

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS
FARMANGUINHOS / CTM

ANDREW ALVES DE SOUZA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO
DE CIPROFLOXACINO EM URINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CLUE-UV**

Rio de Janeiro

2016

ANDREW ALVES DE SOUZA

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
CIPROFLOXACINO EM URINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CLUE-UV

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Lato
Sensu* como requisito para obtenção do título de
Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas

Orientador: Prof. Daniel Filisberto Schulz, Doutor.

Rio de Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

S719v

SOUZA, Andrew Alves de

Validação de metodologia bioanalítica para determinação de ciprofloxacino em urina através da técnica de CLUE-UV. / Andrew Alves de Souza. – Rio de Janeiro, 2016.

vii, 33f. il : 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Filisberto Schulz

Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, 2016.

Bibliografia: f. 41-44

1. Ciprofloxacino. 2. Urina. 3. Cromatografia. 4. Validação.
5. Título.

CDD 615.1

ANDREW ALVES DE SOUZA

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de janeiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Daniel Filisberto Schulz, Doutor, Marinha do Brasil.

Orientador

Prof^a. Margareth Borges Coutinho Gallo, Doutora,
Farmanguinhos/FIOCRUZ

Prof^a. Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa, Doutora, EMBRAPA

RESUMO

O ciprofloxacino é o antimicrobiano mais usado entre os pertencentes à classe das quinolonas. É pouco metabolizado pelo organismo, o que permite o desenvolvimento de técnicas analíticas para o estudo da molécula íntegra a partir de matrizes biológicas. Neste trabalho, foi validado um método bioanalítico para a determinação de ciprofloxacino em urina humana, utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por ultravioleta. O método compreendeu uma técnica pré-analítica de diluição com acetonitrila e água ultra pura, apresentando simplicidade e baixo custo. A separação cromatográfica foi realizada através da coluna Shim-pack XR-ODS III 2.2 μm (200 x 2.0 mm), com fase móvel constituída por metanol, fase A, e metanol 10% mais 0,5% de ácido fórmico, fase B, com eluição por gradiente e tempo de corrida de 10,5 min. O tempo de retenção foi de 5,1 min. A faixa de concentração estudada ficou entre 10 e 540 μg e as curvas de calibração obtidas foram lineares, com fatores de correlação maiores que 0,98. Os ensaios para validação seguiram o estabelecido pela Resolução 27 de 2012 da ANVISA, e foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estudo de estabilidade. Os resultados obtidos nas análises para validação atenderam à norma e permitiram assegurar a confiabilidade do método, que poderá ser aplicado em estudos farmacocinéticos realizados no Hospital Naval Marcílio Dias da Marinha do Brasil.

Palavras-chave: ciprofloxacino; urina; cromatografia; validação.

ABSTRACT

Ciprofloxacin is the antibiotic most commonly used among those belonging to the class of quinolones. It is hardly metabolized by the body, which allows the development of analytical techniques to study the intact molecule from biological matrices. In this study, one was validated bioanalytical method for the determination of ciprofloxacin in human urine using liquid chromatography ultra high performance with detection by UV. The method comprises a pre-analytical technique of dilution with acetonitrile and ultra pure water, featuring simplicity and low cost. The chromatographic separation was performed by column Shim-pack XR-ODS III 2.2 micrometre (200 x 2.0 mm), with mobile phase consisting of methanol, phase A, and 10% methanol plus 0.5% formic acid, phase B, with eluting by gradient and run time 10.5 min. The retention time was 5.1 min. The concentration range studied was between 10 and 540 ug and the obtained calibration curves were linear with correlation factors greater than 0.98. The tests for validation followed established by Resolution 27 of 2012 of ANVISA, and evaluated the following parameters: selectivity, residual effect, matrix effect, calibration curve, precision, accuracy and stability study. The results obtained in this study for validation attended the norm and possible to ensure the reliability of the method, which may be used for pharmacokinetic studies at the Naval Hospital Marcilio Dias of the Navy of Brazil.

Keywords: ciprofloxacin; urine; chromatography; validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química básica das quinolonas	4
Figura 2. Estrutura química do ciprofloxacino	5
Figura 3. Fluxograma da etapa pré-analítica.....	14
Figura 4. Comparação dos cromatogramas do ciprofloxacino e do PI em urina e em solução.....	19
Figura 5. Comparação dos cromatogramas para demonstração da seletividade.....	22
Figura 6. Comparação dos cromatogramas para demonstração do efeito residual.....	23
Figura 7. Curvas de calibração com a equação da regressão linear e o coeficiente de correlação para as curvas 1, 2 e 3	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos da curva de calibração	16
Tabela 2. Gradiente de eluição	20
Tabela 3. Comparação de parâmetros cromatográficos deste trabalho com os da literatura	21
Tabela 4. Cálculos para demonstração do efeito matriz	24
Tabela 5. Comparação dos parâmetros dos picos de ciprofloxacino	24
Tabela 6. Cálculos estatísticos para comprovação da linearidade das curvas de calibração	25
Tabela 7. Cálculos para demonstração da precisão e exatidão.....	27
Tabela 8. Estudo de estabilidade dos padrões em solução	28
Tabela 9. Estudo de estabilidade dos padrões na matriz	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-DF** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada Detector de fluorescência
- CLAE-EM** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas
- CLAE-EM/EM** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas em série
- CLAE-UV** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Ultravioleta
- CLUE** - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
- CLUE-EM** - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas
- CLUE-UV** - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada ao Detector de Ultravioleta
- CQA** – Controle de Qualidade de Alta Concentração
- CQB** - Controle de Qualidade de Baixa Concentração
- CQD** - Controle de Qualidade de Diluição
- CQM** – Controle de Qualidade de Média Concentração
- CV** – Coeficiente de Variação
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- DP** – Desvio Padrão
- DF** – Detector de fluorescência
- EFS** – Extração por Fase Sólida
- EPR** – Erro Padrão Relativo
- FM** – Fase Móvel
- FMN** – Fator de Matriz Normalizado
- LIQ** – Limite Inferior de Quantificação
- LSQ** – Limite Superior de Quantificação
- MS** – Espectrômetro de Massas
- MS/MS** – Espectrômetro de Massas em série
- PI** – Padrão Interno
- R²** – Coeficiente de Correlação
- UV** - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. FLUOROQUINOLONAS	4
3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS	6
3.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EM LABORATÓRIOS ANALÍTICOS	8
3.3.1. Seletividade	9
3.3.2. Efeito residual	9
3.3.3. Efeito matriz	9
3.3.4. Linearidade (curva de calibração)	10
3.3.5. Precisão	10
3.3.6. Exatidão	11
3.3.7. Estudo de estabilidade	11
4. METODOLOGIA	12
4.1. MATERIAL	12
4.1.1. Reagentes e padrão	12
4.1.2. Equipamentos e acessórios	12
4.2. MÉTODOS	13
4.2.1. Etapa pré-analítica	14
4.2.2. Etapa analítica	14
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. ETAPA PRÉ-ANALÍTICA	18
5.2. ETAPA ANALÍTICA	19
5.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	21
5.3.1. Seletividade	21

5.3.2. Efeito residual	23
5.3.3. Efeito matriz	24
5.3.4. Linearidade (curva de calibração).....	24
5.3.5. Precisão e exatidão	26
5.3.6. Estudo de estabilidade.....	27
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O ciprofloxacino é um antimicrobiano de amplo espectro largamente usado no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas e, principalmente, pelas Gram-negativas. Este fármaco pertence ao grupo das fluoroquinolonas que agem inibindo a síntese do DNA bacteriano. É pouco metabolizado pelo organismo e, deste modo, eliminado majoritariamente na forma inalterada através da urina (VYBÍRALOVÁ et al., 2009). Essa característica farmacocinética do ciprofloxacino é importante para a realização de estudos analíticos a partir desta matriz biológica.

A análise de fármacos em urina exige o emprego de métodos bioanalíticos que permitam o trabalho com baixas concentrações do analito e apresentem resultados confiáveis. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca como uma técnica bastante usada neste tipo de análise, possuindo elevada sensibilidade em ensaios para identificação e quantificação do ciprofloxacino através do sistema de detecção por ultravioleta (CAÑADA-CAÑADA; ESPINOSA-MANSILLA; MUÑOZ, 2007; SUN; QIAO, 2008; TUERK et al., 2006). Para a obtenção de resultados fidedignos nas análises do fármaco nesta matriz é necessária a validação da metodologia desenvolvida, a qual deve seguir os critérios estabelecidos pela legislação vigente no país (ANVISA, 2012).

Muitos trabalhos reportam diferentes técnicas pré-analíticas para obtenção de fluoroquinolonas em urina (LOMBARDO-AGUÍ et al., 2012; JUNZA et al., 2014; SUN; SU; LI, 2008), e também, apresentam métodos analíticos que utilizam diferentes sistemas de detecção (HOU et al., 2014; RAMBA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2009; SERENO; BOOMEL; HALLET, 2007). Com isso, há uma grande variação nos valores dos parâmetros analíticos e no custo das análises. Desta forma, o presente estudo propõe uma técnica simples e de baixo custo para obtenção de ciprofloxacino em amostras de urina, e uma técnica analítica eficaz, rápida e com baixo consumo de solventes, através da cromatografia líquida de ultra eficiência

(CLUE), modernização da técnica de CLAE, acoplada ao detector de ultravioleta.

Após a validação desta nova metodologia, o Laboratório de Bioanálises do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias, da Marinha do Brasil, poderá aplicá-la em estudos farmacocinéticos para avaliação da eliminação do ciprofloxacino através da análise da urina de pacientes em tratamento com este antimicrobiano.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Validar uma metodologia bioanalítica para determinação de ciprofloxacino em urina humana por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLUE-UV).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se a técnica pré-analítica, simples e de baixo custo, estabelecida previamente pelo laboratório para obtenção de ciprofloxacino em urina é adequada aos ensaios de validação.

Demonstrar que as condições analíticas pré-estabelecidas pelo laboratório levam a resultados confiáveis para identificação e quantificação do ciprofloxacino em um baixo tempo de análise.

Comprovar a confiabilidade do método bioanalítico desenvolvido através dos ensaios para validação definidos pela Resolução 27 de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. FLUOROQUINOLONAS

O uso clínico de antimicrobianos pertencentes ao grupo das quinolonas data a partir da década de 1960. O ácido nalidíxico, produzido sinteticamente, foi a primeira quinolona a ser utilizada na terapia medicamentosa, restrito ao tratamento de infecções do trato urinário. Entretanto, a sua baixa biodisponibilidade após administração por via oral, a baixa atividade terapêutica e a elevada resistência apresentada por bactérias Gram-negativas limitaram sua indicação na clínica, o que conduziu ao desenvolvimento de novas quinolonas com maior eficácia e espectro de ação ampliado, as fluoroquinolonas (GOODMAN; BRUNTON; LAZO, 2005; GUTIÉRREZ-ZUFIAURRE, 2004).

As quinolonas fluoradas são resultantes da adição molecular de um átomo de flúor na posição seis e de um anel piperazínico na posição sete na estrutura básica das quinolonas, como mostrada na **figura 1**. Tais alterações levaram a um aumento significativo da atividade antibacteriana e ao melhoramento das propriedades farmacocinéticas destes fármacos, respectivamente (GUTIÉRREZ-ZUFIAURRE, 2004). Além desses benefícios, menores efeitos colaterais e menor resistência bacteriana estão relacionados à terapia com fluoroquinolonas (GOODMAN; BRUNTON; LAZO, 2005).

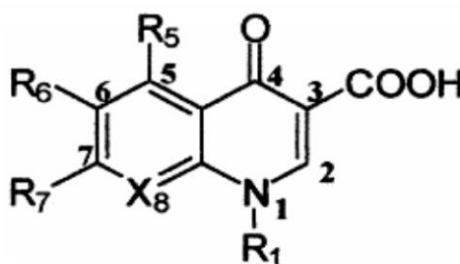


Figura 1. Estrutura química básica das quinolonas (adaptado de Cazedey, 2009).

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas ocorre através da inibição da síntese da molécula de DNA bacteriana. Ao se ligarem às enzimas nucleares topoisomerase II (DNA-girase) e topoisomerase IV, estes antimicrobianos impedem as etapas de transcrição, replicação e separação do

DNA de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, determinando o largo espectro de ação desta nova classe de quinolonas (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). Com a ampliação da atividade bacteriana, as quinolonas deixaram de ser indicadas exclusivamente para infecções urinárias e passaram a ser utilizadas no tratamento do acometimento de outros locais, como: infecções gastrintestinais, infecções respiratórias, infecções ósseas e articulares, prostatites e infecções genitais causadas por algumas doenças sexualmente transmissíveis. A maioria destas infecções é tratada com o ciprofloxacino, antimicrobiano com elevada efetividade pertencente a esta classe (GOODMAN; BRUNTON; LAZO, 2005). A **figura 2** apresenta a estrutura química da molécula de ciprofloxacino.

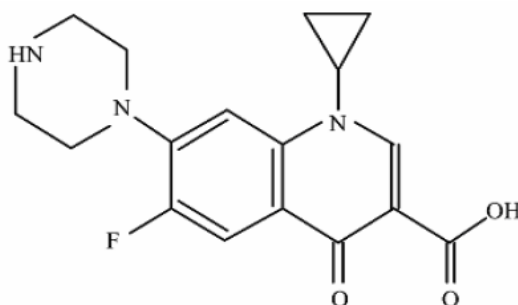


Figura 2. Estrutura química do ciprofloxacino (adaptado de Cazedey, 2009).

Concernente à farmacocinética, as fluoroquinolonas possuem boa absorção oral, apresentando biodisponibilidade entre 80 e 95%; o tempo de meia-vida no sangue varia de 3 a 10 horas, conforme o fármaco específico; e são eliminadas principalmente por via renal através da secreção tubular e da filtração glomerular (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). A baixa metabolização apresentada por algumas fluoroquinolonas, como demonstrada pelo ciprofloxacino (PELLEGRINO; SEGOLONI; CAGINI, 2008; VYBÍRALOVÁ et al., 2009), associada à sua elevada concentração na urina de pacientes em uso deste antimicrobiano, tem possibilitado o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a identificação e quantificação destes fármacos nesta matriz através da molécula íntegra (CAÑADA-CAÑADA et al., 2009; RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2009; SUN; SU; LI, 2010; TUERK et al., 2006).

3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS

A análise de fluoroquinolonas a partir de diferentes tipos de matrizes, biológicas, veterinárias ou ambientais, pode ser realizada através de distintas técnicas analíticas. As principais reportadas pela literatura são a eletroforese capilar e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido à elevada eficiência e à obtenção de resultados confiáveis apresentados por estas (MARKMAN, KOSCHTSCHAK; YAHO, RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2009; SUN; SU; LI, 2010; VYBÍRALOVÁ et al., 2009). A detecção destes fármacos por CLAE pode ser determinada de acordo com o módulo detector acoplado ao seu sistema: CLAE-UV (acoplado ao detector de ultravioleta), CLAE-DF (acoplado ao detector de fluorescência) e CLAE-EM ou EM/EM (acoplado ao detector de massas ou massas em série) (CAÑADA-CAÑADA et al., 2009). O uso do detector eletroquímico também é relatado pela literatura (SERENO et al., 2007, apud CAÑADA-CAÑADA et al., 2009, p. 4869).

O emprego do detector de massas por CLAE nas análises de fluoroquinolonas ocorre principalmente quando é exigido elevada sensibilidade, especificidade e versatilidade do sistema de detecção, como exemplo, nos estudos para avaliação de resíduos destes fármacos presentes em amostras de alimentos de origem animal (HOU et al., 2014; LOMBARDO-AGUÍ et al., 2012). Além da aplicação na análise de produtos veterinários, Ibanéz et al. (2009) obtiveram bons resultados ao investigarem amostras ambientais de águas contaminadas por antimicrobianos através da CLAE-EM/EM. Mesmo em baixas concentrações, na ordem de nanogramas, o estudo permitiu a identificação e a quantificação desses fármacos nas amostras analisadas. Apesar das vantagens apresentadas pelo detector de massas, o alto investimento em sua aquisição é um fator limitante para muitos laboratórios, o que torna o emprego da CLAE-UV e da CLAE-DF mais habitual em estudos com amostras mais concentradas, como as matrizes biológicas, devido ao menor custo com equipamento e menor exigência em relação à sensibilidade (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2009).

Análises de fluoroquinolonas em fluidos biológicos através da CLAE-DF são reportadas na literatura e apresentam bons resultados no que se refere à sensibilidade e especificidade, como em Guo et al. (2005) na avaliação de ciprofloxacino no plasma; Rambla-Alegre, Esteve-Romero e Carda-Broch (2009), na avaliação de diferentes fluoroquinolonas em urina; e Cañada-Cañada et al. (2009), que avaliaram estes fármacos em soluções aquosas e em amostras de urina. Amostras biológicas também são comumente analisadas por CLAE-UV para determinação de fluoroquinolonas, como as descritas por Kumar et al. (2008) e por Sun, Su e Li (2008), a partir da urina; e por Pellegrino, Segoloni e Cagini (2008), a partir do humor aquoso. Cañada-Cañada, Espinosa-Mansilla e Muñoz (2007) em estudo realizado com amostras de urina para identificação e quantificação de 15 fluoroquinolonas, fizeram uma análise comparativa entre estes dois detectores e obtiveram melhores resultados de sensibilidade através do CLAE-UV em relação ao CLAE-DF.

Anteriormente à análise por CLAE as amostras necessitam passar por processos de extração, concentração e/ou diluição, cujo objetivo é separar a molécula do fármaco de diferentes substâncias de não interesse e de interferentes presentes na matriz, além de poder aumentar a proporção deste analito na amostra (LANÇAS, 2004). Grande parte dos métodos de extração apresentados pela literatura para análise de fluoroquinolonas a partir de matrizes complexas, principalmente biológicas, ocorre através da extração por fase sólida (EFS) (LOMBARDO-AGUÍ et al., 2012; SUN; SU; LI, 2008; TUERK et al., 2006). A obtenção do fármaco por este método apresenta melhor recuperação deste quando comparado com o método de extração líquido-líquido e por diluição (PELEGRINO; SEGOLONI; CAGINI, 2007; VYBÍRALOVÁ et al., 2009), No entanto, estas duas últimas técnicas demandam menor consumo de reagentes e solventes, além de possuir menor custo com o processo (JUNZA et al., 2014).

3.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EM LABORATÓRIOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um novo método analítico ou bioanalítico deve ser acompanhado de um procedimento de validação, no qual exigências analíticas pré-definidas deverão ser demonstradas através de ensaios específicos. Uma vez que os resultados destes testes estejam dentro dos parâmetros estabelecidos por diretrizes nacionais ou internacionais, regulamentares ou orientadoras, o método pode ser considerado validado e pode-se afirmar que conduz à finalidade pretendida de forma confiável e reproduzível. A validação de uma metodologia analítica é obrigatória antes da sua implantação na rotina de um laboratório analítico (ANVISA, 2003; ICH, 1994; INMETRO, 2010; ISO/IEC 17025, 2005; US-FDA, 2000; US-FDA, 2001).

No Brasil, os laboratórios analíticos durante o procedimento de validação devem seguir as normas estabelecidas pela Resolução 27 de 22 de maio de 2012, da ANVISA, e as orientações do documento DOQ-CGCRE-008 de julho de 2011, do Instituto Nacional de Metrologia, Validação e Qualidade Industrial (INMETRO). Os critérios para aceitação da nova metodologia levam em conta fatores peculiares da análise pretendida, como por exemplo, se o método será executado somente em um laboratório e em um equipamento específico, não é necessária a realização dos ensaios de validação em outro laboratório ou equipamento. Igualmente, na análise de elementos traço não será exigida a verificação da ampla faixa de linearidade do equipamento. Com isso, os ensaios são adequados de acordo com o que se pretende analisar e a rotina de trabalho (RIBANI et al., 2004).

Os métodos bioanalíticos que utilizam a CLAE para identificação e quantificação de fármacos e/ou seus metabólitos a partir de matrizes biológicas deverão assegurar a validação através da apresentação dos ensaios de seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estudo de estabilidade. É necessário que os equipamentos e utensílios que necessitem de calibração estejam com esta atualizada durante a realização destes testes (ANVISA, 2012). A seguir são descritos cada

parâmetro de validação exigido pela RDC 27 de 2012 da ANVISA para validação de métodos bioanalíticos.

3.3.1. Seletividade

É a capacidade de se avaliar a partir de uma amostra complexa a presença da substância em estudo, avaliando se os interferentes da matriz causam alguma alteração na resposta do pico correspondente ao analito (RIBANI, 2004). Para a demonstração da seletividade deve ser verificado se picos interferentes no mesmo tempo de retenção do analito, na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ), correspondem a no máximo 20% (vinte por cento) da resposta deste, e para o PI, a no máximo 5% (cinco por cento) de sua resposta (ANVISA, 2012).

3.3.2. Efeito residual

O efeito residual ou “carryover” corresponde ao aumento da resposta do analito ou do PI provocado pela contaminação de amostras com os mesmos padrões analisados previamente à injeção atual. A avaliação deste parâmetro deve ocorrer por meio da comparação entre os cromatogramas das injeções de amostras do branco e da amostra do analito na concentração do limite superior de quantificação (LSQ) acrescida do PI. Picos interferentes na amostra do branco após a injeção do LSQ não devem ser superiores a 20% da resposta do LIQ, e não superiores a 5% da resposta do PI (ANVISA, 2012).

3.3.3. Efeito matriz

É o efeito causado por componentes presentes na matriz biológica no pico correspondente ao analito e ao PI. É avaliado através da análise dos padrões na matriz e em solução. A demonstração deste parâmetro deve ser realizada através da obtenção do fator de matriz normalizado por PI (FMN) para a amostra de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e para a amostra de controle de qualidade alta concentração (CQA). Em seguida, deve ser calculado o coeficiente de variação (CV) dos FMNs destas amostras, o qual

deve ser inferior a 15% (quinze por cento) (ANVISA, 2012). Abaixo segue a fórmula para o cálculo do FMN:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

3.3.4. Linearidade (curva de calibração)

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia produzir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de trabalho (RIBANI et al., 2004). É demonstrada através da construção de, no mínimo, três curvas de calibração que devem ser preparadas através das seguintes amostras: branco, amostra zero (matriz acrescida somente do PI) e, no mínimo, 6 (seis) amostras com concentrações diferentes do analito adicionadas do PI. Para a construção da curva não são consideradas as amostras branco e zero (ANVISA, 2012).

A partir das respostas obtidas pelo equipamento de CLAE das replicatas das amostras, verifica-se a linearidade da curva de calibração através da equação da regressão linear, estabelecida pelo modelo dos mínimos quadrados, e do coeficiente de correlação. Entretanto, previamente à obtenção da equação da curva é demonstrada a homocedasticidade dos dados através do teste de Cochran (INMETRO, 2011). Segue abaixo a fórmula para o seu cálculo.

$$C = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}}$$

3.3.5. Precisão

Corresponde à dispersão dos resultados obtidos a partir de ensaios independentes de amostras ou padrões sob as mesmas condições de análise (RIBANI, 2004). É determinada em uma mesma corrida e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes que deverão ser realizadas em dias distintos. Cada corrida deverá conter 5 (cinco) concentrações diferentes do analito nas amostras: LIQ, CQB, controle de qualidade de média concentração (CQM),

CQA e controle de qualidade de diluição (CQD), acrescidas do PI. Todos os pontos devem ser analisados em, no mínimo, 5 (cinco) replicatas e o resultado é expresso pelo CV que não deve ser superior a 20% para o LIQ, e para as demais concentrações, não superior a 15% (ANVISA, 2012). É expressa abaixo a fórmula para o cálculo da precisão:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

3.3.6. Exatidão

É a concordância entre os resultados obtidos por uma análise com aqueles considerados como referência (RIBANI, 2004). É determinada em uma mesma corrida e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes que deverão ser realizadas em dias distintos. Cada corrida deverá conter 5 (cinco) concentrações diferentes do analito nas amostras: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, acrescidas do PI. Todos os pontos devem ser analisados em, no mínimo, 5 (cinco) replicatas e o resultado é expresso pelo erro padrão relativo (EPR) que não poderá possuir valores acima da faixa de mais ou menos 20% (vinte por cento) para o LIQ, e para os demais pontos, os valores devem estar na faixa de mais ou menos 15% (quinze por cento) (ANVISA, 2012). Segue abaixo a fórmula para o cálculo da exatidão:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

3.3.7. Estudo de estabilidade

Os ensaios para a verificação da estabilidade do analito na matriz têm o objetivo de determinar a variação de sua concentração pelo período de tempo em que a amostra é armazenada antes do preparo e da análise. Podem ser realizados através do estudo da estabilidade do analito na matriz biológica, estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento, estabilidade de longa duração, estabilidade pós-processamento e estabilidade do analito e PI em solução (ANVISA, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAL

4.1.1. Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados no desenvolvimento do método foram: acetonitrila e metanol grau HPLC da J. T. Baker (USA), ácido fórmico 48-52% grau HPLC da Fluka (EUA), ácido fórmico 99% grau HPLC da Merck (Alemanha) e ácido fórmico 88% PA da Sigma-Aldrich (EUA). A água utilizada foi obtida por sistema de ultra purificação de água, com resistividade de 18,18 MΩ.cm e condutividade de 0,05 μS/cm a 25 graus Celsius. Os padrões analíticos primários de ciprofloxacino e levofloxacino, certificados, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

4.1.2. Equipamentos e acessórios

Equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência da marca Shimadzu, modelo Nexera (Japão), composto por: duas bombas, forno de coluna, amostrador automático, detector de arranjo de fotodiodos e degaseificador; coluna cromatográfica Shim-pack, XR-ODS III, com dimensões 200 x 2.0 mm, partícula 2.2 μm, marca Shimadzu (Japão); balança analítica da marca Marte, modelo AY220 (Brasil); centrífuga refrigerada da marca Hettich, modelo Rotina 38R (Alemanha); agitador tipo Vórtex da marca Biomixer, modelo QL-901 (Brasil); ultra purificador de água da marca Gehaka, modelo Master P&D (Brasil); pipetas automáticas com volumes reguláveis da marca Gilson (França); refrigerador farmacêutico 2 a 8°C da marca Sanyo (Inglaterra); freezer - 20°C da marca Indrel (Brasil); banho de ultrassom da marca Soniclear (Brasil); proveta; béquer; balão volumétrico; vials com volume de 1,5 mL; tubos de polipropileno com volume de 4 mL; e ponteiros para pipetas automáticas.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Etapa pré-analítica

O preparo das amostras para análise seguiu uma técnica de diluição definida previamente pelo laboratório. Inicialmente foram preparadas as soluções padrões de ciprofloxacino e levofloxacino na concentração de 1,0 mg/mL em água ultra purificada, ficando armazenadas sob refrigeração em temperatura de 2 a 8°C. As amostras de urina foram coletadas de seis voluntários sadios que não estavam fazendo o uso destes antimicrobianos, e em seguida foram misturadas em um único recipiente estéril. A solução padrão de levofloxacino foi acrescida nas amostras de urina para servir como padrão interno (PI) nas análises para validação, em concentração constante de 100 µg/mL. A resolução 27 de 2012 (ANVISA) determina o uso de PI para a validação de métodos bioanalíticos.

A solução padrão de ciprofloxacino foi adicionada em diferentes concentrações nas amostras de urina, acrescidas do PI, para completar o volume de 1,0 mL, conforme os pontos estabelecidos nos parâmetros para validação do método. Posteriormente foram pipetados 500 µL das amostras e adicionados em tubos de polipropileno com 500 µL de acetonitrila. Os tubos, então, foram colocados por 5 segundos em agitador tipo vórtex para homogeneização da fase aquosa com a fase orgânica, e em seguida, foram centrifugados a 4000 rpm por 30 minutos e a temperatura de 19°C. Após a centrifugação do material, foram pipetados 100 µL do sobrenadante dos tubos e diluídos em vials acrescidos de 900 µL da solução água:acetonitrila (50:50 v/v). Estes foram agitados vigorosamente de forma manual para que a solução presente nos vials e as amostras acrescidas do padrão de ciprofloxacino e do PI fossem bem misturadas para obtenção de um meio homogêneo. Em seguida, as amostras foram analisados por CLUE-UV conforme as condições cromatográficas pré-estabelecidas pelo laboratório. A **figura 3** abaixo apresenta o fluxograma das fases da etapa pré-analítica.

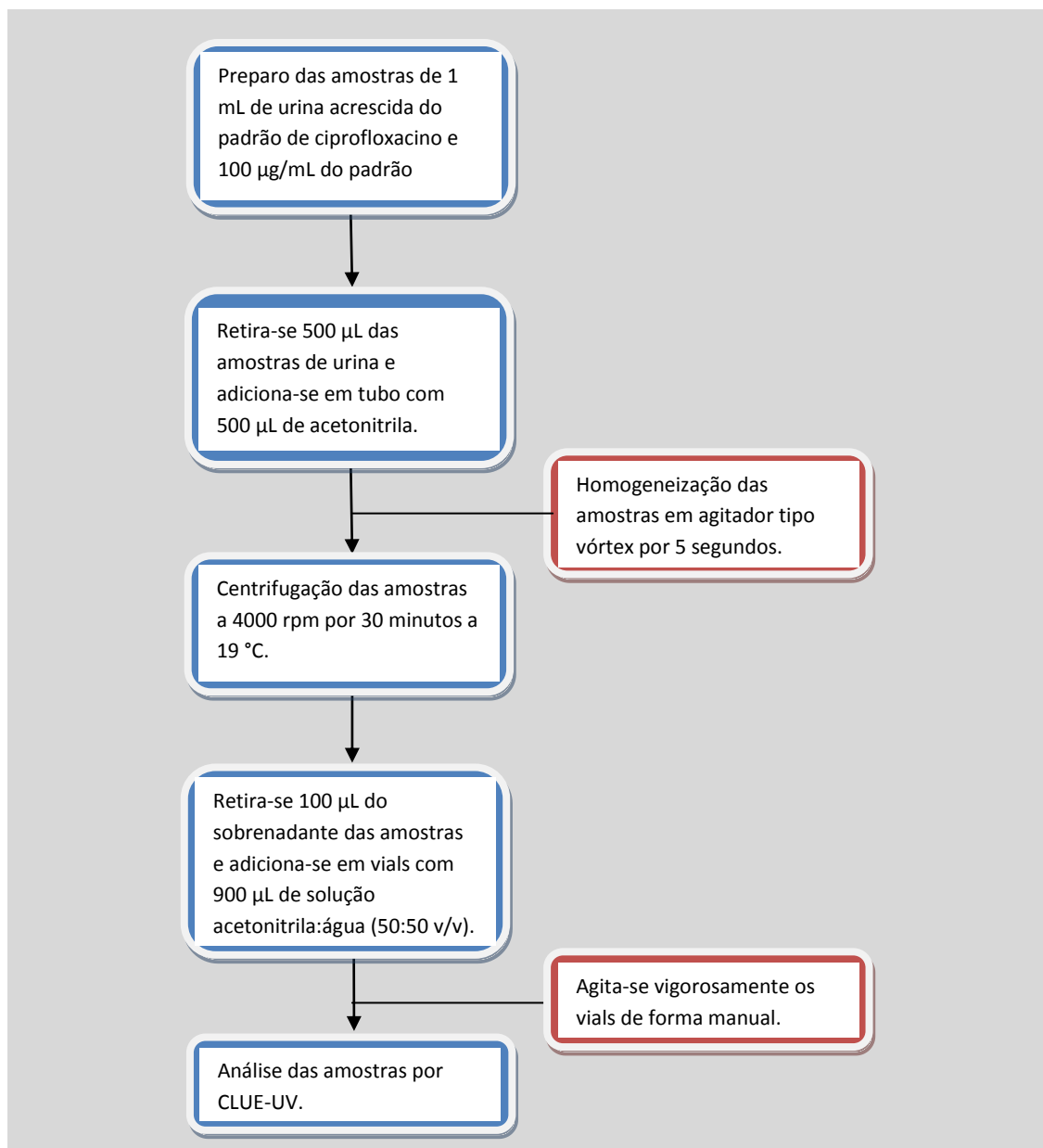


Figura 3. Fluxograma da etapa pré-analítica.

4.2.2. Etapa analítica

As análises das amostras foram realizadas através do cromatógrafo líquido de ultra eficiência com o sistema de detecção por ultravioleta. As condições cromatográficas foram estabelecidas conforme ensaios prévios realizados pelo laboratório com o mesmo analito, os quais consideraram a sua característica química e parâmetros convencionados pela quinta edição da Farmacopeia Brasileira, volume 2, de 2010 (ANVISA). A fase móvel (FM) foi

composta por metanol 10% mais ácido fórmico 0,5%, fase A, e metanol, fase B, com eluição por gradiente. Um baixo fluxo da FM, 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, foi proposto para redução do consumo de solventes e minimização da geração de resíduos químicos. O volume de injeção foi de 1 μL e a temperatura do módulo do forno da coluna foi de 40°C. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo fase reversa C18, da marca Shimadzu, modelo Shim-pack XR-ODS III, com dimensões 200 x 2.0 mm e partícula 2.2 μm . A escolha do comprimento de onda de 278 nm seguiu o determinado pela farmacopeia.

O “software” utilizado para operação do cromatógrafo foi o LCsolution® da Shimadzu, e o tratamento dos dados obtidos nas análises e os cálculos estatísticos foram realizados pelo “software” Excel® da Microsoft.

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O presente trabalho seguiu, principalmente, as normas para validação de métodos bioanalíticos estabelecidas pela resolução 27 de 2012 (ANVISA) e a as orientações sobre validação de métodos analíticos do documento DOQ-CGCRE-008 de 2011 (INMETRO). Este último foi utilizado de forma a complementar as exigências da primeira. Foram realizados os ensaios para verificação de cada parâmetro estabelecido pela ANVISA.

A seletividade foi verificada através da comparação do cromatograma da amostra branco com os cromatogramas da amostra acrescida somente do PI e aquela com a presença do analito e do PI. O efeito residual foi analisado através da injeção de 4 (quatro) amostras consecutivas: 1. branco; 2. LSQ mais PI; 3. branco; e 4. branco. Em seguida, foi verificada nos cromatogramas das amostras 3 e 4 a presença de picos interferentes oriundos da amostra 2, nos tempos de retenção do analito e do PI. A análise do efeito matriz foi realizada através de 6 (seis) replicatas de cada amostra, CQB e CQA, em urina e em solução. As respostas obtidas foram aplicadas na fórmula do FMN e o CV para cada concentração foi calculado utilizando a fórmula do FMN.

Os ensaios para verificação da linearidade do método proposto foram realizados, inicialmente, a partir do estabelecimento de 7 (sete) concentrações diferentes de ciprofloxacino na amostra de urina, dentro da faixa de trabalho esperada. A **tabela 1** apresenta os pontos usados para a construção da curva de calibração deste trabalho.

Tabela 1. Pontos da curva de calibração.

Curva de Calibração		
Pontos	Ciprofloxacino (analito) ($\mu\text{g/mL}$)	Levofloxacino (PI) ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	100
2	90	100
3	180	100
4	270	100
5	360	100
6	450	100
7	540	100

A construção da curva de calibração no corrente método de validação foi iniciada pela obtenção do LIQ que considerou a menor concentração do analito na amostra que apresentasse um pico com elevado número de pratos teóricos, boa resolução e assimetria do pico próxima de 1 (um). A partir do LIQ, foram estabelecidos mais 6 (seis) pontos equidistantes para a curva, dentro da faixa de concentração esperada para a rotina de trabalho. Para cada concentração foram realizadas 5 (cinco) replicatas em uma mesma corrida, e em seguida, foram realizados os cálculos estatísticos para verificação da linearidade da curva. O mesmo procedimento foi realizado em 3 (três) dias distintos para obtenção de 3 (três) curvas.

Para a obtenção da precisão, as amostras com as concentrações do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD foram preparadas e analisadas através de 5 (cinco) replicatas de cada ponto em uma mesma corrida para o cálculo do CV da precisão intracorrída. Nos dois dias seguintes, repetiu-se o mesmo ensaio e o CV foi calculado para avaliar a precisão intracorrída e intercorrídas. Já para a obtenção da exatidão, foram utilizadas as mesmas amostras para o ensaio da precisão, porém o cálculo foi realizado através do EPR da exatidão intracorrída.

E nos dois dias seguintes, repetiu-se o mesmo ensaio e o EPR foi calculado para avaliar a exatidão intracorrída e intercorrídas.

Os ensaios para o estudo de estabilidade foram realizados conforme a rotina laboratorial estabelecida para este método bioanalítico. A estabilidade do padrão de ciprofloxacino foi verificada através dos ensaios de estabilidade na matriz biológica e em solução, após 2 horas da coleta da amostra, e após ciclos de congelamento e descongelamento de 12 horas e 72 horas. As amostras usadas para este estudo foram a CQB e a CQA, exceto para a estabilidade em solução, na qual foram usadas as concentrações da solução primária (1 mg/mL) e da solução de trabalho (100 µg/mL).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ETAPA PRÉ-ANALÍTICA

A maioria dos métodos de preparo de amostras descritos na literatura em que houve a determinação de fluoroquinolonas a partir de matrizes complexas utilizaram técnicas de extração para recuperação do analito, principalmente a por EFS (AGUÍ et al., 2012; HOU et al., 2014; IBANEZ et al., 2009; TUERK et al., 2006; VYBÍRALOVÁ et al., 2005). O método adotado no presente estudo para o preparo por diluição, mostrou ser simples, rápido e de baixo custo, o qual consumiu baixa quantidade de solventes e despendeu menor investimento com equipamentos e consumíveis quando comparado ao procedimento por EFS.

Na etapa do preparo de amostras foi verificada a adequabilidade do método pré-analítico ao processo de validação por meio de várias repetições de cada fase deste procedimento. Logo após cada processamento das amostras, foram realizados os ensaios analíticos onde foi permitida a observação de similares respostas para o analito, sustentando a eficiência do método criado pelo laboratório.

A mistura das 6 (seis) amostras de urina de indivíduos diferentes em um único frasco pretendeu aumentar a presença de um maior número de substâncias interferentes na amostra final com o objetivo de verificar se poderiam alterar a resposta do analito, o que não foi observado nos ensaios. Esta análise foi demonstrada no ensaio do efeito matriz descrito mais adiante no item 5.3.3. Na **figura 4** foi possível observar a presença de poucos interferentes na matriz pela comparação dos cromatogramas dos padrões do analito e do PI na amostra de urina final e em solução. Foi observado, também, que estes eluíram em tempos de retenção diferentes do analito e do PI.

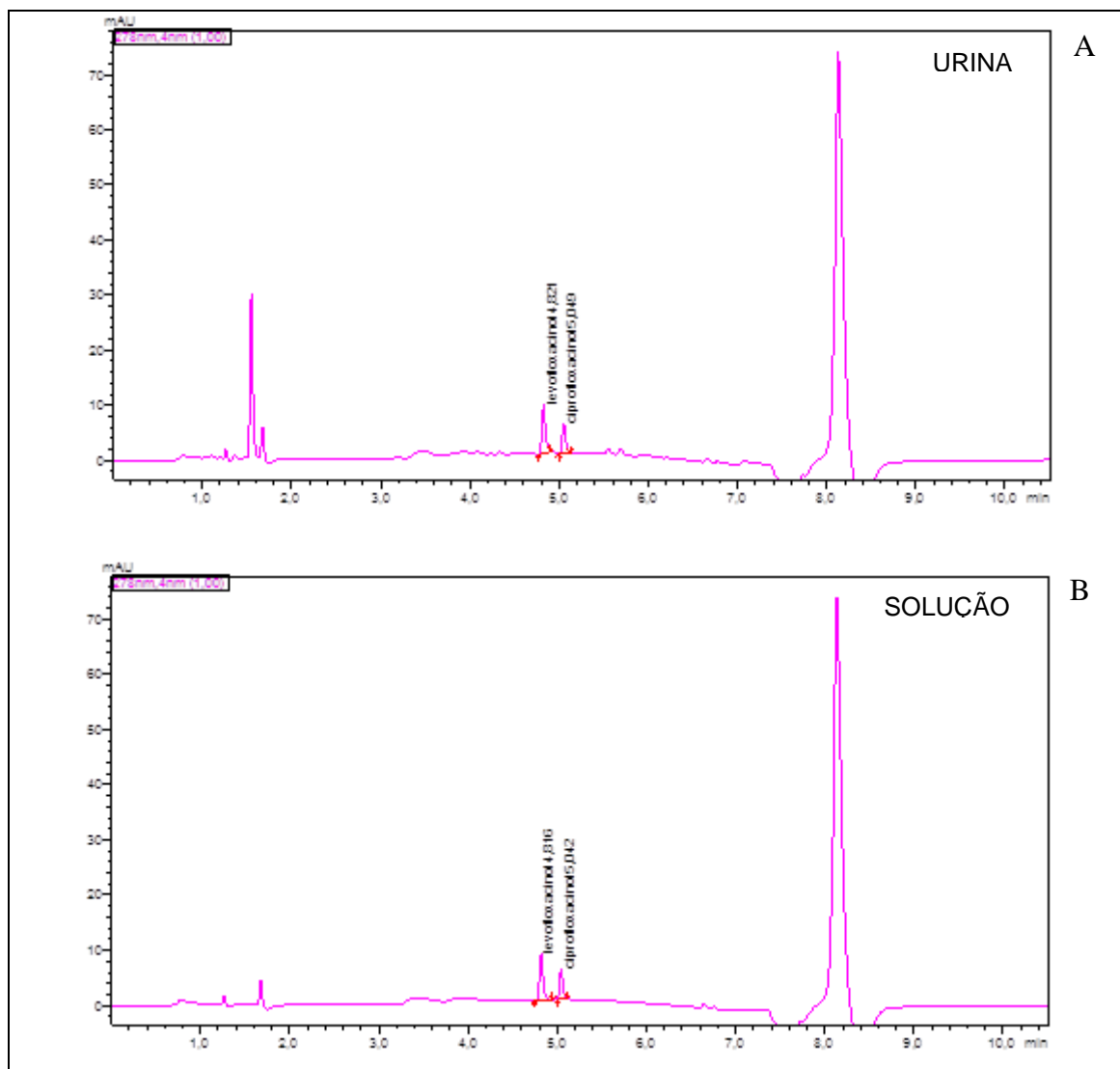


Figura 4. Comparação dos cromatogramas do ciprofloxacino e do PI em urina e em solução. A - padrões na urina; B - padrões em solução. Onde: primeiro pico - PI; segundo pico - ciprofloxacino.

5.2. ETAPA ANALÍTICA

Assim como o método pré-analítico, os parâmetros da etapa analítica procederam de uma metodologia já estabelecida pelo Laboratório de Bioanálises do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias, local onde este estudo foi realizado. O gradiente da fase móvel utilizada (**tabela 2**), composta pelas fases A, metanol 10% mais ácido fórmico 0,5%, e B, metanol, permitiu uma boa separação dos padrões analisados e um baixo tempo de retenção, de 5,1 minutos para o analito e 4,9 minutos para o padrão

interno. A adição de ácido fórmico na fase A tornou possível a obtenção de picos gaussianos e aumentou a sensibilidade da detecção por UV. Tal fato foi observado pela comparação entre as análises prévias em que foi usado o ácido fórmico 99% grau HPLC com os ensaios para validação, no qual foram testados o ácido fórmico 48-52% grau HPLC e o ácido fórmico 88% padrão analítico, todos de marcas diferentes. A intensidade do sinal com as adições do primeiro e do segundo na fase A foi significativamente maior com relação à adição do terceiro, estando os três na mesma proporção. E na comparação entre os dois primeiros, o ácido fórmico 99% apresentou maior sinal do que o ácido fórmico 48-52%, entretanto, devido a limitações de recursos do laboratório foi utilizado o segundo na realização das análises.

Tabela 2. Gradiente de eluição. Fase A – metanol 10% mais ácido fórmico 0,5%; Fase B – metanol.

Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Fase A	Fase B
0,01	400	100	0
1,25	400	100	0
5,75	400	47	53
6,25	400	0	100
6,45	400	0	100
6,50	400	100	0
10,50	400	100	0

O fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ proporcionou um baixo consumo de solventes, importante para minimização da geração de resíduos químicos. A seleção do comprimento de onda de 278 nm seguiu o estabelecido pela quinta edição da Farmacopeia Brasileira. Os parâmetros utilizados na fase analítica foram comparados com os dados cromatográficos de diferentes trabalhos da literatura, que também analisaram o ciprofloxacino, para demonstração de possíveis vantagens do método validado por este estudo, conforme demonstrados na **tabela 3**.

Tabela 3. Comparação de parâmetros cromatográficos deste trabalho com os da literatura. t corrida – tempo de corrida; tR – tempo de retenção; vol. inj. – volume de injeção.

Parâmetros	Coluna C18 (dimensões)	Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	t corrida (min)	tR (min)	vol. inj. (μL)	Técnica
Trabalho	200 x 2.0 mm, 2,2 μm	400	10,5	5.1	1	CLUE-UV
AGUÍ (2012)	50 x 2.1 mm, 1.8 μm	400	5,5	1	5	CLUE-EM
ALEGRE (2009)	150 x 4.6 mm, 5 μm	1000	10	6.4	20	CLAE-DF
CAÑADA (2009)	150 x 4.9 mm, 4 μm	1500	11	6.4	20	CLAE-DF
GUA (2005)	250 x 4.0 mm, 5 μm	1000	11	4.3	20	CLAE-DF
IBANEZ (2009)	50 x 2.1 mm, 1.7 μm	300	6	2	10	CLUE-EM
JUNZA (2014)	100 x 2.1 mm, 1.7 μm	300	7	3.7	7	CLUE-EM
TUERK (2006)	250 x 3 mm, 5 μm	300	20	10.8	N/I	CLAE-UV
VIBÍRALOVÁ (2005)	250 x 4.5 mm, 5 μm	1000	25	13.9	N/I	CLAE-DF

A tabela acima permite verificar que os autores que usaram a técnica de CLUE em seus trabalhos obtiveram os tempos de corrida e de retenção significativamente inferiores ao que usaram a técnica de CLAE. E entre os que usaram a primeira técnica, o presente estudo apresentou maiores valores para esses parâmetros devido ao comprimento da coluna ser duas a quatro vezes maior quando comparado aos outros trabalhos. Outra comparação relevante é em relação ao baixo fluxo utilizado na CLUE, importante para a diminuição do gasto de solventes e da geração de resíduos químicos nas análises.

5.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.3.1. Seletividade

Para avaliação da seletividade, assim como dos demais parâmetros para validação, foi usada a mistura das amostras de urina provenientes de 6 (seis) voluntários com o objetivo de aumentar a complexidade da matriz. Foram comparados os cromatogramas da amostra branco com aqueles da amostra zero e da amostra do LIQ acrescida do PI, conforme apresentado na **figura 5**. A análise comparativa dessas amostras permitiu demonstrar que a seletividade

está dentro dos limites estabelecidos pela norma da ANVISA, devido à ausência de picos interferentes nos tempos dos padrões.

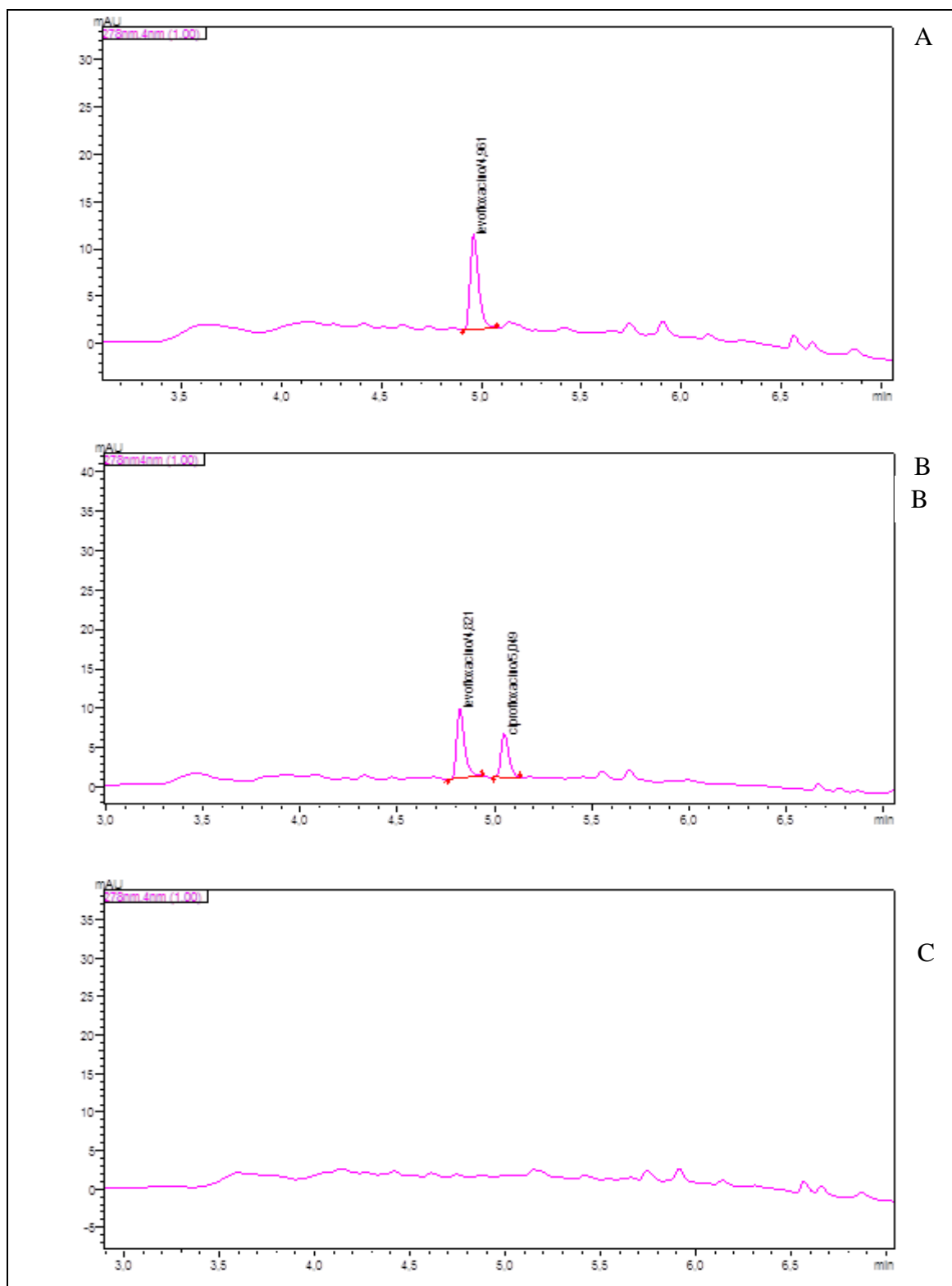


Figura 5. Comparação dos cromatogramas para demonstração da seletividade. A – amostra zero (somente o PI); B – LIQ mais o PI; C – amostra branco.

5.3.2. Efeito residual

Este parâmetro foi demonstrado através da comparação entre os cromatogramas de três amostras do branco, um obtido antes e dois depois da injeção do LSQ acrescido do PI, conforme apresentado na **figura 6**. Este ensaio permitiu observar a ausência de picos residuais do analito e do PI nas duas amostras branco injetadas após o LSQ nos tempos de retenção do analito e do PI, atendendo ao exigido pela norma da ANVISA.

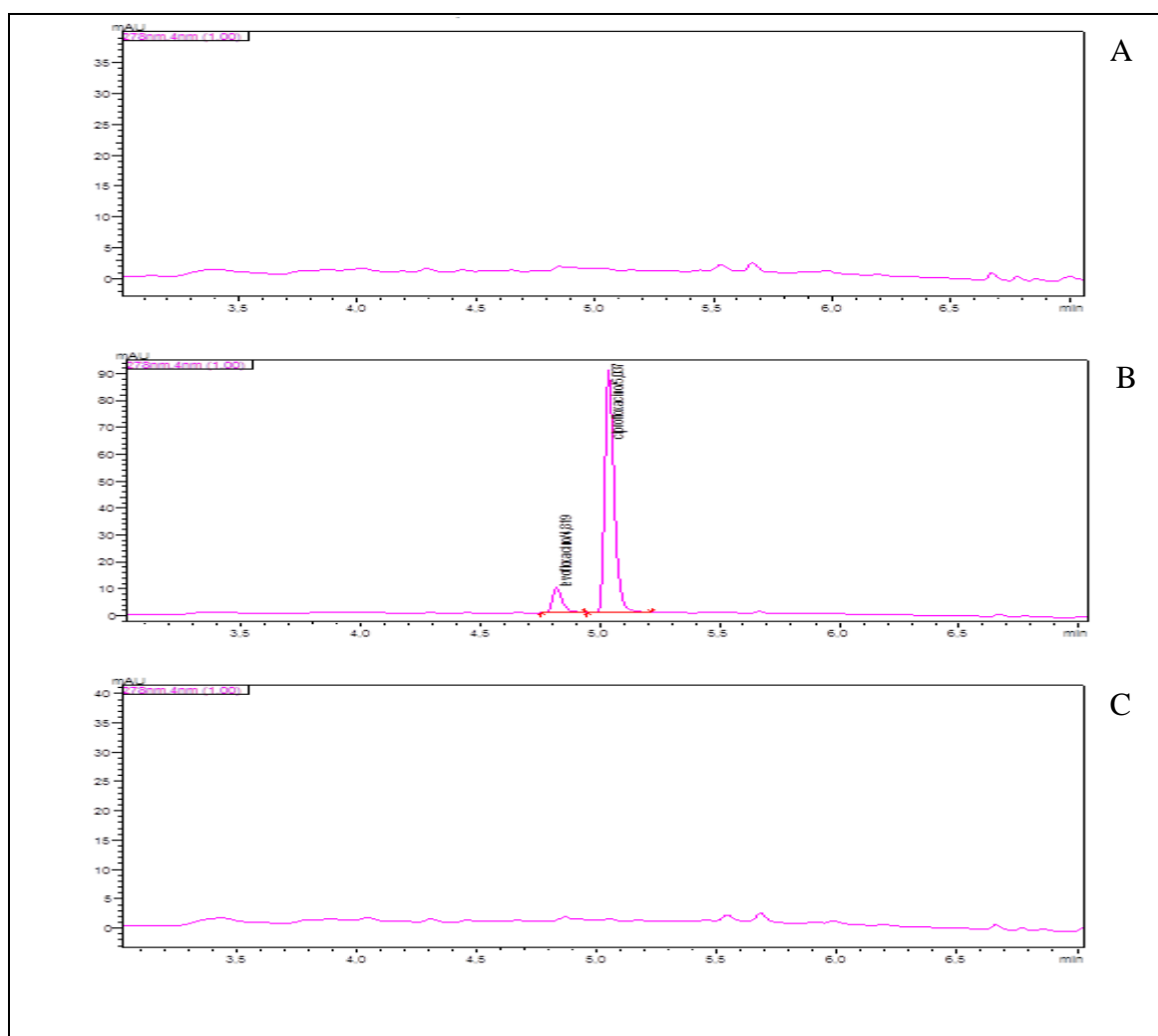


Figura 6. Comparação dos cromatogramas para demonstração do efeito residual. A – amostra branco 1; B – LSQ mais o PI; C – amostra branco 2.

5.3.3. Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi feita por meio da análise de 6 (seis) replicatas das amostras do CQB e do CQA em urina e em solução. Em

seguida, foram calculados o FMN e o CV das respostas de cada amostra, conforme mostrado na **tabela 4**. Os valores do CV ficaram abaixo de 15%, limite estabelecido pela norma da ANVISA, demonstrando ausência de interferência da matriz nos picos do analito e do PI.

Tabela 4. Cálculos para demonstração do efeito matriz. FMN – fator de matriz normalizado; CV – coeficiente de variação.

Replicatas	CQB (30 µg/mL)		CQA (450 µg/mL)	
	FMN	CV	FMN	CV
1	0,96		0,96	
2	0,98		0,98	
3	1,02	1,94%	0,97	1,22%
4	0,99		0,96	
5	0,98		0,99	
6	0,99		0,97	

5.3.4. Linearidade (curva de calibração)

A definição dos pontos da curva de calibração foi iniciada pelo estabelecimento do LIQ, o qual considerou alguns parâmetros do pico do analito na separação cromatográfica, como o tempo de retenção, o número de pratos teóricos, a resolução (com relação ao PI) e a assimetria do pico. Foram analisadas três concentrações para o estabelecimento do LIQ: 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL. A primeira não apresentou pico identificável e as duas seguintes tiveram os dados do pico comparados, permitindo demonstrar que a concentração de 10 µg/mL expressou valores dentro dos limites aceitáveis. A **tabela 5** apresenta os parâmetros dos picos nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL.

Tabela 5. Comparação dos parâmetros dos picos de ciprofloxacino. tR – tempo de retenção; NPT – número de pratos teóricos.

Parâmetros	tR	NPT	Resolução	Assimetria
5 µg/mL	5,098	38821	1,898	0,778
10 µg/mL	5,100	47312	2,483	0,986

Após determinado o LIQ foram estabelecidos mais 6 (seis) pontos equidistantes com base na faixa de trabalho definida pelo laboratório em análises prévias do ciprofloxacino em urina. Cada ponto foi analisado em 5 (cinco) replicatas e em 3 dias diferentes para a elaboração de 3 curvas de calibração. Entretanto, antes da obtenção das curvas foi realizado o teste de Cochran para comparar a variância entre as respostas dos pontos da curva e avaliar se houve homogeneidade na distribuição entre elas. Como apresentado

na **tabela 6**, o teste para as três curvas ficaram dentro dos limites permitidos pela literatura. Em seguida, foram construídas as três curvas de calibração e foram determinados a equação da regressão linear e o coeficiente de correlação para cada curva, o qual apresentou valores dentro do limite estabelecido pela norma, maior ou igual a 0,98. A **tabela 6** apresenta os cálculos estatísticos para comprovação da linearidade de cada curva e a **figura 7** apresenta as curvas de calibração com a equação da regressão linear e o coeficiente de correlação cada para uma destas.

Tabela 6. Cálculos estatísticos para comprovação da linearidade das curvas de calibração. Conc. média – concentração média; DPR – desvio padrão relativo; VAR – variância; T. Cochran – teste de Cochran.

Amostras (µg/mL)	Curva 1			Curva 2			Curva 3		
	Conc. média	DPR	VAR	Conc. média	DPR	VAR	Conc. média	DPR	VAR
10	9,55	3,42%	0,1068	11,77	3,73%	0,1926	11,37	1,09%	0,0155
90	93,08	1,16%	1,1561	91,65	1,84%	2,8582	91,17	0,55%	0,2535
180	180,48	0,90%	2,6149	183,97	0,81%	2,2079	182,42	0,58%	1,1237
270	260,20	0,80%	4,2832	259,29	0,46%	1,4062	272,60	0,41%	1,2426
360	367,95	1,64%	36,6022	358,74	0,26%	0,8663	397,93	0,75%	8,8749
450	454,03	1,05%	22,7346	455,43	0,43%	3,9176	447,98	0,46%	4,3079
540	534,11	0,90%	23,2174	540,35	0,52%	7,7994	551,35	0,59%	10,7158
	T. Cochran		0,4035	T. Cochran		0,4052	T. Cochran		0,3345

Teste de Cochran:

$C_{\text{tabelado}} = 0,431$ (Tabela C para um nível de significância $\alpha = 5\%$). Este valor considera o número de pontos e o número de replicatas de cada curva (“Portal Action”).

O $C_{\text{calculado}}$ para os valores de cada curva é menor que o C_{tabelado} , o que significa que as variâncias são homogêneas nas três curvas.

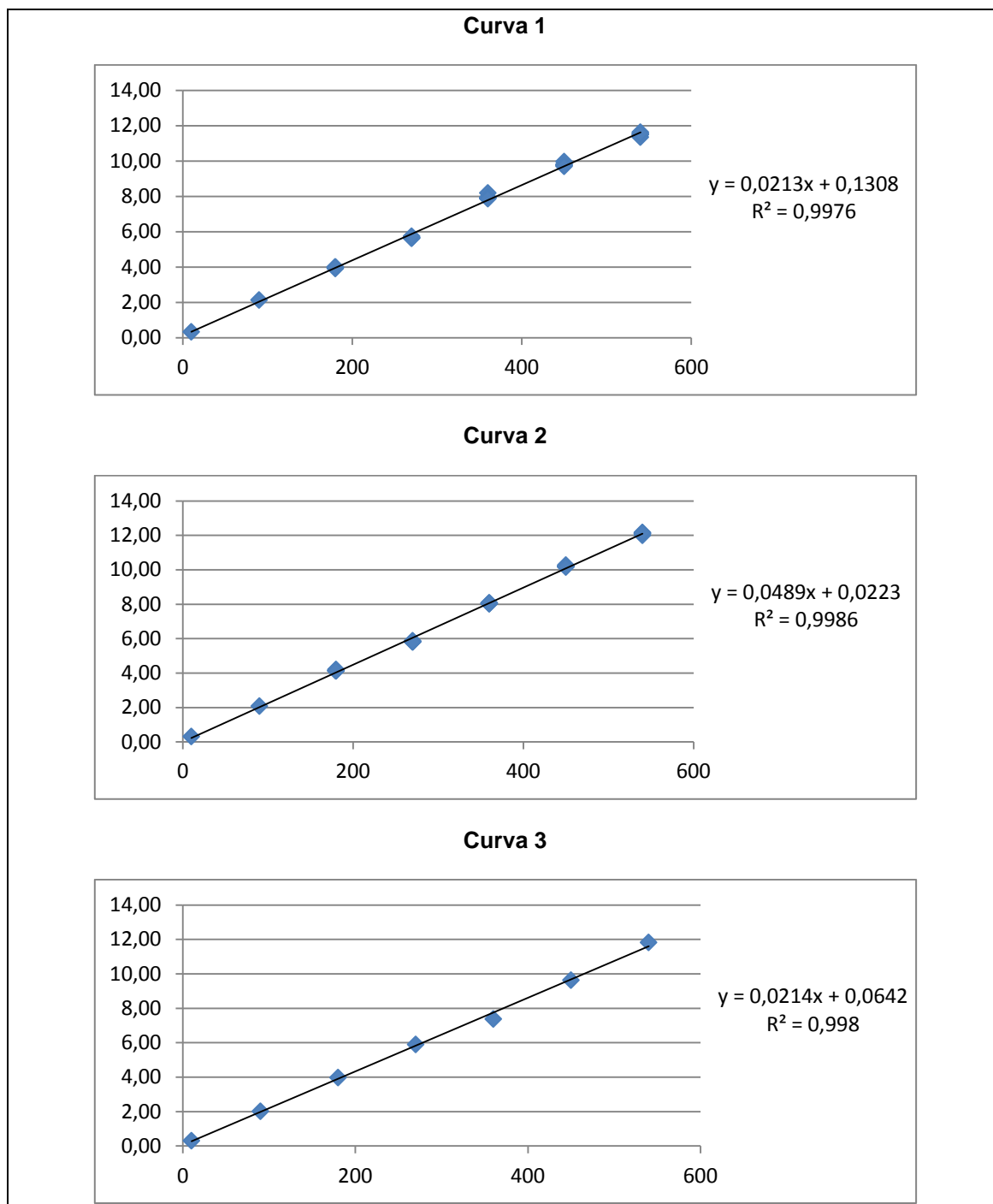


Figura 7. Curvas de calibração com a equação da regressão linear e o coeficiente de correlação para as curvas 1, 2 e 3. R^2 - coeficiente de correlação.

5.3.4. Precisão e exatidão

A verificação da precisão e exatidão, intracorrída e intercorrídas, foi realizada através da análise de 5 (cinco) replicatas de cada uma das amostras LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, em 3 (três) corridas em dias diferentes.

Obtiveram-se as concentrações das injeções de cada ponto e a partir destas foram calculados o CV para demonstração da precisão e o EPR para demonstração da exatidão, conforme apresentados na **tabela 7**. Os valores dos CVs foram inferiores a 20% para o LIQ e a 15% para os demais pontos, conforme estabelecido pela norma; e os valores dos EPRs ficaram dentro da variação de mais ou menos 20% para LIQ e mais ou menos 15% para os demais pontos, também atendendo a norma.

Tabela 7. Cálculos para demonstração da precisão e exatidão. Conc. média – concentração média; CV 1, CV 2 e CV 3 – coeficiente de variação das corridas 1, 2 e 3; CV int. – intercorridas; EPR 1, 2 e 3 – erro padrão relativo das corridas 1, 2 e 3; EPR int. – intercorridas.

Amostras	Conc. média (µg/mL)	Precisão				Exatidão			
		CV 1	CV 2	CV 3	CV int.	EPR 1	EPR 2	EPR 3	EPR int.
LIQ (10 µg/mL)	10,90	3,42%	3,33%	0,98%	8,86%	-4,48%	17,71%	13,70%	8,97%
CQB (30 µg/mL)	28,67	0,90%	0,70%	0,72%	4,54%	-10,49%	-2,26%	-0,54%	-4,43%
CQM (270 µg/mL)	264,31	0,80%	0,41%	0,37%	2,24%	-3,32%	-3,97%	0,96%	-2,11%
CQA (450 µg/mL)	452,45	1,05%	0,39%	0,41%	0,71%	0,90%	1,19%	-0,45%	0,54%
CQD (630 µg/mL)	623,40	0,58%	0,52%	0,52%	1,87%	0,25%	-3,66%	0,27%	-1,05%

5.3.5. Estudo de estabilidade

A avaliação da estabilidade foi demonstrada através de ensaios realizados com as soluções padrões e com as amostras de urina. As soluções primárias e de trabalho foram analisadas no início e no fim da validação, ficando armazenadas durante esse período sob-refrigeração de 2 a 8°C. O estudo com a matriz foi realizado com as amostras CQB e CQA em 3 (três) condições: até 2h após a coleta das urinas, após ciclo de congelamento e descongelamento de 12h e após ciclo de congelamento e descongelamento de 72h, conforme determinado pela norma. Os resultados das análises deste estudo demonstraram que não houve alterações significativas nas respostas do analito e do PI nas condições estabelecidas, conforme apresentado nas **tabelas 8 e 9**. Desta forma, o armazenamento nestas condições não irá alterar a estabilidade no analito na matriz estudada.

Tabela 8. Estudo de estabilidade dos padrões em solução. mAU – unidades de mili absorvância.

Período da validação	Ciprofloxacino (analito)		Levofloxacino (PI)	
	Sol. primária (1 mg/mL)	Sol.de trabalho (100 µg/mL)	Sol. primária (1 mg/mL)	Sol.de trabalho (100 µg/mL)
Início (mAU)	9945178	971665	4892429	476747
Fim (mAU)	9891665	980013	5000122	495524

Tabela 9. Estudo de estabilidade dos padrões na matriz. mAU – unidades de mili absorvância.

Amostras	Ciprofloxacino acrescido do PI na matriz		
	Até 2h após a coleta	Após 12h a -20°C	Após 72h a -20°C
CQB (mAU)	0,6811	0,6598	0,6703
CQA (mAU)	9,6643	9,7205	9,6735

6. CONCLUSÃO

O método bioanalítico desenvolvido no presente estudo permitiu verificar que a técnica pré-analítica proposta é adequada para a obtenção de ciprofloxacino a partir da urina, além de ser pouco dispendiosa, rápida e simples. A técnica analítica apresentou resultados confiáveis para a determinação do fármaco através da CLAE-UV, em curto tempo de análise. E os dados obtidos com a validação atenderam aos critérios fixados pela Resolução 27 de 2012 da ANVISA, confirmando a validade deste novo método.

Validado o método, o seu emprego em estudos farmacocinéticos permitirá conhecer o perfil da depuração individual de pacientes assistidos pelo Hospital Naval Marcílio Dias que estejam em tratamento com o ciprofloxacino, possibilitando prever a concentração efetiva deste fármaco no sangue e, caso necessário, a alteração da dose pelo médico. Outra aplicação deste método poderá ocorrer em posteriores estudos de bioequivalência farmacêutica a serem conduzidos pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha em parceria com este hospital.

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC 27 de 22 maio de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Brasília: Diário Oficial da União, 10 de maio de 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopeia Brasileira, v. 2, ed. 5. Brasília, 2010.

AGUÍ, M. L.; CAMPAÑA, A. M. G.; GRACIA, L. G.; BLANCO, C. C. **Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure.** Talanta, n. 93, p. 193-199, 2012.

CAÑADA-CAÑADA, F.; ARANCIBIA, J. A.; ESCANDAR, G. M.; IBAÑEZ, G. A.; ESPINOSA, M. A.; MUÑOZ, P. A.; OLIVIERI, A. C. **Second-order multivariate calibration procedures applied to high performance liquid chromatography coupled to fast scanning fluorescence detection for the determination of fluoroquinolones.** Journal of chromatography, v. 1216, n. 24, p. 4868-4876, 2009.

CAÑADA-CAÑADA, F.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; MUÑOZ, P. A. **Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine.** Journal of separation science, n. 30(9), p. 1242-1249, 2007.

CAZEDEY, E. C. L. **Análise químico-farmacêutica de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical Method Validation**, Guidance for Industry, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Analytical Procedures and Methods Validation**, Guidance for Industry, 2000.

GOODMAN, L.S.; BRUNTON, L.L.; LAZO J.S. Goodman e Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10 ed., p. 883-997. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GUO, L.; ZENGHONG, X.; XUCONG, L.; XIAOPING, W.; BIN, Q.; YUBIN, Z.; HAINAN, Y.; GUONAN, C. **Pharmacokinetics of ciprofloxacin in eels by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Analytical Biochemistry, n. 341, p. 275-279, 2005.

GUTIÉRREZ-ZUFIAURRE, N. **Relación estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas.** Revista Española de Quimioterapia, v. 17, n. 3, p. 232-243, 2004.

HOU, X. L.; GUO, C.; LI, Z.; TING, Y.; JIAN, Z.; LEI, W.; YIN-LIANG, W. **Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk.** Journal of Chromatography B, n. 962, p. 20-29, 2014.

IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C.; JUAN, V. S.; FÉLIX, H.. **Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, n. 1216, p. 2529-2539, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, rev. 4, 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Q2(R1), 1994.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**, ISO/IEC 17025, 2005.

JUNZA, A.; DORIVAL-GARCÍA, N.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BARRÓN, D.; BALLESTEROS, O.; BARBOSA, J.; NAVALÓN, A.. **Multiclass method for the determination of quinolones and beta-lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, n. 1356, p. 10-22, 2014.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12 ed., p. 834-836. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KUMAR, A.; KUMAR, M. A.; KUMAR, T. D.; SINGH, B. **Gradient HPLC of antibiotics in urine, ground water, chicken muscle, hospital wastewater, and pharmaceutical samples using C-18 and RP-amide columns.** Journal of separation science, n. 31(2), p. 294-300, 2008.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (EFS)**, I Edição; São Carlos, São Paulo Editora: RiMa 1-16; 37-24 (2004);

LOMBARDO-AGUÍ, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L.; CRUCEZ-BLANCO, C. **Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure.** Talanta, n. 93, p. 193-199, 2012.

MARKMAN, B. L. O.; KOSCHTSCHAK, M. R. W.; YAHO, H. M. **Determinação de quinolonas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna monolítica de fase reversa.** Revista Adolfo Lutz, v. 64, n. 1, p. 65-69, 2005.

PELLEGRINO, R. M.; SEGOLONI, F.; CAGINI, C. **Simultaneous determination of Ciprofloxacin and the active metabolite of Prulifloxacin in aqueous human humor by high-performance liquid chromatography.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n. 47, p. 567-574, 2008.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. **Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection.** Journal of Chromatography B, n. 877, p. 3975-3981, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, v. 27, p. 771-780, 2004.

SERRANO, A.; BOOMEL, M. V.; HALLET, J. **Evaluation between ultrahigh pressure liquid chromatography and high-performance liquid chromatography analytical methods for characterizing natural dyestuffs.** Journal of Chromatography A, n. 1318, p. 102-111, 2013.

SUN, H.; SU, M.; LI, L. **Simultaneous Determination of Tetracaine, Proline, and Enoxacin in Human Urine by CE with ECL Detection.** Journal of Chromatography Science, v. 48, 2010.

SUN, H. W.; QIAO, F. X. **Recognition mechanism of water-compatible molecularly imprinted solid-phase extraction and determination of nine quinolones in urine by high performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, n. 1212, p. 1-9, 2008.

TUERK, J.; REINDERS, M.; DREYER, D.; KIFFMEYER, T. K.; SCHIMIDT, K. G.; KUSS, H. M. **Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring—Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection.** Journal of Chromatography B, n. 831, p. 27-80, 2006.

VYBÍRALOVÁ, Z.; NOBILIS, M.; ZOULOVA, J.; KVETINA, J.; PETR, P. **High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n. 37, p. 851-858, 2005.