.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. **Methods to compare dissolution profiles.** *Drug Inf. J.*, v.30, p. 1113-20, 199.

POLENTARUTTI, B.; ALBERY, T.; DRESSMAN, J.; ABRAHAMSSON, B. **Modification of gastric pH in the fasted dog.** *J Pharm Pharmacol*, v. 62, p. 462-9, 2010.

PRESCOTT, J. F. **In Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.** 3rd edn. Eds Prescott J, Baggot D, Walter R. Iowa State University Press, Ames, IA. 2000.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., **Farmacologia**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004

REECE, W.O.; SWENSON, M. J. **Dukes- Fisiologia dos Animais Domésticos.** 11^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996.

SÁRKÖZY, G. **Quinolones: a class of antimicrobial agents.** *Vet. Med.*, v.46, p.257–274, 2001.

SEEDHER, N.; AGARWAL, P. **Various solvent systems for solubility enhancement of enrofloxacin.** *J. Pharm. Sci.*, v. 71, p. 82–87, 2009.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THIES, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. **Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral.** *Pharm. Technol.*, São Paulo, n. 1, p. 34-43, 1997.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 5. Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CHIANN, C.; GONÇALVES, J. E. *Biofarmacotécnica*. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009.

SUNDERLAND, J.; LOVERING, A. M.; CAROLINE M TOBIN, C. M.; MACGOWAN, A. P.; JOHN M ROE, J.M.; DELSOL, A. A. **A reverse-phase HPLC assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig faeces.** *Int Jour Antimicrobial Agents*, v. 23, p. 390–393, 2004.

TURIEL, E.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A.R. **Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection.** *J Chromatogr A.*, v. 8, p. 145-55, 2003.

USLU, M. O.; YEDILER, A.; BALCIOGLU, I. A.; HOSTEDE-SCHULTE, S., **Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices.** *Springer Science*, v. 190, p. 55-63, 2008.

USP 24. *The United States Pharmacopeia*. 24 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2000.

USP 32. The United States Pharmacopeia. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009

USP 36. The United States Pharmacopeia. 36 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

VICH GL1 – International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. Bruxelles, 1998.

VICH GL1. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. London, 2006. 22p.

WEBSTER, C. R. L. **Farmacologia Clínica em Medicina Veterinária**. São Paulo: E.D; Roca, 2005 p. 22-23.

WU, G.; Meng, Y.; Zhu, X.; Huang, C. **Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheirsinensis***. ELSEVIER, 2006.

YUKSEL, N.; KANIK, A E.; BAYKARA, T. **Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and –independent methods**. *Int. J. Pharm.*, v.209, p. 57-67, 2000.