

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
ATIVIDADE DE ENSINO: TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
FARMÁCIA

Lionel Salem Aza-Gnandji

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de
ciprofloxacino em pomada oftálmica

Porto Alegre, dezembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
ATIVIDADE DE ENSINO: TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
FARMÁCIA

Lionel Salem Aza-Gnandji

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de
ciprofloxacino em pomada oftálmica

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em Farmácia
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elfrides Eva
Scherman Schapoval

Coorientadora: Msc. Lívia Maronesi Bueno

Porto Alegre, dezembro de 2019.

Lionel Salem Aza-Gnandji

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de ciprofloxacino em pomada oftálmica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Coorientadora: Msc. Lívia Maronesi Bueno

Aprovado em: Porto Alegre, dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof Dr. Tercio Paschke Oppe / UFRGS

Msc. Fabio de Souza Barbosa / UFRGS

AGRADECIMENTOS

A todos os professores e integrantes do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico pelo auxílio, troca de experiências e motivação, não somente ao longo deste trabalho, mas também durante os anos de iniciação científica. Em especial, a professora orientadora, Dr^a Elfrides Schapoval, por servir como exemplo de profissional, pelo incentivo, confiança, tranquilidade e suporte fornecidos. À co-orientadora, Lívia Bueno, por aceitar esse desafio, pelo apoio, parceria, paciência e disponibilidade proporcionada.

A todos os professores, os quais eu levo de exemplo, pelos ensinamentos, ajuda, por dividir experiências e pela capacidade de aumentar a paixão e o orgulho por ter escolhido esta profissão.

Aos amigos que dividiram a vida acadêmica comigo, conseguindo tornar essa trajetória menos complicada e mais agradável. Aos amigos que, de longe ou perto, se fizeram sempre presentes durante esses anos, torcendo por mim, servindo de conforto, e sempre prontos para dividir momentos e risadas.

A minha família, por serem minha base, respeitarem minhas escolhas, entenderem minhas ausências, pelo apoio e amor incondicional. Aos meus pais, pelo incentivo a educação, por nunca medirem esforços, e pelo constante amparo. Aos meus irmãos e irmãs, pelo exemplo, parceria, e por sempre conseguirem tornar todos os momentos mais leves.

A minha namorada Karolline, por todo incentivo, parceria e apoio durante a elaboração do meu trabalho, com muito carinho e amor.

A todos vocês, o meu MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O ciprofloxacino é um antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas de segunda geração, com um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, disponível no mercado brasileiro sob várias formas farmacêuticas. O controle de qualidade de medicamentos é essencial para assegurar que o produto esteja dentro dos padrões de qualidade exigidos, através da execução de métodos analíticos eficazes e validados. No entanto, nos dias atuais, o ciprofloxacino em pomada oftálmica ainda não possui monografia na Farmacopeia Brasileira. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para a quantificação do ciprofloxacino em pomada oftálmica por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados da linearidade foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e foram lineares ($r = 1,0$) no intervalo selecionado de 10-50 $\mu\text{g/mL}$, preciso com desvio padrão relativo da repetibilidade intradia (0,70), precisão intermediária (1,38) e exata com a recuperação média (97,41%). Por meio deste estudo, foi possível elaborar um método adequado, simples e confiável que pode ser utilizado para a análise de medicamentos no controle de qualidade de rotina desse fármaco.

Palavras-chave: Ciprofloxacino. Validação analítica. Controle de qualidade. CLAE. Pomada oftálmica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	9
3 MATERIAIS	10
3.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E PRODUTO FARMACÊUTICO.....	10
3.2 SOLUÇÕES: AMOSTRA, PADRÃO E PLACEBO	10
3.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	11
3.3.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE	11
3.3.2 Validação do método analítico por CLAE	13
3.3.2.1 Teste de especificidade/seletividade	13
3.3.2.2 Limites de detecção e quantificação	13
3.3.2.3 Linearidade	14
3.3.2.4 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	14
3.3.2.5 Exatidão	15
3.3.2.6 Robustez	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE	17
4.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	19
4.3 LINEARIDADE	19
4.4 PRECISÃO	21
4.5 EXATIDÃO	22
4.6 ROBUSTEZ.....	23
5 CONCLUSÃO	25

1 INTRODUÇÃO

O ciprofloxacino ácido, 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-(piperazin-1-il) -1,4 dihidroquinoleína-3-carboxílico, ilustrado abaixo na Figura 1, é um agente antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas de segunda geração com amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (CAMPOLI RICHARDS et al., 1998). Acredita-se que o mecanismo de ação das quinolonas antibacterianas, como o ciprofloxacino, envolve a inibição da topoisomerase II bacteriana (DNA-girase) e topoisomerase IV, enzimas essenciais no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano, atuando através de ação bactericida (ANDRIOLE, V. T., 2005).

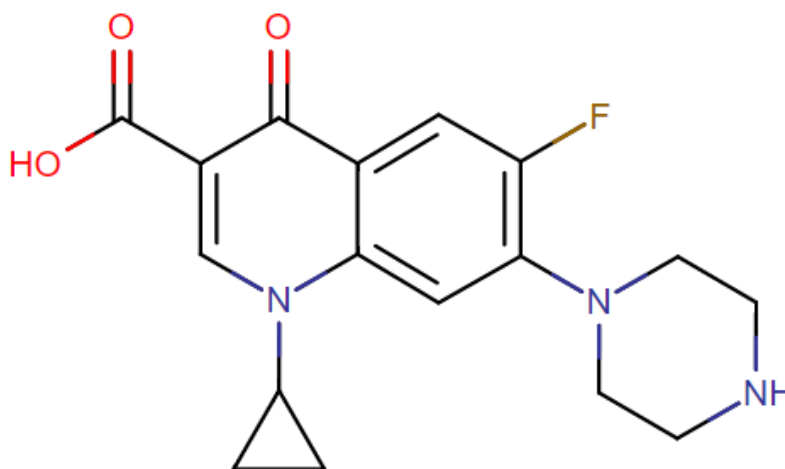


Figura 1. Estrutura química do ciprofloxacino (DrugBank, 2019).

A pomada de ciprofloxacino oftálmica é indicada para o tratamento de conjuntivite bacteriana causada por cepas suscetíveis de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre outros (FDA, 2017).

O controle de qualidade de medicamentos é essencial para assegurar que o produto esteja dentro dos padrões de qualidade exigidos, através da execução de métodos analíticos eficazes e validados.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica com vasta aplicação na área química e farmacêutica. É um processo físico utilizado na separação, identificação e quantificação de cada constituinte de uma mistura, cujo fundamento depende da interação entre a fase estacionária, o analito e a fase móvel. É um método que oferece grandes benefícios em termos de conveniência, precisão, velocidade e capacidade de realizar separações difíceis (LANÇAS, 2009; NOGUEIRA et al., 2011).

A literatura relata diversos métodos analíticos para a determinação do cloridrato de ciprofloxacino com base nas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HUSAIN et al.,1995; LAC; ZOTOU et al.,2002; KASSAB et al.,2005). A CLAE é descrita como o método oficial de análise do ciprofloxacino em Farmacopeias. Entretanto, os estudos de desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação do ciprofloxacino em pomada oftálmica ainda são escassos frente a sua importância para o controle de qualidade de medicamentos. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar método analítico para a quantificação do ciprofloxacino em pomada oftálmica por cromatografia líquida de alta eficiência e compará-lo ao método descrito na farmacopéia americana (USP, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método analítico para determinação de ciprofloxacino em pomada oftálmica.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Determinação do teor do ciprofloxacino em pomada oftálmica em estudo;
- b) Desenvolvimento de um método simples e exequível; e
- c) Validação do método, conforme os guias oficiais.

3 MATERIAIS

3.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E PRODUTO FARMACÊUTICO

A substância química de referência (SQR) de cloridrato de ciprofloxacino (pureza de 87.33%) foi adquirida junto à Farmacopeia Brasileira.

O medicamento Maxiflox® foi adquirido no comércio local no formato de pomada oftálmica estéril contendo 3,5 mg g⁻¹ de cloridrato de ciprofloxacino.

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Foi utilizada água ultrapura (Milli-Q® apparatus, Millipore, USA) para preparação das soluções.

3.2 SOLUÇÕES: AMOSTRA, PADRÃO E PLACEBO

- a. A amostra utilizada no desenvolvimento e validação do método foi preparada, pesando com exatidão o equivalente a 250 mg de cloridrato de ciprofloxacino pomada oftálmica (0,750 mg de ciprofloxacino) em um tubo de ensaio com tampa. A extração do ciprofloxacino da sua forma farmacêutica foi realizada pela adição de 15 mL de hexano, agitando vigorosamente até a dispersão total da pomada. Colocou-se a amostra em banho-maria a $60,0 \pm 1,0$ °C, com a tampa ligeiramente desenroscada, durante 30 minutos com agitação frequente. Após decorrido o tempo, retirou-se do banho, apertou-se a tampa e agitou-se por 2 minutos no vortex enquanto ainda quente. Logo depois adicionou-se 12,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e agitou-se vigorosamente por 2 min. A amostra foi mantida em repouso até separação de fases e logo após, desprezou-se a camada orgânica. A partir da camada aquosa denominada solução amostra (60 ug/mL) foi transferida alíquota de 2,5 mL para um balão volumétrico de 5 mL completando o volume com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se a concentração final de 30 ug/mL de ciprofloxacino.

- b. Para o preparo da solução SQR, pesou-se, com exatidão, o equivalente a 5,60 mg da SQR de cloridrato de ciprofloxacino (5,0 mg de ciprofloxacino), transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com solução de ácido clorídrico 0,1 M. A partir dessa solução padrão estoque (100 ug/mL) foi transferida alíquota de 1,5 mL para um balão volumétrico de 5 mL, completando o volume com solução de ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se a concentração final de 30 ug/mL de ciprofloxacino.
- c. A solução placebo foi preparada pela pesagem dos excipientes contidos na pomada de Maxiflox®, nas quantidades indicadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY, 2006), seguida do mesmo procedimento realizado no preparo na solução amostra descrito no item 3.2.a.

Vaseline branca	20%
Oleo mineral	31,5%
Cera microcristalina	8%

3.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

3.3.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE

A composição da fase móvel testada foi uma mistura de ácido fosfórico 0,025 M com pH previamente ajustado com trietilamina para 3,0 e acetonitrila nas proporções 85: 15 como descrito na Farmacopéia Brasileira para doseamento de comprimidos de cloridrato de ciprofloxacino. A coluna testada foi a C18 de marca e tamanho: Thermo hypersil Gold (4 x 250 mm, 5 um). Com base na análise do cromatograma ilustrada na Figura 2, obtido nessas condições que consta na Tabela 1, o método foi considerado definido, podendo ser iniciada a validação analítica do mesmo.

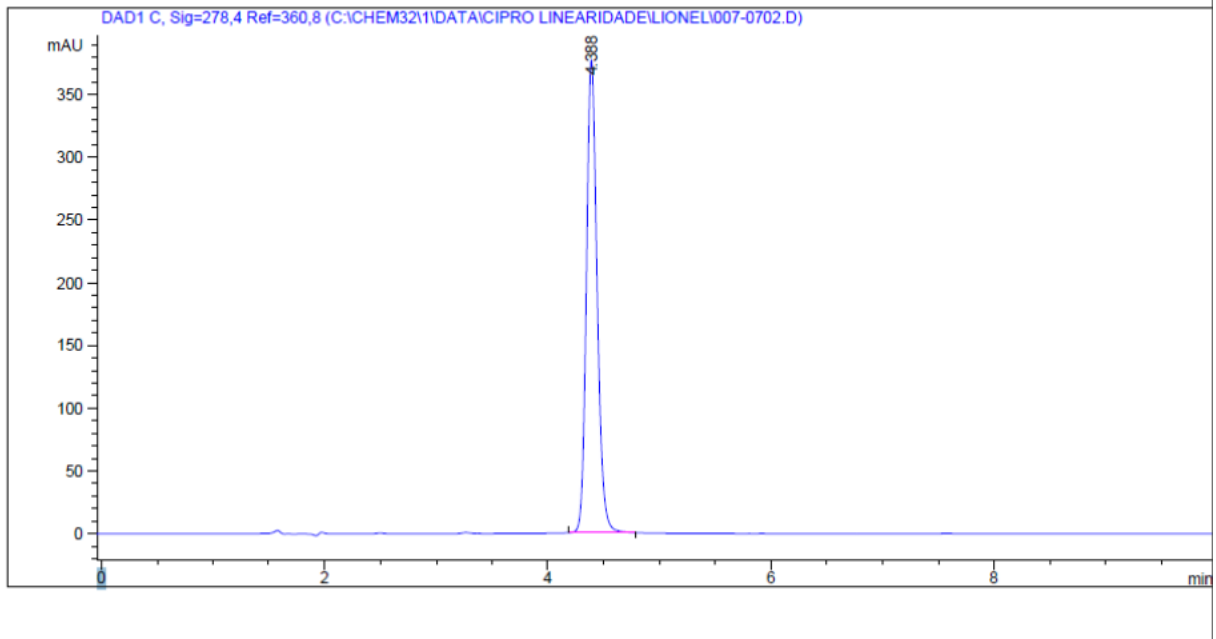


Figura 2. Cromatograma representativo da injeção de ciprofloxacino SQR 30 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel H₃PO₄: ACN (85:15, v/v), vazão 1,5 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Coluna: hypersil gold (4 x 250 mm, 5 µm), 30 °C.

Adequabilidade do sistema cromatográfica

Tempo de retenção	k'	Área	Pratos
4,388	1,63	2514	10846

Tabela 1. Condições cromatográficas definidas para o método de quantificação de ciprofloxacino em pomada

Parâmetro	Descrição
Equipamento	CLAE Agilent, LC 1200
Fase móvel	H ₃ PO ₄ : acetonitrila (85:15, v/v)
Vazão da fase móvel	1,5 ml/min
Detecção	Detector DAD 278 nm
Coluna cromatográfica	Hypersil Gold (4 x 250 mm, 5 µm)
Temperatura da coluna	30°C
Volume de injeção	20 µL
Diluyente	Ácido clorídrico 0,1 M

3.3.2 Validação do método analítico por CLAE

A validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi efetuada conforme previsto na legislação vigente através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (BRASIL, 2017).

3.3.2.1 Teste de especificidade/seletividade

A especificidade do método foi avaliada pela injeção da solução placebo contendo os excipientes presentes na formulação e extraídos conforme descrito no item 3.2, alínea “c”, já o cromatograma foi comparado com o cromatograma da solução amostra de ciprofloxacino.

Além disso, estudos de degradação forçada de amostra de ciprofloxacino foram conduzidos para verificar a possível interferência dos produtos de degradação na quantificação da substância ativa.

A solução amostra foi preparada conforme descrito no item 3.2, alínea “a” e submetida às seguintes condições de degradação: para degradação ácida, alcalina e oxidativa, alíquotas de 2,5 mL da solução estoque foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, adicionados 2,5 mL de HCl 1 M ou NaOH 1M ou H₂O₂ 3%. Para avaliação da degradação fotolítica, cubeta de quartzo de um centímetro de diâmetro contendo alíquota da mesma solução estoque foi colocada em uma câmara de UV-C (100 x 18 x 17 cm), espelhada internamente e com lâmpadas fluorescentes UV-C emitindo radiação a 254 nm. Após duas horas, uma alíquota de cada solução, em todas as condições de estresse, foi diluída e injetada no sistema cromatográfico na concentração de 30 µg/mL.

3.3.2.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do ciprofloxacino foram estabelecidos com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), obtidos a partir das três curvas padrão, conforme as equações abaixo (BRASIL, 2017).

Cálculo do Limite de Detecção:

$$LD = (3,3 \cdot s) / I$$

Cálculo do Limite de Quantificação:

$$LD = (10 \cdot s) / I$$

3.3.2.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de três curvas padrão, obtidas a partir da solução estoque de SQR, em 5 níveis diferentes de concentração, em intervalo compreendido entre 10,0 a 50,0 µg/mL, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Diluições de ciprofloxacino SQR para construção da curva padrão

Volume de solução estoque (100 µg/mL)	Volume final	Concentração
1,0 mL	10,0 mL	10,0 µg/mL
2,0 mL	10,0 mL	20,0 µg/mL
3,0 mL	10,0 mL	30,0 µg/mL
4,0 mL	10,0 mL	40,0 µg/mL
5,0 mL	10,0 mL	50,0 µg/mL

3.3.2.4 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão do método foi estabelecida pelos estudos da repetibilidade e precisão intermediária. Ambas foram determinadas pela análise dos desvios padrão

relativos (DPR) entre as análises de um mesmo dia (repetibilidade) e também as análises dos dois dias, para a verificação da precisão intermediária. As seis soluções amostra de ciprofloxacino foram preparadas individualmente, de acordo com o procedimento descrito no item 3.2, alínea “a”.

3.3.2.5 Exatidão

A análise da exatidão do método foi realizada através da adição de concentração conhecida de ciprofloxacino SQR à solução amostra. A concentração da solução amostra foi mantida constante, sendo modificadas as concentrações do padrão adicionado em três níveis dentro da faixa de linearidade: concentração baixa (R1), média (R2) e alta (R3) conforme ilustrado na Tabela 3. Também foram injetadas a solução amostra e a solução padrão individualmente. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, e cada uma analisada três vezes.

Tabela 3. Preparo das soluções para avaliação da exatidão pelo teste de recuperação

	Volume de solução amostra de ciprofloxacino 60 µg/mL* (mL)	Volume de solução de ciprofloxacino SQR 100 µg/mL* (mL)	Concentração final (µg/mL)
Amostra	2,5 mL	-	30,0
R1	2,5 mL	0,25 mL	35,0
R2	2,5 mL	0,50 mL	40,0
R3	2,5 mL	0,75 mL	45,0
Padrão	-	1,50 mL	30,0

* Alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 5 mL.

3.3.2.6 Robustez

A robustez do método desenvolvido para a análise de ciprofloxacino foi avaliada através da observação do perfil cromatográfico após alterações em alguns parâmetros do sistema cromatográfico.

Para cada modificação efetuada a amostra foi injetada três vezes, e a média dos resultados comparados com a condição normal. Na Tabela 4 estão expostas as alterações definidas para a verificação da robustez do método.

Tabela 4. Alterações nas condições do método cromatográfico para avaliação da robustez

Parâmetro	Condição normal	Alteração 1	Alteração 2
Vazão da fase móvel	1,5 mL/min	1,3 mL/min	1,7 mL/min
Proporções da fase móvel H ₃ PO ₄ : acetonitrila (v/v)	85:15	83:17	87:13
Temperatura da coluna	30°C	29°C	31°C

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de ciprofloxacino contido na amostra de ciprofloxacino pomada oftálmica, foi avaliada pela injeção da solução amostra preparada conforme descrito no item 3.2, alínea “a”. O resultado demonstrou que a solução amostra apresentou a formação de pico cromatográfico, e o tempo de retenção igual a 4,390 min próximo ao do fármaco quando comparado com o padrão de ciprofloxacino como ilustrado na Figura 3.

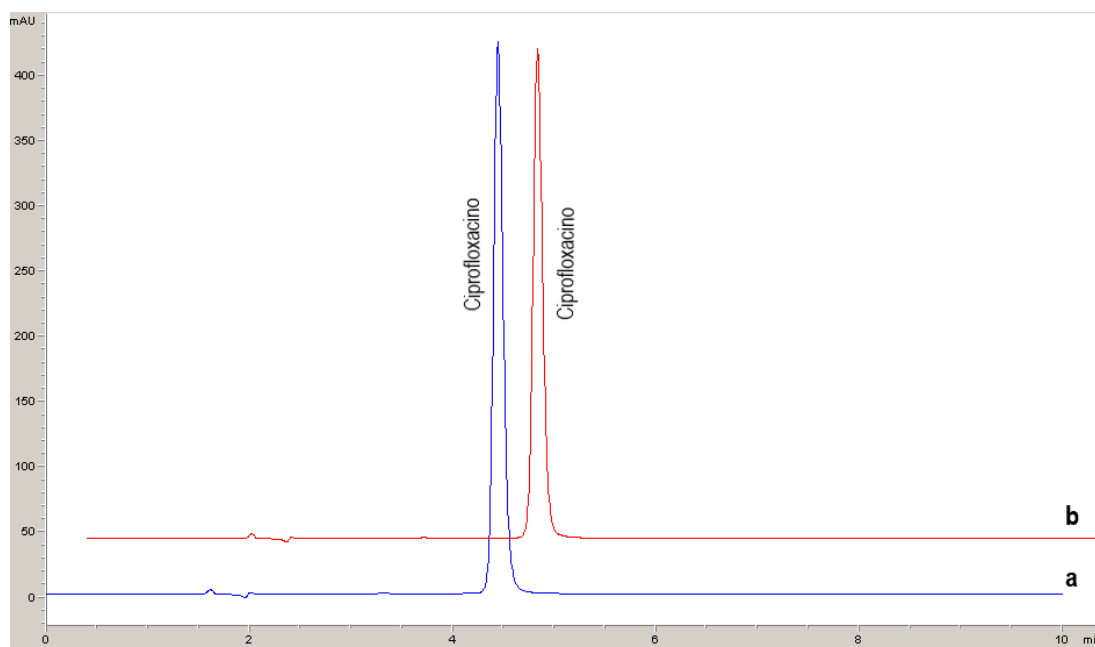


Figura 3. Cromatogramas representativos da amostra (a) e padrão (b) de ciprofloxacino 30 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: fase móvel H_3PO_4 : ACN (85:15, v/v), vazão 1,5 mL/min, volume de injeção de 20 μL . Coluna: hypersil gold (4 x 250 mm, 5 μm), 30 $^\circ\text{C}$.

4.1 ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

A fim de demonstrar a especificidade do método desenvolvido, uma solução placebo conforme ilustrado no item 3.2, alínea “c” foi utilizada para avaliar a possível interferência dos excipientes da formulação da pomada oftálmica de ciprofloxacino. Os resultados demonstram que a solução placebo não apresentou a formação de pico

cromatográfico, especialmente, no tempo de retenção próximo ao do fármaco quando comparado com a amostra de ciprofloxacino como ilustrado na Figura 4.

A confirmação da seletividade de método deve ser feita pelo estudo de degradação forçada sob diferentes condições, a fim de verificar se os produtos de degradação formados interferem na quantificação da substância de interesse.

Abaixo estão representados os cromatogramas correspondentes aos estudos de degradação forçada e o placebo do ciprofloxacino em pomada oftálmica (figura 4).

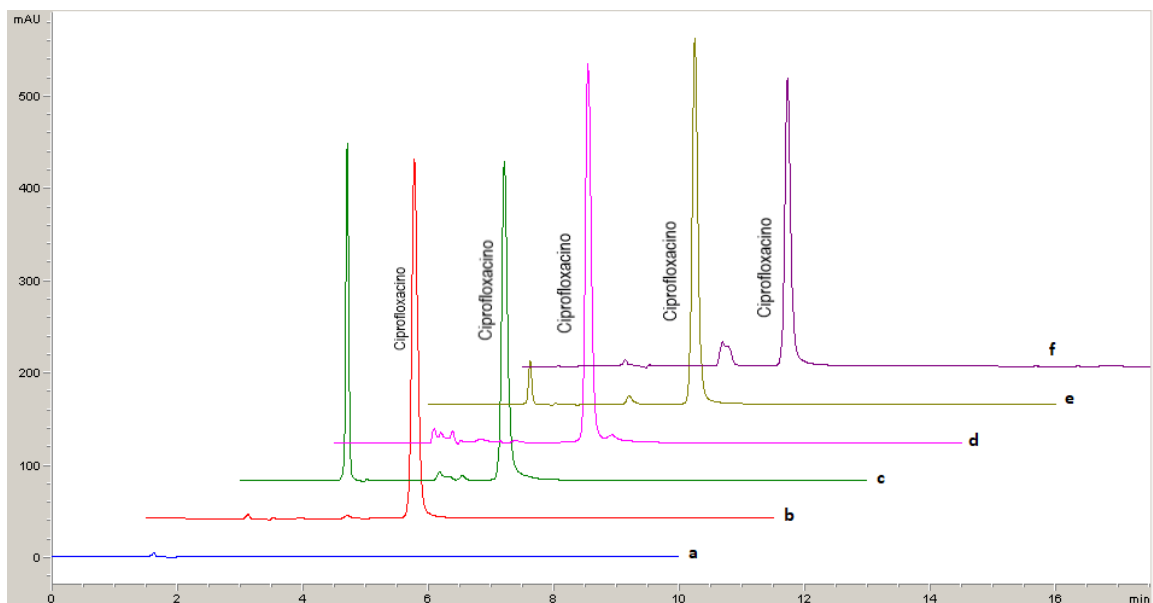


Figura 4. Cromatogramas representativos do placebo, da amostra e dos estudos de degradação do ciprofloxacino em pomada oftálmica 30 mg/mL, nas seguintes condições: placebo (a); amostra não degradada (b); degradação oxidativa (c); amostra em meio alcalina (d); amostra em meio ácido (e); amostra em presença de radiação UVC (f).

Como se pode observar nos cromatogramas acima, o fármaco mostrou-se suscetível às degradações em meio ácido, alcalino, oxidativo e na presença de radiação UV-C, originando novas entidades químicas após duas horas de exposição. No entanto, os produtos formados não interferiram na quantificação do ciprofloxacino, comprovando que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada. Os dados de pureza de pico foram adquiridos pelo *software* do próprio equipamento e confirmaram que não há interferência ou coeluição com outras substâncias.

A literatura relata também que o ciprofloxacino é suscetível a degradação fotolítica, sofrendo reações de degradação de descarboxilação ou abertura do ciclopropano da sua estrutura química, no entanto apresenta estabilidade térmica (NUDELMAN, N.E.S., 1975).

4.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção e quantificação do método, obtidos através dos dados da curva padrão, foram de 0,34 e 1,04 µg/mL, respectivamente. Tais valores representam que o método possui sensibilidade adequada para a determinação e quantificação de ciprofloxacino em pomada oftálmica.

4.3 LINEARIDADE

A avaliação da linearidade foi realizada pela análise de regressão linear, na qual foi determinada a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados, com análise de variância para confirmar a linearidade do método. A Figura 5 mostra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

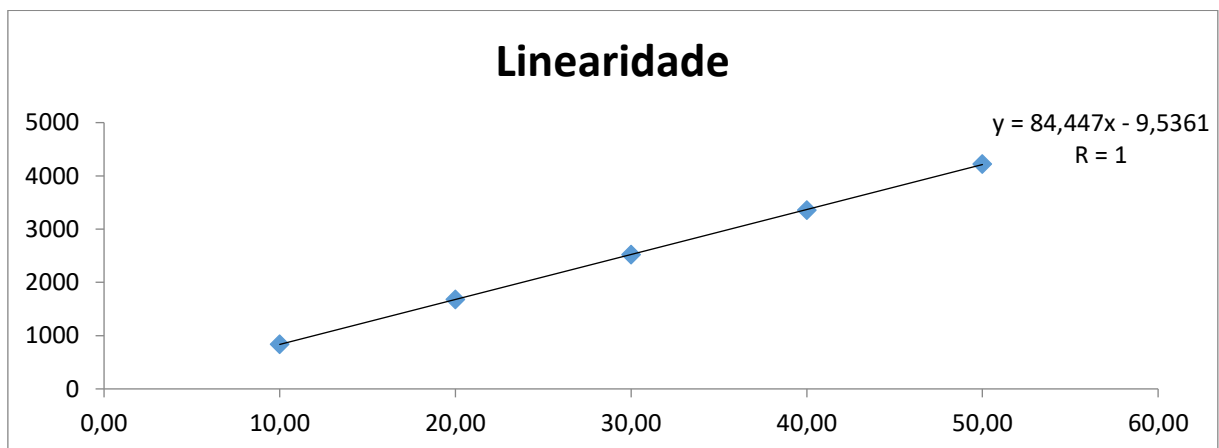


Figura 5. Representação gráfica da curva padrão de ciprofloxacino obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

A Figura 6 apresenta os resultados correspondentes à análise de regressão linear ($p \leq 0,05$) dos dados determinados a partir da curva padrão média do ciprofloxacino.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999985172
R-Quadrado	0,999970345
R-quadrado ajustado	0,99996046
Erro padrão	8,396427812
Observações	5

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	7131802,5	7131802,5	101160,3191	6,85394E-08
Resíduo	3	211,5	70,5		
Total	4	7132014			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-9,5	8,806247782	-1,078779548	0,359692482	-37,52541071	18,52541071	-37,52541071	18,52541071
Variável X 1	84,45	0,265518361	318,0571005	6,85394E-08	83,60500207	85,29499793	83,60500207	85,29499793

Figura 6. Estatística de regressão linear do ciprofloxacino

A Tabela 5 apresenta os dados para o cálculo do resíduo padronizado de regressão linear, realizado sobre os resultados obtidos na linearidade.

Tabela 5. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade do ciprofloxacino

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	835	4	0,550091331
2	1679,5	-0,5	-0,068761416
3	2524	-2	-0,275045666
4	3368,5	-10,5	-1,443989745
5	4213	9	1,237705496

A Figura 7 representa os resíduos obtidos a partir da curva de regressão linear do ciprofloxacino.

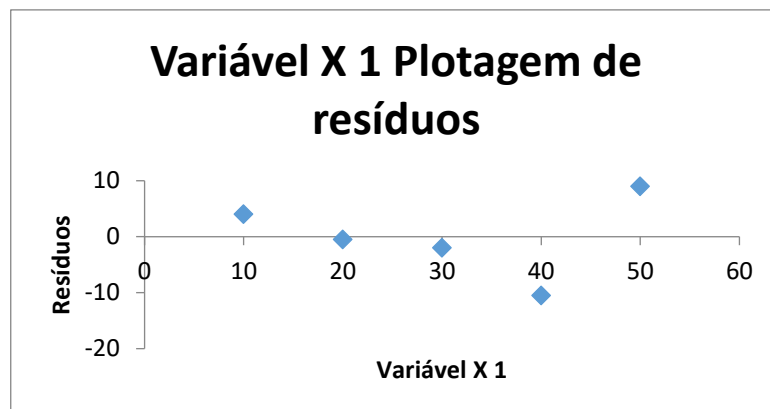


Figura 7. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear do ciprofloxacino.

O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação da reta $y = 84,447x - 9,5361$, com um coeficiente de correlação (r) de 1,0.

A análise do gráfico dos resíduos permite afirmar que não há tendência nos mesmos, sendo aleatoriamente distribuídos com ausência de amostras atípicas, de maneira que se pode afirmar haver homocedasticidade. Os resíduos padronizados também são adequados, uma vez que se encontram todos contidos no intervalo entre -2 e 2.

A ANOVA da regressão apresenta elevada significância (F de significação = $6,85394E-08$). Além disso, o intercepto, no intervalo de confiança contém o zero, enquanto que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero.

Deste modo, comprova-se que o método proposto possui relação linear entre a área e a concentração do analito no intervalo avaliado.

4.4 PRECISÃO

O estudo completo da precisão do método foi conduzido por dois dias, sendo cada dia avaliado individualmente para verificação da repetibilidade. Ao final das duas análises as médias dos DPR foram relacionadas para compor o resultado da precisão intermediária.

A Tabela 6 apresenta os valores experimentais obtidos na determinação do ciprofloxacino em pomada oftálmica nos dois diferentes dias.

Tabela 6. Resultados obtidos nos testes de repetibilidade e precisão intermediária

REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			
	DIA 1 (µg/mL)	DIA 2 (µg/mL)	INTERDIAS
AMOSTRA 1	104,45	101,27	
AMOSTRA 2	103,21	101,42	
AMOSTRA 3	103,92	102,96	
AMOSTRA 4	104,25	101,27	
AMOSTRA 5	104,54	100,84	
AMOSTRA 6	104,47	102,98	
MÉDIA	104,14	101,79	102,96
DPR %	0,49	0,92	1,38

Os baixos valores de DPR obtidos na avaliação da precisão intra e inter dias demonstram que não houve variação significativa entre as análises realizadas em um mesmo dia, bem como entre os dois dias, indicando que o método é preciso em seus resultados.

4.5 EXATIDÃO

Os resultados encontrados no teste de recuperação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Percentuais de recuperação da amostra em três níveis de concentração

TESTE DE RECUPERAÇÃO				
	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL (µg/mL)	RECUPERAÇÃO (%)	RECUPERAÇÃO MÉDIA DRP (%)
R1	35,0	35,01	98,24	97,68 1,98
	35,0	35,01	99,29	
	35,0	35,01	95,52	
R2	40,0	40,01	97,20	96,90 0,92
	40,0	40,01	95,90	
	40,0	40,01	97,61	
R3	45,0	45,01	96,90	97,63 1,40
	45,0	45,01	96,78	
	45,0	45,01	99,21	

Os valores encontrados no teste de recuperação do ciprofloxacino encontram-se dentro dos limites considerados adequados para comprovação da exatidão do método analítico, bem como os valores dos DPR em cada nível de concentração avaliado. A recuperação média foi de 97,41%, considerada satisfatória e demonstra que o método proposto é exato.

4.6 ROBUSTEZ

A Tabela 8 traz os resultados avaliados no teste de robustez do método frente às modificações propostas. Nas condições normais (vazão 1,5 mL/min, fase móvel H₃PO₄: ACN 85: 15 v/v, Temperatura 30°C) o tempo de retenção é igual a 4,390 min e o teor 99,29%.

Tabela 8. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método

Alteração	Teor (%)	Tempo de retenção (min)
Vazão 1,3 mL/min	99,21	4,9
Vazão 1,7 mL/min	99,22	3,77
Fase móvel H ₃ PO ₄ : ACN (83:17 v/v)	99,17	3,3
Fase móvel H ₃ PO ₄ : ACN (87:13 v/v)	99,05	5,88
Temperatura 29°C	98,92	4,32
Temperatura 31°C	99,78	4,17

A avaliação da robustez do método cromatográfico indicou que este resiste a pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas, visto que não houve prejuízo na quantificação do fármaco.

5 CONCLUSÃO

Após a finalização dos ensaios e interpretação dos resultados de cada parâmetro avaliado, é possível afirmar que o método desenvolvido para a determinação do ciprofloxacino em pomada oftálmica atendeu aos requisitos necessários para garantir o seu uso de forma confiável. Logo, pode-se afirmar que o método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência está validado, conforme preconizado pelos guias oficiais. O método desenvolvido mostrou-se mais simples do que o método descrito na Farmacopeia Americana, principalmente quando se comparam os componentes das fases móveis, constituindo-se em colaboração positiva para controle de qualidade do produto analisado, bem como colaborar na elaboração de monografia da Farmacopeia Brasileira referente à pomada oftálmica de ciprofloxacino.

REFERÊNCIAS

ANDRIOLE, V. T.; *Clinical Infectious Diseases* 2005, Supplement 2, 41, S113-S11

BRASIL. Resolução n. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, v. 2017, 2017.

BRAZILIAN Pharmacopoeia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2019.

CAMPOLI RICHARDS, D. M.; Monk, P. J.; Price, A.; *Drugs* 1988, 35, 4, 373–447.

DRUGBANK - Ciprofloxacin Structure. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB06605>> Acesso em: 01 de dezembro 2019.

FDA – Food and Drug Administration. FDA Approved Drug Products – Ciloxan®

Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020369s022lbl.pdf>.

Acesso em 04 de dezembro de 2019.

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

KASSAB, N.M., Singh, A.K., Kedor-Hackmam, E.R.M., Santoro, M.I.R.M., 2005, Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 41(4), 507-513.

LANÇAS, F. M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 17–23, 2011.

NUDELMAN, N.E.S. *Estabilidad de medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. p.23-61.

USP 42. The United States Pharmacopeia.42 Ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2019.

ROWE, Paul J.; Sheskey, Siân C; Quinn E Marian. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, 2006.

ZOTOU, A., Miltiadou, N., 2002, Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 28, 559-568.