



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

CONTROLE DE QUALIDADE DE BESIFLOXACINO EM  
SUSPENSÃO OFTÁLMICA: METODOLOGIA ANALÍTICA – ESTUDO  
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE - CITOTOXICIDADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MÁRCIA DE CASTRO NEVES COSTA

PORTO ALEGRE, 2013



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

CONTROLE DE QUALIDADE DE BESIFLOXACINO EM  
SUSPENSÃO OFTÁLMICA: METODOLOGIA ANALÍTICA – ESTUDO  
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE - CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada por MÁRCIA DE CASTRO  
NEVES COSTA para obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas

ORIENTADOR: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Porto Alegre, 2013.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

#### CIP - Catalogação na Publicação

de Castro Neves Costa, Márcia  
Controle de qualidade de besifloxacino em  
suspensão oftálmica: Metodologia analítica - Estudo  
preliminar de estabilidade - Citotoxicidade / Márcia  
de Castro Neves Costa. -- 2013.  
121 f.

Orientadora: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Besifloxacino. 2. Validação. 3. Controle de  
qualidade. 4. Bioensaio. 5. Estabilidade. I.  
Scherman Schapoval, Elfrides Eva, orient. II. Título.

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



## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval, pela orientação, apoio, carinho e confiança no meu trabalho.

Aos professores da disciplina de Controle de Qualidade professores Cássia, Martin e Nádia pela receptividade e disposição em sempre colaborar. Em especial ao professor Tércio pelo auxílio e presteza no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade: Alianise, Alini, Amanda, Camila, Clésio, Diogo, Jaison, Letícia, Lorena, Magda, Mariana, Maximiliano, Nathalie, Vítor, Rita e Rúbia, por me acolherem de braços abertos e pelo auxílio em vários momentos deste trabalho.

À minha família, pela força e por entenderem meus momentos de ausência; em especial aos meus pais, Luiz Roberto e Ângela, e minha irmã Luciana, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu namorado Roberto pelo amor, companheirismo e por ser meu porto seguro.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pelas condições de trabalho oferecidas.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de estudos.

E a todos àqueles que, mesmo não citados, contribuíram para este trabalho e participaram desta etapa de minha vida.

Muito obrigada.





## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Conjuntivite.....	13
3.2 Quinolonas.....	14
3.3 Besifloxacino.....	15
3.4 Relação estrutura-atividade.....	17
3.5 Mecanismo de ação e resistência.....	19
3.6 Interações medicamentosas.....	22
3.7 Efeitos adversos.....	22
3.8 Fotossensibilidade das quinolonas.....	23
3.9 Fototoxicidade ocular.....	24
4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS....	27
4.1 Ensaio microbiológico.....	29
4.1.1 Execução do ensaio.....	30
4.1.2 Procedimento.....	33
4.1.3 Validação.....	33
4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
4.2.1 Execução do ensaio.....	38
4.2.2 Validação.....	39
4.3 Análise estatística comparativa dos métodos desenvolvidos.....	43
5 ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE.....	45

5.1	Introdução.....	47
5.2	Parte experimental.....	49
5.2.1	Estudo preliminar da estabilidade.....	49
5.2.1.1	Execução do ensaio.....	49
5.2.1.2	Condições de estudo.....	50
5.2.2	Estudo da cinética de degradação.....	51
5.2.2.1	Condições de estudo.....	52
5.2.2.2	Cálculos cinéticos.....	53
6	ESTUDO DA CITOTOXICIDADE.....	55
6.1	Introdução.....	57
6.2	Parte experimental.....	59
6.2.1	Execução do ensaio.....	59
6.2.2	Procedimento.....	60
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Estrutura química do besifloxacino	16
<b>Figura 3.2</b>	Estrutura química básica das quinolonas	18
<b>Figura 6.1</b>	Estruturas do olho humano	57
<b>Figura 6.2</b>	Representação gráfica da separação das células mononucleares	61



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b>	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico para determinação de besifloxacino suspensão oftálmica	30
<b>Tabela 4.2</b>	Parâmetros fixados para determinação de besifloxacino por ensaio microbiológico - método difusão em ágar – técnica cilindros em placas	31
<b>Tabela 4.3</b>	Excipientes farmacêuticos presentes na suspensão de besifloxacino 0,6% com suas respectivas percentagens propostas para elaboração do placebo/branco	34
<b>Tabela 4.4</b>	Teste de recuperação aplicado ao ensaio microbiológico para determinação de besifloxacino	35
<b>Tabela 4.10</b>	Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações	38
<b>Tabela 4.11</b>	Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE	42



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSF	Besifloxacino
CBM	Concentração bacteriostática mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e.p.m	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
FQR	Fluoroquinolona resistente
FQS	Fluoroquinolona sensível
gl	Graus de liberdade
ICH	International Conference on Harmonisation
k	Constante de velocidade de reação
LDH	Lactato desidrogenase
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coefficiente de correlação de Pearson
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SQR	Substância Química de Referência
TEA	Trietilamina
t <sub>90%</sub>	Tempo de vida útil
USP	The United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta

UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
UV/VIS	Espectrofotometria na região ultravioleta e visível



## RESUMO

O presente trabalho relata o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de besifloxacino (BSF) em suspensão oftálmica, bem como estudo preliminar de estabilidade, cinética de degradação e citotoxicidade. O ensaio microbiológico de difusão em ágar- método de cilindros em placa foi realizado com *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 como microrganismo teste. Apresentou resultados satisfatórios, com especificidade, linearidade na faixa de 0,5 a 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , precisão, exatidão, e robustez. Soluções de BSF do produto acabado expostas à radiação UVA (352nm) e soluções placebo da formulação foram utilizadas para avaliar a especificidade do bioensaio. A robustez do método foi avaliada variando a concentração de microrganismo na camada inoculada. O desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi verificado através da especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. No método cromatográfico foi utilizada coluna Agilent® Eclipse Plus C18, fase móvel constituída por 0,5% de trietilamina (pH 3,0) e acetonitrila (74:26 v/v). O método apresentou-se específico, linear, no intervalo de 20 a 80 $\mu\text{g/mL}$ , preciso, exato e robusto. Os métodos microbiológico e CLAE validados foram comparados estatisticamente e verificou-se não haver diferença significativa entre eles. No estudo preliminar de estabilidade constatou-se estabilidade frente à degradação térmica no período avaliado e instabilidade frente à fotodegradação. Pôde-se sugerir que os excipientes presentes na formulação protegeram a substância ativa frente à radiação UV. A cinética de degradação, frente à radiação UVA, mostrou que as amostras de BSF seguem reação de primeira ordem enquanto que a SQR apresenta reação de segunda ordem. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que nas concentrações testadas, independentemente se houve ou não degradação à luz UVA, o BSF não alterou a membrana celular, sendo considerado não tóxico às células mononucleares humanas nas condições analisadas.

**Palavras-chaves:** besifloxacino, validação, CLAE, controle de qualidade, estabilidade, bioensaio.



## ABSTRACT

This paper describes the development and validation of analytical methodology for determination of besifloxacin (BSF) ophthalmic suspension, a preliminary stability study, degradation kinetics and cytotoxicity evaluation. The agar diffusion cylinder plate method microbiological assay was performed with *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 as test microorganism. It showed excellent results including specificity, linearity in the range of 0.5 to 2.0 g mL<sup>-1</sup>, precision, accuracy, and robustness. Solutions of BSF drug product exposed to UVA (352nm) and placebo solutions containing only excipients in the formulation, were used to evaluate the specificity of the bioassay. The robustness of the method was evaluated by varying the concentration of microorganism in the layer inoculated. The method by high performance liquid chromatography (HPLC) was validated through specificity, linearity, accuracy, precision and robustness analysis. The column chromatographic method used Agilent Eclipse Plus ® C18, mobile phase consisting of 0.5% triethylamine (pH 3.0) and acetonitrile (74:26 v / v). The method proved to be specific, linear in the range from 20 to 80 µg mL<sup>-1</sup>, precise, accurate, and robust. The microbiological and HPLC validated methods were compared statistically and no significant difference between them was found. In the stability study, it was evidenced a stable towards thermal degradation during the evaluation period and instability against photodegradation. It can be concluded that the excipients present in the formulation protected the active principle against UV radiation. The kinetics of degradation from UVA radiation showed that solutions of drug product follow first-order reaction, while BSF RS follow second-order reaction. Cytotoxicity evaluation demonstrated that, at all concentrations tested, regardless whether or not the degradation UVA light, the BSF does not alter the cell membrane, considered non-toxic to human mononuclear cells.

**Keywords:** besifloxacin, validation, HPLC, quality control, stability, bioassay.



# 1.INTRODUÇÃO



## 1.INTRODUÇÃO

A preocupação relativa à qualidade, quando associada à atividade produtiva, sempre foi aspecto inerente ao ser humano, que busca aperfeiçoar, desenvolver, superar limites, independentemente da atividade que exerça, a fim de atender aos anseios da sociedade como consumidora (PINTO *et al.*, 2010).

O avanço na ciência e tecnologia possibilitou à humanidade a produção de uma infinidade de medicamentos através de uma variedade de processos químicos e biológicos. Ao contrário do que ocorria antigamente, o processo moderno de desenvolvimento da medicina envolve inúmeros fatores e, como resultado, as questões de qualidade, segurança e eficácia tornaram-se mais profundas (WHO, 2007).

A industrialização de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos foi uma decorrência da evolução tecnológica, envolvendo complexidade crescente até obtenção do produto final acabado. Neste caso, as características essenciais da qualidade, esperadas pelo consumidor, são eficácia terapêutica, funcional e cosmética, além de segurança (PINTO *et al.*, 2010).

A qualidade é constituída sobre o medicamento durante todo o seu processo de concepção, desenvolvimento e fabricação. Fabricantes são os principais responsáveis pela qualidade de seus medicamentos, seguindo os princípios de boas práticas de fabricação. Depois que um produto sai das instalações do fabricante, distribuidores, dispensadores e usuários são responsáveis por manter a qualidade do produto através de armazenamento adequado, transporte, distribuição, dispensação e uso (WHO, 2007).

O programa de controle interno da qualidade é um conjunto de ações que visam a garantir a qualidade e reprodutibilidade dos processos e dos resultados produzidos por meio da verificação contínua dos fatores que interferem nessa. Deve ser visto como uma oportunidade de aprimoramento das atividades desenvolvidas no laboratório. A validação de procedimentos analíticos é um aspecto vital não apenas para os propósitos regulatórios, mas também para uma

aplicação eficiente e de longo prazo da metodologia desenvolvida (ERMER & PLOSS, 2005).

As principais agências reguladoras da fabricação e qualidade dos medicamentos têm empreendido a tarefa de uniformizar a validação de métodos analíticos dentro da indústria farmacêutica através dos guias da Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Um exemplo é o ICH Q10, que constitui para a indústria e para as autoridades reguladoras um respaldo para um sistema de qualidade efetivo, a fim de melhorar a qualidade e a disponibilidade de medicamentos de interesse à saúde pública. A implantação do ICH Q10 durante todo o ciclo de vida do produto facilitaria sua melhoria contínua, reforçando a ligação entre o desenvolvimento farmacêutico e sua fabricação (ICH, 2008).

O aumento na pesquisa e desenvolvimento de fármacos sintéticos nas últimas décadas reflete-se no amplo número de fármacos disponíveis. As fluoroquinolonas são um grupo de compostos quimioterápicos de origem sintética, caracterizadas pela eficácia terapêutica e farmacologia promissoras a cada geração desenvolvida (WOLFSON & HOOPER, 1989; SCOPER, 2008).

O besifloxacino é uma fluoroquinolona sintética quiral, desenvolvida para o tratamento tópico de infecções oftálmicas, e aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA), em maio de 2009. É a única fluoroquinolona oftálmica que não foi estudada primeiramente para uso sistêmico (CHANG & FUNG, 2010).

Começou a ser comercializado no Brasil a partir do segundo semestre de 2011, pela Bausch & Lomb, sob o nome de Besivance<sup>®</sup> na forma de suspensão oftálmica a 0,6%, formulada com tecnologia DuraSite<sup>®</sup> que permite que a substância ativa permaneça na superfície ocular por mais tempo (NESS *et al.*, 2010).

A maioria dos trabalhos científicos publicados aborda o uso terapêutico, experimentação em animais e ensaios clínicos com o besifloxacino, mas não há publicações sobre sua determinação por método de bioensaio. A metodologia validada descrita na literatura para determinação de besifloxacino é por cromatografia líquida acoplada a espectro de massas para determinação em



fluidos biológicos e tecidos (ARNOLD *et al.*, 2008; PROKSCH & WARD, 2010; TORKILDSEN *et al.*, 2010; DONNENFELD *et al.*, 2011).

A importância de desenvolver e validar metodologia analítica para este fármaco é justificada por seu potencial terapêutico, pela ausência deste tipo de informação específica na literatura, assim como pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos está relacionada à aparição de cepas resistentes, produto da administração de doses sub-terapêuticas.

No intuito de suprir essa falta de informações acerca de metodologias validadas, realizou-se neste trabalho o desenvolvimento e validação de metodologia por bioensaio e por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de besifloxacino. Além disto, foi feita análise preliminar da estabilidade da substância química de referência e da forma farmacêutica suspensão oftálmica que levou ao estudo da cinética de degradação do besifloxacino. Verificou-se, também, a citotoxicidade do besifloxacino submetido à degradação forçada pela radiação ultravioleta A (UVA) frente às células mononucleares humanas.



## 2.OBJETIVOS



## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliar quantitativamente o besifloxacino na forma farmacêutica suspensão oftálmica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método microbiológico, difusão em ágar-cilindros em placa, para doseamento do besifloxacino na forma farmacêutica suspensão oftálmica;
- Desenvolver e validar método analítico para determinação quantitativa de besifloxacino na forma farmacêutica suspensão oftálmica, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Realizar estudo preliminar de estabilidade térmica e fotoquímica da suspensão oftálmica de besifloxacino;
- Realizar estudo da cinética de degradação do besifloxacino, forma farmacêutica suspensão oftálmica, por meio dos métodos microbiológico e CLAE, previamente validados;
- Realizar ensaio de citotoxicidade do besifloxacino degradado frente à luz UVA e não degradado na forma farmacêutica suspensão oftálmica.



### 3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA





### 3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CONJUNTIVITE

Conjuntivite é um termo genérico para inflamação da conjuntiva causada por vários agentes infecciosos (bactérias, vírus ou fungos) e não infecciosos (alergia, causas químicas ou mecânicas). O organismo que causa a conjuntivite bacteriana tende a ser diferente de acordo com a idade do paciente. Em neonatos, o microrganismo predominante é *Chlamydia trachomatis*, seguido de *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Em crianças, os principais responsáveis são *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *S. aureus*. Em adultos, os principais causadores são *S. aureus* e *H. influenzae*. Outros microrganismos comumente envolvidos na conjuntivite bacteriana em adultos são *S. pneumoniae*, estafilococos coagulase-negativo e espécies de *Moraxella* e *Acinetobacter* (TARABISHY & JENG, 2008).

O período de incubação e de contágio da conjuntivite bacteriana é de 1-7 dias e 2-7 dias, respectivamente (HØVDING, 2008). Os pacientes podem ter um comprometimento uni ou bilateral dos olhos, apresentando eritema, inflamação, prurido, secreção purulenta formando crostas nos cílios (HUTNIK *et al.*, 2010).

O diagnóstico usualmente é clínico. Mesmo a conjuntivite bacteriana sendo tipicamente auto-limitada, o tratamento com antibiótico tópico pode trazer uma melhora clínica e microbiológica mais rápida, reduzindo o risco de contágio e complicações (HUTNIK *et al.*, 2010).

O uso tópico de fluoroquinolonas é considerado o tratamento padrão para conjuntivite bacteriana. No entanto, a prevalência de isolados resistentes fomenta a contínua busca e desenvolvimento de agentes mais potentes (KARPECKI *et al.*, 2009; COMSTOCK *et al.*, 2010a).

Outra aplicação para fluoroquinolonas tópicos é na prevenção de endoftalmite, uma complicação da cirurgia de catarata caracterizada por uma infecção intra-ocular que pode levar à perda da visão. O uso desses quimioterápicos tópicos é no intuito de reduzir a flora bacteriana na superfície

ocular e de prover uma concentração adequada na câmara anterior para provocar a morte de bactérias acidentalmente introduzidas no olho (KOCH *et al.*, 2005; DONNENFELD *et al.*, 2011).

### 3.2 QUINOLONAS

A descoberta do ácido nalidíxico, em 1962, e a sua introdução para uso clínico, em 1967, marcou o início de cinco décadas de desenvolvimento e uso de quinolonas (EMMERSON & JONES, 2003).

A aplicação prática do ácido nalidíxico como antimicrobiano tornou-se evidente logo após seu descobrimento. Por causa da polaridade de sua molécula (conjuga-se avidamente com as proteínas plasmáticas), apresenta um grande volume de distribuição, sendo inadequado para o tratamento de infecções sistêmicas. Contudo, tanto o ácido nalidíxico, quanto seu principal metabólito (7-hidroxi-metil) acumulam-se no trato urinário, sendo então utilizados no tratamento de infecções urinárias não complicadas (WOLFSON & HOOPER, 1989, HEEB *et al.*, 2011).

Até o desenvolvimento da flumequina, a primeira monofluoroquinolona, em 1976, nenhum dos compostos derivados do ácido nalidíxico tinha oferecido alguma vantagem significativa em comparação a ele. A flumequina foi o primeiro composto desenvolvido com um flúor na posição 6 e que dava indicações que modificações na estrutura química básica poderiam aumentar a ação contra Gram-positivos (EMMERSON & JONES, 2003).

As fluoroquinolonas (FQ) são uma classe de agentes antibacterianos sintéticos conhecidos pelo seu amplo espectro de ação (ARNOLD *et al.*, 2008). Derivados do ácido nalidíxico, pela adição de um grupo 6-flúor, têm um espectro terapêutico extensivo e melhoramento das propriedades farmacocinéticas (HEEB *et al.*, 2011).

### 3.3 BESIFLOXACINO

Besifloxacino, a nova fluoroquinolona sintética quirial, foi desenvolvida pela Bausch & Lomb para o tratamento tópico de infecções oftálmicas. A suspensão oftálmica de besifloxacino (Besivance<sup>®</sup>) é formulada com DuraSite<sup>®</sup>, um polímero sintético que ajuda a estabilizar pequenas moléculas em misturas aquosas (CHANG & FUNG, 2010). DuraSite<sup>®</sup> contém uma base policarbofílica que aumenta a viscosidade permitindo que o besifloxacino permaneça na superfície ocular por um tempo maior. Com isso, propicia administração menos freqüente para atingir a mesma eficácia, uma característica atraente para aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento (NESS, *et al.*, 2010). O tempo de permanência do besifloxacino na conjuntiva é de 4,7 horas, comparado a 3,0 horas para o moxifloxacino e de 2,9 horas para o gatifloxacino (O'BRIEN, 2012).

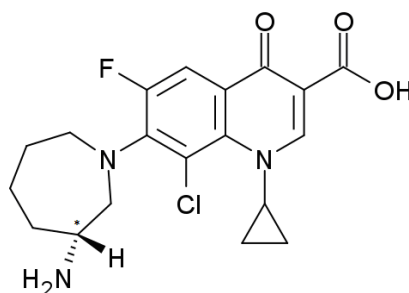
Besifloxacino tem o modo de uso mais favorável de todas as fluoroquinolonas (1 gota, 3 vezes ao dia, por 5-7 dias), o que favorece a adesão do paciente ao tratamento. A baixa adesão pode resultar em aumento dos desfechos clínicos, aumento dos custos com saúde e aumento dos níveis de resistência bacteriana devido a concentrações subótimas dos antimicrobianos (KHIMDAS *et al.*, 2011).

Apesar de conseguir obter uma concentração alta na superfície ocular, a concentração média sistêmica do besifloxacino após aplicação de 3 vezes ao dia é baixa, sendo menor que 0,5ng/mL. Este dado sugere uma probabilidade pequena de desencadear efeitos adversos sistêmicos após a utilização tópica de besifloxacino (O'BRIEN, 2012).

Estruturalmente (Figura 3.1), o besifloxacino apresenta um grupo N-1 ciclopropil, que confere um amplo espectro de atividade contra bactérias aeróbicas, e um substituinte 8-cloro (ARNOLD *et al.*, 2008; CAMBAU, *et al.*, 2009; CHANG & FUNG, 2010). Este último, em teoria, diminui o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, aumentando a potência do besifloxacino através de uma forte e equilibrada afinidade pelas enzimas

topoisomerase IV e DNA girase bacteriana. Além disso, o substituinte volumoso amino-azepinil em C-7 também pode contribuir para a segmentação da DNA girase, bem como proporcionar um espectro de ação mais amplo e potente contra organismos Gram-positivos (O'BRIEN, 2012).

Quimicamente o besifloxacino é (+)-7-[(3R)-aminoheptahidro-1H-azepin-1-il]-8-cloro-1-ciclopropil-6-fluor-4-oxo-1,4-deidroquinolona-3-ácido carboxílico. Sua fórmula química é  $C_{19}H_{21}ClFN_3O_3$  e sua massa molecular é 430,40 (CHANG & FUNG, 2010).



**Figura 3.1.** Estrutura química do besifloxacino

A molécula de besifloxacino tem um centro quiral e um par de enantiômeros. Os enantiômeros podem diferir consideravelmente em seus efeitos farmacológicos e tóxicos. Clinicamente, apenas o R-besifloxacino é utilizado. Isto porque apresenta maior atividade antibacteriana quando comparado ao seu isômero-S (WANG *et al.*, 2012).

O desenvolvimento clínico do besifloxacino para uso tópico oftálmico apontou consistente segurança e eficácia em ensaios clínicos com conjuntivite bacteriana (HAAS *et al.*, 2009). Estudos demonstraram superior eficácia do besifloxacino em relação ao veículo e equivalência clínica (não-inferioridade) quando comparado ao moxifloxacino (McDONALD *et al.*, 2009; COMSTOCK *et al.*, 2010b; SILVERSTEIN *et al.*, 2011). O tratamento com besifloxacino suspensão oftálmica, resultou em taxas de erradicação microbiana de 90% ou superior, e taxas maiores do que aquelas observadas em tratamento com veículo e similares àsquelas observadas com moxifloxacino solução oftálmica (MORRIS *et al.*, 2011).

A potência *in vitro* do besifloxacino foi similar ou superior quando comparada a outras quinolonas. Contra isolados Gram-positivos, besifloxacino foi o mais potente, seguido por moxifloxacino, gatifloxacino, levofloxacino e ciprofloxacino. Contra bactérias Gram-negativas, ciprofloxacino foi o mais potente, enquanto que o besifloxacino e o moxifloxacino tiveram potências similares (HAAS *et al.*, 2011a). Os valores de MIC (concentração inibitória mínima) variam de 0,015 a 4 µg/mL (O'BRIEN, 2012).

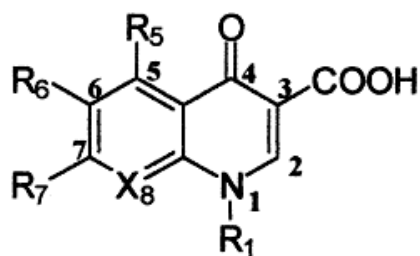
De maneira similar à tobramicina e a outras fluoroquinolonas indicadas para uso oftálmico, o besifloxacino apresentou índices concentração bactericida mínima: concentração inibitória mínima baixos (CBM:CIM), típicos de agentes bactericidas. No entanto, quando comparado com moxifloxacino e ciprofloxacino, o besifloxacino demonstrou incremento de potência bactericida e velocidade de ação quando testado contra isolados fluoroquinolonas-susceptíveis (FQS) e fluoroquinolonas-resistentes (FQR) dos quatro patógenos mais prevalentes em conjuntivite bacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (HAAS *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que o besifloxacino pode ter um efeito anti-inflamatório através da sua capacidade de inibir a produção de citocinas pelas células epiteliais da córnea. Além disso, também apresenta aumento de sua eficácia contra a maioria das citocinas pró-inflamatórias em doenças imunes e infecciosas, quando comparado, *in vitro*, com o moxifloxacino (ZHANG *et al.*, 2008; ZHANG & WARD, 2008).

Em geral, quando comparado com gatifloxacino e moxifloxacino, o besifloxacino apresenta uma maior rapidez na morte de bactérias a uma concentração inferior (HAAS *et al.*, 2011b).

### 3.4 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

As quinolonas representam um grupo de análogos químicos derivados de anel aromático bicíclico fundido a um anel heterocíclico de 6 membros contendo 1 a 4 átomos de nitrogênio (Figura 3.2) (O'DONNELL & GELONE, 2000).



**Figura 3.2.** Estrutura química básica das quinolonas.

Existem aspectos na estrutura química das quinolonas que têm impacto direto ou subsequente na sua atividade antimicrobiana:

#### Substituição na posição 1

A presença de grupamentos alquílicos nesta posição tem produzido vários compostos com potente atividade, sendo que a substituição etila tem demonstrado os mais altos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (APPELBAUN & HUNTER, 2000).

#### Substituições nas posições 3 e 4

Considera-se esta posição da molécula como essencial para a presença de atividade antimicrobiana. Acredita-se que a porção 4-oxo-carboxílica é o ponto de ligação entre a molécula e a enzima DNA-girase bacteriana, através da complexação com um íon metálico da mesma. Tentativas de substituição nesta parte da molécula afetam a estereoquímica da região e não têm produzido compostos com atividade antibacteriana significativa (APPELBAUN & HUNTER, 2000).

#### Substituição na posição 5

Em geral, observou-se que a presença de substituintes volumosos nesta posição diminui a atividade dos derivados quinolônicos contra Gram-positivos, provavelmente devido à interferência com os sítios de ligação enzimática da molécula nas posições 3 e 4. Alguns derivados que apresentam grupos metila e

amino têm maior atividade contra Gram-positivos (APPELBAUN & HUNTER, 2000; MANDELL & TILLOTSON, 2002).

#### Substituição na posição 6

A adição de halogênios, particularmente o flúor, nesta posição mostrou um aumento significativo tanto no espectro de ação contra Gram-positivos quanto na penetração na célula bacteriana (O'DONNELL & GELONE, 2000). A atividade contra Gram-positivos associada à fluorização nesta posição, combinada com a solubilidade em soluções oftálmicas, expandiu a utilidade clínica das quinolonas para o campo oftalmológico (BLONDEAU, 2004).

#### Substituição na posição 7

A presença de heterociclos, contendo átomos de nitrogênio (N) nesta posição, confere notável atividade contra Gram-positivos e *P. aeruginosa*. Os compostos com anel piperazínico substituído mostram maior atividade contra Gram-positivos, acredita-se que seja por causa de melhor penetração na célula bacteriana (APPELBAUN & HUNTER, 2000; MANDELL & TILLOTSON, 2002).

#### Substituição na posição 8

Modificações nesta posição afetam as propriedades antibacterianas contra organismos anaeróbios e a estabilidade frente à luz ultravioleta. Compostos de núcleo naftiridona com um grupo metoxila ligado ao nitrogênio, como o moxifloxacino e gatifloxacino, apresentam baixa fototoxicidade e boa atividade contra anaeróbios (APPELBAUN & HUNTER, 2000).

### 3.5 MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA

As fluoroquinolonas são agentes bactericidas que inibem seletivamente a DNA girase (topoisomerase II) e a topoisomerase IV bacterianas. A inibição dessas enzimas interfere na transcrição, replicação e separação do DNA

cromossomal bacteriano durante a divisão celular. DNA girase é o alvo primário na terapia antibiótica na maioria das bactérias Gram-negativas, enquanto que a topoisomerase IV é o alvo primário para as bactérias Gram-positivas (CAMBAU *et al.*, 2009; PATRICK, 2009).

O reconhecimento das duas enzimas-alvos tem importantes implicações para o desenvolvimento de resistência (HOOPER, 2001). A atividade sobre estas duas enzimas, teoricamente, reduz o desenvolvimento da resistência bacteriana porque a ocorrência simultânea de mutações em ambas as enzimas é altamente improvável (O'BRIEN, 2012).

A resistência a antibióticos entre os patógenos oculares vem crescendo em paralelo com o aumento da resistência entre patógenos sistêmicos. Os fatores que contribuem para o desenvolvimento dessa resistência entre os isolados oculares incluem o uso exagerado tanto de antimicrobianos para infecções sistêmicas quanto antimicrobianos tópicos para infecções nos olhos. Outros fatores a serem considerados são: regimes de doses inapropriados, uso indevido de antibióticos para infecções virais ou não bacterianas, duração prolongada do tratamento, globalização e migração (SHARMA, 2011).

Desde a introdução das antigas fluoroquinolonas para uso oftálmico, os relatos de resistência *in vitro* de isolados bacterianos oculares em relação àqueles compostos, vêm aumentando, especialmente sobre organismos Gram-positivos (HWANG, 2004).

FINTELMANN e colaboradores (2011) encontraram associação entre o uso de fluoroquinolonas e resistência a fluoroquinolonas em *S. aureus* ocular. Outros fatores de risco associados à resistência incluem idade avançada, imunossupressão sistêmica e recente hospitalização.

Além da resistência a antibacterianos oculares, a multiresistência representa a maior barreira para o sucesso clínico da terapia com fluoroquinolonas. Concentrações subterapêuticas nas células epiteliais da córnea e nos corpos ciliares podem levar à multiresistência associada a bombas de efluxo. Essas proteínas podem bombear os agentes antimicrobianos para fora das



células, levando a uma erradicação incompleta dos micróbios (BAROT *et al.*, 2011).

Os isolados com baixo nível de resistência, geralmente são provenientes de uma única mutação cromossomal. As mutações podem ocorrer tanto nos genes que codificam as duas principais enzimas-alvo das fluoroquinolonas (topoisomerases II e IV), como naqueles que codificam as proteínas das bombas de efluxo e da permeabilidade da membrana, afetando o transporte das fluoroquinolonas através da membrana celular bacteriana. Outro mecanismo de resistência às fluoroquinolonas reportado é mediado por plasmídios (HWANG, 2004; McDONALD & BLONDEAU, 2010).

O mais freqüente mecanismo descrito para explicar a multiresistência é a super-expressão de glicoproteína-P (P-gp), uma proteína trans-membrana transportadora. Um estudo demonstrou que altos níveis de expressão de P-gp, em nível de RNA mensageiro, foram detectados em células epiteliais da córnea expostas a fluoroquinolonas por 3 semanas. Esse resultado sugere que a exposição à fluoroquinolonas por longos períodos pode levar a uma super-expressão da proteína de efluxo transportador (BAROT *et al.*, 2011).

Como um mecanismo direto de resistência, as bombas de efluxo expõem o agente antimicrobiano assim que ele entra na membrana ou citoplasma, resultando em uma concentração intracelular subterapêutica. Esta diminuição na concentração intracelular pode predispor o microrganismo ao aparecimento de mecanismos de resistência adaptativa. Bactérias Gram-positivas expressam sistemas de efluxo para fluoroquinolonas, produzindo moderada resistência aos antimicrobianos da classe das quinolonas, com pouco ou nenhum reconhecimento sobre outros agentes antibacterianos (GERMAN *et al.*, 2008). Alguns autores sugerem a co-administração de inibidores das bombas de efluxo juntamente com o antimicrobiano para superar essa resistência mediada por efluxo (KARLA *et al.*, 2007; GERMAN *et al.*, 2008).

Mutações nos genes que codificam as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV são as principais causas de resistência clínica a fluoroquinolonas em *S. aureus*. Estudo realizado por SANFILIPPO e

colaboradores (2011) confirmou que o besifloxacino é menos afetado por mutações que causam aumento da resistência a outras fluoroquinolonas, possivelmente por sua combinação de anel 7-azepinil e 8-cloro substituinte formando uma interação única com a DNA-girase e topoisomerase IV.

### 3.6 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

A co-administração de quinolonas com sais di ou trivalentes diminui sua absorção. Dentre esses produtos inclui-se o alumínio ou magnésio presente em antiácidos, o zinco em multivitamínicos e suplementos com ferro e cálcio (O'DONNELL & GELONE, 2004).

Outro tipo de interação das quinolonas resulta na inibição de várias rotas metabólicas, especialmente das enzimas do citocromo P450. A inibição do sistema citocromo P450 pelas fluoroquinolonas resulta numa redução da depuração plasmática, podendo causar náuseas, vômito e convulsões durante a co-administração com teofilina (SCHOLAR, 2003).

Uma busca na literatura feita por CHANG & FUNG (2010) não encontrou publicações de interações medicamentosas com a suspensão oftálmica de besifloxacino. Entretanto isso não significa que ele não tenha potencial para interações medicamentosas. Uma aplicação ocular de outra medicação tópica oftálmica, 2-5 minutos após a primeira medicação, no mesmo olho, pode afetar a concentração, distribuição e eliminação da medicação.

### 3.7 EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos adversos mais comuns reportados para todas as quinolonas envolvem o trato gastrointestinal (náusea, anorexia, vômito, dor abdominal, diarreia, distúrbio do paladar) e o sistema nervoso central (tontura, dor de cabeça, sonolência, convulsão, psicose) (DE SARRO & DE SARRO, 2001; STAHLMANN, 2002; OWENS & AMBROSE, 2005).

Há limitação de dados na literatura sobre reações adversas do besifloxacino: sendo um análogo da estrutura básica da quinolona, teoricamente o besifloxacino pode apresentar algum efeito fototóxico. Em um estudo de toxicidade de dose oral repetida com besifloxacino observou-se alguns efeitos adversos transitórios e reversíveis (ROY *et al.*, 2011).

Os efeitos adversos relatados para o besifloxacino suspensão oftálmica são aqueles comuns a pacientes com conjuntivite bacteriana aguda: visão borrada, dor nos olhos, irritação nos olhos, prurido e hiperemia conjuntival (COMSTOCK *et al.*, 2010b; O'BRIEN, 2012).

### 3.8 FOTOSSENSIBILIDADE DAS QUINOLONAS

Fotosensibilidade induzida por medicamentos geralmente é iniciada pela absorção de energia luminosa pelo fármaco e, em seguida, provoca reações químicas no corpo. Estudiosos apontaram possíveis mecanismos de reação para a fototoxicidade: a primeira possibilidade é que fármacos fotoativados ligam-se covalentemente a componentes celulares como DNA e proteínas; a outra possibilidade é que o fármaco transfere a energia absorvida a moléculas de oxigênio, formando espécies reativas de oxigênio que causam danos não específicos ao corpo (MATSUMOTO *et al.*, 1992; MARUTANI *et al.*, 1993; ROSEN *et al.*, 1997; GUIDI *et al.*, 2011).

Dois tipos de reações de fotosensibilidade têm sido associadas à terapia com fluoroquinolonas: reações fotoalérgicas e respostas fototóxicas. Reações fotoalérgicas são raras e dependem de exposição prévia a fluoroquinolona. Em contraste, as respostas fototóxicas são mais comuns e podem desenvolver-se sem exposição prévia a fluoroquinolona se a dose do fármaco fotolábil e a exposição à luz UVA forem suficientemente altas (MANDELL & TILLOTSON, 2002; YABE *et al.*, 2005).

Halogenação da posição C-8 é responsável por muitas das reações fotosensíveis que ocorrem durante o tratamento com fluoroquinolonas. Fármacos dessa classe, com um flúor ou um cloro na posição C-8, exibem

reações fototóxicas mais severas, um hidrogênio substituinte apresenta fototoxicidade moderada, enquanto que um grupamento metoxi substituinte na mesma posição, não é fototóxico (MANDELL & TILLOTSON, 2002; YABE *et al.*, 2005).

### 3.9 FOTOTOXICIDADE OCULAR

Para uma reação fotoquímica ocorrer no olho, a radiação ultravioleta (UV) ou luz visível precisa ser absorvida em um tecido ocular em particular. A córnea humana filtra toda a radiação abaixo de 295nm, enquanto o cristalino humano adulto absorve a remanescente UV-B e toda UV-A (295-400 nm), então apenas a luz visível alcança a retina (ZHAO *et al.*,2010).

Fármacos que absorvem abaixo de 295 nm podem induzir reações fototóxicas no cristalino humano. Quinolonas e fluoroquinolonas absorvem radiação UV e induzem estados tripletes de longa vida que interagem com oxigênio produzindo oxigênio singlete, superóxido e outras espécies reativas. Estes podem causar danos no cristalino, levando a perda de transparência e catarata *in vivo*. Se o fármaco fotossensibilizante liga-se a proteínas no cristalino o tempo de retenção no cristalino eleva-se e o dano aumenta (ZHAO *et al.*,2010).

A retina consome relativamente altos níveis de oxigênio, sendo facilmente oxigenada devido à suplementação vascular vinda do plexo coróide. Vários pigmentos nas células da retina geram espécies reativas de oxigênio e causam respostas fotossensibilizantes (SHIMODA *et al.*, 1993).

Um estudo envolvendo fluoroquinolonas utilizadas para combater infecções oculares, demonstrou que estas absorviam radiação UV, tendo um potencial fotossensibilizante. O dano fototóxico causado tanto nas células epiteliais quanto nas proteínas do cristalino pode acarretar em opacidade do mesmo, levando ao desenvolvimento de catarata (ZHAO *et al.*,2010).

Embora as fluoroquinolonas induzam apenas danos moderados a proteínas do cristalino, esses danos não podem ser reparados e são cumulativos. Por isso, é necessário tomar algumas precauções para prevenir a radiação UV de alcançar os

olhos (como o uso de óculos de sol apropriados que bloqueiam os raios UVA e UVB), enquanto se estiver fazendo uso destes antimicrobianos (ZHAO *et al.*,2010).



4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS  
ANALÍTICOS QUANTITATIVOS





## 4. ANÁLISE QUANTITATIVA

### 4.1 ENSAIO MICROBIOLÓGICO. MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR – CILINDROS EM PLACA.

No estudo de antimicrobianos e no tratamento das doenças infecciosas, os conceitos de sensibilidade e resistência bacteriana fundamentam-se na correlação entre a concentração inibitória mínima (CIM) e os níveis plasmáticos alcançados pelo antimicrobiano administrado. Para se obterem concentrações plasmáticas que se caracterizem com atividade biocida ou biostática, é necessário que a potência do antimicrobiano esteja adequada nas preparações farmacêuticas que serão administradas ao paciente. Neste aspecto, é crescente a preocupação com a qualidade dos medicamentos. A atividade (potência) de antimicrobianos pode ser demonstrada sob condições adequadas através de seu efeito inibitório sobre o crescimento microbiano. Uma redução na atividade antimicrobiana pode revelar alterações sutis, não demonstradas por métodos químicos (PINTO *et al.*, 2010).

O método de difusão em ágar relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento com a dose da substância ensaiada. É fundamentalmente um método físico, no qual um microrganismo é usado como revelador. Este método emprega um meio de cultura sólido inoculado (ágar), distribuído em placas, em sistema de mono ou bicamada, através do qual a substância-teste se difunde. A solução-teste é aplicada sobre a superfície deste meio em uma área restrita delimitada por cilindros, conforme delineamento de escolha, e as placas são então incubadas. O crescimento do microrganismo ocorre respeitando as áreas onde tenha ocorrido a difusão do antimicrobiano, gerando contraste e resultando na zona de inibição de crescimento. O delineamento escolhido foi o ensaio balanceado ou fatorial com 3 doses (3x3), no qual se determina a potência do antimicrobiano através do emprego de 3 concentrações do padrão e 3 de amostra, com razões idênticas, numa mesma placa (PINTO *et al.*, 2010).

A constituição do meio, capacidade do cilindro, espessura de ágar, pH da solução diluente, temperatura e tempo de incubação são fatores que determinam a otimização do ensaio (PINTO *et al.*, 2010).

Para a quantificação de besifloxacino (BSF) foram desenvolvidos vários ensaios preliminares, mudando variáveis como as concentrações da substância de referência, o pH da solução diluente, o meio de cultura e o microrganismo, a fim de estabelecer as condições experimentais ideais (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1.** Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico para determinação de besifloxacino suspensão oftálmica.

Parâmetros	Descrição
Meios de cultura	Meio n° 1 de Grove-Randall Meio n° 11 de Grove-Randall
Microrganismos	<i>Kochuria rhizophila</i> ATCC 9341 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
Solução diluente	Água Solução tampão pH 6,0 Solução tampão pH 7,0
Concentração da solução padrão	0,5; 1,0; 2,0 µg/MI 0,5; 1,5; 4,5 µg/mL
Concentração do inóculo	1% 2%

#### 4.1.1. Execução do ensaio

A partir dos resultados obtidos com os diferentes microrganismos e meios de cultura, foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico, que se encontram apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Parâmetros fixados para determinação de besifloxacino pelo ensaio microbiológico - método difusão em ágar – cilindros em placa.

Parâmetros	Descrição
Meio de cultura (camada base e inóculo)	Meio n° 11 de Grove-Randall
Microrganismo	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
Solução diluente	Água
Concentração da solução padrão	0,5; 1,0; 2,0 µg/mL
Concentração do inóculo	2%
Temperatura de incubação	35±2°C
Tempo de incubação	18 horas

#### 4.1.1.1. Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura Grove-Randall n° 1 (MERCK), para a manutenção e repique do microrganismo teste, e n° 11 (MERCK) como constituinte das camadas base e inoculada com o microrganismo teste.

Os meios foram pesados nas quantidades especificadas pelo fabricante, dissolvidos em água sob aquecimento e finalmente esterilizados em autoclave (Webeco C) a 121 °C, durante 15 minutos.

#### 4.1.1.2. Inóculo

As culturas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 122228 foram repicadas com alça de platina para meio inclinado Grove-Randall n° 1, e mantidas para seu desenvolvimento em estufa microbiológica (Heraeus B5042) a temperatura entre 35-37 °C, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo a 580 nm em espectrofotômetro Analyser Modelo 5042, obtendo-se transmitância de 25% ± 2% (FB 5, 2010). Uma alíquota desta suspensão foi transferida para quantidade suficiente do meio Grove-Randall n° 11, para obter uma concentração de 2% do inóculo, e mantida em banho-maria (Biopar BMD01ESP) a 47 °C±1 °C.

#### 4.1.1.3. Preparo da substância de referência (SQR) - Padrão

A substância química de referência (SQR) utilizada para o desenvolvimento do trabalho foi o cloridrato de BSF, com teor declarado de 99,6%, adquirida pela Sequoia Research Products (Oxford, UK), conforme especificado no certificado de análise.

Pesou-se uma quantidade de BSF substância química de referência (SQR) equivalente a 10 mg de BSF base e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL com auxílio de 50 mL de solução diluente (água). Levou-se a banho ultrassônico durante 20 minutos e transcorrido esse tempo, completou-se o volume com solução diluente. Alíquotas de 100, 200 e 400  $\mu\text{L}$  desta solução, medidas com micropipeta automática (Transferpette, Brand), foram transferidas a balões volumétricos de 10 mL e completados a volume com solução diluente, obtendo-se concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu\text{g/mL}$  de BSF, P1, P2 e P3, respectivamente.

#### 4.1.1.4. Preparo das amostras

As amostras de Besivance<sup>®</sup>, suspensão oftálmica 0,6%, foram gentilmente cedidas pela Bausch & Lomb em evento de lançamento do produto no Brasil e também adquiridas em comércio local.

Após uma inversão do frasco de amostra, uma alíquota equivalente a 5 mg de BSF base foi retirada com o uso de micropipeta automática e transferida a balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 50 mL de solução diluente e levada a banho ultrassônico durante 20 minutos. O volume foi completado com solução diluente. Alíquotas de 100, 200 e 400  $\mu\text{L}$  desta solução, medidas com micropipeta automática, foram transferidas a balões volumétricos de 10 mL e completados a volume com solução diluente, obtendo-se concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu\text{g/mL}$  de BSF, A1, A2 e A3, respectivamente.

### **4.1.2. Procedimento**

Foram utilizadas 6 placas de Petri esterilizadas (20,0 mm de altura x 100,0 mm diâmetro) para cada ensaio, as quais foram colocadas em capela de fluxo laminar (Veco HLFS-12M) e adicionadas de 20 mL de meio n° 11 para a camada base. Após solidificação desta camada foram adicionados 5 mL de meio n° 11 inoculado (2%) em cada placa. Em seguida foram distribuídos 6 cilindros de aço (6,0 mm diâmetro interno x 8,0 mm diâmetro externo x 10 mm altura) na superfície do ágar, mantendo uma distância equivalente entre os mesmos. A cada cilindro foram adicionados, alternadamente, 200 µL das soluções padrão e amostra. As placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 35 °C ± 2 °C, durante 18 horas. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo<sup>®</sup>, Tóquio, Japão).

### **4.1.3. Validação**

#### **4.1.3.1. Especificidade**

A especificidade foi estudada a partir da análise da amostra em presença dos excipientes da formulação (placebo) e de produtos de degradação causados pela luz UVA para verificar se os mesmos não interferiam na determinação de BSF.

Solução amostra de BSF em suspensão oftálmica de 50µg/mL foi preparada conforme item 4.2.1.4. e submetida à luz UVA por 2 horas. Transcorrido este tempo, foram retiradas alíquotas desta solução de modo a obter concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL e distribuídas os cilindros conforme item 4.1.2. De maneira similar foi preparada e distribuída uma solução com os excipientes presentes na formulação.

Os excipientes da suspensão de BSF 0,6%, obtidos a partir da bula do medicamento Besivance<sup>®</sup>, e a formulação proposta para o placebo estão listados na Tabela 4.3. (KIBBE, 2000; ROWE *et al.*, 2006).

**Tabela 4.3.** Excipientes farmacêuticos presentes na suspensão de besifloxacino 0,6% com suas respectivas percentagens propostas para elaboração do placebo

Excipiente	Percentagem proposta
Cloreto de benzalcônio	0,01%
Policarbofila	0,50%
Manitol	10,00%
Polaxamer 407	15,00%
Cloreto de sódio	0,45%
Edeteato dissódico diidratado (EDTA)	0,05%
Água para injeção	q.s.p 100%

#### 4.1.3.2. Linearidade

O delineamento 3x3 foi utilizado no ensaio e os parâmetros de inclinação, desvio do paralelismo e coeficiente de correlação foram determinados. A equação da reta foi obtida por meio do método dos mínimos quadrados e a validade dos dados foi avaliada mediante análise de variância (ANOVA).

#### 4.1.3.3. Precisão

Ensaio foram realizados durante três dias, utilizando-se seis placas preparadas segundo o descrito no item 4.2.2. A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas por meio do desvio padrão relativo (DPR) dos valores de atividade percentual de BSF, determinados nos ensaios pela equação de Hewitt.

#### 4.1.3.4. Exatidão

Foi aplicado o teste de recuperação, onde soluções de BSF amostra foram adicionadas de alíquotas de uma solução de BSF SQR, a fim de obter valores 10% acima da concentração teste. A exatidão foi expressa como percentagem de recuperação da substância de referência, para cada nível de concentração avaliado.

## Teste de recuperação

Foram preparadas, em triplicata, soluções amostra com concentração de 50 µg/mL. Alíquotas destas soluções foram transferidas, individualmente, para balões volumétricos de 10 mL, de modo a obter concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL, R1, R2 e R3, respectivamente. A partir de uma solução de BSF SQR de 5 µg/mL, foram transferidas alíquotas de 100, 200 e 400 µL para R1, R2 e R3 respectivamente, completando-se o volume com solução diluente. As concentrações finais obtidas foram 0,55, 1,1 e 2,2 µg/mL para R1, R2 e R3 (Tabela 4.4). A percentagem de recuperação (% R) foi calculada por meio da fórmula:

$$\% R = \frac{(C_F - C_A) \times 100}{C_R}$$

onde  $C_F$  é a concentração da solução R1, R2 ou R3;  $C_A$  é a concentração da amostra e  $C_R$  é a concentração teórica da substância de referência adicionada.

**Tabela 4.4** Teste de recuperação aplicado ao ensaio microbiológico para determinação de besifloxacino.

	Vol. de amostra (50 µg/mL) (µL)	Vol. adicionado de BSF SQR (5 µg/mL) (µL)	Concentração final (µg/mL)*
R1	100	100	0,55
R2	200	200	1,10
R3	400	400	2,20

\*cada amostra foi realizada em triplicata

### 4.1.3.5. Robustez

Para avaliação da robustez do método, variou-se a concentração do meio inoculado no doseamento do BSF. Foi feita a quantificação de BSF utilizando-se meio inoculado nas concentrações de 1,8 e 2,2%.

## 4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica cromatográfica que teve seu desenvolvimento mais intenso nos últimos anos, levando à fabricação de melhores colunas, detectores e softwares de controle. A maioria de suas aplicações nas análises farmacêuticas concentra-se na determinação quantitativa de fármacos nas formulações. Estas análises normalmente não requerem grandes quantidades de tempo a ser gasto, podendo ser otimizadas através da escolha de fases móveis, da seleção de colunas e detectores de modo que as análises de misturas complexas possam ser realizadas (WATSON, 2005).

Já existe uma boa compreensão prática da separação cromatográfica e como isto pode variar de acordo com a amostra e as condições experimentais. Todos os procedimentos sistemáticos no desenvolvimento da metodologia por CLAE devem ser baseados no conhecimento do processo cromatográfico. Portanto, antes de começar o ensaio é preciso conhecer a amostra a ser analisada: saber o número de compostos presentes, suas estruturas químicas, peso molecular, seus espectros no ultravioleta, solubilidade, concentrações. A técnica de CLAE pode ser analítica ou preparativa. O objetivo da técnica analítica é obter informações sobre a composição da amostra. Já a preparativa, objetiva o isolamento de produto purificado para posterior uso (SNYDER, *et al.*, 1997).

Obter separação aceitável e detecção dos compostos são os primeiros passos para que uma metodologia possa ser realizada durante longos períodos por outros laboratórios também. O método utilizado com um produto ou um processo, pode ser submetido à aprovação regulamentar interna e oficial, envolvendo agências como FDA, ANVISA, ICH. Muitas agências oficiais estabelecem guias ou procedimentos padrões para a validação de metodologias. A transferência de metodologia entre laboratórios é melhor realizada através de um processo sistemático de validação, cujo verdadeiro objetivo é desafiar o método e determinar os limites de variabilidade permitidos para as condições necessárias para executar o método (SNYDER, *et al.*, 1997).



Procurou-se na literatura científica trabalhos que abordassem a determinação de BSF. Foram encontrados alguns trabalhos utilizando CLAE para determinação de BSF em fluidos biológicos e tecidos, mas nenhum abordava a determinação do BSF com enfoque no controle de qualidade do fármaco em forma farmacêutica:

- ARNOLD e colaboradores (2008) determinaram BSF em lágrima utilizando CLAE acoplado a massas, com fase móvel composta de formato de amônio 5mM:água, pH3,25, em combinação com acetonitrila:metanol (20:80 v/v);
- BALZLI e colaboradores (2010) determinaram BSF em humor aquoso, utilizando detector UV, 296nm, e como fase móvel acetonitrila:tampão ácido fosfórico/fosfato de sódio 31mM, pH 3,0, na proporção de 28:72 v/v;
- TORKILDSEN e colaboradores (2010) utilizaram CLAE acoplado a massas para determinar BSF em biópsia de conjuntiva. A fase móvel empregada era composta de acetonitrila:água com 0,2% ácido fórmico (20:80 v/v);
- DONNENFELD e colaboradores (2011) determinaram BSF em humor aquoso por CLAE acoplado a massas, utilizando acetonitrila:água com 0,2% de ácido fórmico (20:80 v/v) como fase móvel;
- WANG e colaboradores (2012) empregaram CLAE-UV para determinação de impureza enantiomérica de BSF. Para tanto foi utilizado metanol:tampão fosfato monobásico de potássio (20mM, pH 3,0) na proporção de 50:50 v/v.

Baseado na escassez de informação sobre a quantificação de BSF em forma farmacêutica e, tendo como suporte os trabalhos envolvendo fluidos biológicos e tecidos, desenvolveu-se e validou-se um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do BSF na forma farmacêutica suspensão oftálmica.

#### 4.2.1. Execução do ensaio

Otimizou-se um método para quantificação de BSF na matéria-prima (SQR) e na forma farmacêutica suspensão oftálmica, utilizando coluna C18 (Agilent Eclipse Plus 5 $\mu$ m, 150mm x 4,6mm), detecção no ultravioleta (295nm), trietilamina 0,5% pH 3,0 : acetonitrila (74:26 v/v) como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e temperatura de análise 25 °C. Foi utilizado cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent (Santa Clara, CA, EUA) modelo de bombas quaternárias Q1311A, injetor automático ALS-G1329A, equipado com forno TCC-G1315B, detector de arranjo de diodos G1315B e gestor de sistema ChemStation para cálculo de dados e respostas do sistema.

As fases móveis preparadas foram filtradas por meio de membrana de nylon com 0,45 $\mu$ m de diâmetro de poro (Millipore) e desaeradas através de fluxo constante de gás hélio durante as análises.

A conformidade do sistema cromatográfico deve ser avaliada de acordo com os parâmetros e recomendações apresentados na Tabela 4.10 (SHABIR, 2003).

**Tabela 4.10.** Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetros	Recomendação
Fator de capacidade ( $k'$ )	O pico principal deve estar afastado dos demais picos e do pico não retido, geralmente $k' > 2,0$ .
Repetibilidade	É aconselhável $DPR \leq 1\%$ para $n \geq 5$ .
Resolução (RS)	$R_s > 1,5$ entre o pico de interesse e o do interferente potencial mais próximo (impureza, excipiente, padrão interno, produto de degradação).
Assimetria (TF)	$TF \leq 2$ .
Pratos Teóricos (N)	Em geral deve ser maior que 2000.

## **4.2.2. Validação**

### **4.2.2.1. Especificidade**

Para avaliar a especificidade do método, foram preparadas soluções de BSF SQR e de placebo da suspensão oftálmica na concentração de 50 µg/mL. A mistura placebo foi composta pelos excipientes descritos no item 4.1.3.4.

A especificidade também foi verificada a partir da avaliação dos prováveis produtos de degradação que poderiam interferir na determinação. As soluções amostra foram preparadas na concentração de 500 µg/mL utilizando água ultra-pura como diluente e degradadas como segue:

Degradação térmica: 10 mL da solução amostra de BSF foi colocado em tubo de ensaio com rosca, fechado e mantido em estufa (Biomatic) a 60 °C por 24 horas. Após este período o conteúdo do tubo foi diluído na fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL.

Degradação fotoquímica UVA: 2 mL da solução amostra de BSF foram transferidos para cubetas descartáveis e mantidas por 1 hora expostas a uma distância de 10 cm da lâmpada UVA (Light Express<sup>®</sup>, 352 nm, 30W), em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm). Após este período o conteúdo das cubetas foi diluído na fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL.

Degradação fotoquímica UVC: 2 mL da solução amostra de BSF foram transferidos para cubetas descartáveis e mantidas por 1 hora expostas a uma distância de 10 cm da lâmpada germicida Daylight F30T8 UV-C (254 nm) com potência de 30 watts, em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm). Após este período o conteúdo das cubetas foi diluído na fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL.

Degradação oxidativa: o equivalente a 5mg de BSF foi transferido para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com peróxido de hidrogênio 3% e 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e 30%, respectivamente). Deixou-se a solução reagir por um período de 1 hora (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) e 16 horas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%). Após este período as soluções foram diluídas na fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL.

Degradação ácida: preparou-se soluções amostra de BSF na concentração de 500 µg/mL em HCl 1,0 M e deixadas reagir por 1 hora. Após este período a solução foi neutralizada com NaOH 1,0M e diluída em fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL.

Degradação básica: preparou-se soluções amostra de BSF na concentração de 500 µg/mL em NaOH 1,0 M e deixadas reagir por 1 hora. Após este período a solução foi neutralizada com HCl 1,0M e diluída em fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL.

Todas as soluções obtidas ( $C_{\text{final}} = 50 \mu\text{g/mL}$ ) foram filtradas com filtro de 0,45µm de diâmetro de poro e, em seguida, procedeu-se a análise cromatográfica. Os cromatogramas foram avaliados a fim de detectar possíveis interferentes na especificidade do método. A detecção por arranjo de fotodiodo também auxilia na determinação da especificidade do método, fornecendo provas da pureza do pico de BSF.

#### 4.2.2.2. Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela construção de curvas padrão, utilizando soluções de SQR de BSF na faixa de 20 a 80µg/mL.

Para construção das curvas padrão, pesou-se uma quantidade de BSF SQR equivalente a 10 mg de BSF base e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 20 mL, com auxílio de 10 mL de solução diluente (água ultrapura). Levou-se a banho ultrassônico durante 20 minutos e transcorrido esse tempo, completou-se o volume com solução diluente, obtendo-se uma solução

com concentração de 500µg/mL. A partir desta, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos e completados os volumes com água ultrapura para obtenção de soluções com concentrações finais de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80µg/mL. Cada concentração foi preparada em triplicata e foram feitas três determinações.

As curvas padrão foram obtidas pela construção de gráficos de concentração versus área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a ANOVA foi realizada para verificação da linearidade do método.

#### 4.2.2.3. Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia).

Para o preparo das soluções amostra foram utilizados 6 frascos de amostra. Após uma inversão de cada frasco, uma alíquota equivalente a 5 mg de BSF base foi retirada de cada frasco de amostra com o uso de micropipeta automática e transferida a balão volumétrico de 10 mL com auxílio de 5 mL de solução diluente e levada a banho ultrassônico, durante 20 minutos. O volume foi completado com solução diluente obtendo-se uma solução com concentração de 500µg/mL. A partir desta, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos e completados os volumes com água ultrapura para obtenção de soluções com concentrações finais 50µg/mL.

A repetibilidade foi avaliada através das áreas absolutas obtidas quando seis soluções amostra de 50µg/mL foram ensaiadas no mesmo dia. Para a precisão intermediária soluções amostra (50µg/mL) foram analisadas em três dias diferentes e comparados os resultados. O desvio padrão relativo foi determinado, sendo que este não deve ultrapassar 5% para que o método seja considerado preciso (BRASIL, 2003).

#### 4.2.2.4. Exatidão

O teste de recuperação foi efetuado adicionando quantidades conhecidas da substância de referência de BSF a uma solução amostra de concentração conhecida.

A partir de uma solução amostra de 500µg/mL (A) e de solução SQR de 500µg/mL foram feitas soluções em triplicata de modo a obter concentrações finais de 50, 60 e 70 µg/mL (R1, R2 e R3 respectivamente), conforme Tabela 4.11:

**Tabela 4.11.** Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE

	Vol. de amostra (500µg/mL) (mL)*	Vol. adicionado de BSF SQR (500µg/mL) (mL)*	Concentração final (µg/mL)
A	0,8	-	40
R1	0,8	0,2	50
R2	0,8	0,4	60
R3	0,8	0,6	70

\* alíquotas transferidas a balões volumétricos de 10mL.  
Para cada solução foram realizadas três determinações.

A percentagem de recuperação (% R) foi calculada através da fórmula:

$$\% R = \frac{(C_F - C_A)}{C_R} \times 100$$

onde  $C_F$  é a concentração da solução R1, R2 ou R3;  $C_A$  é a concentração da amostra e  $C_R$  é a concentração teórica da substância de referência adicionada

#### 4.2.2.5. Robustez

A robustez do método foi testada através de variações no pH da fase móvel, na proporção de trietilamina na fase móvel, na vazão e mudanças na proporção de acetonitrila e trietilamina na fase móvel.

#### 4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Com o objetivo de avaliar a capacidade de utilizar os métodos desenvolvidos indistintamente para a quantificação de BSF em suspensão oftálmica, realizou-se análise estatística dos dados obtidos neste trabalho, empregando como ferramenta o teste t de *Student*.





## 5. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE



## 5. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

### 5.1 INTRODUÇÃO

A estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

As razões para determinar a estabilidade de produtos farmacêuticos englobam tanto razões legais quanto de saúde pública. A razão legal está no fato de que todos os medicamentos devem cumprir com as condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança durante o período em que se encontram no mercado até o momento de serem usados. Sua relevância na saúde pública está embasada no fato que a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (NUDELMAN, 1975).

A aplicação de alguns princípios físico-químicos nos estudos de estabilidade tem provado ser muito vantajoso no desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis. Através do uso desta metodologia é possível extrapolar os resultados obtidos a partir de condições de armazenamento exageradas com o intuito de prever a estabilidade para períodos de tempo prolongado de armazenamento em prateleira. Os fatores que podem alterar um produto ao longo do tempo são temperatura, radiações, umidade, presença de oxigênio (ou outros gases atmosféricos), pressão, mudanças de pH, interações, contaminação microbiana, entre outros. As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Portanto, para que o estudo seja

adequado, há que se aplicar princípios de cinética química (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

A finalidade dos testes de estabilidade é proporcionar provas sobre como a qualidade de um fármaco ou produto acabado varia com o tempo sob a influência de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, e para estabelecer o prazo de validade do medicamento e condições de armazenamento recomendadas (ICH, 2003).

Os estudos de estabilidade compreendem duas etapas de avaliação: testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados de estabilidade estão relacionados com os processos de degradação, os quais envolvem reações químicas que consomem energia e podem aumentar em função da temperatura. São destinados a aumentar a velocidade de degradação química ou a variação física de um medicamento, submetendo, para isso, as formulações farmacêuticas em estudo a condições drásticas de temperatura, umidade, luz, entre outros, por um determinado período de exposição. Já os testes confirmatórios são aqueles realizados para definir as condições utilizadas na manipulação, embalagem e rotulagem do insumo farmacêutico ativo. (NUDELMAN, 1975; ICH, 2003).

Nas últimas três décadas, a literatura tem mostrado como um grande número de fármacos são reativos quando expostos à luz ambiente, onde a radiação UVA representa em torno de 90% da radiação UV solar que efetivamente chega à superfície do planeta. Este processo é um dos fatores responsáveis pela geração de diversos efeitos colaterais. A radiação UVA pode gerar reações de fotossensibilização tanto ao penetrar na derme quanto ao atingir o fluxo de sangue por via cutânea; em ambos dos casos, os fármacos podem desencadear tais reações. A fotoreatividade das fluoroquinolonas está fortemente modulada pela natureza e posição dos substituintes ligados à estrutura das quinolonas. As fluoroquinolonas sofrem diversos processos fotoquímicos como a desalogenação, oxidação do substituinte amino da posição C-7, descarboxilação, formação de ânion superóxido e geração de oxigênio singlete (GUIDI *et al.*, 2011).

Foram realizados testes preliminares, utilizando-se fatores como temperatura elevada e exposição à luz ultravioleta, a fim de verificar a degradação do BSF pelo método CLAE previamente validado. O estudo preliminar permite determinar o fator ou fatores degradantes, bem como fornece dados aproximados da cinética da reação. Devido à conhecida fotoreatividade das fluoroquinolonas, e também por se tratar de uma suspensão oftálmica sem restrições de uso durante o dia, optou-se por realizar um estudo da cinética de degradação em radiação UVA do BSF na sua forma farmacêutica por método microbiológico difusão em ágar, acompanhado por CLAE.

## 5.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.2.1. Estudo preliminar da estabilidade do BSF

#### 5.2.1.1. Execução do ensaio

##### Preparo da substância de referência

Pesou-se uma quantidade de BSF SQR equivalente a 10 mg de BSF base e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 20 mL com auxílio de 10 mL de solução diluente (água). Levou-se a banho ultrassônico durante 20 minutos e transcorrido esse tempo, completou-se o volume com solução diluente obtendo-se uma solução de concentração de 500 µg/mL.

##### Preparo das amostras

Uma alíquota equivalente a 5 mg de BSF base foi retirada do frasco de amostra com o uso de micropipeta automática e transferida a balão volumétrico de 10 mL com auxílio de 5 mL de solução diluente (água) e levada a banho ultrassônico durante 20 minutos. O volume foi completado com solução diluente a fim de obter uma solução com concentração de 500 µg/mL.

### 5.2.1.2. Condições de estudo

As soluções de SQR e de amostra foram avaliadas quanto ao teor residual de BSF e à possível formação de produtos de degradação. O monitoramento da degradação foi efetuado através do método CLAE previamente validado. As condições empregadas estão descritas abaixo:

Degradação fotoquímica UVA: alíquotas de solução SQR e amostra na concentração de 500 µg/mL foram transferidas para cubetas de quartzo descartáveis e expostas à luz ultravioleta a uma distância de 10 cm da lâmpada UVA (Light Express<sup>®</sup>, 352 nm, 30W), em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm). Os tempos de exposição das soluções amostra foram 60, 120, 180, 240 e 300 minutos; para as soluções padrão os tempos foram de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Após este período o conteúdo das cubetas foi diluído a uma concentração de 50 µg/mL em fase móvel para determinação por CLAE (conforme item 4.3.1.). Os tempos para padrão e amostra foram diferentes, pois foi observado, em testes preliminares, que o padrão degradava mais rapidamente que a amostra.

Degradação fotoquímica UVC: alíquotas de solução SQR e amostra na concentração de 500 µg/mL foram transferidas para cubetas de quartzo descartáveis e expostas à luz ultravioleta a uma distância de 10 cm lâmpada germicida Daylight F30T8 UV-C (254 nm) com potência de 30 watts, em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm). Os tempos de exposição das soluções amostra e padrão foram 60, 120, 180 e 240 minutos. Após este período o conteúdo das cubetas foi diluído a uma concentração de 50 µg/mL em fase móvel para determinação por CLAE (conforme item 4.3.1.).

Degradação térmica: alíquotas de solução padrão e amostra na concentração de 500 µg/mL foram transferidas para frascos de vidro com tampa e mantidos em estufa contendo termômetro para verificação da temperatura interna. As soluções

padrão e amostra foram mantidas a 60 °C por 24 e 168 horas. Após este período o conteúdo dos frascos foi diluído na fase móvel a uma concentração de 50 µg/mL para determinação por CLAE.

### **5.2.2. Estudo da cinética de degradação do BSF**

Ao considerar os estudos preliminares de estabilidade e a fotoreatividade das fluoroquinolonas, realizou-se a cinética de degradação do BSF sob condição de luz UVA.

A degradação compreende uma ou mais reações, cuja velocidade pode ser calculada matematicamente. A análise da cinética de degradação é fundamental para o estudo da estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975).

A velocidade de reação pode ser definida como a velocidade com a qual muda a concentração de uma substância que intervém nessa reação. A velocidade de reação pode ser classificada como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa. A representação gráfica da concentração (C) em função do tempo (t) é uma reta cuja inclinação corresponde à constante de velocidade de reação (k) (NUDELMAN, 1975).

Quando a velocidade de reação é dependente da concentração do reagente, a reação segue uma cinética de primeira ordem. A representação gráfica do logaritmo da concentração (log C) em função do tempo (t) é uma reta com inclinação igual a -k (NUDELMAN, 1975).

A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para este tipo de reação, a representação do inverso da concentração ( $1/C$ ) em função do tempo ( $t$ ) fornece uma reta. Uma reação de pseudoprimeira ordem pode ser definida como uma reação de segunda ordem que aparenta uma reação de primeira ordem. Este tipo de cinética é verificado quando um dos reagentes se encontra em grande excesso ou é mantido a uma concentração constante, comparativamente com o outro reagente. Nestas circunstâncias a velocidade de reação é determinada por um dos reagentes mesmo que estejam presentes dois reagentes, uma vez que a segunda substância não implica uma mudança significativa da concentração do produto durante a reação de degradação (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

O objetivo deste estudo foi determinar qual a ordem da cinética de degradação do BSF por método microbiológico de difusão em ágar-cilindros em placa e por CLAE e, em posse desta informação, calcular a constante de velocidade de reação e o tempo de vida útil do produto acabado suspensão oftálmica. Estes dados são importantes no que tangem o controle de qualidade por auxiliar no monitoramento do produto comercializado.

#### **5.2.2.1. Condições de estudo**

Degradação fotoquímica UVA: alíquotas de solução SQR e amostra na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  foram transferidas para cubetas de quartzo descartáveis e expostas à luz ultravioleta a uma distância de 10 cm da lâmpada UVA (Light Express<sup>®</sup>, 352 nm, 30W), em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm). Os tempos de exposição das soluções amostra foram 60, 120, 180, 240 e 300 minutos; para as soluções padrão os tempos foram de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Após este período o conteúdo das cubetas foi diluído a uma concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  em água para determinação por método microbiológico (conforme item 4.2.1.) e em fase móvel para determinação por CLAE (conforme item 4.3.1.), ambos métodos previamente validados.



### 5.2.2.2. Cálculos cinéticos

A ordem de reação para a cinética de degradação do BSF foi determinada representando a concentração do fármaco residual em função do tempo (reação de ordem zero), log da concentração em função do tempo (reação de primeira ordem) e inverso da concentração em função do tempo (segunda ordem). Os coeficientes de regressão linear (r) foram obtidos, sendo que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem da reação. Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k), e período de vida útil  $t_{90\%}$  (tempo no qual 90% da concentração do fármaco encontra-se inalterada) foram obtidos.

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$$C = C_0 - kt \text{ (reação de ordem zero)}$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \text{ (reação de primeira ordem)}$$

$$1/C = 1/C_0 - kt \text{ (reação de segunda ordem)}$$

Onde  $C_0$  é a concentração dos reagentes no tempo zero,  $C$  é a concentração após reação no tempo  $t$  e  $k$  é a constante de velocidade de reação.



## 6. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE

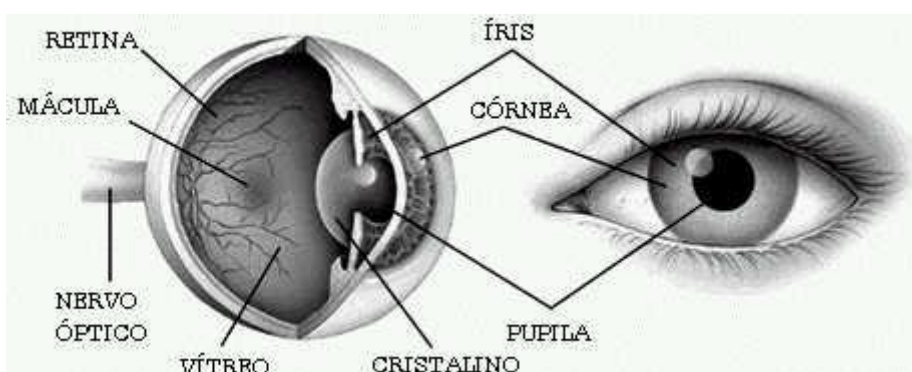


## 6. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE

### 6.1 INTRODUÇÃO

O epitélio é a principal barreira da córnea. O nível de penetração do fármaco varia em até 20 vezes dependendo da integridade do epitélio córneo. Devido a essa barreira, os olhos são relativamente impermeáveis a microrganismos e outros elementos do ambiente. Para erradicar as bactérias durante uma infecção ocular, medicamentos tópicos devem ser administrados com certa frequência. Portanto é importante escolher um medicamento adequado, que tenha a menor citotoxicidade (TSAI *et al.*, 2010).

A exposição crônica aos raios solares pode causar danos às células epiteliais e às proteínas presentes no cristalino humano. Estes danos podem acabar por causar opacidade e obstruir a visão, levando a um quadro de catarata. A exposição aos raios solares durante o uso de medicamentos fotossensibilizantes pode acelerar drasticamente este processo. Para que ocorra uma reação fotoquímica nos olhos, a radiação UV precisa ser absorvida pelo tecido ocular. A córnea filtra todas as radiações menores que 295nm, enquanto que o olho humano absorve a radiação UVB remanescente e toda UVA (295-400nm), apenas a luz visível chega à retina (Figura 6.1). Portanto medicamentos que absorvem radiação acima de 295nm podem induzir reações fototóxicas no cristalino humano (ZHAO *et al.*, 2010).



**Figura 6.1.** Estruturas do olho humano.

Vários estudos abordam a detecção da citotoxicidade por parte de medicamentos tópicos usados contra infecções oculares, em especial a família das fluoroquinolonas (TSAI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010; MENCUCCI *et al.*, 2011; AYAKI *et al.*, 2012). Um destes estudos, com o propósito de detectar e prevenir fototoxicidade ocular por parte de algumas fluoroquinolonas mostrou que todas aquelas estudadas absorviam radiação UV e, por conseguinte, eram potencialmente fotossensibilizantes. Todas as fluoroquinolonas em questão são usadas contra infecções oculares e, sob radiação UVA, induziram uma significativa apoptose nas células epiteliais córneas (ZHAO *et al.*, 2010).

Vários fatores podem contribuir para a citotoxicidade das fluoroquinolonas em colírios. Além da toxicidade intrínseca dos antimicrobianos, outros componentes da formulação incluindo a osmolaridade, o pH e a presença de conservantes (como o cloreto de benzalcônio) também podem contribuir. Alguns estudos apontam o conservante como um dos principais causadores da citotoxicidade das fluoroquinolonas em colírios. Outros associam a citotoxicidade das fluoroquinolonas ao seu efeito sobre a topoisomerase II (TSAI *et al.*, 2010; MENCUCCI *et al.*, 2011; AYAKI, *et al.*, 2012).

A citotoxicidade ou morte celular por necrose pode ser determinada pela integridade da membrana. A enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) é liberada rapidamente para o meio quando a membrana celular é danificada. No kit comercial DOLES, essa enzima converte lactato a piruvato e liberando NADH. O NADH reage com outros reagentes do teste formando, por fim, um composto corado que pode ser medido por espectrofotômetro ou fotocolorímetro. A viabilidade celular é inversamente proporcional à quantidade de LDH liberado.

O objetivo deste capítulo foi avaliar a citotoxicidade do BSF em suspensão oftálmica e de seu provável produto de degradação formado quando exposto à luz UVA.

## 6.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.2.1. Execução do ensaio

#### 6.2.1.1. Preparo da solução padrão

Pesou-se uma quantidade de BSF SQR equivalente a 10 mg de BSF base e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL com auxílio de 3 mL de solução diluente (água). Levou-se a banho ultrassônico durante 20 minutos e transcorrido esse tempo, completou-se o volume com solução diluente obtendo uma solução de 2mg/mL. Esta solução foi submetida à exposição à luz UVA por 5 horas e, a partir daí, realizou-se as diluições a fim de obter as concentrações de trabalho de 10, 100 e 200 $\mu$ g/mL. Optou-se por utilizar essas concentrações porque são bem superiores à concentração sistêmica alcançada pelo BSF relatada na literatura (0,5ng/mL).

#### 6.2.1.2. Preparo da solução amostra

Uma alíquota equivalente a 10 mg de BSF base foi retirada do frasco de amostra com o uso de micropipeta automática e transferida a balão volumétrico de 5 mL com auxílio de 3 mL de solução diluente e levada a banho ultrassônico durante 20 minutos. O volume foi completado com solução diluente a fim de se obter uma solução de concentração final 2mg/mL. Esta solução foi submetida à exposição à luz UVA por 5 horas e, a partir daí, realizou-se as diluições a fim de obter as concentrações de trabalho de 10, 100 e 200 $\mu$ g/mL.

## **6.2.2 Procedimento**

### 6.2.2.1. Separação das células mononucleares

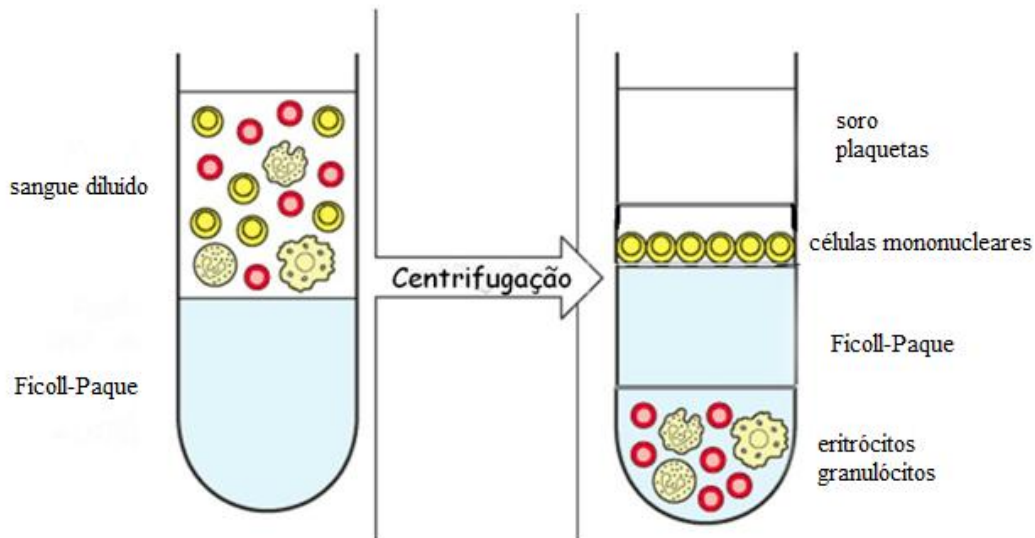
Coletou-se sangue venoso periférico de 5 indivíduos saudáveis (50mL). Em tubo cônico Falcon de 50 mL, a cada 10mL de sangue adicionou-se 10mL de meio Hank's, gerando uma mistura na proporção 1:1. Este procedimento foi feito para cada um dos indivíduos.

Para separar as células mononucleares, utilizou-se o meio Ficoll-Paque, que propicia a separação das células por gradiente de densidade. Para cada tubo cônico Falcon, pipetou-se 3 mL de meio Ficoll-Paque e adicionou-se, lentamente, pelas bordas do tubo, 10mL do sangue diluído em meio Hank's. Submeteu-se os tubos à centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos.

Após a centrifugação, as duas fases tornam-se bem visíveis e a separação ocorre da seguinte maneira: na fase superior ficam o plasma e seus constituintes solúveis, na interface as células mononucleares, em seguida o Ficoll e após os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de sedimento celular no fundo do tubo (Figura 6.2). As células mononucleares, que se encontravam em uma nuvem formada na interfase foram retiradas com auxílio de pipeta Pasteur e colocadas em novo tubo cônico Falcon de 15mL.

Procedeu-se a lavagem destas células em meio Hank's por duas vezes, seguida de centrifugação 1000rpm durante 10 minutos. Esta centrifugação resulta na sedimentação das células, que são ressuspensas em meio Hank's para a contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico Alphaphot-2 YS2 (Nikon) com aumento de 40 vezes. A concentração final obtida é de  $10^7$  células/mL.





**Figura 6.2.** Representação gráfica da separação das células mononucleares.

#### 6.2.2.2. Condições de estudo

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar o efeito das estruturas degradadas frente à luz UVA em relação à molécula intacta do BSF permitindo prever possíveis efeitos adversos resultantes das amostras degradadas. O Triton X-100 a 1% foi utilizado como um parâmetro porque provoca a morte das células em 100%. A lesão celular (citotoxicidade) foi determinada pela medida da lactato desidrogenase (LDH) através de um kit comercial (DOLES Reagentes, Goiânia, Brasil).

Pipetou-se os reagentes em uma placa de 96 poços na sequência: alúmen férrico, substrato e solução amostra. As soluções amostra eram constituídas de soluções de BSF SQR e em suspensão oftálmica (com e sem degradação frente à luz UVA). As soluções fotodegradadas foram preparadas expondo o BSF em solução aquosa (2,0 mg/mL) a radiação UVA durante 5 horas. Após o período de exposição, a solução foi diluída com Hank's até concentração final de 10, 100 e 200 µg/mL em triplicata. Após a adição das amostras, as placas foram mantidas a 37 °C. Ao mesmo tempo, um ensaio em branco (basal) foi realizado em triplicata apenas com alúmen férrico e substrato. Um ensaio de controle positivo foi

realizado com Triton X-100 (100% de morte celular). Foi feito também um branco apenas com a solução diluente final, sem a amostra (meio Hank's e água). Após, solução de NAD foi adicionada a cada poço da placa e transcorrido o tempo indicado pelo kit, pipetou-se solução estabilizadora. Passado este procedimento, a placa foi observada a 492nm utilizando um leitor de placas Envision (Perkin Elmer). A leitura do branco é subtraído das leituras obtidas para cada amostra.

A análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para a comparação das médias dos testes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 5\%$ . A análise dos dados foi realizada utilizando Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA).

## 7. CONCLUSÕES GERAIS



## 8. REFERÊNCIAS



## 8. REFERÊNCIAS

ALBINO, A.; MONTI, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. **Chemical Society Reviews**. n.32, p.238-250, 2003.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJAIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug delivery Reviews**. n.59, p.29-37, 2007.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**. n.16, p.5-15, 2000.

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

AYAKI, M.; IWASAWA, A.; NIWANO, Y. In vitro assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell lines. **Biocontrol Science**. v.17, n.2, p.93-99, 2012).

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

BAROT, M.; GOKULGANDHI, M.R.; HAGHNEGAHDAR, M.; DALVI, P.; MITRA, A.K. Effect of Emergence of Fluoroquinolone Resistance on Intrinsic Expression of P-Glycoprotein Phenotype in Corneal Epithelial Cells. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. v.27, n.6, 2011.

BLONDEAU, J.M. Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance. **Survey of Ophthalmology**. v.49, p.S73-78, 2004.

BONILLA, F.L.G. **Validação de metodologia para análise de moxifloxacino em comprimidos**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos – 2/2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun.2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 01 de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago.2005.

CAMBAU, E.; MATRAT, S.; PAN, X.; BETTONI, R.R.D.; CORBEL, C.; AUBRY, A.; LASCOLS, C.; DRIOT, J.; FISCHER, L.M. Target specificity of the new fluoroquinolone besifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.63, p.443-450, 2009.

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

COMSTOCK, T.L.; PATRENO, M.R.; DECORY, H.H.; USNER, D.W. Safety and Tolerability of Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0.6% in the Treatment of Bacterial Conjunctivitis: Data from Six Clinical and Phase I Safety Studies. **Clinical Drug Investigation**. v.30, p.675-685, 2010a.

COMSTOCK, T.L.; KARPECKI, P.M.; MORRIS, T.M.; ZHANG, J-Z. Besifloxacin: a novel anti-infective for the treatment of bacterial conjunctivitis. **Clinical Ophthalmology**. v.4, p. 215–225, 2010b.

DE SARRO, A.; DE SARRO, G. Adverse Reactions to Fluoroquinolones. An Overview on Mechanistic Aspects. **Current Medicinal Chemistry**. v. 8, p.371-384, 2001.

DOLES Reagentes. Kit comercial para determinação de desidrogenase láctica (DHL). Bula do kit disponível em <http://intranet.doles.com.br/temp/produtos/instrucoes/DHL.pdf>. Acessado em 22 de janeiro de 2013.

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

EMMERSON, A.M.; JONES, A.M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, Suppl. S1, p.13–20, 2003.

ERMER, J.; PLOSS, H. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.37, p.859-870, 2005.



FB 5. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília:ANVISA, 2010.

FINTELMANN, R.E.; HOSKINS, E.N.; LIETMAN, T.M.; KEENAM, J.D.; GAYNOR, B.D.; CEVALLOS, V.; ACHARYA, N.R. Topical Fluoroquinolone Use as a Risk Factor for In Vitro Fluoroquinolone Resistance in Ocular Cultures. **Archives of Ophthalmology**. v.129, n.4, p.399-402, 2011.

GERMAN, N.; WEI, P.; KAATZ, G.W.; KERNS, R.J. Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as a substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. **European Journal of medicinal Chemistry**. v.43, p.2453-2463, 2008.

GUIDI, G.; BRACCHITTA, G.; CATALFO, A. Photosensitization reactions of Fluoroquinolones and Their Biological Consequences. **Photochemistry and Photobiology**. v.87, p.1214-1229, 2011.

HAAS, W.; PILLAR, C.M.; ZURENKO, G.E.; LEE, J.C.; BRUNNER, L.S.; MORRIS, T.W. Besifloxacin, a novel fluoroquinolone, has broad-spectrum in vitro activity against aerobic and anaerobic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n.8, p.3552-3560, 2009.

HAAS, W.; PILLAR, C.M.; HESJE, C.K.; SANFILIPPO, C.M.; MORRIS, T.W.. Bactericidal activity of besifloxacin against *staphylococci*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.65, p.441-1447, 2010.

HAAS, W.; GEARINGER, L.S.; USNER, D.W.; DeCORY, H.H; MORRIS, T.W. Integrated analysis of three bacterial conjunctivitis trials of besifloxacin ophthalmic suspension, 0,6%: etiology of bacterial conjunctivitis and antibacterial susceptibility profile. **Clinical Ophthalmology**. v.5, p.1369-1379, 2011a.

HAAS, W.; PILLAR, C.M.; HESJE, C.K.; SANFILIPPO, C.M.; MORRIS, T.W. In vitro time-kill experiments with besifloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin in the absence and presence of benzalkonium chloride. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.66, p.840-844, 2011b.

HEEB, S.; FLETCHER, M.P.; CHHABRA, S.R.; DIGGLE, S.P., WILLIAMS, P.; CÂMARA, M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, p.247-274, 2011.

HEWITT, W. **Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis**. New York: Interpham/CRC, 2004.

HOOPER, D.C. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**. v.32, p.S9-15, 2001.

HØVDING, G. Acute bacterial conjunctivitis. **Acta Ophthalmologica**. v.86, p.5-17, 2008.

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

HWANG, D.G. Fluoroquinolones Resistance in Ophthalmology and the Potencial Role for Newer Ophthalmic Fluoroquinolones. **Survey of Ophthalmology**. v.49, p.S79-83, 2004.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)**. ICH Steering Committee, Suíça, 2003.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology**. ICH Steering Committee, Suíça, 2005.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Quality System Q10**. ICH Steering Committee, Suíça, 2008.

KARLA, P.K.; PALM, D.; QUINN, T.; MITRA, A.K. Molecular evidence and functional expression of a novel drug efflux pump (ABCC2) in human corneal epithelium and rabbit cornea and its role in ocular drug efflux. **International Journal of Pharmaceutics**. v.336, p.12-21, 2007.

KARPECKI, P.; DEPAOLIS, M.; HUNTER, J.A.; WHITE, E.M.; RIGEL, L.; BRUNNER, L.S.; USNER, D.W.; PATERNO, M.R.; COMSTOCK, T.L. Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0.6% in Patients With Bacterial Conjunctivitis: A Multicenter, Prospective, Randomized, Double-Masked, Vehicle-Controlled, 5-Day Efficacy and Safety Study. **Clinical Therapeutics**. v.31, n. 3, p.514-526, 2009.

KHIMDAS, S.; VISSCHER, K.L.; HUTNIK, C.M.L. Besifloxacin Ophthalmic Suspension: Emerging Evidence of its Therapeutic Value in bacterial Conjunctivitis. **Ophthalmology and Eye Diseases**. v.3, p.7-12, 2011.

KIBBE, A.H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3.ed. Washington:American Pharmaceutical Association, 2000, 665p.

KOCH, H.; KULUS, S.C.; ROESSLER, M.; ROPO, A.; GELDSETZER, K. Corneal penetration of fluoroquinolones: Aqueous humor concentration after topical application of levofloxacin 0,5% and ofloxacin 0,3% eyedrops. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**. v.31, p.1377-1385, 2005.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.;

KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p.1277-1355.

MANDELL, L.; TILLOTSON, G. Safety of Fluoroquinolones: An Update. **Canadian Journal of Infectious Diseases.** v.13, n.1, 2002.

MARONA, H.R.N. **Esparfloxacino: estudo químico-farmacêutico e caracterização de mutantes resistentes.** Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2000. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

MARUTANI, K.; MATSUMOTO, M.; OTABE, Y.; NAGAMUTA, M.; TANAKA, K.; MIYOSHI, A.; HASEGAWA, T.; NAGANO, H.; MATSUBARA, S.; KAMIDE, R.; YOKOTA, T.; MATSUMOTO, F.; UEDA, Y. Reduced Phototoxicity of a Fluoroquinolone Antibacterial Agent with a Methoxy Group at the 8 Position in Mice Irradiated with Long-Wavelength UV Light. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v.37, n.10, p.2217-2223, 1993.

MATSUMOTO, M.; KOJIMA, K.; NAGANO, H.; MATSUBARA, S.; YOKOTA, T. Photostability and Biological Activity of Fluoroquinolones Substituted at the 8 Position after UV Irradiation. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v.36, n.8, p.1715-1719, 1992.

McDONALD, M.B.; PROTZKO, E.E.; BRUNNER, L.S.; MORRIS, T.W.; HAAS, W.; PATERNO, M.R.; COMSTOCK, T.L.; USNER, D.W. Efficacy and Safety of Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0,6% Compared with Moxifloxacin Ophthalmic Solution 0,5% for Treating Bacterial Conjunctivitis. **Ophthalmology.** v.116, n.9, p.1615-1623, 2009.

McDONALD, M.; BLONDEAU, J.M. Emerging antibiotic resistance in ocular infections and the role of fluoroquinolones. **Journal of Cataract and Refractive Surgery.** v.36, p.1588-1598, 2010.

MENCUCCI, R.; PALADINI, I.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; MENCHINI, U.; SCARTABELLI, T. In vitro comparison of the cytotoxic effects of clinically available ophthalmic solutions of fluoroquinolones on human keratocytes. **Canadian Journal of Ophthalmology.** v.46, n.6, p.513-520, 2011.

MORRIS, T.W.; GEARINGER, L.S.; USNER, D.W.; PATERNO, M.R.; DeCORY, H.H.; COMSTOCK, T.L.; HAAS, W. Integrated analysis of three bacterial conjunctivitis trials of besifloxacin ophthalmic suspension, 0,6%: microbiological eradication outcomes. **Clinical Ophthalmology.** v.5, p.1359-1367, 2011.

NESS, P.J.; MAMALIS, N.; WERNER, L.; MADDULA, S.; DAVIS, D.K.; DONNENFELD, E.D.; OLSON, R.J. An Anterior Chamber Toxicity Study

Evaluating Besivance, AzaSite, and Ciprofloxacin. **American Journal of Ophthalmology**. v.150, n.4, p.498-504, 2010.

NUDELMAN, N.E.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires, El Ateneo, 1975.

O'BRIEN, T.P. Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0,6%: a Novel Topical Fluoroquinolone for Bacterial Conjunctivitis. **Advances in Therapy**. v.29, n.6, p.473-490, 2012.

O'DONNELL, J.A.; GELONE, S.P. Fluoroquinolonas. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.14, n.2, p.489-513, 2000.

O'DONNELL, J.A.; GELONE, S.P. The newer fluoroquinolonas. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.18, p.691-716, 2004.

OWENS, R.C.; AMBROSE, P.G. Antimicrobial Safety: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**. v.41, p.S144–157, 2005.

PAIM, C.S.; FÜHR, F; BARTH, A.B.; GONÇALVES, C.E.I.; NARDI, N.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. **Talanta**. v.83, p.1774-1779, 2011.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4 ed. Oxford University Press, 2009. 752 p.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2010. 780 p.

PROKSCH, J.W.; WARD, K.W. Ocular Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Besifloxacin, Moxifloxacin, and Gatifloxacin Following Topical Administration to Pigmented Rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. v. 26, n. 5, p.449-458, 2010.

ROSEN, J.E.; CHEN, D.; PRAHALAD, A.K.; SPRATT, T.E.; SCHLUTER, G.; WILLIAMS, G.M. A Fluoroquinolone Antibiotic with a Methoxy Group at the 8 Position Yields Reduced Generation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine after Ultraviolet-A Irradiation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.145, p.381-387, 1997.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5. ed., Washington : American Pharmaceutical Association, 2006, 918p.

ROY, B.; NANDI, U.; DAS, A.; PAL, T.K. Acute and twenty-eight days repeated oral dose toxicity study of besifloxacin in Wistar albino rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.32, p.82-101, 2011.

SANFILIPPO, C.M.; HESJE, C.K.; HAAS, W.; MORRIS, T.W. Topoisomerase Mutations That Are Associated with High-Level Resistance to Earlier Fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* Have Less Effect on the Antibacterial Activity of Besifloxacin. **Chemotherapy**. v.57, p.363-371, 2011.

SHABIR, A.G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the difference and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v.987, p.57-66, 2003.

SCHOLAR, E.M. Fluoroquinolones: Past, Present and Future of a Novel Group of Antibacterial Agents. **American Journal of Pharmaceutical Education**. v.66, p.164-172, 2003.

SCOPER, S.V. Review of third- and fourth-generation fluoroquinolones in ophthalmology: in-vitro and in-vivo efficacy. **Advances in Therapy**. v.25, n.10, p. 979- 994, 2008.

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

SHIMODA, K.; YOSHIDA, M.; WAGAI, N.; TAKAYAMA, S.; KATO, M. Phototoxic Lesions Induced by Quinolone Antibacterial Agents in Auricular Skin and Retina of Albino Mice. **Toxicologic Pathology**. v.21, n.6, p.554-561, 1993.

SILVERSTEIN, B.E.; ALLAIRE, C.; BATEMAN, K.M.; GEARINGER, L.S.; MORRIS, T.W.; COMSTOCK, T.L. Efficacy and Tolerability of Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0,6% Administered Twice Daily for 3 Days in the Treatment of Bacterial Conjunctivitis: A Multicenter, Randomized, Double-Masked, Vehicle-Controlled, Parallel-Group Study in Adults and Children. **Clinical Therapeutics**. v.33, n.1, p.13-26, 2011.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed., New York, NY : John Wiley & Sons, 1997, 765 p.

STAHLMANN, R. Clinical Toxicological Aspects of Fluoroquinolones. **Toxicology Letters**. v.127, p.269-277, 2002.

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

TORKILDSEN, G.; PROKSCH, J.W.; SHAPIRO, A.; LYNCH, S.K.; COMSTOCK, T.L. Concentrations of besifloxacin, gatifloxacin, and moxifloxacin in human conjunctiva after topical ocular administration. **Clinical Ophthalmology**. v.4, p.331–341, 2010.

TSAI, T-H.; CHEN, W-L.; HU, F-R. Comparison of fluoroquinolones: cytotoxicity on human corneal epithelial cells. **Eye**. n.24, p.909-917, 2010.

USP 34. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

YABE, K.; GOTO, K.; JINDO, T.; SEKIGUCHI, M.; FURUHAMA, K. Structure-phototoxicity relationship in Balb/c mice treated with fluoroquinolone derivatives, followed by ultraviolet-A irradiation. **Toxicology Letters**. v.157, p.203-210, 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2. ed., Edinburgh:Elsevier Churchill Livingstone, 2005, 382 p.

WHO. **Ensuring the Quality of Medicines in Resource-Limited Countries. An Operational Guide**. 2007. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 10 jun. 2011.

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

WOLFSON, J.S.; HOOPER, D.C. Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v.2, n.4, p.378-424, 1989.

ZHANG, J-Z.; CAVET, M.E.; WARD, K.W. Anti-Inflammatory Effects of Besifloxacin, a Novel Fluoroquinolone, in Primary Human Corneal Epithelial Cells. **Current Eye Research**. v.33, p.923–932, 2008.

ZHANG, J-Z.; WARD, K.W. Besifloxacin, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent, exhibits potent inhibition of pro-inflammatory cytokines in human THP-1 monocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.61, p.111–116, 2008.

ZHAO, B.; CHIGNELL, C.F.; RAMMAL, M.; SMITH, F.; HAMILTON, M.G.; ANDLEY, U.P.; ROBERTS, J.E. Detection and Prevention of Ocular Phototoxicity of Ciprofloxacin and Other Fluoroquinolone Antibiotics. **Photochemistry and Photobiology**. v.86, n.4, p.798-805, 2010.