Controle de Qualidade de Medicamentos de Uso Veterinário: Danofloxacina e Norfloxacina

Juliana Cristina Pereira, Lívia Maniero Peruchi, Susanne Rath

Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP, Brasil

jucris_pereira@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Danofloxacina (Figura 1.a) e Norfloxacina (Figura 1.b) são antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas amplamente empregados na medicina veterinária. As fluoroquinolonas de modo geral inibem a subunidade A da enzima procariótica DNA-girase, o que acarreta em inibição do crescimento bacteriano. A qualidade dos medicamentos veterinários ainda não é fiscalizada no Brasil. De modo geral, fármacos tem sido determinados por cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD).

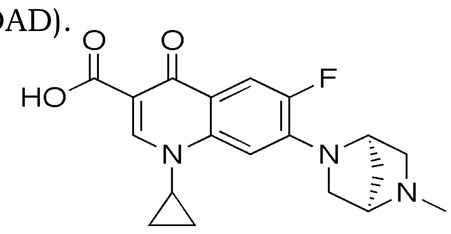

Figura 1.a Estrutura da danofloxacina

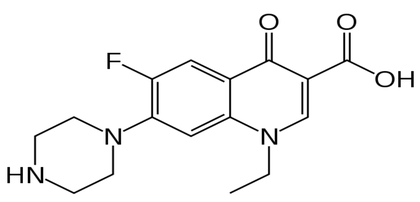

Figura 1.b Estrutura da norfloxacina

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos, para a quantificação de danofloxacina e norfloxacina em diferentes formulações empregadas na medicina veterinária seguindo o guia do MAPA (2011).

MATERIAL E MÉTODOS

SOLUÇÕES E PREPARO DE AMOSTRA

- Soluções estoque individuais de danofloxacina e norfloxacina a 250 μg mL^{-1} em metanol.
- Medicamentos veterinários (formulações injetáveis) de princípio ativo Danofloxacina (25 mg mL^{-1} - 2,5% m/v) e Norfloxacina (151,2 mg mL^{-1})

EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo à Líquido Agilent 1200 series, (DAD), Degasser (Agilent) e bomba quartenária (Agilent). Programa computacional Agilent ChemStation..
- Cromatógrafo à Líquido Waters 1525 Binary, (DAD), Injetor Automático. Programa computacional Millenium e/ou Empower.

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Norfloxacina

✓Fase estacionária (C_{18}) (ACE 250 mm x 4,6 mm x 5 μm).
✓ Fase móvel metanol (90:10 v/v):ácido fórmico 0,1% a proporção 20:80 (v/v).
✓ Eluição com gradiente; vazão:0,8 mL min^{-1}; volume de injeção: 50 μL.

Danofloxacina

✓Fase estacionária (C_{18}) (Zorbax Eclipse 150 mm x 4,6 mm x 5 μm).
✓ Fase móvel metanol:ácido fórmico 0,1% pH 4,1 a proporção 30:70 (v/v).
✓ Eluição isocrática; vazão:1,0 mL min^{-1}; volume de injeção: 20 μL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

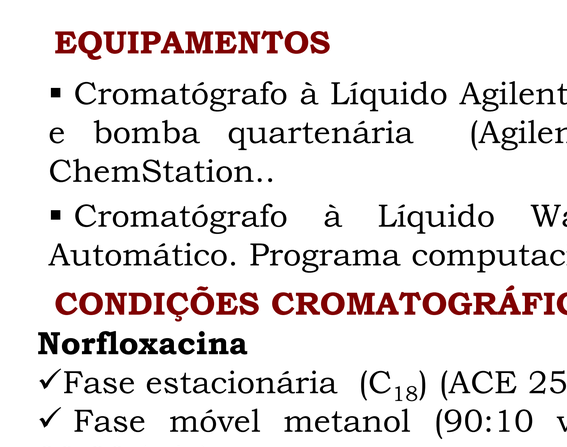

Figura 2.a Cromatograma obtido para uma solução de danofloxacina empregando HPLC-DAD nas condições cromatográficas acima.

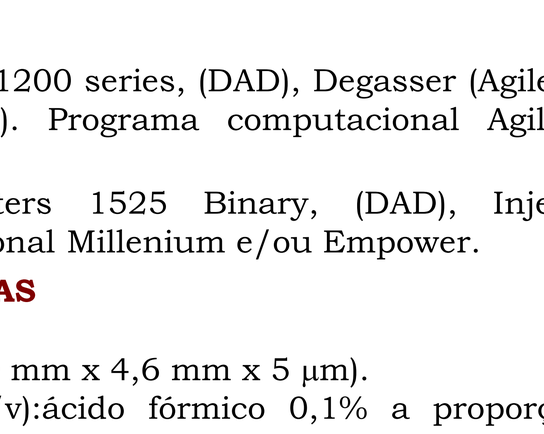

Figura 2.b Cromatograma obtido para uma solução de norfloxacina empregando HPLC-DAD nas condições cromatográficas acima.

MÉTODO CROMATOGRÁFICO HPLC

PARÂMETROS DE CONFORMIDADE					
Composto	**t_M (min)**	**t'_R (min)**	**k**	**Fator de Assimetria**	**N° de pratos teóricos**
Danofloxacina	1,600	7,824	3,89	1,17	6,19 10^3
Norfloxacina	2,601	8,181	2,85	0,97	6,62 10^4

VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

LINEARIDADE

Para a eliminação de possíveis *outliers* foi empregado o teste de resíduos padronizados Jacknife. O Teste de Levene confirmou a homoscedasticidade da curva e, portanto, foi aplicado o método dos mínimos quadrados ordinários para estabelecimento da equação da curva de calibração.

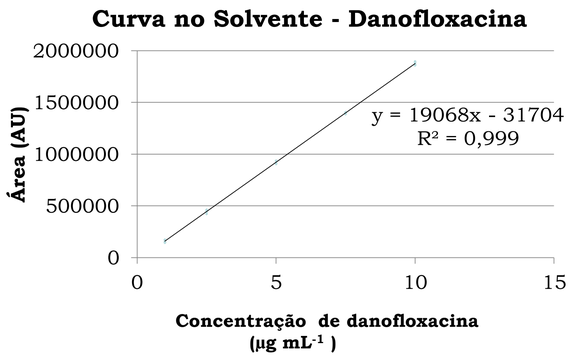

Figura 3.a Curva de calibração no solvente para Danofloxacina

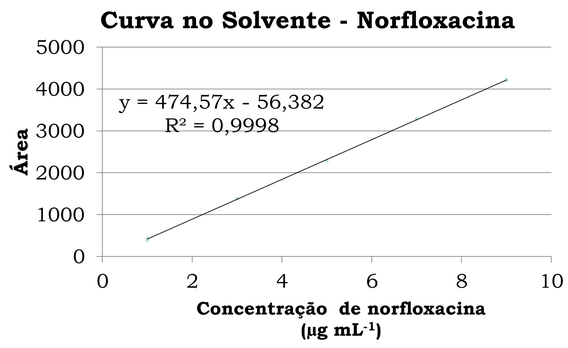

Figura 3.b Curva de calibração no solvente para Norfloxacina

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Parâmetros de validação		Danofloxacina	Norfloxacina
Linearidade (r)		0,999	0,999
Precisão	**Intra-dia, n=6 (RSD/%)**	4,70	2,70
	Inter-dia, 3 dias (RSD/%)	7,3	-
Efeito matriz		Não	Não

ROBUSTEZ (TESTE DE YOUDEN)

Danofloxacina

Parâmetros	Nominais	Modificados	Efeito padronizado (%)
Composição da fase móvel (fase orgânica: fase aquosa; v/v)	30:70	32:68	-1,72
Temperatura da coluna	30 °C	35 °C	0,35
Marca do MeOH	Tedia	JTBaker	0,13
Uso de ultra-som na etapa de preparo de amostra	Sem	Com 15'	6,54
Solubilização da amostra (solvente)	MeOH	FM (70:30 v/v)	-3,67
Volume de amostra	0,1 mL	0,2 mL	3,54
Comprimento de onda (nm)	282	285	4,61

Para 8 graus de liberdade, temos um valor limite de 5% para parâmetros robustos a um nível de confiança de 95%. Assim verifica-se que a utilização de ultrassom no preparo de amostra apresenta um efeito significativo e necessita ser rigorosamente controlado. Em relação ao outros parâmetros o método se mostrou robusto.

ANÁLISE DE AMOSTRAS

Com um nível de confiança de 95% o teor de danofloxacina no medicamento analisado foi de 24 ±1 mg/mL e o de norfloxacina de 13,4 ±0,5 g/100mL. Todas as análises foram realizadas pelo método de adição de padrão. Ambas amostras estão em conformidade com o valor nominal, considerando um faixa aceitável de 90 a 110%.

CONCLUSÕES

- A cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa, é adequada para separar os princípios ativos norfloxacina e danofloxacina.
- Comparando o Guia da ANVISA (2003) e do MAPA (2011), foi verificado que o segundo requer um número maior de ensaios para validação do método. Ainda, o Guia do MAPA recomenda tratamento estatístico mais criterioso e também mais laborioso. Em adição, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação propostos pelo MAPA abrangem geralmente uma faixa menor e nem sempre foram atingidos, principalmente no que concerne os parâmetros de precisão e exatidão.

AGRADECIMENTOS