



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

KAIRO HENRIQUE ELIAS GONÇALVES

**ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE FÁRMACOS
FLUOROQUINOLÍNICOS ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO
MICRO-ONDAS**

Anápolis-GO
2014

KAIRO HENRIQUE ELIAS GONÇALVES

**ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE FÁRMACOS
FLUOROQUINOLÍNICOS ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO
MICRO-ONDAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

Anápolis-GO
2014

Gonçalves, Kairo Henrique Elias.

Estudos de degradação forçada de fármacos fluoroquinolônicos assistida por irradiação micro-ondas - 2014.

77 folhas. il figuras.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto L. B. Aquino.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2014.

1. Estudos de degradação forçada 2. Fluoroquinolonas 3. Irradiação micro-ondas. I Título

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE FÁRMACOS FLUOROQUINOLÍNICOS
ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS

KAIRO HENRIQUE ELIAS GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

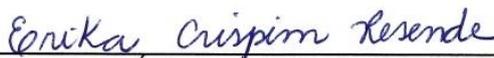
Aprovada em 28/11/2014 por:



Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino (UEG)



Prof. Dr. Renato Rosseto (UEG)



Profa. Dra. Érika Crispim Resende (IFGoiano)

ANÁPOLIS – GO
NOVEMBRO 2014

*À Deus, por iluminar o meu caminho.
À minha família, por fazerem parte de todas as minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Aparecida pela minha criação, apoio, motivação e, principalmente, pelo amor. Obrigado por participar da minha vida mesmo estando longe. Ao meu pai Jonas por mudar radicalmente minha vida para melhor. E aos demais familiares, pois a família é a base de tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto de Aquino pela oportunidade, confiança e principalmente pela dedicação durante esse período.

Aos colegas de laboratório pela ajuda com os experimentos e equipamentos. Muito obrigado pela companhia.

À minha noiva, Priscila, por não me deixar desistir e por acreditar em mim mesmo quando nem eu conseguia acreditar. Sempre companheira e disposta a ajudar a qualquer custo. Uma das peças principais para que esse trabalho se tornasse real.

RESUMO

Estudos de degradação forçada são importantes para determinar a estabilidade de um fármaco, elucidar suas principais rotas de degradação, além de monitorar seus produtos de degradação, os quais podem gerar a ineficácia terapêutica ou apresentar perfil toxicológico. Orienta-se que tais estudos sejam realizados por meio de condições de estresse extremo tais como, ácidos ou bases (hidrólise), peróxido de hidrogênio (estresse oxidativo), termólise e exposição à luz. No entanto, tais estudos são onerosos e demandam longo período de tempo e grandes quantidades de solventes. O aquecimento através de irradiação de micro-ondas nos diversos campos da química já é uma tecnologia consolidada. Recentemente estudos de degradação forçada têm usado micro-ondas como fonte de aquecimento em reatores modernos com características de controle de temperatura, potência, pressão e agitação, o que tornam essa tecnologia viável em estudos de estresse. O objetivo desse estudo foi planejar e validar um método de degradação forçada assistido por irradiação micro-ondas em fármacos fluoroquinolônicos (levofloxacino e norfloxacino) paralelamente ao estudo de estresse convencional e compará-los. Para tanto, soluções de levofloxacino e norfloxacino foram submetidas a degradação forçada usual sob ação de vários agentes estressantes e sob irradiação micro-ondas em tubos de vidro vedados e em condições de agitação, temperaturas de até 120°C e pressão máxima de 100 psi. Ambos os fármacos foram degradados entre 10 e 30%, apresentando perfil cromatográfico equivalente e presença de picos de possíveis produtos de degradação com áreas e tempos de retenção também análogos. Para o levofloxacino, estresse por solução de peróxido de hidrogênio 0,3% (v/v) à temperatura ambiente por 720 minutos gerou de 26% de degradação, e a mesma solução em estufa a 60°C por 60 minutos, degradou 27%. Essa solução em exposição à irradiação micro-ondas a 100°C por 20 minutos e 120°C por 5 minutos degradou, respectivamente, 28% e 25%. Para o norfloxacino, aplicando-se hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ à temperatura ambiente por 1440 minutos obteve-se degradação de 7%, em estufa a 60°C por 180 minutos 12% de degradação. Em exposição a micro-ondas a 100°C por 20 minutos e 120°C por 5 minutos obteve-se degradação, respectivamente, de 11% e 10%. Para as condições capazes de gerar degradação foram formadas quantidades semelhantes de produtos de degradação para ambos fármacos, atestando a equivalência entre o uso de degradação forçada convencional e por irradiação micro-ondas (com controle térmico, agitação e de pressão), mas com redução significativa de tempo para a nova técnica, já que a mesma possibilita a elevação de temperatura acima do ponto de ebulição dos solventes.

Palavras chave: Estudos de degradação forçada; Fluoroquinolonas; Irradiação Micro-ondas.

ABSTRACT

Forced degradation studies are important to determine the stability of a drug, elucidate its main routes of degradation, and to monitor its degradation products, which can generate therapeutic inefficacy or exhibit a toxicity profile. Some guides suggest that such studies must be conducted by conditions of extreme stress such as acids or bases (hydrolysis), hydrogen peroxide (oxidative stress), temperature and exposure to light. However, such studies are costly and require a long time and large amounts of solvents. Heating by microwave irradiation in different areas of chemistry is already an established technology. Recently, forced degradation studies have been used with microwave as a heating source in modern reactors that control temperature, power, pressure and agitation, making this technology viable in studies of stress. The aim of this study was to design and validate a method of forced degradation assisted by microwave irradiation in fluorinated quinolones (levofloxacin and norfloxacin) alongside conventional stress study and compare them. For this purpose, solutions of levofloxacin and norfloxacin were subjected to usual forced degradation under influence of various stress agents and under microwave irradiation in sealed glass tubes and stirring conditions, temperatures up to 120 ° C and a maximum pressure of 100 psi. Both drugs were degraded between 10 and 30%, with equivalent chromatographic profile of peaks and the presence of possible degradation products with areas and retention times very similar. For levofloxacin, stress solution of 0.3% (v/v) hydrogen peroxide at room temperature for 720 minutes produced a 26% of degradation and the same solution in an oven at 60 ° C for 60 minutes, degraded 27%. This solution in exposure to a microwave irradiation at 100 ° C for 20 minutes and 120 ° C for 5 minutes degraded, respectively, 28% and 25%. For norfloxacin, applying 0.1 mol L⁻¹ sodium hydroxide at room temperature for 1440 minutes, 7% of degradation was observed and in an oven at 60 ° C for 180 minutes, 12% of degradation. On exposure to microwave at 100 ° C for 20 minutes and 120 ° C for 5 minutes was obtained degradation, respectively, 11% and 10%. For the conditions that generate degradation were formed similar amounts of degradation products for both drugs, stating the equivalence between the use of conventional and forced degradation by microwave irradiation (with temperature control, agitation and pressure), but with reduced significant time to the new technique, since it enables the temperature rise above the boiling point of the solvent.

Keywords: Forced degradation studies; Fluoroquinolones; Microwave Irradiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural de norfloxacinó e levofloxacinó.....	18
Figura 2. Mecanismos de aquecimento por micro-ondas.....	29
Figura 3. Tipos de aquecimento por condução e irradiação micro-ondas	31
Figura 4. Reator de irradiação micro-ondas	41
Figura 5. Fluxograma de DAM.....	42
Figura 6. Cromatogramas iniciais de levofloxacinó e seu diluente (A) e norfloxacinó com seu respectivo diluente (B).....	44
Figura 7. Cromatograma de varredura dos espectros de levofloxacinó (A) e norfloxacinó (B).	45
Figura 8. Cromatograma do produto de degradação para a condição termolítica para levofloxacinó.....	46
Figura 9. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L ⁻¹ (A) e HCl 1,0 mol L ⁻¹ (B) para levofloxacinó.	47
Figura 10. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L ⁻¹ e sob influência de temperatura 60°C por 24 h.	48
Figura 11. Cromatograma do produto de degradação por hidrólise alcalina mediada por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (A) e NaOH 1,0 mol L ⁻¹ (B) para levofloxacinó.	49
Figura 12. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise alcalina mediada por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e à temperatura 60°C por 24 horas para levofloxacinó.	49
Figura 13. Cromatograma do produto de degradação por oxidação convencional mediada por H ₂ O ₂ 0,3% (v/v) por 24 horas para levofloxacinó.	50
Figura 14. Cromatograma do produto de degradação por oxidação convencional mediada por H ₂ O ₂ 1,0% (v/v) por 24 horas para levofloxacinó.	50
Figura 15. Cromatograma do produto de degradação por oxidação convencional por H ₂ O ₂ 0,3% (v/v) 60°C em 60 minutos.	51
Figura 16. Cromatograma de varredura dos espectros do produto de degradação e cálculo de pureza de pico oxidativo por H ₂ O ₂ 0,3% (v/v) sob aquecimento a 60°C por 60 minutos. ...	52
Figura 17. Cromatograma do produto de degradação para a condição termolítica para norfloxacinó	53
Figura 18. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L ⁻¹ (A), HCl 1,0 mol L ⁻¹ (B) e HCl 0,1 mol L ⁻¹ com aquecimento a 60°C (C) para norfloxacinó.	54
Figura 19. Cromatograma do produto de degradação da condição hidrólise alcalina por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (A) e NaOH 1,0 mol L ⁻¹ (B) para norfloxacinó.....	55
Figura 20. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise alcalina mediada por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e aquecimento a 60°C por 24 horas para norfloxacinó.	56
Figura 21. Cromatograma de varredura dos espectros do produto de degradação e cálculo de pureza de pico por hidrólise alcalina em NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e aquecimento para norfloxacinó.	57
Figura 22. Cromatograma do diluente por H ₂ O ₂ 1,0% (v/v).....	58
Figura 23. Cromatogramas dos produtos de degradação oxidativos por H ₂ O ₂ 1,0% (v/v) (A), H ₂ O ₂ 3,0% (v/v) (B) e H ₂ O ₂ 1,0% (v/v) em aquecimento (C) para norfloxacinó.....	59

Figura 24. Cromatograma do produto de degradação por oxidação de levofloxacino submetida a aquecimento por irradiação de micro-ondas (cromatograma do experimento a 5 minutos (A), 10 minutos (B), 15 minutos (C) e 20 minutos (D)).	60
Figura 25. Comparativo das porcentagens de degradação oxidativa para levofloxacino.	62
Figura 26. Cromatograma em em varredura dos espectros do produto de degradação referente a oxidação de levofloxacino submetida a aquecimento por irradiação micro-ondas em 20 minutos.	63
Figura 27. Cromatograma do produto de degradação hidrolítico alcalino de norfloxacino submetida a aquecimento por irradiação de micro-ondas (cromatograma do experimento a 5 minutos (A), 10 minutos (B), 15 minutos (C) e 20 minutos (D)).	65
Figura 28. Cromatograma em em varredura dos espectros do produto de degradação alcalino (NaOH 0, 1 mol L ⁻¹) submetido a aquecimento por irradiação micro-ondas em 20 minutos para norfloxacino.	66
Figura 29. Comparativo das porcentagens de degradação para norfloxacino.	67
Figura 30. Comparação estrutural entre LXN e NXN.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de algumas impurezas conhecidas de levofloxacino e norfloxacino	19
Tabela 2. Resultados de adequação do sistema.....	37
Tabela 3. Parâmetros cromatográficos para o levofloxacino.....	38
Tabela 4. Parâmetros cromatográficos para o norfloxacino.	38
Tabela 5. Condições Estressantes para levofloxacino e norfloxacino	40
Tabela 6. Variáveis usadas no reator com aquecimento por micro-ondas.	43
Tabela 7. Resultados de adequação do sistema para levofloxacino e norfloxacino	45
Tabela 8. Resultados de testes de estresse para levofloxacino	61
Tabela 9. Comparativo dos resultados dos testes de estresse para levofloxacino.	62
Tabela 10. Resultados de testes de estresse para norfloxacino.....	66
Tabela 11. Comparativo dos resultados dos testes de estresse para norfloxacino	67

SIGLAS E ABEVIATURAS

AAPH	Hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ACVA	4,4'-azobis (ácido 4-cianoaléico)
AIBN	Azobisisobutironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASEAN	Association of South East Asian Nations
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de Variância
DAM	Degradação forçada Assistida por irradiação Micro-ondas
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDA	Food and Drug Administration
FML	Fase móvel de levofloxacino
FMN	Fase móvel norfloxacino
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
ICH	International Conference on Harmonization
IF	Insumo Farmacêutico
K'	Fator de Capacidade
LXN	Padrão Referência Levofloxacino
LXN 1	Solução Estoque 1 de levofloxacino
LXN 2	Solução Estoque 2 de levofloxacino
NaOH	Hidróxido de sódio
NXN	Padrão Referência Norfloxacino
NXN 1	Solução Estoque 1 de norfloxacino
NXN 2	Solução Estoque 2 de norfloxacino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Ângulo de Pureza
PD	Produtos de Degradação
PFA	Produto Farmacêutico Acabado
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução
SDL	Solução diluente de levofloxacino
SNGPC	Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados
TH	Ângulo Limite
UR	Umidade relativa
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	ANTIMICROBIANOS.....	16
2.2	QUINOLONAS.....	17
2.3	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	20
2.4	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	22
2.5	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	23
2.6	FATORES ATUANTES NA DEGRADAÇÃO DE MEDICAMENTOS....	26
2.6.1	Temperatura.....	26
2.6.2	Hidrólise.....	27
2.6.3	Oxidação.....	27
2.6.4	Fotólise.....	28
2.7	IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS.....	29
3.	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4.	METODOLOGIA.....	35
4.1	MATERIAIS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE LEVOFLOXACINO..	35
4.2	MATERIAIS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE NORFLOXACINO..	35
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES TESTE.....	36
4.3.1	Preparo do padrão químico de referência de levofloxacino.....	36
4.3.2	Preparo do padrão químico de referência de norfloxacino.....	36
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	37
4.4.1	Metodologia analítica para o levofloxacino.....	37
4.4.2	Metodologia analítica para o norfloxacino.....	38
4.4.3	Especificidade/seletividade do método frente degradação forçada e estudo de produtos de degradação.....	38
4.5	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	39
4.5.1	Estudo de degradação forçada para levofloxacino.....	39
4.5.2	Estudo de degradação forçada para norfloxacino.....	40
4.6	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA INDUZIDA POR REATOR DE MICRO-ONDAS.....	41
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	AVALIAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO FRENTE AS AMOSTRAS INICIAIS.....	44
5.2	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA LEVOFLOXACINO.....	45
5.2.1	Temperatura.....	46
5.2.2	Hidrólise ácida.....	47
5.2.3	Hidrólise alcalina.....	48
5.2.4	Oxidação.....	49
5.3	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA NORFLOXACINO.....	52
5.3.1	Temperatura.....	53
5.3.2	Hidrólise ácida.....	53
5.3.3	Hidrólise alcalina.....	54

5.3.4	Oxidação.....	57
5.4	AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO FORÇADA ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS (DAM).....	59
5.4.1	Degradação forçada assistida por irradiação micro-ondas do levofloxacino.....	59
5.4.2	Degradação forçada assistida por irradiação micro-ondas do norfloxacino.....	64
5.5	DIFERENÇAS NOS PERFIS DE DEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS.	68
6.	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

No âmbito fármaco-químico, impurezas são definidas como tudo aquilo capaz de comprometer a pureza de um insumo farmacêutico (IF). Sendo que impurezas de origem orgânica comumente são advindas de síntese, de subprodutos, de substâncias relacionadas ou, ainda, de produtos de degradação (PD), que por sua vez são provenientes de alterações químicas sofridas especialmente pelo insumo farmacêutico ou até pelos próprios excipientes de determinada formulação (BRASIL, 2010; EITENMILLER e LANDEN JR, 1999). As causas de formação de produtos de degradação são inúmeras, dentre as quais se destacam temperatura, umidade, pH, luz e até incompatibilidade entre fármaco e recipiente ou entre fármaco e embalagem, ou ainda, de maneira mais geral, advindos de armazenamento indevido, transporte e do próprio envelhecimento (BRASIL, 2008; SMITH e WEBB, 2008).

Uma vez apontada a possibilidade de derivação de PD a partir de insumos farmacêuticos, levanta-se a necessidade de quantificação e monitoramento desses produtos, já que riscos de ineficácia e de toxicidade estão agregados à presença dos mesmos. Os estudos de degradação forçada, realizados com base em guias elaborados por instituições internacionais avaliam o perfil de degradação de um fármaco perante ensaios de estresse (ICH, 1993; FDA, 1998). Estes estudos fornecem informações valiosas no que diz respeito à estabilidade dos fármacos nas formulações durante seu prazo de validade. Além disso, órgãos regulamentadores se mostram cada vez mais criteriosos quanto aos limites de impurezas e produtos de degradação e ensaios de degradação forçada para identificação e quantificação dos mesmos (SINGH et al., 2013).

Entretanto o modo de realização de estudos de degradação forçada sempre apresentou desafios, a começar pela falta de detalhamento por parte das próprias diretrizes regulamentares, que sempre enfatizaram apenas a realização de uma série de testes de estresse capazes de simular a degradação primária dos próprios fármacos e medicamentos. Para tanto, são citadas apenas faixas de pH, concentrações, umidade e temperatura. Além de citar agentes estressantes como ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Com isso os estudos realizados, ainda hoje, quase sempre se prolongam por dias até se atingir a faixa recomendada de decaimento no teor do fármaco. Além de que, tradicionalmente, quando os estudos de estresse são feitos em solução, os volumes gastos podem ultrapassar 100 mL (ALSANTE et al., 2007; SINGH e BAKSHI, 2000; SINGH et al., 2013).

No contexto de estudos de estresse, novas pesquisas têm sido amplamente realizadas, dentre as quais o uso de irradiação micro-ondas tem se destacado em experimentos de degradação forçada como alternativa para o aquecimento (também chamado de aquecimento dielétrico), acelerando reações de degradação. Nesse contexto, destacam-se reatores de micro-ondas com controles térmicos e capazes de fornecer temperaturas elevadas e controladas ao meio reacional, além de proporcionar monitoramento do tempo reacional, pressão e agitação, por exemplo. Com isso reduções expressivas de tempo têm sido conquistadas sem que a degradação perca seu perfil e eficiência já observada em exposição dos fármacos a agentes degradantes por longos períodos de tempo, seja à temperatura ambiente ou em aquecimento por meio de estufas ou refluxo. Pelo emprego de aquecimento por irradiação no micro-ondas, consegue-se também reduzir consideravelmente quantidades de solventes empregados como agentes estressantes, sem que a eficiência do estudo seja afetada (BOJANA, MARKUS e KAPPE, 2011; SILVA, et al., 2013).

A realização de estudos de produtos de degradação advindos de fármacos é um fator trivial para o desenvolvimento de especialidades farmacêuticas, bem como para a administração segura de tais produtos (BAERTSCHI et al., 2005). Assim, o desafio deste trabalho consiste na realização do estudo de degradação forçada de dois fármacos fluoroquinolônicos, levofloxacino e norfloxacino, através do uso de irradiação micro-ondas visando comparar seu desempenho frente as técnicas convencionais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são fármacos empregados no tratamento de doenças infecciosas inviabilizando o crescimento dos micro-organismos nocivos, não prejudicando o hospedeiro. A descoberta da penicilina em 1929 e sua posterior inserção no tratamento de doenças infecciosas foi o marco inicial que culminou no desenvolvimento dessa nova classe de fármacos. Hoje existe uma infinidade de antimicrobianos disponíveis, que sistematicamente podem ser divididos em dois subgrupos, aqueles que são sintetizados por procedimentos químicos em laboratórios são chamados fármacos sintéticos, já os produzidos por bactérias ou fungos são denominados antibióticos. Posteriormente, os antimicrobianos são classificados em grupos de acordo com certas características pertinentes a seus representantes, tais como suas estruturas químicas, mecanismos de ação e espectros de atividade (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000; LOPES, 2005).

O uso de antimicrobianos, entre os anos 2000 a 2010 atingiu um elevado crescimento de 36% em escala global. Sendo que, 76% do aumento global do consumo dessa classe medicamentosa correspondeu a Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, os chamados países do BRICS (BOECKEL, et al. 2014).

No âmbito de controlar o consumo desnecessário dessa classe de fármacos, bem como evitar automedicação e surgimento de bactérias resistentes, no Brasil a ANVISA implementou em 2010 a RDC 44/10, posteriormente revogada pela RDC 20/2011, que tornou obrigatória a venda de antibióticos apenas mediante a retenção de receita. Posteriormente, complementar a essa resolução, passou a vigorar em 16 de abril de 2013 a prática de escrituração eletrônica dos antibióticos por parte de todas as drogarias e farmácias do território nacional brasileiro, no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). Processo semelhante que já havia sido implementado realizado para psicotrópicos (portaria 344) há alguns anos (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013).

Essa medida se faz importante, pois o uso indiscriminado de antimicrobianos induz ao surgimento de resistência bacteriana, que é uma resposta adaptativa

inevitável ao uso de antimicrobianos, pois esse processo de alteração de patógenos susceptíveis por uma espécie mais resistente é uma resposta natural (FRENCH, 2005).

2.2. QUINOLONAS

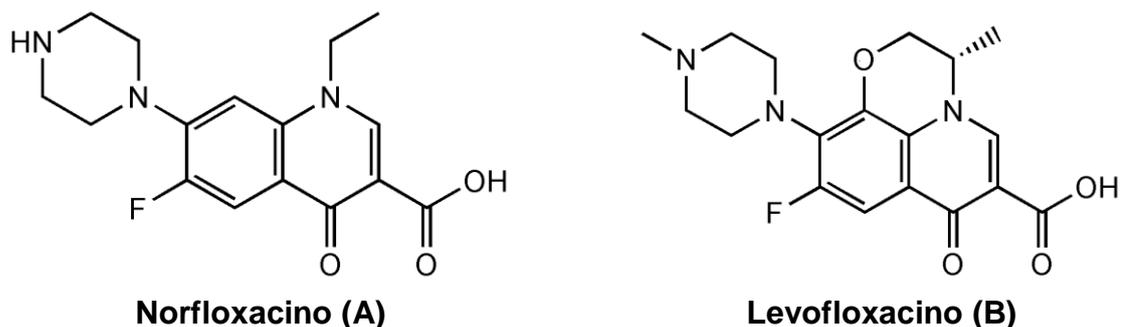
As quinolonas são um grupo de antimicrobianos cujo mecanismo de ação consiste na inibição de processos de transcrição e replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) bacteriano. O uso dessa classe de antimicrobianos se consolidou desde a década de 1960, quando em 1962 Leshner e colaboradores descreveram o ácido nalidíxico, que foi introduzido na prática clínica. Antibióticos quinolônicos tem como alvo a inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana, pois a enzima DNA-girase é que se encarrega de tornar a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres causam a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (BERGAN, 1988; GOODMAN e GILMAN'S, 2006).

Quinolonas estão entre os antibióticos de maior uso nos últimos anos. A classificação das quinolonas é dada em gerações de acordo com seu espectro de ação, além de suas características farmacocinéticas. As quinolonas de primeira geração (ácido nalidíxico) apresentam um espectro de ação limitado a bacilos gram-negativos e, com isso, são utilizadas apenas para infecções do trato urinário. A introdução de um átomo de flúor na estrutura das quinolonas possibilitou o surgimento das novas gerações capazes de apresentar melhor atividade farmacocinética, que são as chamadas de fluoroquinolonas (WOLFSON e HOOPER, 1985; CALVO e MARTINEZ, 2009).

O surgimento das fluoroquinolonas nos anos 1980 possibilitou avanços terapêuticos importantes, mais especificamente com o acréscimo de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolínico, possibilitando aumento do espectro de ação e melhor biodisponibilidade por via oral. Nesse momento surgiam as fluoroquinolonas de segunda geração, como o norfloxacin (Figura 1). Com esse incremento na

atividade farmacocinética, a atividade contra bacilos gram-negativos foi melhorada, porém ainda apresentando baixa atividade contra gram-positivos e anaeróbios, como é o caso do norfloxacin. Já quinolonas de terceira geração, a exemplo do levofloxacin (Figura 1), exibem maior atividade contra gram-positivos, além de melhora em sua farmacocinética, o que viabilizou seu emprego sistêmico. As quinolonas de quarta geração, a exemplo do gemifloxacin, mostram maior atividade frente a bactérias gram-positivas e bactérias anaeróbias. Entretanto, algumas espécies de bactérias tais como, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* são capazes de adquirir mutações que inviabilizem a eficiência das fluoroquinolonas (ZHAO et al. 1997; HAYASHI; NAKATA; YAZAKI, 2004; CALVO e MARTINEZ, 2009).

Figura 1. Fórmula estrutural de norfloxacin e levofloxacin



(A): ácido-etil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolonocarboxílico;

(B): (S)-(-)-9-fluoro-2,3-di-hidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico;

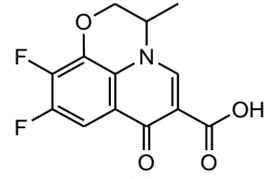
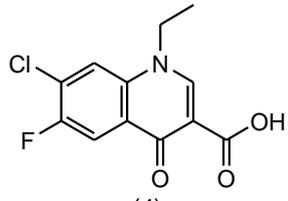
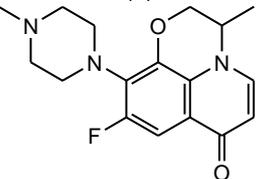
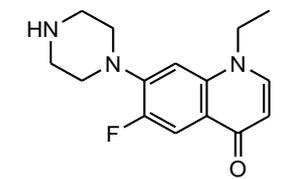
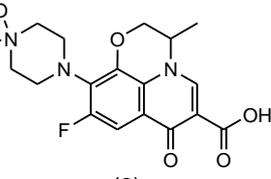
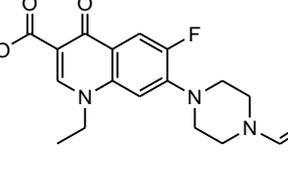
Tamãna a importância das quinolonas, especialmente quinolonas fluoradas, fez com que as mesmas tivessem sido constantemente estudadas para se chegar a aprimoramentos estruturais visando melhoras terapêuticas pelo uso das mesmas. Especialmente após a introdução do norfloxacin, diversas outras estruturas de fluoroquinolonas surgiram na tentativa de aumentar o espectro geral antibacteriano, melhorar absorção, permeação celular, biodisponibilidade, entre outros. Observa-se inclusive, derivados de fluoroquinolonas capazes de apresentar potencial anticâncer (BHANOT; SINGH; CHATTERJEE, 2001; RAJULU, G. G. et al. 2014).

Algumas dessas novas fluoroquinolonas apresentam modificações não somente na estrutura básica anelar, mas também, possuem novas aminas cíclicas

ou heterocíclicos nitrogenados, apropriadamente substituídos na posição sete do grupamento farmacóforo. No entanto, vale ressaltar que as posições indispensáveis para a atividade biológica das fluoroquinolonas são a C-6 (contendo um átomo de flúor), C-7 (contendo grupos piperazila e pirrolidina) e N-1 (contendo grupos etila, ciclopropila, ter-butila e arilas fluorados) (BHANOT; SINGH; CHATTERJEE, 2001; SOUZA et al., 2004).

Mesmo várias décadas após a descoberta classe de quinolonas, ainda hoje seus representantes são de grande interesse terapêutico e econômico para a indústria farmacêutica por se manterem eficientes contra vários antimicrobianos. Com isso possuem prática clínica consolidada (do ponto de vista terapêutico), perfil de impurezas (Tabela 1), vias de degradação e métodos analíticos quantitativos já bem elucidados (do ponto de vista químico). Portanto, representantes dessa classe de fármacos se mantêm em posição privilegiada para continuarem sendo estudados nos mais diversos campos científicos (DEVI e CHANDRASEKHAR, 2009; USP, 2012).

Tabela 1. Exemplos de algumas impurezas conhecidas de levofloxacin e norfloxacin

Impurezas conhecidas de levofloxacin		Impurezas conhecidas de norfloxacin	
Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Fórmula molecular
	$C_{13}H_9F_2NO_4$		$C_{12}H_9ClFNO_3$
(1)		(4)	
	$C_{17}H_{20}FN_3O_2$		$C_{15}H_{18}FN_3O$
(2)		(5)	
	$C_{18}H_{20}FN_3O_5$		$C_{17}H_{18}FN_3O_4$
(3)		(6)	

Fonte: TLC PharmaChem Inc.

2.3. ESTUDO DE ESTABILIDADE

Estudos de estabilidade são realizados afim de se avaliar a manutenção das características químicas, físicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas de determinada especialidade farmacêutica, determinando assim, seu prazo de validade. Sendo o prazo de validade o tempo limite para que o produto farmacêutico apresente-se apto ao uso, este é determinado com base em estudos de estabilidade, que vão atestar as características dos produtos farmacêuticos estabelecendo ou confirmando seu prazo de validade. Os testes de estabilidade determinam tal prazo, baseando-se também no período temporal compreendido entre a fabricação do produto farmacêutico até o momento em que sua potência não seja inferior a 90% e os produtos de alteração, caso presentes, estejam devidamente identificados, quantificados e qualificados (BRASIL, 2005; ALLEN JR., POPOVICH e ANSEL, 2007; BRASIL, 2013).

Além disso, a etapa de desenvolvimento e pré-formulação conta com estudos de estabilidade para aperfeiçoar a disposição dos excipientes propostos juntamente com o princípio ativo, evitando incompatibilidade de atividades com base em suas propriedades físicas e químicas, tais como forma cristalina ou polimórfica individual, tamanho da partícula e presença de água. A avaliação de possíveis interações entre produto e materiais de embalagem também são determinadas devido aos estudos de estabilidade, sendo possível identificar alterações químicas que podem acarretar modificação em nível físico ou químico entre componentes de embalagem e formulação (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001; KLICK et al. 2005).

Estudos de estabilidade podem ser realizados de três formas, são eles os estudos de estabilidade acelerado, de longa duração e de acompanhamento. O estudo de estabilidade acelerado (em temperaturas e umidade elevadas) é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas no produto, a fim de simular o impacto de curtas exposições a condições drásticas de armazenamento, fato que pode ser observado ao longo do transporte. Esse estudo pode simular o que ocorreria com o produto farmacêutico em condições normais de armazenamento por longos períodos de tempo. Para tanto, a realização de estudos de estabilidade acelerada conta com produtos farmacêuticos submetidos a condições de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

e $75\% \pm 5\%$ UR (umidade relativa), fato que possibilita acelerar possíveis degradações intrínsecas do fármaco (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade de longa duração é projetado em condições de temperatura e umidade menos elevadas que os estudos de estabilidade acelerada, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR, para países que se enquadrem na classificação climática de clima quente e úmido, como é o caso do Brasil. Estudos de estabilidade de longa duração são utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento do produto. Por fim, os estudos de estabilidade de acompanhamento são realizados a fim de garantir se o medicamento mantém o padrão de qualidade verificado nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

Para se considerar um produto farmacêutico estável, não basta simplesmente considerar sua potência para assegurar que o mesmo mantenha suas características e resposta farmacológica, mas deve-se controlar também a presença de Produtos de Degradação (PD) e outras impurezas, que podem afetar a atividade terapêutica do medicamento. Logo, deve-se monitorar o aparecimento destes compostos nos medicamentos acabados ou nos fármacos, visto que sua presença é praticamente inevitável. Para tanto, deve-se ter total conhecimento da estrutura química, propriedades físicas e químicas, processos de isolamento e purificação do PD no produto acabado (ICH, 2003b; CARVALHO et al. 2005; RAO, et al., 2010).

Ao longo da realização dos estudos de estabilidade se pode concluir que um determinado produto farmacêutico acabado (PFA) realmente conserva-se dentro dos limites de teor e de produto de degradação por meio de métodos analíticos específicos ao fármaco de interesse, sendo indispensável que os testes sejam capazes de avaliar a presença ou formação qualitativa e quantitativa de produtos de degradação de forma rápida, fornecendo resultados precisos e reprodutíveis. Caso a metodologia empregada ser por cromatografia, aconselha-se ainda emprego de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas, que são capazes de assegurar a pureza dos picos cromatográficos referentes as substâncias de interesse de modo específico e seletivo, portanto sem interferentes. Métodos que sigam essa regra são conhecidos como metodologias indicativas de estabilidade (SINGH e BAKSHI, 2002; BRASIL, 2003; BRASIL 2013).

Para controle de produtos de degradação de fármacos, testes específicos para os mesmos devem ser adotados. Caso as impurezas ou produtos de degradação não estejam disponíveis, deve-se adotar procedimentos que envolvam testes de estresse em condições variadas. Assim, os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir avaliação da formação de PD e sem que haja degradação completa da molécula de interesse farmacológico (BRASIL, 2013).

2.4. PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Impurezas podem ser conceituadas como substâncias que apresentem potencial de contaminação. A impureza pode ainda ser definida como uma substância de interesse misturada ou impregnada em outra substância estranha ou de qualidade inferior. Em outras palavras, impurezas são caracterizadas como todos os componentes presentes no insumo farmacêutico ou no produto farmacêutico acabado que não sejam princípio ativo nem excipientes (ICH, 1999; AHUJA, 2007).

As impurezas são oriundas de vias orgânicas e inorgânicas. Classificam-se como impurezas inorgânicas, metais pesados, catalisadores, entre outros componentes que tenham sido utilizados na via de síntese do próprio fármaco. Quando se refere à impurezas orgânicas, trata-se de substâncias correlatas ao insumo ativo, sejam elas produtos intermediários, subprodutos, substâncias relacionadas ou PD, podendo essas impurezas ser originárias das mais variadas vias, tais como síntese, estocagem inadequada, e no PFA, podem advir desde a produção até do seu próprio envelhecimento (RAO et al., 2010).

Já os produtos de degradação presentes no produto acabado, geralmente surgem de condições de transporte e estocagem do medicamento. Especificamente, tratam-se de alterações na pureza do PFA que são mediadas por efeitos de mudanças na temperatura, umidade, pH, ou ainda de características intrínsecas do insumo ativo, bem como de interações na formulação entre insumos ativos e excipientes, forma farmacêutica e propriedades dos materiais de embalagem primária (BRASIL, 2005).

2.5. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Estudos de degradação forçada ou testes de estresse são importantes para determinar a estabilidade de um fármaco, elucidar suas principais rotas de degradação, além de monitorar seus possíveis produtos de degradação. Os testes de degradação forçada visam, portanto, simular condições extremas de estresse que o produto farmacêutico venha a enfrentar, tanto para o insumo ativo como para as variadas formas farmacêuticas de PFA (ICH, 2003; ICH, 2006).

Testes de estresse são essenciais nas pesquisas de identificação de possíveis PD, propiciando que as principais vias de degradação de determinado princípio ativo sejam determinadas. Os testes de estresse devem obrigatoriamente ser mais extremos que as condições apresentadas nos estudos de estabilidade acelerados. A exemplo disso, tem-se métodos de degradação forçada proporcionados por altas temperaturas, diversas faixas de pH, oxidação, metais pesados e fotólise. Contudo, avaliar alguns dos possíveis produtos de degradação formados sob tais condições talvez não seja necessário uma vez que se prove que os mesmos não sejam formados sob condições de estabilidade acelerada ou de longa duração (ICH, 2003; BRASIL, 2013).

Testes de degradação forçada são recomendados, ainda, para casos em que se pretende avaliar impurezas ou apenas PD de determinados fármacos e tais impurezas não estejam disponíveis. Neste momento os estudos de degradação forçada podem ser realizados desde que abordem procedimentos bem caracterizados (ICH, 1994; BRASIL, 2003).

A natureza dos testes de estresse de fármacos depende diretamente do fármaco em questão e tendem a variar amplamente de acordo com sua estabilidade inerente do fármaco. Para tanto alguns dos principais guias, tais como o International Conference on Harmonization (ICH) já recomendam condições iniciais de estresse, tais como aquecimento com incremento de 10°C a partir da condição de estabilidade acelerada (50°C, 60°C, etc.). Entretanto existem condições estressantes bastante distintas entre si, a exemplo de algumas regiões que adotam como estudo de estresse o simples uso das mesmas condições de estabilidade acelerada (40°C/75% UR) e até outros casos com condições mais externas, como o uso de 5 –

10°C abaixo da temperatura de fusão do fármaco. Embora exista uma infinidade de recomendações a cerca da condução de estudos de estresse, pode-se observar guias validados e mundialmente respeitados que dispostam como referência nesse campo, como o ICH (ICH, 2003; REPUBLIC OF KENYA, 2010; ASEAN, 2012).

Condições catalíticas por faixas extremas de pH buscam induzir hidrólise na molécula do fármaco. Para essa técnica uma condição inicial pode partir do uso de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ como condição hidrolítica ácida e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ como condição hidrolítica alcalina. A indução a degradação pela ação de luz trata-se de uma condição também indispensável, pois possibilita avaliar a fotosensibilidade de determinado fármaco, sendo ainda, indispensável para definir condições de estocagem do fármaco e do PFA. Esse estudo de estresse pode ser conduzido a princípio pelo fármaco isolado e/ou em solução simples ou em suspensão, sendo recomendada uma exposição a 1,2 milhões de lux por hora emitida por fontes de luz fluorescente. Para o estudo de degradação oxidativa observa-se uso amplo de peróxido de hidrogênio (0,02 – 3,0%) como agente estressante, além de azobisisobutironitrila (AIBN) e hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), por exemplo, que são agentes oxidantes mais seletivos. Metais como cobre e ferro também podem ser usados como agentes indutores de oxidação em estudos de estresse (ICH, 1996; ICH, 2003; OMS, 2009; ALSANTE, et al. 2007).

Em relação a gama de materiais empregados na realização de testes de estresse, as possibilidades são diversas. O primeiro material é o recipiente onde ocorrerá a condição de estresse, de modo que o vidro destaca-se por ser tratar de material inerte. Diversos materiais tais como frascos, tubos, ampolas, entre outros podem ser usados e devem sempre se apresentar devidamente vedados. Geralmente opta-se pelo uso de estudos de degradação forçada em solução, onde os volumes usados podem chegar até a 100 mL e as concentrações de fármacos normalmente usadas são de até 10 mg mL⁻¹ (SINGH e BAKSHI, 2000).

Um segundo material de destaque em estudos de estresse consiste no equipamento para criar determinada condição de estresse. Pode-se optar pela realização de estudos de degradação forçada à temperatura ambiente, mas quando se pretende acelerar a degradação, parte-se para técnicas de aquecimento tais

como banhos termostatzados de água, que ajudam no fornecimento de altas temperaturas às amostras a serem estressadas, ou ainda, banhos de óleo e refluxo, quando testes de estresse requerem temperaturas mais elevadas (superiores a 80°C). Independente da condição catalítica escolhida, sempre é necessário manter um controle rígido da temperatura reacional com auxílio de termômetros devidamente calibrados (SINGH e BAKSHI, 2000; JUNWAL, et al. 2012).

Dessa forma, cuidados com monitoramento da temperatura são importantes tanto para se assegurar quais variáveis juntas geram situação de estresse além de garantir que a condução de estudos de estresse se dê de maneira segura. Essa preocupação ganha campo especialmente quando se opta por utilizar fornos de convecção ou câmaras de aquecimento para aquecer amostras, pois nesses casos, cuidados com temperatura reacional devem ser redobrados, já que propiciam maior incidência de acidentes no ambiente laboratorial caso amostras aquecidas estourem no interior dos fornos (SINGH e BAKSHI, 2000).

Ao longo da realização de ensaios de degradação forçada é importante salientar que não basta apenas estressar o fármaco e/ou o PFA de maneira descontrolada visando apenas formar produtos de degradação. É necessário saber quando a degradação atinge um limite satisfatório, o que indica o término do estudo de estresse. Caso os estudos de estresse persistam por longos períodos de tempo, os produtos de degradação formados podem sofrer novas clivagens originando compostos secundários, o que não é o intuito dos estudos de degradação forçada, uma vez que um PFA dificilmente encontra condições tão severas no armazenamento quando está prestes a ser destinado ao uso (OMS, 2009).

Assim, orienta-se que em tais estudos atinjam em torno de 10 a 30% de degradação em relação a concentração inicial de fármaco não degradado. Isso faz com que cada teste de estresse siga condições particulares de acordo com a susceptibilidade do fármaco a sofrer ou não degradação nas mais diversas condições de estresse (OMS, 2009).

Para se avaliar os resultados do estudo de degradação forçada, técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) são bastante populares por possibilitarem boa separação entre fármaco e PD formados no estudo de estresse.

Para tanto, a metodologia cromatográfica deve ser capaz de validar a especificidade/seletividade para determinados compostos, por exemplo, por seu acoplamento a detectores com arranjo de diodos e espectro de massas, que são capazes de monitorar purezas cromatográficas. Assim pode-se confirmar se o método em questão seja efetivo ou não na função de medir determinado composto (fármaco ou produto de degradação) sem presença de interferentes (SINGH e BAKSHI, 2002; ICH, 2003; USP, 2012).

2.6. FATORES ATUANTES NA DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS

A estabilidade de uma especialidade farmacêutica é dependente de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de fatores diretamente relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, processo de fabricação e propriedades dos materiais de embalagens (BRASIL, 2005).

2.6.1. Temperatura

A temperatura é um fator que influencia a velocidade de reações, portanto análises que empreguem termodegradação são úteis para avaliação da estabilidade térmica (ATKINS, 1999). Por essa via de degradação destacam-se alterações que podem ocorrer na estrutura da molécula por reações de descarboxilação, hidrólise e rearranjos, por exemplo (BAERTSCHI et al., 2005).

Em se tratando de fármacos, sua degradação pode ser aumentada com o aumento da temperatura, de modo que a cada aumento de 10°C aumenta-se em média de duas a três vezes a velocidade da reação (nesse caso, reações de degradação). Algumas reações não são afetadas significativamente quando ocorre uma variação da ordem de 10°C enquanto que outras apresentam alterações significativas. E, ainda, quando se pretende conduzir estudos de degradação forçada, sugere-se que o intervalo de temperatura em que amostras são submetidas varie de 40° C a 110° C e, o período de exposição de poucos minutos a meses

(SINGH e BAKSHI, 2000; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001; ALSANTE, et al. 2007).

2.6.2. Hidrólise

Quando se considera mecanismos de degradação, a água é avaliada como um dos principais agentes indutores. Diversos fármacos são considerados instáveis nesse meio, necessitando de diversas alterações durante a estocagem e sua pré-formulação, como substituição da água por outros excipientes tais como polietilenoglicol em casos de formulações líquidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação. Para a condução de hidrólise alcalina e ácida, orienta-se que as faixas de pH ideais sejam de 12 – 13 e 1 – 2, respectivamente (ALSANTE, 2007; ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

Fármacos que contenham em sua estrutura grupos funcionais éster e amida (anestésicos e vitaminas, por exemplo) estão sujeitos a reações de hidrólise quando dispostos em solução. A hidrólise de uma ligação éster pode ser catalisada por substâncias de natureza polar como ácidos minerais, bases ou algumas enzimas, desde que sejam capazes de fornecer prótons ou íons hidroxilas para as reações. Para emprego desse tipo de degradação forçada em fármacos e insumos farmacêuticos são amplamente utilizados o ácido clorídrico e o hidróxido de sódio para hidrólise ácida e alcalina, respectivamente (SINGH e BAKSHI, 2000; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001).

2.6.3. Oxidação

Reações de degradação oxidativas são causadas por radicais livres ou pelo oxigênio molecular. A partir do momento que uma substância perde elétrons diz-se que ela oxidou. Na oxidação, átomos ou radicais eletropositivos são perdidos, ou ainda, átomos ou radicais eletronegativos são adicionados à molécula da substância. Tanto a perda de hidrogênio quanto o acréscimo de oxigênio a uma

molécula são as formas mais comuns de oxidação, sendo que calor, luz e metais de transição (Cu II 0,05 mmol L⁻¹ e Fe III 0,1 mmol L⁻¹) atuam como indutores de catálise desse tipo de reação (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001; SINGH, et al. 2013).

A maioria das reações de decomposição oxidativa de fármacos tem natureza auto oxidativa e necessitam de pequena quantidade de oxigênio molecular para começarem a formar radicais livres com reações em cadeia. O agente oxidante mais usual e recomendado por guias e legislações para estudos de degradação forçada é o peróxido de hidrogênio. Entretanto, tem crescido o emprego outros agentes oxidantes ditos mais seletivos, tais como AIBN, AAPH e 4,4'-azobis (ácido 4-cianovalérico) (ACVA), que são mais seletivos que peróxidos e são usados em caráter confirmatório dos resultados de peróxidos (BRASIL, 2003; FLORENCE e ATTWOOD, 2003; ALSANTE, et al. 2007; OMS, 2009).

2.6.4. Fotólise

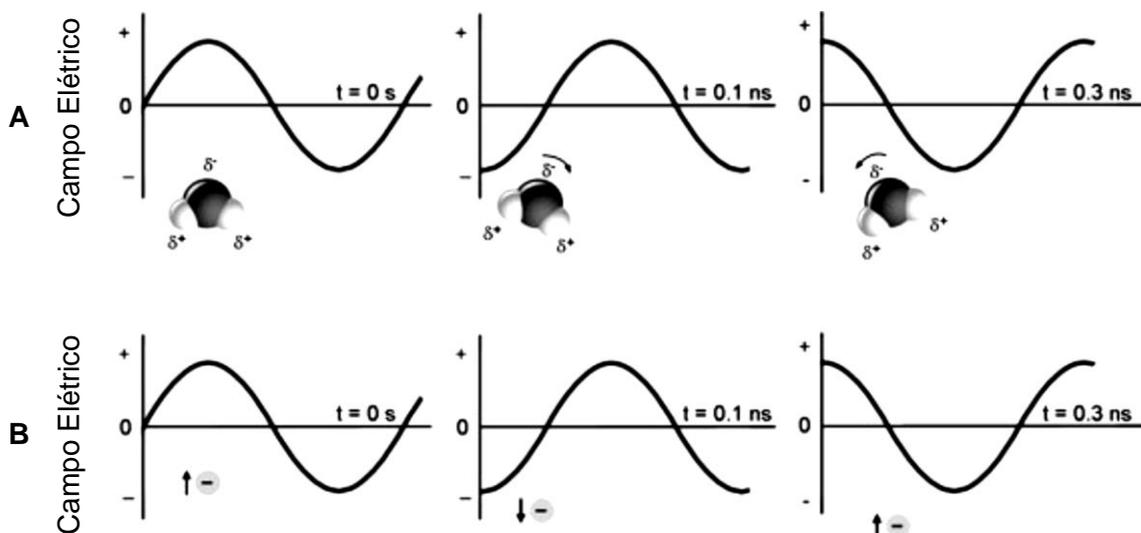
Reações de fotólise dão se pela absorção de energia luminosa, sendo que no panorama farmacêutico, diversos são os fármacos que estão suscetíveis a tal forma de degradação. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, inclusive de fármacos, ocorrendo a degradação da molécula. Quanto menor o comprimento de onda, mais energética é a radiação luminosa e mais radiação é absorvida pelo fármaco fotossensível (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001; MORIWAKI et al. 2001). Ao aumentar o conteúdo energético do sistema, pela transferência do fóton ao fármaco, reações oxidativas tendem a ser catalisadas (ALLEN Jr., POPOVICH e ANSEL, 2007).

Estudos de fotoestabilidade podem ser realizados pela exposição do fármaco a fontes luminosas, por lâmpada fluorescente artificial, com saídasde luz visível e ultravioleta (UV) e lâmpadas de xenônios ou de haletos metálicos, que possui melhor distribuição espectral. Ao término dos estudos, o ICH recomenda que a amostra tenha sido exposta a uma iluminação equivalente a 1,2 milhões de lux horas (ICH, 1996).

2.7. IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS

As micro-ondas consistem em uma radiação não ionizante, ou seja, não possui energia suficiente para arrancar elétrons dos átomos, mas que é capaz de gerar movimento das espécies em solução pela migração de íons ou rotações de dipolo (Figura 2). A interação das ondas eletromagnéticas com o dipolo elétrico das moléculas gera aquecimento a partir do momento em que as moléculas tendem a se alinhar rapidamente ao campo elétrico aplicado. Quando o mesmo é removido as moléculas retornam ao estado desordenado dissipando a energia absorvida na forma de calor. O mecanismo de aquecimento por migração ou condução iônica se dá pelo atrito das espécies iônicas presentes sob ação de um campo eletromagnético, gerando calor (WATKINS, 1983; BARBOZA et al. 2001).

Figura 2. Mecanismos de aquecimento por micro-ondas



A. Rotação de dipolo – moléculas tentam se alinhar ao campo elétrico.

B. Condução iônica – íons se movem em relação ao campo elétrico.

Adaptado de KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009.

As micro-ondas são formadas por ondas eletromagnéticas com frequência entre 0,3 e 300 GHz, correspondendo a comprimentos de onda da ordem de 1 cm a 1 m e encontram-se na região do espectro eletromagnético entre o infravermelho e as radiofrequências (GEDYE e WEI, 1998).

A capacidade de um material converter energia eletromagnética em energia térmica está diretamente relacionada com sua constante dielétrica. Logo, quanto maior sua constante dielétrica, maior será seu acoplamento com a irradiação micro-ondas. Dentre alguns solventes que cumprem esse requisito, pode-se citar a água, acetato de etila, acetona e ácido acético, entre outros. Substâncias apolares como hexano ou com dipolo nulo, tais como o tetraclorometano não são aquecidos por micro-ondas, por absorverem fracamente a radiação. Materiais cristalinos altamente ordenados também não absorvem micro-ondas, como é o caso da porcelana, embora possua constante dielétrica semelhante ao ácido acético (SANGHI, 2000).

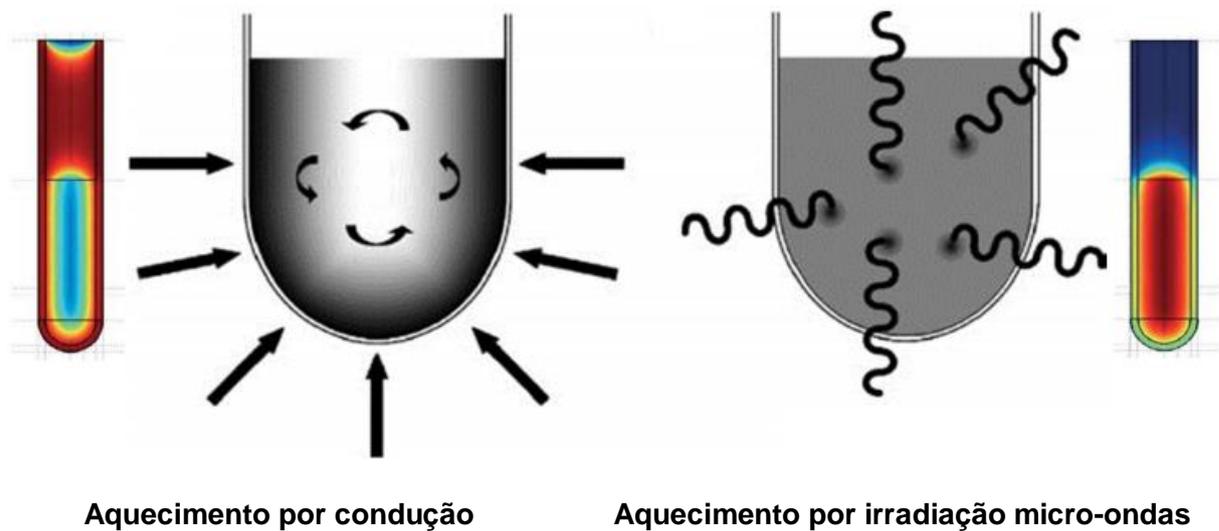
As propriedades dielétricas podem ser definidas por dois fatores, sendo uma a constante dielétrica, ϵ' , que descreve a habilidade de uma molécula ser polarizada sob a influência de um campo elétrico. Outro fator de perda dielétrica, ϵ'' , quantifica a eficiência com a qual a energia absorvida é convertida em calor. A razão entre esses dois parâmetros determina o fator de dissipação ($\tan \delta$). Este, por sua vez, é definido como a capacidade de uma substância em converter energia absorvida em calor, em certa temperatura e frequência. Logo, temos: $\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$ sendo uma equação diretamente proporcional ao aquecimento por micro-ondas (LINDSTROM, et al. 2001).

Um dos motivos que fazem com que a tecnologia de aquecimento por irradiação micro-ondas venha substituindo gradativamente a técnica de aquecimento convencional em experimentos deve-se ao tipo de transferência de calor. Nas técnicas convencionais (refluxo e estufa, por exemplo), o calor é transferido ao meio reacional pelo fenômeno de condução a partir do meio externo. Para tanto, antes o calor deve atravessar as paredes do recipiente onde a mistura reacional se encontra. Assim a transferência de calor passa a depender da condutividade térmica do material, o que pode demandar muito tempo e ainda não assegura que a transferência de energia em questão seja eficiente. Por outro lado, o aquecimento por irradiação micro-ondas se dá diretamente com as moléculas do meio reacional, sem limitação do recipiente, dispensando sua condutividade térmica (Figura 3) (BARBOZA et al. 2001; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

Além disso, o resultado é um superaquecimento localizado quase instantâneo, pois o mecanismo de aquecimento tem atuação de rotações dipolo e

ainda pode ter atuação da condução iônica, onde o movimento de espécies iônicas que possam estar presentes, também gera aquecimento (BARBOZA et al. 2001; DHAKITE, KADAM, 2014).

Figura 3. Tipos de aquecimento por condução e irradiação micro-ondas



Adaptado de KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009.

O aquecimento por irradiação micro-ondas além de reduzir o tempo de experimento e assegurar uma distribuição mais uniforme de temperatura apresenta, ainda, vantagens em alguns pontos tais como melhor reprodutibilidade, evita perdas de calor para o ambiente, assegura pureza no produto final, reduz quantidades de reagentes e amostra (reduzindo emissão de substâncias poluentes), além de possuir um baixo custo operacional (DHAKITE, KADAM, 2014).

Baseando sem em diversos dados experimentais crescentes, o uso irradiação por micro-ondas em diversos campos de pesquisas tem crescido, especialmente, na última década e já conquista espaço tanto no campo acadêmico quanto no campo industrial. Fato também observado em testes de estresse por meio de aquecimento por irradiação micro-ondas em equipamentos modernos que, podem ser capazes de submeter experimentos à altas temperaturas, inclusive acima dos pontos de ebulição dos solventes utilizados. Isso ocorre quando os reatores de micro-ondas oferecem capacidade de controlar pressão do meio reacional, além de predizer com exatidão

as temperaturas do meio (BOJANA, MARKUS e KAPPE, 2011; SONAWANE e, GIDE, 2013).

Em recentes ensaios de degradação forçada realizados em reatores com a tecnologia por micro-ondas, observa-se a possibilidade de reduzir o tempo de realização do experimentos sem que os resultados obtidos deixem de ser equivalentes às técnicas de estresse forçado convencionais, ou seja, uma porcentagem equivalente de degradação pode ser observada em ensaios bem elaborados como base irradiação micro-ondas (SILVA, et al. 2013; SONAWANE & GIDE, 2013; DHAKITE, KADAM, 2014).

Alguns dos estudos de degradação forçada que têm proposto o emprego de irradiação micro-ondas como alternativa específica para o aquecimento convencional por banho, refluxo, entre outros (SINGH, et al., 2013). Nesses estudos, o uso de irradiação micro-ondas tem proporcionado boa redução nos tempos reacionais. Dependendo da estabilidade intrínseca do fármaco estudado, não é difícil se deparar com alguns casos em que os estudos de estresse usuais realizados à temperatura ambiente ou por aquecimento convencional persistam por várias horas ou dias até atingirem degradação suficiente (BENDE, et al. 2007)

A realização de estudos de degradação forçada em fornos de micro-ondas com controle de temperatura e pressão, tem implicado significativamente na redução de tempo nos experimentos onde reações estressantes que antes levavam horas passam a gastar poucos minutos. A redução no tempo em estudos assistidos por irradiação micro-ondas é um efeito bastante expressivo mas deve vir acompanhado de resultados semelhantes aos obtidos por técnicas convencionais que usam aquecimento simples. Esse ponto possui grande importância e tem sido confirmado pela realização ensaios paralelos mediados por estudos de estresse convencional, gerando amostras com degradações semelhantes e perfis cromatográficos equivalentes (BOJANA, MARKUS e KAPPE, 2011; DHAKITE).

Em estudos de estresse assistidos por irradiação micro-ondas em equipamentos modernos com capacidade de aquecer o ambiente reacional, observa-se que essa elevação de temperatura está diretamente relacionada à redução dos tempos de reação. Quando se pode trabalhar com altas temperaturas do meio reacional obtêm-se um resultado positivo nos efeitos cinéticos de uma

reação química que, segundo a relação de Arrhenius, cada aumento na ordem de 10°C gera uma redução pela metade no tempo reacional (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009; BOJANA, MARKUS e KAPPE, 2011).

Entre outros fatores, o uso de irradiação micro-ondas em testes de estresse tem proporcionado redução das quantidades de reagentes empregados ao longo dos ensaios. Isso se deve ao fato de alguns reatores possibilitarem realização dos estudos de estresse em pequenas quantidades de amostra, que ficam expostas as micro-ondas armazenadas em pequenos tubos de vidro, devidamente vedados (BOJANA, MARKUS e KAPPE, 2011).

O alcance e reprodutibilidade de estudos de estresse assistido por micro-ondas tem se mostrado eficiente em diferentes classes de fármacos. Observam-se estudos realizados em protetores gastrointestinais (tal como rebamipida), anti-inflamatórios não esteroides (como a indometacina), anti-helmínticos (a exemplo do levamisol), entre outros. Os fármacos estudados obtiveram êxito na realização de seus estudos de degradação, apresentando resultados como redução no tempo reacional, diminuição com gasto de reagentes e amostras e manutenção das vias de degradação simplesmente pelo uso de reatores modernos, de fácil manuseio e capazes de oferecer controles mais específicos de variáveis como temperatura, tempo, pressão e agitação. Entretanto estudos de degradação forçada por micro-ondas devem ser cautelosamente monitoradas, pois por serem capazes de fornecer temperaturas superiores às usadas em estudos de estresse convencional, talvez possam proporcionar vias de degradação diferentes quando comparadas (BOJANA, MARKUS e KAPPE, 2011; SILVA, et al. 2013; SINGH, et al. 2013; SONAWANE & GIDE, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar estudos de degradação forçada em fármacos fluoroquinolônicos assistida por irradiação micro-ondas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Submeter os fármacos levofloxacino e norfloxacino a degradação forçada em reator de micro-ondas;
- Comparar resultados obtidos com técnicas de degradação forçada usuais (hidrólise, oxidação e aquecimento);
- Padronizar a técnica de degradação por irradiação micro-ondas para que a mesma apresente resultados semelhantes a ensaios de degradação por hidrólise, oxidação e aquecimento.

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE LEVOFLOXACINO

Foi adquirido o padrão químico de referência levofloxacino (LXN) *USP reference standards*, lote F0H194.

Para o preparo das soluções de referência utilizou-se como solução diluente de levofloxacino (SDL) uma mistura de água purificada Milli-Q, e acetonitrila grau HPLC (Merck) em uma proporção 85:15 (v/v). Para a filtragem das amostras e da fase móvel empregou-se filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de porosidade (Millipore) (USP, 2011).

A fase móvel de levofloxacino (FML) foi composta pela dissolução de 7,0 g de perclorato de sódio (Sigma Aldrich) e 4,0 g de acetato de amônio (J.T. Baker) em 1.300 mL de água milli-Q, para posterior ajuste de pH para 2,2 com ácido fosfórico grau HPLC (Fmaia). Por fim, adicionou-se a essa solução a quantidade de 240 mL de acetonitrila grau HPLC. Homogeneizou-se a mistura. Para a filtragem das amostras e da fase móvel empregou-se filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de porosidade. Utilizou-se fluxo isocrático 1 mL por minuto da FML. Como fase estacionária, a coluna cromatográfica empregada foi uma coluna de fase reversa X-Terra Waters, C18, de 150 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno e com dimensões das partículas de 5,0 µm (USP, 2011).

A metodologia analítica foi executada em cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo *Waters 2695 Separations Module Alliance*, detector *Waters 2998 Photodiode Array Detector*, em acordo com o laboratório analítico da Brainfarma S.A. Indústria química e farmacêutica.

4.2. MATERIAIS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE NORFLOXACINO

Foi adquirido o padrão químico de referência norfloxacin (NXN) *USP reference standards*, lote H1D317.

Para o preparo das soluções de referência utilizou-se como solução diluente para o norfloxacin a sua própria fase móvel (FMN), que por sua vez foi composta

por uma solução contendo 0,1% (v/v) de ácido fosfórico em água purificada Milli-Q e acetonitrila grau HPLC (Merck), na proporção de 85:15 (v/v). Homogeneizou-se a mistura. A filtragem das amostras e da fase móvel empregou filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de porosidade (Millipore). Utilizou-se fluxo isocrático 1 mL por minuto da FMN. Utilizou-se a coluna cromatográfica ACE C18, de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno e com dimensões das partículas de 5,0 µm (USP, 2011).

A metodologia analítica se desenvolveu por CLAE em cromatógrafo de maneira homóloga ao levofloxacino (item 4.1).

4.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES TESTE

4.3.1 Preparo do padrão químico de referência de levofloxacino

O preparo da solução de referência deu-se a partir da pesagem equivalente de 50 mg de LXN, e sua posterior transferência a um balão volumétrico de 100 mL, na cor âmbar. Avolumou-se o balão com solução diluente SDL. A solução foi homogeneizada e posteriormente levada a banho ultrassônico (LXN 1) por 10 minutos. Uma alíquota de 2 mL foi transferida a um balão volumétrico (âmbar) de 50 mL, e utilizou-se solução diluente SDL para completar o balão (LXN 2). Ao fim, obteve-se solução de LXN com concentração de 20,0 µg mL⁻¹. Filtrou-se em membrana hidrofílica de 0,45 µm.

4.3.2 Preparo do padrão químico de referência de norfloxacino

A preparação da solução de referência deu se a partir da pesagem equivalente de 20 mg de NXN, e sua posterior transferência a um balão volumétrico (âmbar) de 50 mL. Avolumou-se o balão com fase móvel FMN. A solução foi homogeneizada e posteriormente levada a banho ultrassônico (NXN 1) por 10 minutos. Uma alíquota de 10 mL foi transferida a um balão volumétrico (âmbar) de 20 mL, utilizando-se fase móvel para completar o balão (NXN 2). Ao fim, obteve-se

solução de NXN com concentração de 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Filtrou-se em membrana hidrofílica de 0,45 μm .

4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Para realização dos ensaios cromatográficos, a adequação do sistema foi determinada pelas leituras das absorvâncias da solução padrão sendo definidos pelos parâmetros apresentados na Tabela 2 (SHABIR, 2003).

As concentrações de levofloxacino e norfloxacino obtidas nos experimentos, foram determinadas por meio de construção de curva de calibração para os respectivos fármacos e os dados foram reprocessados usando o *Software Empower 2*.

Tabela 2. Resultados de adequação do sistema

Parâmetro	Especificação
Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variância (CV%)	$\leq 2,0\%$
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	Em geral ≥ 2000
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	Em geral $\leq 2,0$
K' (Fator de Capacidade)	O Pico principal deve estar bem resolvido dos demais picos e do pico não retido, geralmente $k \geq 2,0$
Pureza de pico	Ângulo limite > ângulo de pureza dos picos

Adaptado de SHABIR, 2003

4.4.1 Metodologia analítica para o levofloxacino

As soluções obtidas pelos estudos de degradação forçada de LXN foram submetidas a análise por CLAE, norteadas pelos parâmetros da farmacopeia americana, *United States Pharmacopeia* (USP). A metodologia em questão consistiu na utilização dos materiais descritos no item 4.1.1 (USP, 2011). Os parâmetros cromatográficos utilizados para os ensaios de LXN são expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos para o levofloxacino.

Parâmetro	Especificação
Coluna	X-Terra C18; 5 mm; 4,6 mm x 150 mm
Comprimento de onda	294 nm
Fase móvel	Solução tampão pH 2,2 : acetonitrila (130:24 (v/v)) (isocrático)
Volume de injeção	10 µL
Fluxo	1 mL/minuto
Temperatura da coluna	35°C
Temperatura de amostras	25°C

4.4.2 Metodologia analítica para o norfloxacino

As soluções obtidas pelos estudos de degradação forçada de NXN foram submetidas a análise por CLAE, norteadas pelos parâmetros do compêndio oficial, USP. A metodologia em questão consistiu na utilização dos materiais descritos no item 4.1 (USP, 2011). Os parâmetros cromatográficos utilizados para os ensaios de NXN são expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos para o norfloxacino.

Parâmetro	Especificação
Coluna	ACE C18; 250 mm x 4,0 mm; 5,0 µm*
Comprimento de Onda	275 nm
Fase móvel	Solução de Ácido Fosfórico (0,1%): Acetonitrila (85:15) (isocrático)
Volume de Injeção	10 µL
Fluxo	2 mL/minuto
Temperatura da Coluna	40°C
Temperatura de amostras	25°C

* Condiciona-se a coluna com solução de fosfato de sódio monobásico 0,01 mol L⁻¹ (pH ajustado para 4,0 com ácido fosfórico), por 8 horas e fluxo de 0,5 mL/min.

4.4.3 Especificidade/seletividade do método frente degradação forçada e estudo de produtos de degradação

No estudo de estresse avaliou-se a seletividade e especificidade da metodologia analítica, submetendo amostras às diferentes formas de estresse. Os parâmetros, pureza de pico, fator de capacidade (K'), fator de simetria e número de pratos teóricos já demonstrados na Tabela 4 foram calculados para cada condição

como o intuito de demonstrar que os métodos analíticos são capazes de medir fármacos fluoroquinolônicos em presença de impurezas e produtos de degradação e de demais componentes analíticos como a própria fase móvel.

4.5. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

4.5.1 Estudo de degradação forçada para levofloxacin

O estudo de degradação forçada foi realizado a partir da transferência volumétrica de 4 mL da solução LXN 1 para balões volumétricos (âmbar) de 100 mL contendo 50 mL das soluções estressantes (Tabela 5) e, posteriormente avolumados com solução diluente SDL, obtendo-se a solução final (concentração de trabalho de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Feito isso, as soluções de LXN (submetidas aos agentes estressantes HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 0,3% (v/v) e 1,0% (v/v)) foram filtradas diretamente para frascos de vidro âmbar (1,5 mL) com auxílio de membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$. Os frascos foram devidamente tampados, vedados com papel alumínio e reservados à temperatura ambiente ao longo de 24 horas (tempo para que as degradações possíveis ocorressem), e após esse período, foram levados a análise cromatográfica. Para a condição estressante de temperatura, a própria solução LXN 2, já filtrada e vedada em frascos de vidro âmbar (1,5 mL) com auxílio de membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$, foi levada à aquecimento em estufa Nova Ética modelo 400/3ND (pré-aquecida) à temperatura de $60^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ pelo período de 24 horas e, posteriormente, foi levada a análise por CLAE. As leituras foram feitas em comprimento de onda fixo de 294 nm e em varredura de comprimentos de onda. Os ensaios foram realizadas em triplicata.

Tabela 5. Condições Estressantes para levofloxacino e norfloxacino

#	Condição	Agente Indutor
1	Hidrólise ácida	HCl 0,1 mol L ⁻¹
2	Hidrólise ácida	HCl 1,0 mol L ⁻¹
3	Hidrólise básica	NaOH 0,1 mol L ⁻¹
4	Hidrólise básica	NaOH 1,0 mol L ⁻¹
5	Oxidação*	H ₂ O ₂ 0,3% (v/v)
6	Oxidação*	H ₂ O ₂ 1,0% (v/v)
7	Oxidação**	H ₂ O ₂ 1,0% (v/v)
8	Oxidação**	H ₂ O ₂ 3,0% (v/v)
9	Temperatura	60°C ± 5°C

* Condição oxidativa para levofloxacino; **Condição oxidativa para norfloxacino;

4.5.2 Estudo de degradação forçada para norfloxacino

O estudo de degradação forçada foi realizado a partir da transferência volumétrica de 5 mL da solução NXN 1 para balões volumétricos (âmbar) de 10 mL, e posteriormente avolumados com as soluções estressantes (Tabela 5), obtendo-se a concentração final de 200,0 µg mL⁻¹. As soluções de LXN (submetidas aos agentes estressantes HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 1,0% (v/v) e 3,0% (v/v)) foram filtradas diretamente para frascos de vidro âmbar (1,5 mL) com auxílio de membrana hidrofílica de 0,45 µm. Os frascos foram devidamente tampados, vedados com papel alumínio e reservados à temperatura ambiente ao longo de 24 horas (tempo para que as degradações pertinentes ocorressem), e após esse período, foram levados para a análise cromatográfica. Para a condição estressante de temperatura, a própria solução NXN 2, já filtrada em vials âmbar (1,5 mL) com auxílio de membrana hidrofílica de 0,45 µm, foi levada à aquecimento em estufa a temperatura de 60°C ± 5°C pelo período de 24 horas e, posteriormente, foi levada à análise por CLAE. As leituras foram feitas em comprimento de onda fixo de 275 nm e em varredura de comprimentos de onda. Todas as condições catalíticas foram realizadas em triplicata.

4.6. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA INDUZIDA POR MICRO-ONDAS

Paralelamente aos testes convencionais de degradação forçada, a degradação induzida por irradiação micro-ondas em reator da marca *CEM Corporation*, modelo *Discover S-Class* (Figura 4) partiu das soluções LXN 1 (item 4.3.1) e NXN 1 (item 4.3.2) de levofloxacino e norfloxacino, respectivamente.

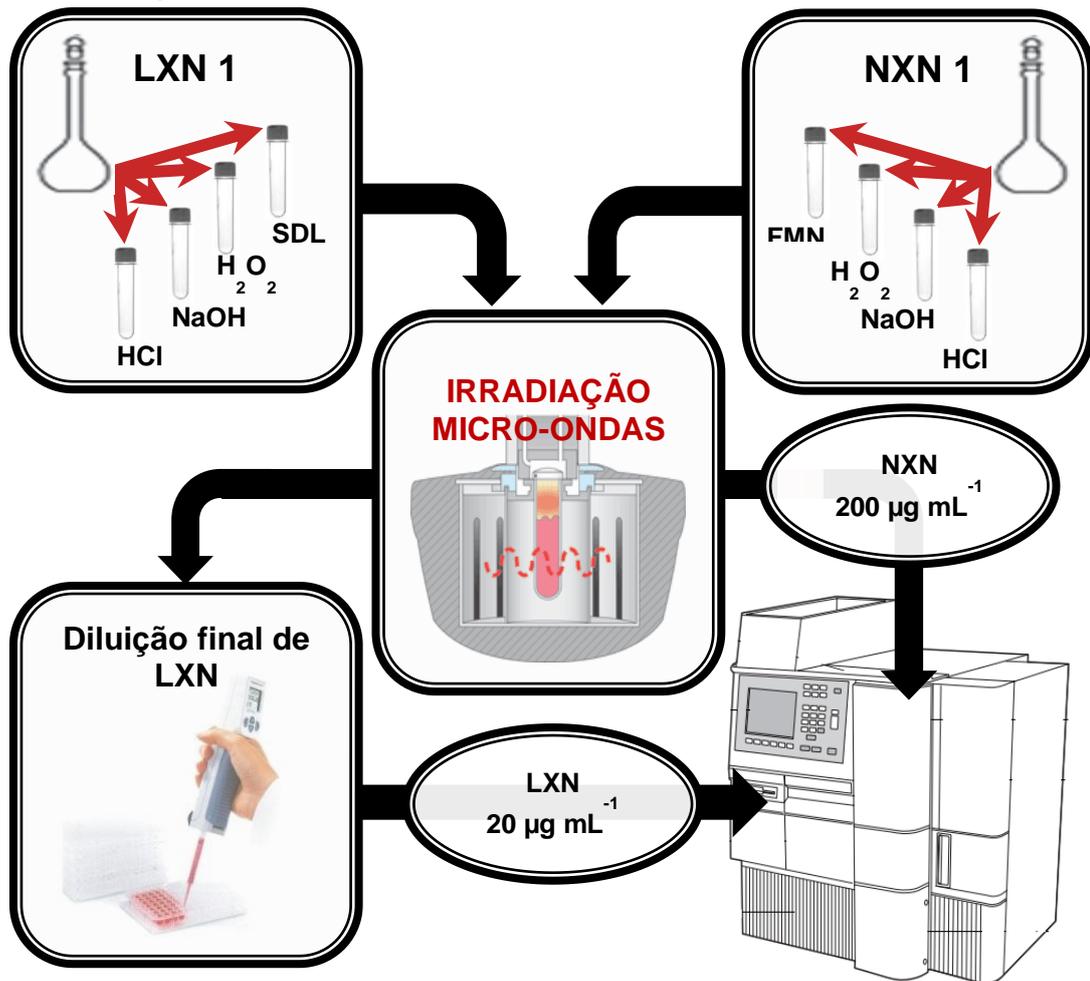
Figura 4. Reator de irradiação micro-ondas



Disponível em: <http://it.cem.com/page199.html>

Para as soluções de LXN e NXN serem submetidas, individualmente, à irradiação micro-ondas (Figura 5), quatro alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções estoque de levofloxacino e norfloxacino (LXN 1 e NXN 1) foram transferidas separadamente para quatro tubos de vidro. As soluções foram diluídas para a proporção de 1:1 (v/v) com 1 mL das soluções conforme Tabela 3. Para o LXN utilizou-se soluções HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹, H₂O₂ 0,3% (v/v) e SDL (tubo 1, tubo 2, tubo 3 e tubo 4). Para o NXN utilizou-se soluções HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹, H₂O₂ 1,0% (v/v) e FMN (tubo 1, tubo 2, tubo 3 e tubo 4). Em seguida, os tubos foram vedados com tampa de silicone, homogeneizados e submetidos, individualmente, a exposição à irradiação micro-ondas.

Figura 5. Fluxograma de DAM.



Após aquecimento por irradiação micro-ondas, conforme parâmetros da Tabela 6, filtrou-se o conteúdo dos tubos de NXN (todos os tubos continham volume total de 2 mL de solução de norfloxacino na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) em frasco de vidro com auxílio de membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$ e submeteu-se os mesmos à análise por CLAE (leituras em comprimento de onda fixo de 275 nm e em varredura de comprimentos de onda). Antes de submeter as amostras estressadas de LXN a CLAE, pipetou-se volumetricamente 1 mL do conteúdo de cada tubo para novos tubos, onde adicionou-se 11,5 mL de SDL com ajuda de repipetador automático *handystep eletronic* (BRAND) devidamente calibrado. Logo, obteve-se uma concentração final de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por fim, filtrou-se o conteúdo de cada tubo em frasco de vidro com auxílio de membrana hidrofílica de $0,45 \mu\text{m}$ e submeteu-se

os mesmos à análise por CLAE (leituras feitas em comprimento de onda fixo de 294 nm e em varredura de comprimentos de onda).

Tabela 6. Variáveis usadas no reator com aquecimento por micro-ondas.

#	Parâmetro	Especificação
1	Potência	300 W
2	Pressão	Até 100 PSI
3	Temperatura A*	100°C
4	Temperatura B**	120°C
5	Agitação	Baixa agitação

*Temperatura programada nos ensaios de até 20 minutos de duração (intervalos de 5, 10, 15 e 20 minutos).

**Temperatura programada nos ensaios de 5 minutos de duração.

Tanto para LXN quanto para NXN, todos os ensaios no reator de irradiação micro-ondas foram realizados em triplicata.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão, baseados nas triplicatas feitas para cada condição de estresse testada. Os dados estatísticos foram tratados pelo *software Graphpad Prisma 5.03* (GraphPad Inc., USA). Diferenças estatísticas foram definidas através de teste t de Student ou Anova seguida pelo teste de Tukey com comparação múltipla, com $p < 0,05$, utilizado como nível mínimo de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO FRENTE AS AMOSTRAS INICIAIS

Os métodos analíticos para levofloxacino e norfloxacinó mostraram ser específicos para seus respectivos fármacos, pois nenhum dos componentes de fase móvel e diluente (branco) apresentaram quaisquer interferência nos tempos de retenção dos fármacos (Figura 6). A pureza dos picos de LXN e NXN obtidos do detector de arranjo de diodos, capaz de realizar varredura em vários comprimentos de onda (Figura 7), foi calculada por meio do *Software Empower 2*, com base nos espectros de absorvância dos fármacos LXN e NXN. Comprovou-se que os picos apresentam-se espectralmente homogêneos, uma vez que o valor obtido pelo ângulo de pureza dos picos (PA) é inferior ao valor do ângulo limite (TH). Como o próprio manual do equipamento esclarece, picos que não cumpram a relação $PA < TH$, exibem heterogeneidade espectral, sendo indicativo de co-eluição de vários compostos em um mesmo pico cromatográfico (WATERS, 2002).

Figura 6. Cromatogramas iniciais de levofloxacino e seu diluente (A) e norfloxacinó com seu respectivo diluente (B).

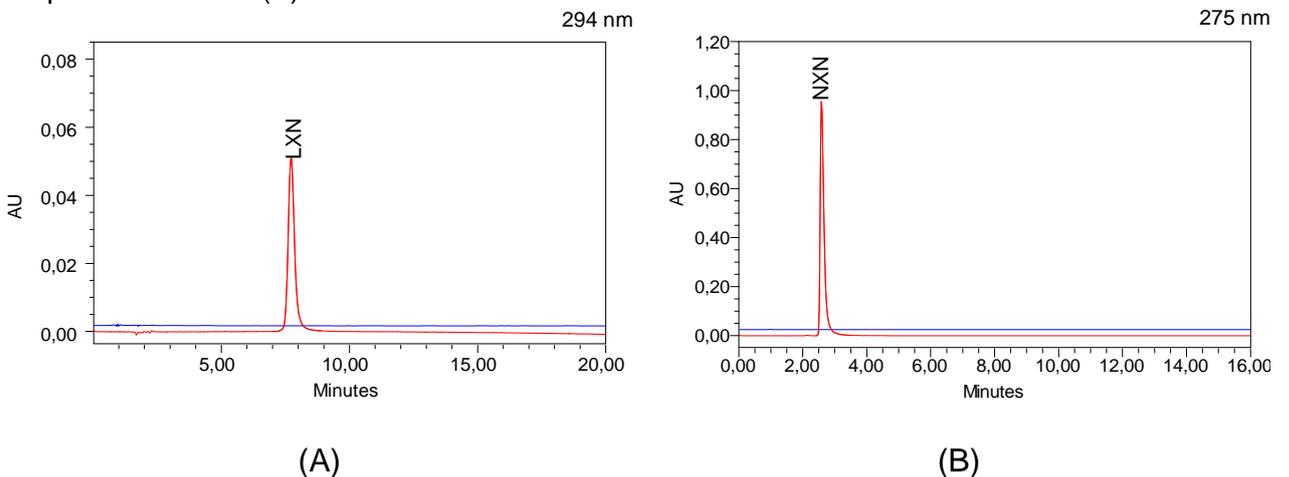
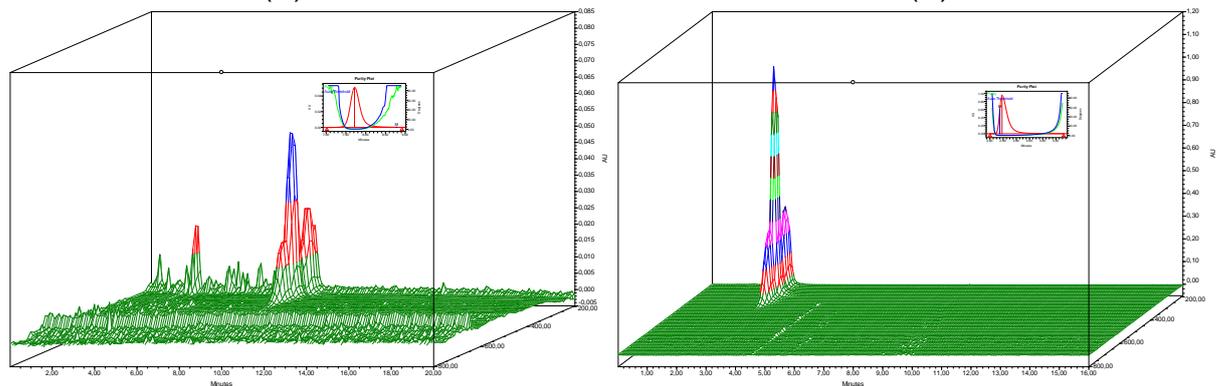


Figura 7. Cromatograma de varredura dos espectros de levofloxacino (A) e norfloxacino (B).



Observou-se ainda que todos os parâmetros cromatográficos (CV%, K' , simetria e pratos teóricos) apresentados foram satisfatórios (Tabela 7). Os valores de área média foram obtidos foram lineares nas faixas de 14 a 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o LXN e de 140 a 260 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o NXN pois de acordo com a curva de calibração $y = 1043159x - 48636,8$ (levofloxacino) e $y = 6494872x - 31390,1$ (norfloxacino) os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99, conforme preconizado pelo FDA (1996).

Tabela 7. Resultados de adequação do sistema para levofloxacino e norfloxacino

Parâmetro	Fármaco	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV% ¹	Pratos Teóricos ²	Simetria do Pico ³	K' ⁴	TR ⁵	Área média ⁶	Pureza de Pico ⁷	
									TH	PA
Resultados	levofloxacino	20,0	1,023	7720,7	1,11	5,36	7,9	980274,2	0,644	0,350
	norfloxacino	200,0	0,871	4891,2	1,24	2,71	2,9	6390461,5	1,024	0,650

¹CV% $\leq 2,0\%$; ²Pratos teóricos ≥ 2000 ; ³Simetria do pico $\leq 2,0$; ⁴ K' $\geq 2,0$; ⁵Tempo de retenção médio; ⁶Área média dos picos (considerando 100% de fármaco) calculada a partir de curva de calibração; ⁷Pureza de pico (TH > PA);

5.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA LEVOFLOXACINO

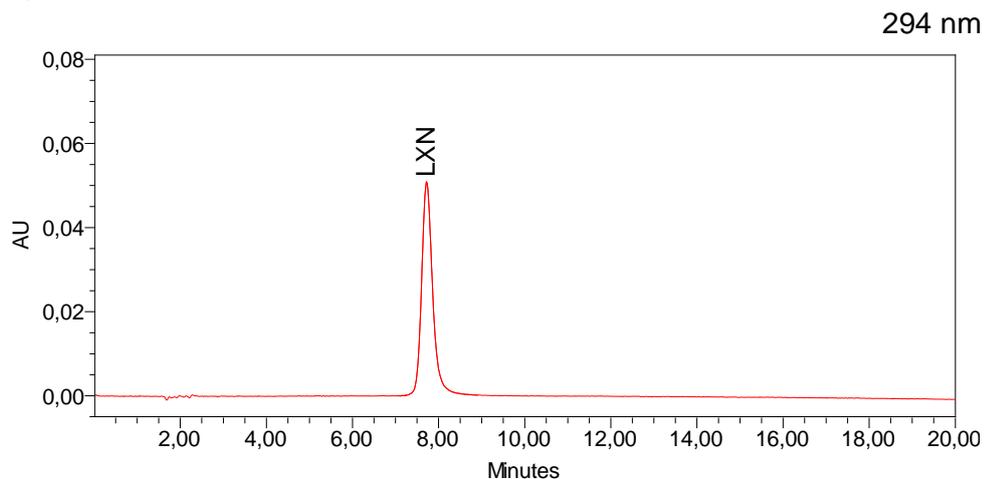
O método analítico demonstrou-se capaz de detectar e quantificar seletivamente os sinais correspondentes ao LXN frente ao surgimento de novos

picos oriundos de possíveis produtos de degradação que foram formados sob algumas condições estresantes. Mesmo em condições de estresse, os picos referentes ao fármaco continuaram se apresentando espectralmente puros.

5.2.1 Temperatura

Amostras de LXN, após serem submetidas a aquecimento ($60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) em estufa, por 24 horas não apresentaram degradação aparente pois a área cromatográfica do pico não apresentou queda quando calculada em relação a curva de calibração. Além disso não se observou a formação de picos oriundos de possíveis produtos de degradação (Figura 8). Diante de exposição as dadas condições de $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, o LXN demonstrou-se estável.

Figura 8. Cromatograma do produto de degradação para a condição termolítica para levofloxacino

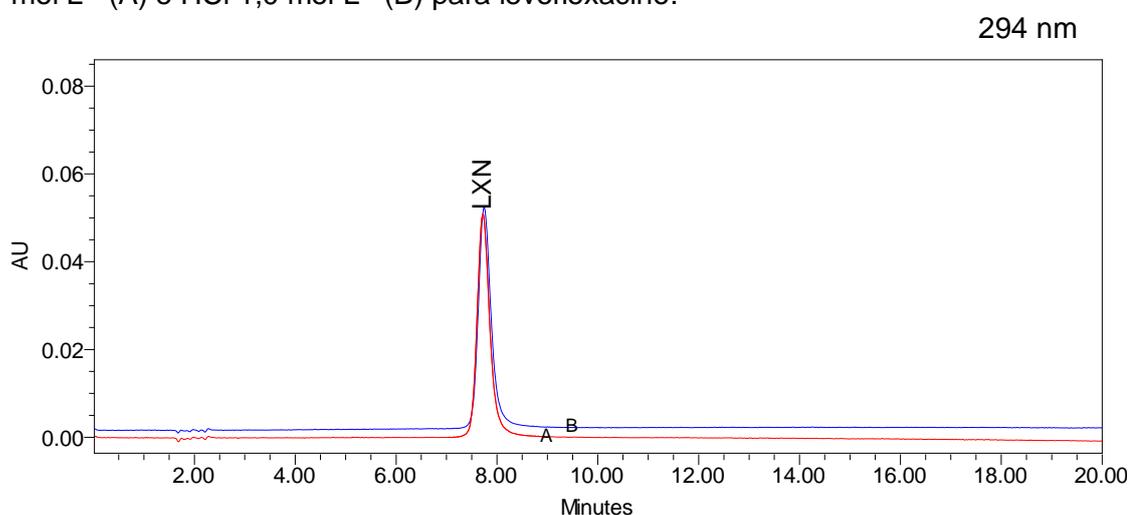


Devi e Chandrasekhar (2009) realizaram estudo de estresse / especificade do levofloxacino e submeteram o fármaco a termólise a 100°C por 5 dias. Os autores não detectaram a degradação expressiva da concentração e nem a formação de produtos de degração frente a essa condição de estresse.

5.2.2 Hidrólise ácida

Amostras de LXN, a princípio submetidas à hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹ por 24 horas, não apresentaram degradação aparente (Figura 9), considerando-se a não formação de picos oriundos de possíveis produtos de degradação ou mesmo a diminuição na área do pico do ativo com base em sua concentração inicial calculada por curva de calibração.

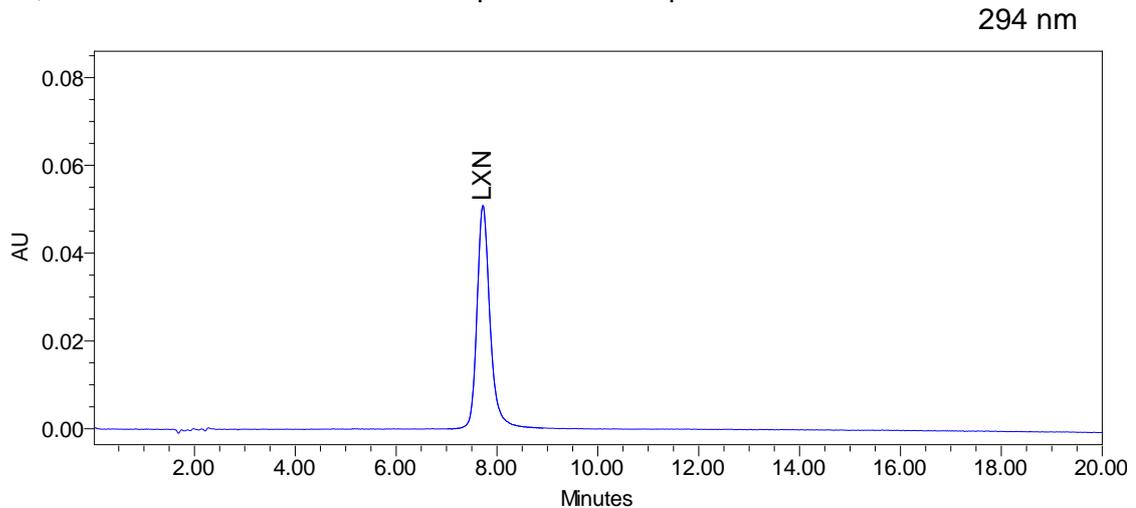
Figura 9. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L⁻¹ (A) e HCl 1,0 mol L⁻¹ (B) para levofloxacino.



Dadas as concentrações de HCl usadas, LXN demonstrou-se estável diante dessa condição, o que levou à tentativa de acelerar a degradação de LXN expondo-o a HCl 0,1 mol L⁻¹ a uma temperatura de 60°C ± 5°C em estufa, pelo prazo de 24 horas. No entanto, ainda assim, não se evidenciou quedas na área referente ao LXN ou indício da formação de possíveis picos oriundos de degradação (Figura 10).

Em uma concentração de 0,5 mol L⁻¹ de HCl, conforme estudos conduzidos por Zheng e colaboradores (2014), após 20 dias de exposição foi possível observar a formação de produtos de degradação do LXN (dentre eles, o composto composto 2 já mencionado na Tabela 1) cujas áreas relativas dos picos somadas chegaram a superar 5% da área cromatográfica total. Nesse estudo, os degradantes formados foram identificados por CLAE acoplada a espectro de massas.

Figura 10. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L⁻¹ e sob influência de temperatura 60°C por 24 h.



5.2.3 Hidrólise alcalina

Na amostra de LXN exposta a degradação por hidrólise alcalina usando NaOH 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 24 horas, não se observou queda significativa de teor ou formação de picos oriundos de possíveis produtos de degradação (Figura 11). No intuito de tentar acelerar tal reação hidrolítica, a amostra de levofloxacino em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ a mesma foi submetida a aquecimento por 24 horas em estufa (60°C ± 5°C), entretanto não se observou decaimento de área referente ao pico de LXN ou a formação de picos de possíveis produtos de degradação (Figura 12). Portanto, o LXN se mostrou estável frente a hidrólise alcalina por NaOH nas concentrações de 0,1 e 1 mol L⁻¹.

Em experimentação semelhante, feita por Devi e Chandrasekhar (2009) induzindo LXN ao mesmo agente estressante alcalino, porém na concentração de 0,5 mol L⁻¹ a 70°C aquecido em estufa por 7 dias não gerou decaimento significativo nas concentrações do fármaco e nenhum PD foi observado em análise CLAE acoplado a espectro de massas.

Figura 11. Cromatograma do produto de degradação por hidrólise alcalina mediada por NaOH 0,1 mol L⁻¹ (A) e NaOH 1,0 mol L⁻¹ (B) para levofloxacin.

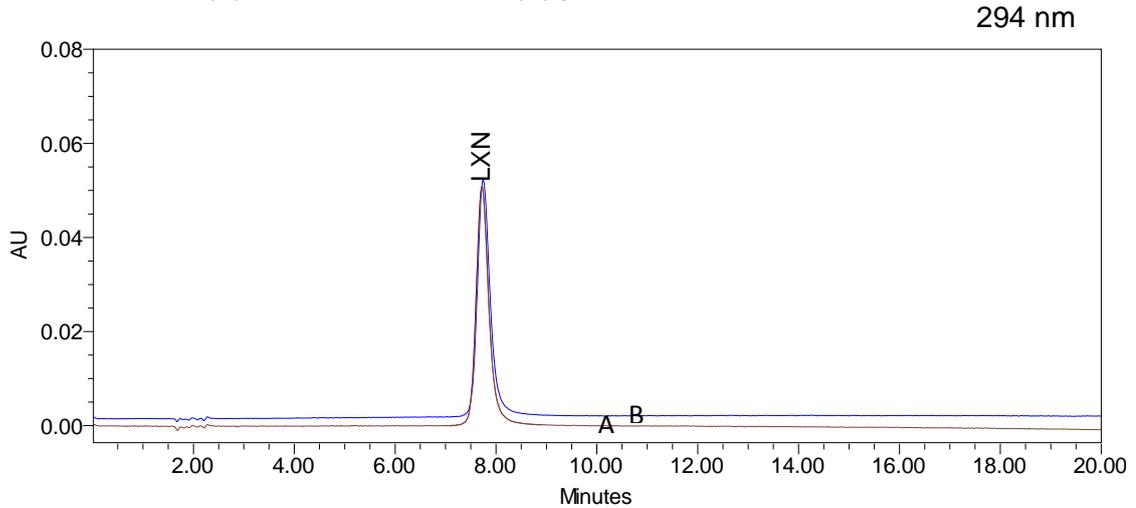
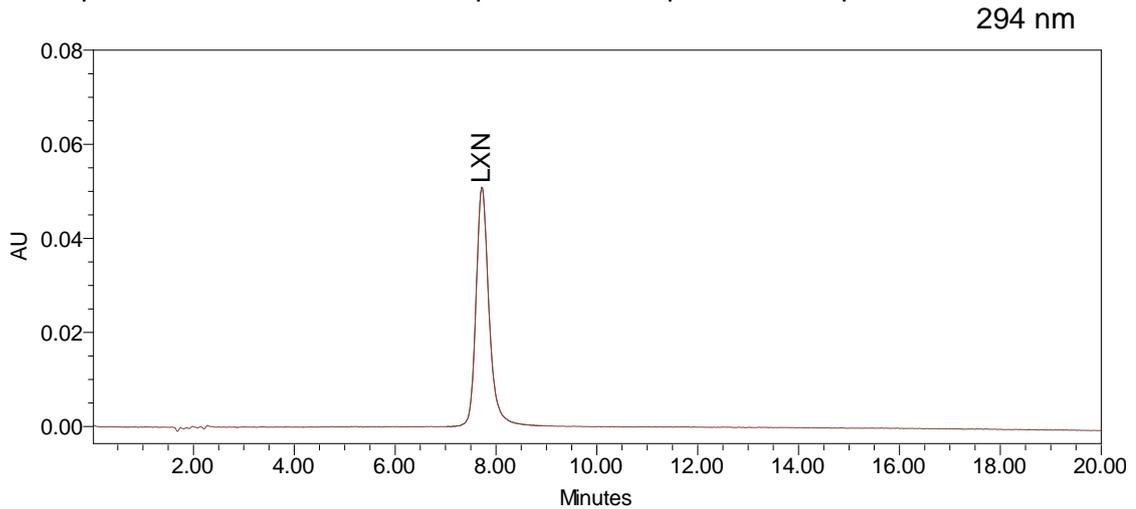


Figura 12. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise alcalina mediada por NaOH 0,1 mol L⁻¹ e à temperatura 60°C por 24 horas para levofloxacin.



5.2.4. Oxidação

A condição oxidativa por peróxido de hidrogênio se mostrou a mais drástica, pois em uma exposição de LXN a esse agente estressante nas concentrações de 0,1% (v/v) e 0,3% (v/v) por 24 horas foi gerado um decaimento na área de LXN (com base em concentração inicial do LXN não estressado e calculado por curva de calibração) de 17,32% e de 24,67% , respectivamente. Além da formação de um possível pico oriundo de degradação mais retido que na coluna cromatográfica

(próximo aos 12 minutos) em ambas concentrações (Figura 13 e Figura 14, respectivamente). Observa-se que o percentual de degradação está diretamente envolvido com a concentração do agente estressante (peróxido de hidrogênio), pois a medida que sua concentração aumenta, a proporção de degradação do LXN também aumenta.

Figura 13. Cromatograma do produto de degradação por oxidação convencional mediada por H_2O_2 0,3% (v/v) por 24 horas para levofloxacin.

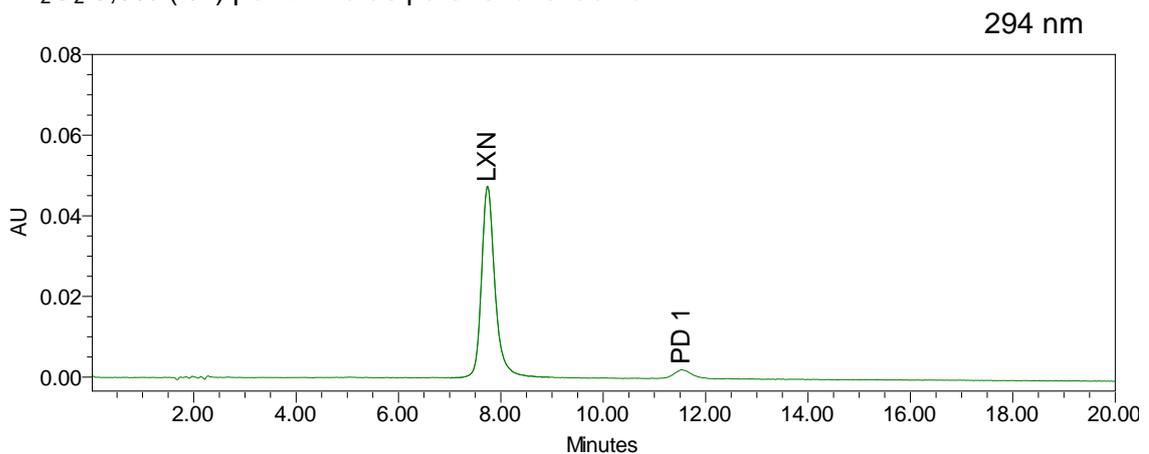
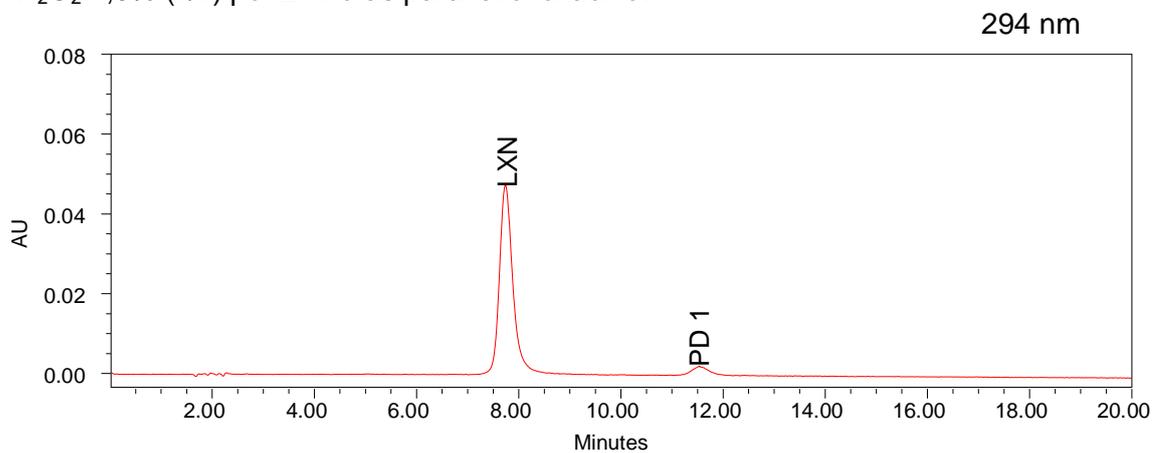


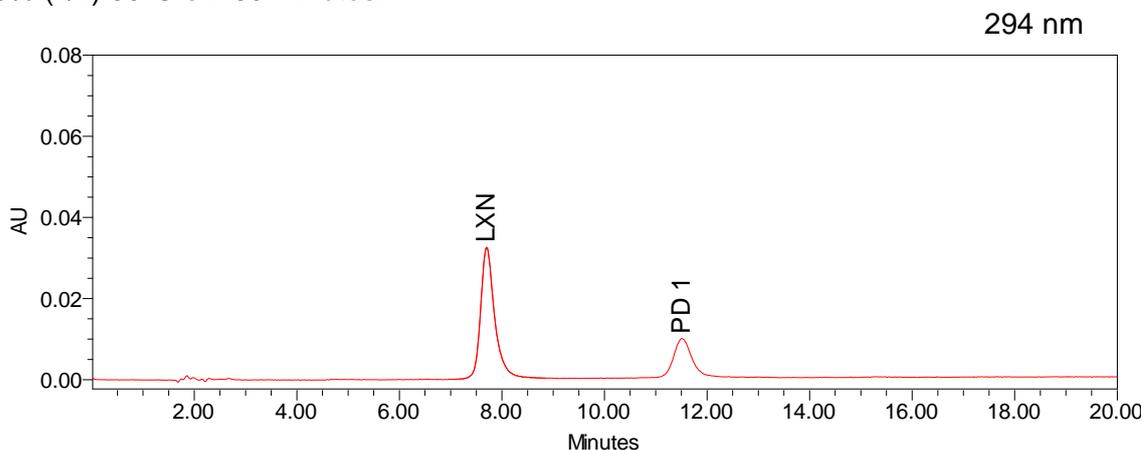
Figura 14. Cromatograma do produto de degradação por oxidação convencional mediada por H_2O_2 1,0% (v/v) por 24 horas para levofloxacin.



Tendo observado formação de PD por agente oxidativo, propôs-se acelerar a degradação do LXN com a menor concentração de peróxido de hidrogênio (0,3%, v/v) associado ao aquecimento em estufa a uma temperatura de $60^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$, pelo prazo de 60 minutos, o que proporcionou uma queda na concentração inicial de LXN

de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $14,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (calculado conforme curva de calibração, item 5.1), que corresponde a diminuição de 26,87% da área do pico do ativo (Figura 15).

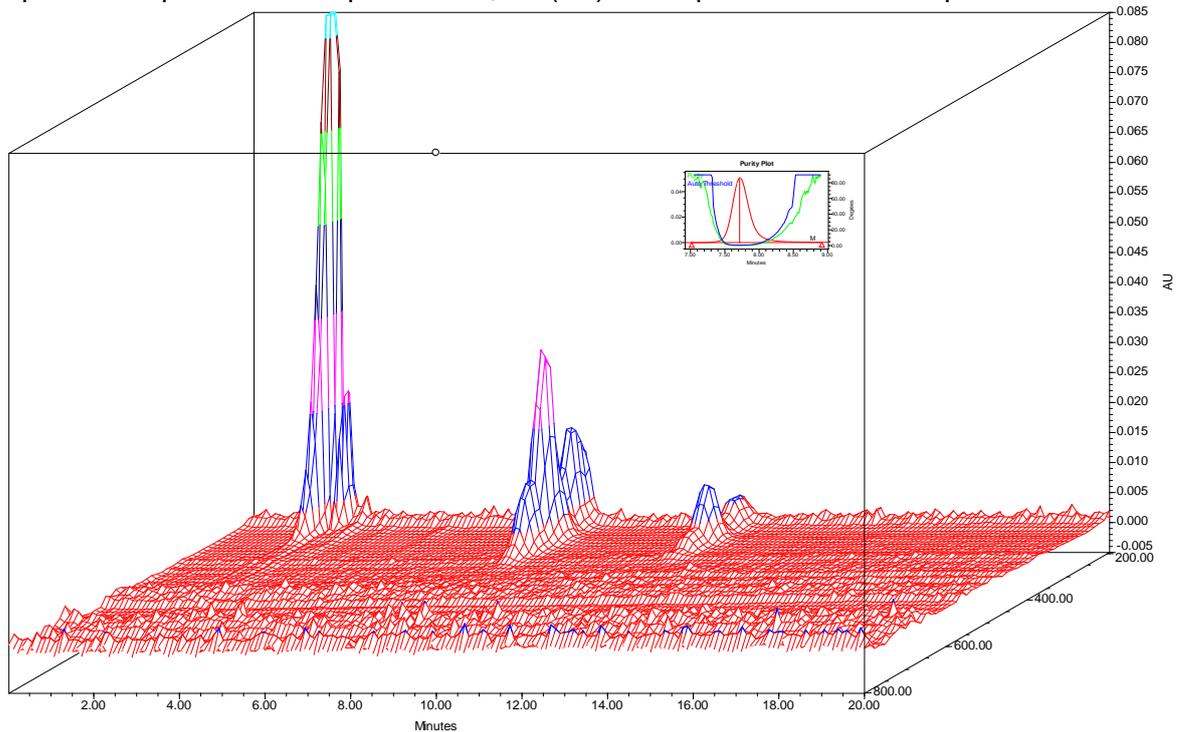
Figura 15. Cromatograma do produto de degradação por oxidação convencional por H_2O_2 0,3% (v/v) 60°C em 60 minutos.



Zheng e colaboradores (2014) comprovaram a capacidade do LXN sofrer degradação frente ao peróxido de hidrogênio pois em estudo de estresse submetido a H_2O_2 15% (v/v) observou-se formação de um produto de degradação oxidativo (composto 3, conforme citado na Tabela 3). Em estudo de degradação forçada realizado por Devi e Chandrasekhar (2009), a condição oxidativa por H_2O_2 0,01% (à temperatura ambiente) gerou um decaimento na concentração de LXN de 100% para 87,3% ao longo de 12 horas de experimento. Assim como para o experimento de Zheng e colaboradores (2014), com formação do degradante oxidativo de estrutura elucidada, o presente estudo de degradação forçada gera apenas um produto de degradação a partir da oxidação por peróxido. Desta forma, pode-se sugerir que possivelmente sejam o mesmo composto.

A Figura 16 mostra que apesar do surgimento de um pico de degradação aproximadamente em 12 minutos, o pico referente ao LXN é puro, visto que após análise do mesmo no software *Empower 2*, observou-se que o valor de TH é superior ao de PA (conforme item 5.1).

Figura 16. Cromatograma de varredura dos espectros do produto de degradação e cálculo de pureza de pico oxidativo por H₂O₂ 0,3% (v/v) sob aquecimento a 60°C por 60 minutos.



Diante do exposto observou-se que dadas as concentrações de agentes estressantes e condições experimentais usadas, apenas para a condição oxidativa o LXN se mostrou passível de sofrer degradação, de modo que a oxidação por peróxido de hidrogênio foi acelerada pela ação da temperatura, reduzindo consideravelmente o tempo gasto no experimento. Para as demais condições estressantes não foram observadas variações significativas na área do pico de levofloxacinol (calculada com base em curva de calibração, item 5.1) ou formação de picos secundários que derivariam de possíveis produtos de degradação.

5.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA NORFLOXACINO

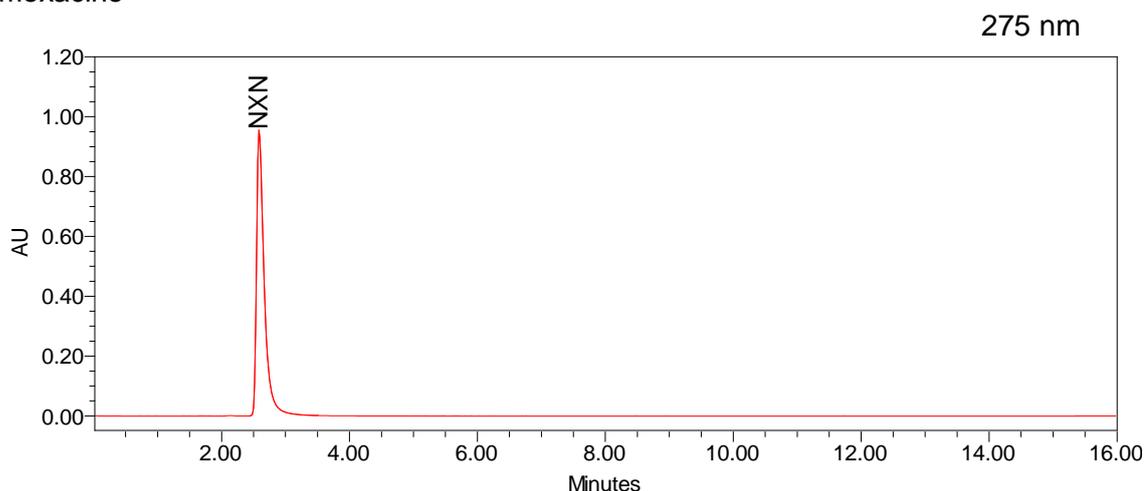
O método analítico usado no doseamento do NXN mostrou-se específico ao fármaco, já que foi capaz de detectar seletivamente os sinais correspondentes ao NXN frente ao surgimento de novos picos oriundos de possíveis produtos de degradação que foram formados sob algumas condições estressantes. Mesmo em

condições de estresse, os picos referentes ao fármaco continuaram se apresentando espectralmente puros conforme avaliação feita no item 5.1.

5.3.1 Temperatura

Amostras de NXN submetidas a aquecimento ($60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) em estufa por 24 horas não apresentaram decaimento significativo na área do pico de norfloxacino, tão pouco degradação aparente pelo não surgimento de picos oriundos de possíveis produtos de degradação (Figura 17). A exposição a essas condições de temperatura, o NXN demonstrou-se estável.

Figura 17. Cromatograma do produto de degradação para a condição termolítica para norfloxacino



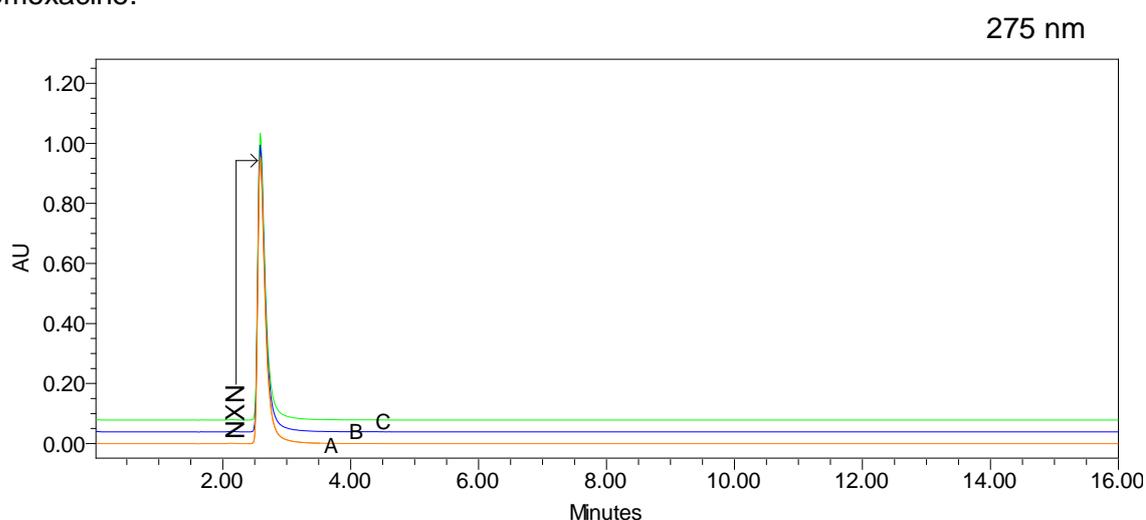
Em estudo realizado por Chierentin e Salgado (2013), uma solução estoque neutra de norfloxacino $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, proveniente de produto acabado (comprimido), foi submetida à temperatura de 80°C . Os autores não observaram a formação de produtos de degradação.

5.3.2 Hidrólise ácida

Amostras de NXN, inicialmente submetidas a hidrólise ácida por 24 horas com $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ não apresentaram decaimento na área do pico relativo ao norfloxacino, além da não formação de picos oriundos de possíveis

produtos de degradação. Na tentativa de proporcionar degradação do NXN sob tais condições por hidrólise ácida, a amostra ácida em HCl 0,1 mol L⁻¹ foi levada a aquecimento em temperatura de 60°C ± 5°C em estufa, por 24 horas. Ainda assim não se evidenciou decaimento no pico referente ao ativo, tão pouco formação de picos secundários, oriundos de possíveis produtos de degradação (Figura 18).

Figura 18. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise ácida por HCl 0,1 mol L⁻¹ (A), HCl 1,0 mol L⁻¹ (B) e HCl 0,1 mol L⁻¹ com aquecimento a 60°C (C) para norfloxacino.



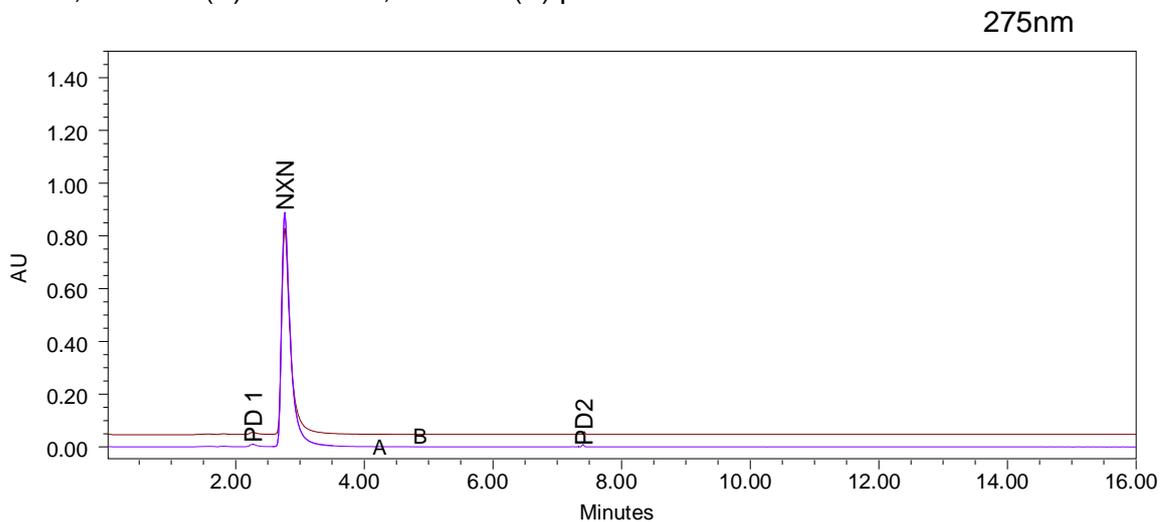
De acordo com Mohamed, El-Koussi e Mohamed (2005), o fármaco norfloxacino quando submetido a condições mais extremas de HCl 2,0 mol L⁻¹ em aquecimento por refluxo a 150°C, possibilita redução na concentração do fármaco para 63% em apenas quatro horas (resultado calculado por determinação espectrofotométrica) além da formação de degradante por descarboxilação a medida que o NXN vai sofrendo degradação (composto 6, ilustrado na Tabela 3). Com isso, pode-se deduzir que são necessárias condições estressante extremas para induzir degradação do fármaco e possivelmente induzir formação do produto de degradação descarboxilado.

5.3.3 Hidrólise alcalina

Na amostra de NXN exposta à degradação por hidrólise alcalina usando NaOH 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 1 mol L⁻¹ por 24 horas observou-se a redução da área do

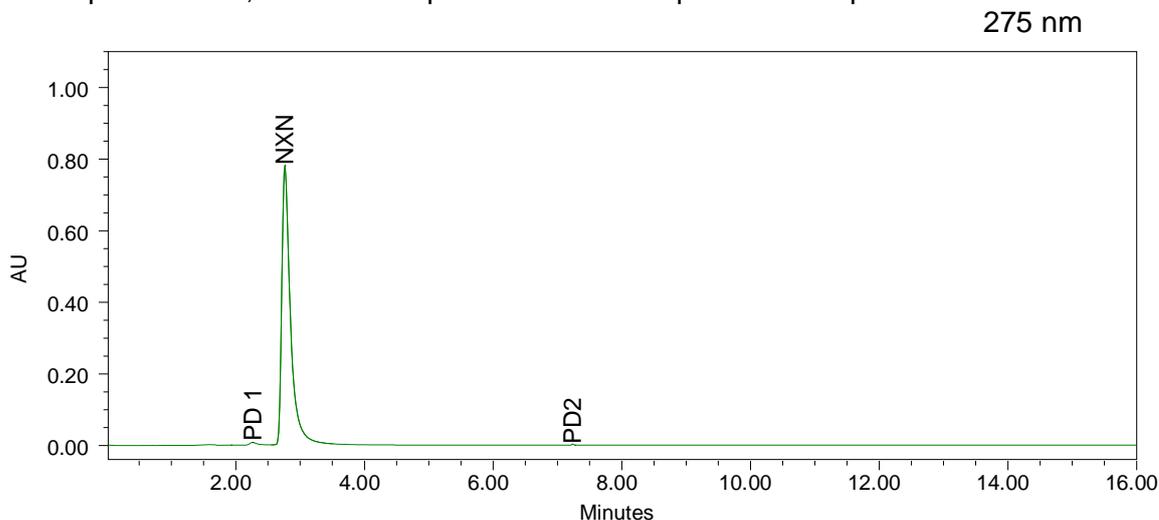
pico referente ao ativo em 6,68%, que implica em redução da concentração do ativo de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $186,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que, para a concentração maior de NaOH como estressante, a queda de área correspondeu a 9,72%, que corresponderia a uma quantidade final de $180,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, confirma-se que a degradação do NXN aumenta à medida que a concentração dos reagentes também se eleva. Além disso, para ambas as condições testadas, observou-se a formação de dois picos desconhecidos, que provavelmente são oriundos de possíveis produtos de degradação (Figura 19).

Figura 19. Cromatograma do produto de degradação da condição hidrólise alcalina por NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (B) para norfloxacino.



Para tentar reduzir o tempo de degradação, uma amostra de norfloxacino em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ que foi submetida a aquecimento por 24 horas em estufa, a uma temperatura de $60^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ obteve como resultado uma diminuição na área do pico de NXN de 11,72% em apenas 3 horas de experimento (Figura 20). Logo, uma concentração final de $174,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ leva à formação de dois possíveis picos de degradação, sendo um menos retido que o NXN e outro mais retido que o fármaco, tal como já ocorrido na mesma condição, sem a presença de aquecimento.

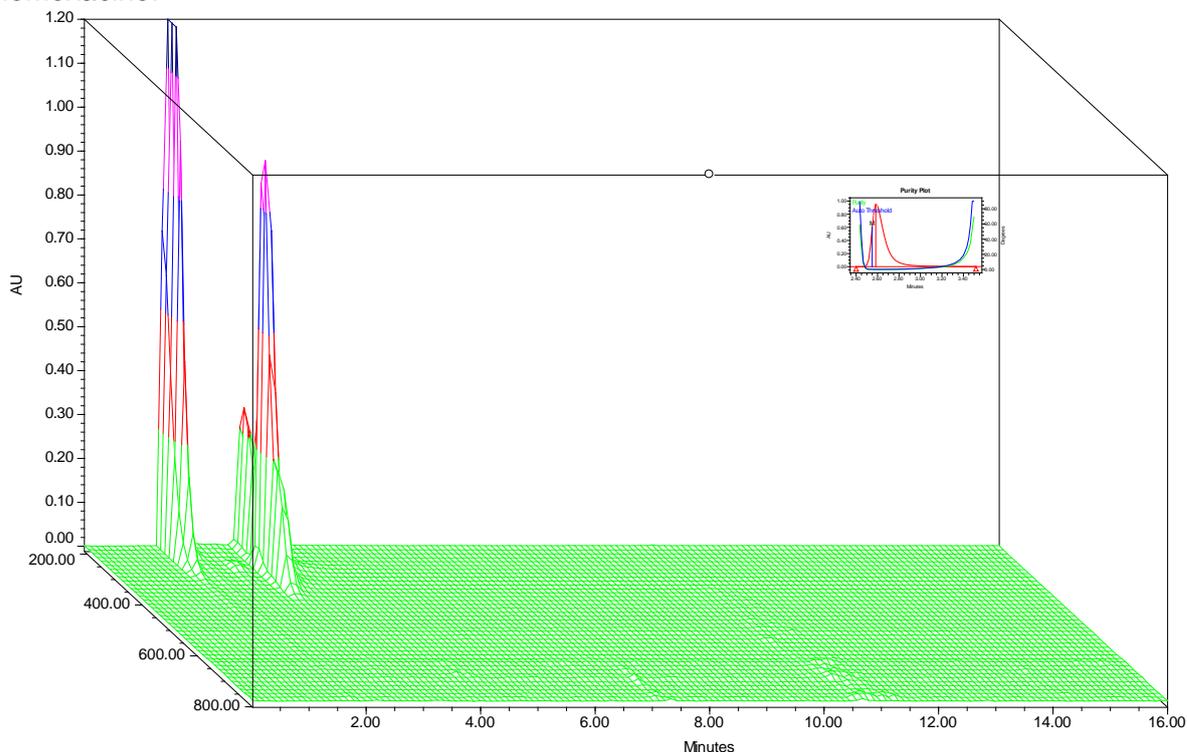
Figura 20. Cromatograma do produto de degradação para a condição hidrólise alcalina mediada por NaOH 0,1 mol L⁻¹ e aquecimento a 60°C por 24 horas para norfloxacin.



De acordo com estudo de especificidade inserido em validação de metodologia analítica de norfloxacin realizada por Chierentin e Salgado (2013), o NXN também se apresentou bastante suscetível a degradação alcalina por NaOH, mais precisamente na concentração 0,1 mol L⁻¹ em exposição a 80°C por 96 horas, tendo banho de água como fonte de aquecimento. Não se observou, na literatura, elucidação do produto de degradação formado especificamente por NaOH, entretanto, partindo-se do princípio de que a reação hidrolítica alcalina ataca o grupamento farmacofórico com a função ácido carboxílico, assim como na hidrólise ácida, um potencial produto de degradação formado poderia ser o mesmo da condição ácida (composto 5 da Tabela 1).

A Figura 21 mostra que apesar do surgimento de dois possíveis picos de produtos de degradação, o pico referente ao NXN é espectralmente puro, visto que o valor de TH é superior ao de PA, conforme pode ser calculado no item 5.1 pelo *Software Empower 2*.

Figura 21. Cromatograma de varredura dos espectros do produto de degradação e cálculo de pureza de pico por hidrólise alcalina em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e aquecimento para norfloxacino.



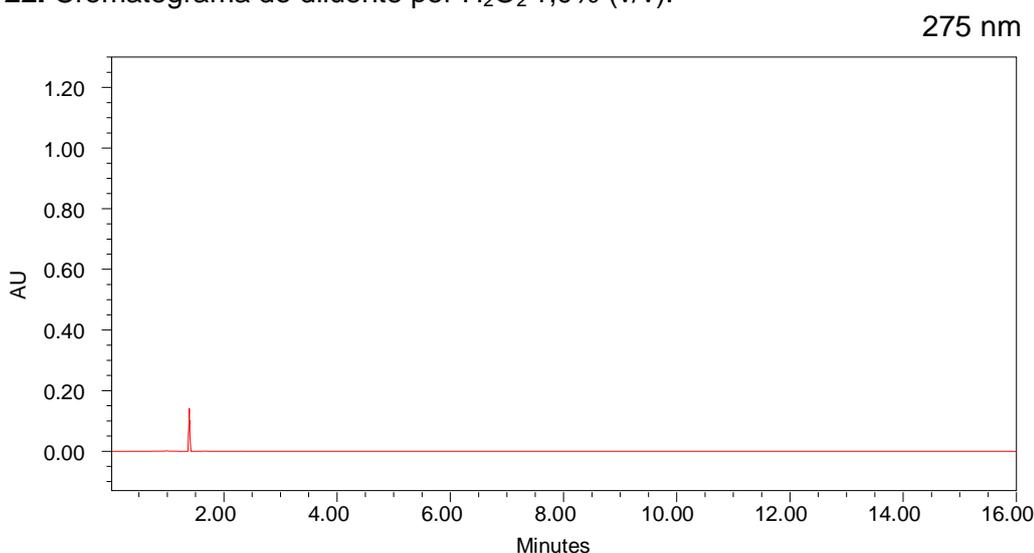
5.3.4. Oxidação

Em exposição a condição oxidativa por peróxido de hidrogênio na concentração 1% (v/v) por 24 horas, observou-se redução pouco significativa da área do ativo na ordem de apenas 0,91% (calculada com base na curva de calibração, item 5.1), embora tenham aparecido dois pequenos sinais aproximadamente em 2 e 7 minutos (semelhantes aos presentes na condição hidrolítica alcalina). Para enfatizar a condição oxidativa, o NXN submetido ao agente estressante peróxido de hidrogênio 3,0% (v/v) pelo mesmo período de 24 horas, apresentou formação de picos de possíveis produtos de degradação nos mesmos tempos encontrados na concentração inicial de peróxido (1,0 %), além do decaimento de 1,87% da área referente ao pico de NXN.

Observou-se, ainda, em ambas as condições o aparecimento de um pico em 1,2 minutos, que praticamente descarta a eluição de qualquer composto oriundo do NXN, pois a eluição se dá no tempo morto da coluna cromatográfica. Entretanto,

deve-se considerar que esse sinal também está presente na corrida cromatográfica da FMN misturada a condição oxidativa (1:1, v/v) sem adição de NXN (branco do NXN), o que sugere que o sinal em questão é oriundo do próprio diluente e não do fármaco. O NXN possui seu máximo de absorção em 275 nm, possibilitando a detecção desse pico. Já em leituras feitas com maiores comprimentos de onda (como o LXN em 294 nm) não detecta-se a presença desse pico (Figura 22).

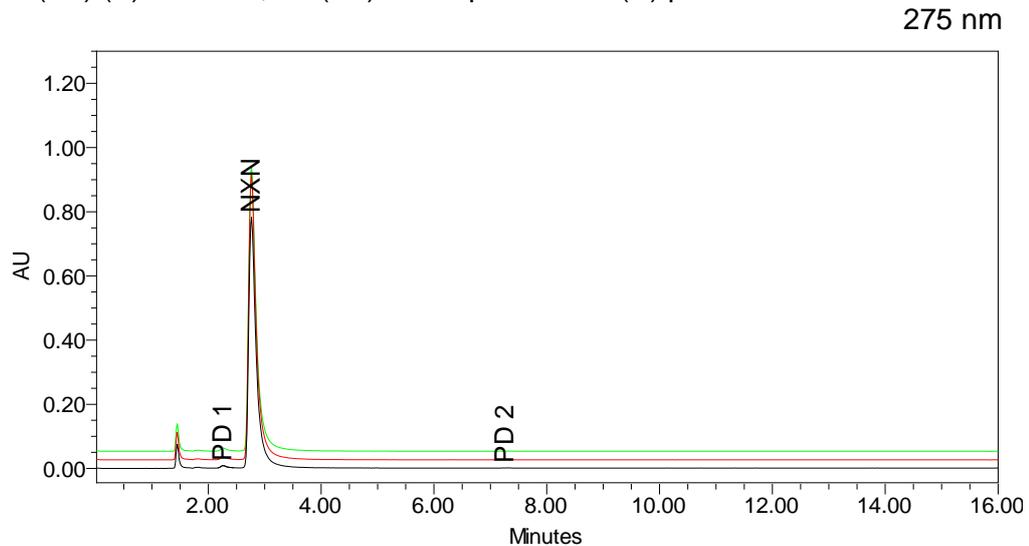
Figura 22. Cromatograma do diluente por H₂O₂ 1,0% (v/v).



Sob o intuito de acelerar a degradação da solução de NXN em condição oxidativa, a amostra submetida a peróxido de hidrogênio 1% (v/v) foi levada a aquecimento em estufa a uma temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, por 6 horas. O resultado foi uma queda na área do pico de NXN de apenas 1,09%, embora com aparecimento de dois pequenos sinais em 1,8 minutos e 7,2 minutos, o que podem corresponder a picos já observados anteriormente e que possivelmente são oriundos de possíveis produtos de degradação.

A Figura 23 mostra os cromatogramas obtidos por meio de análise de NXN em todas as situações de estresse em condição oxidativa por peróxido de hidrogênio.

Figura 23. Cromatogramas dos produtos de degradação oxidativos por H₂O₂ 1,0% (v/v) (A), H₂O₂ 3,0% (v/v) (B) e H₂O₂ 1,0% (v/v) em aquecimento (C) para norfloxacin.



Chierentin e Salgado (2013), também realizaram estudo de estresse oxidativo com a concentração de H₂O₂ 3% (v/v), entretanto com associação de aquecimento a 80°C pelo período de 96 horas, restando uma concentração final de 46,1%, em relação a concentração inicial do fármaco, ainda não degradado.

5.4 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO FORÇADA ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS (DAM)

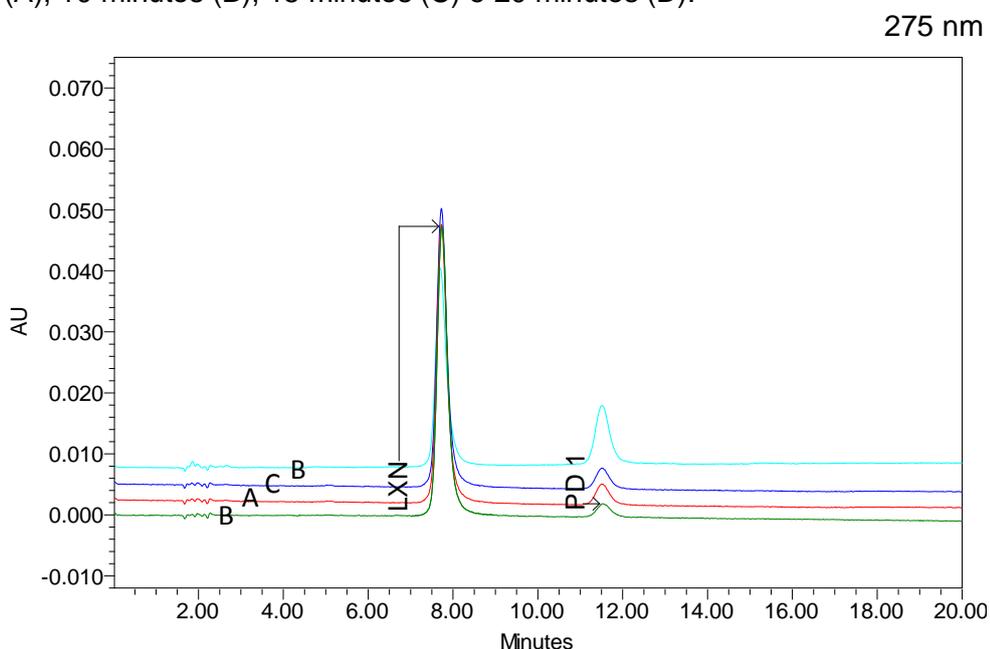
5.4.1 Degradação forçada assistida por irradiação micro-ondas do levofloxacin

Todas as condições de estresse usadas para LXN (item 4.5.1) foram realizadas concomitantemente por irradiação micro-ondas em tubo de vidro vedado, conforme parâmetros descritos na Tabela 6, de modo que para condições hidrolíticas ácida e alcalina e condição inicial sem agente estressante não observou-se degradação (Tabela 8).

Após expor o LXN com o agente estressante oxidativo na menor concentração usada nos testes de estresse convencional (H₂O₂ 0,3% (v/v)) e submetê-lo a irradiação micro-ondas a 300 W, pressão de até 100 psi e 100°C por até 20 minutos com leituras cromatográficas do experimento a cada 5 minutos de exposição as condições descritas anteriormente. Observou-se que nas condições de

DAM definidas o fármaco teve redução na área de seu pico cromatográfico de 9,05% em 5 minutos de exposição, 14,66% em 10 minutos de exposição, 20,39% em 15 minutos de exposição e 27,22% no tempo final aos 20 minutos, portanto redução na concentração de LXN de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $14,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (calculado com base em curva de calibração, conforme citado no item 5.1). Observou-se, ainda, a formação de um pico em aproximadamente 12 minutos, possivelmente oriundo da degradação do próprio levofloxacino (Figura 24).

Figura 24. Cromatograma do produto de degradação por oxidação de levofloxacino submetida a aquecimento por irradiação de micro-ondas (cromatograma do experimento a 5 minutos (A), 10 minutos (B), 15 minutos (C) e 20 minutos (D)).



No intuito de otimizar ainda mais o teste de degradação, alterou-se apenas a temperatura para 120°C , que reduziu o tempo reacional para 5 minutos que proporcionou degradação semelhante a anterior. Observou-se uma redução da área inicial do LXN de 24,88%, ou seja, uma concentração final de $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultado semelhante ao que pode ser observado em condições usuais, embora o tempo de reação tenha sido acentuadamente menor.

Além da equivalência no percentual de degradação (calculado conforme item 5.1), o perfil cromatográfico (quantidade de picos e tempo de retenção) das impurezas em DAM não se mostrou diferente do que foi visualizado em condições

convencionais de testes de estresse (Tabela 8). Diante disso, sugere-se que a condução de estudos de degradação forçada por micro-ondas não interfere na via de degradação da molécula, uma vez que o perfil cromatográfico permanece, embora condição e tempo de experimentos diminuam consideravelmente.

Tabela 8. Resultados de testes de estresse para levofloxacino

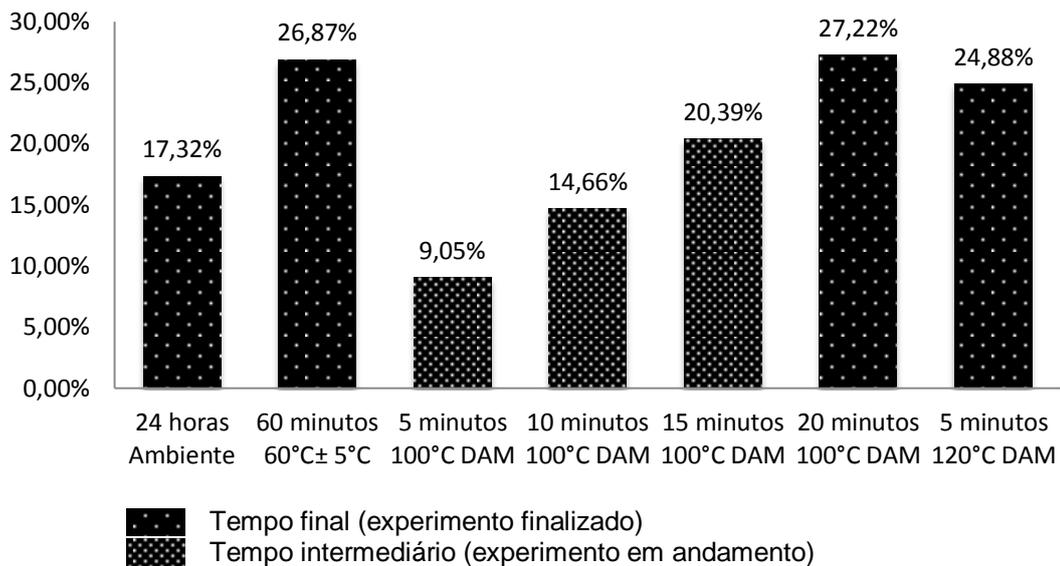
	Condição	Tempo	Temperatura	% Degradação	CV%
Estresse usual	Temperatura	24 horas	60°C± 5°C	-	0,19
	HCl 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	-	0,20
	HCl 1,0 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	-	0,42
	HCl 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	60°C± 5°C	-	0,51
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	-	0,04
	NaOH 1,0 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	-	0,04
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	60°C± 5°C	-	0,38
	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	24 horas	Ambiente	17,32%	1,31
	H ₂ O ₂ 0,3% (v/v)	24 horas	Ambiente	24,68%	0,79
	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	60 minutos	60°C± 5°C	26,87%	0,88
DAM	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	5 minutos	100°C	9,05%	1,67
	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	10 minutos	100°C	14,66%	0,90
	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	15 minutos	100°C	20,39%	1,24
	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	20 minutos	100°C	27,22%	1,79
	H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	5 minutos	120°C	24,88%	0,71
	HCl 0,1 mol L ⁻¹	20 minutos	100°C	-	0,65
	Sem agente estressante	20 minutos	100°C	-	0,43
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	20 minutos	100°C	-	0,84

Ao submeter o levofloxacino às condições de DAM (Tabela 6) com a presença dos agentes estressantes NaOH 0,1 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹ ou sem adição dos mesmos, não foram observados o surgimento de picos oriundos de possíveis produtos de degradação e nem mesmo redução significativa das áreas referentes ao ativo.

Portanto, conforme condições pré-estabelecidas inicialmente na Tabela 6, o LXN é relativamente estável diante de indução de estresse, sob influência da irradiação micro-ondas, por aquecimento e hidrólise (ácida e alcalina), mas não por oxidação, como pode ser observado (Figura 24). Diante disso, observa-se que as

técnicas convencionais e por DAM para H₂O₂ apresentam resultados semelhantes, sem que haja comprometimento da técnica e alcançam uma considerável economia de tempo (Figura 25).

Figura 25. Comparativo das porcentagens de degradação oxidativa para levofloxacin.



Após os testes de estresse, observou-se que apenas a condição oxidativa por peróxido de hidrogênio foi capaz de reduzir a concentração de LXN e a condição oxidativa à temperatura ambiente por 24 horas apresentou o menor decaimento de teor ($p < 0,05$). Para as condições de estresse em peróxido de hidrogênio com aquecimento e em exposição a irradiação por micro-ondas ao longo de 20 minutos (tempo final) a 100 °C e 5 minutos a 120 °C os resultados se apresentaram bastante próximos (Tabela 9).

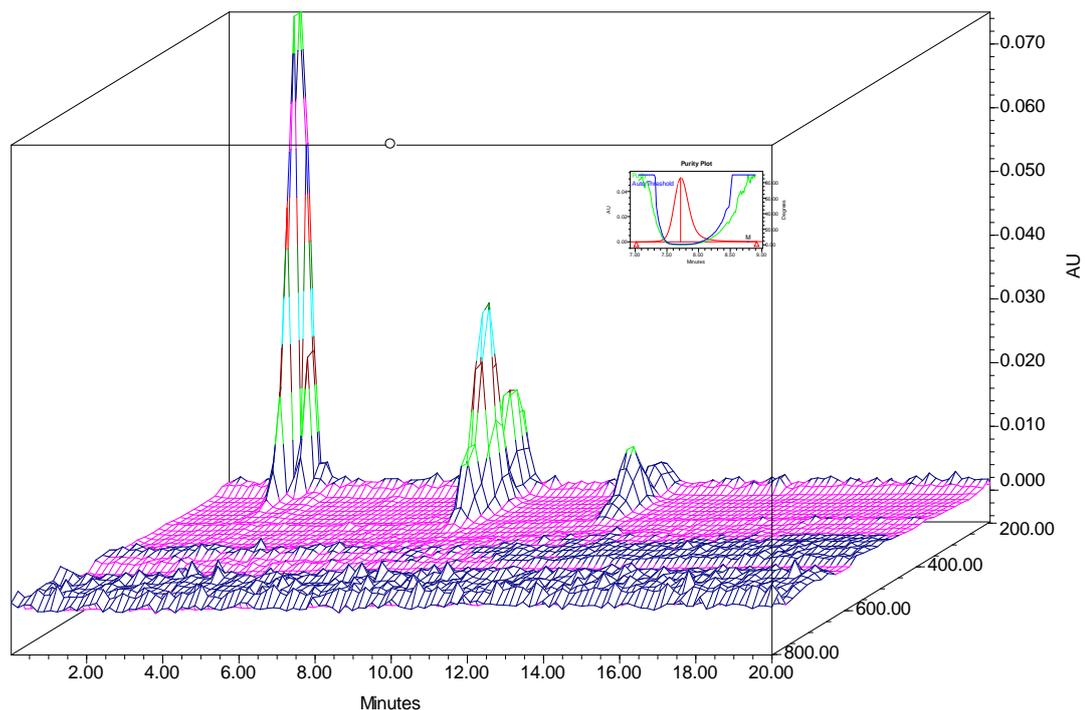
Tabela 9. Comparativo dos resultados dos testes de estresse para levofloxacin.

Condição de estresse	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Concentração final de LXN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%*
Convencional H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	720	Ambiente	16,5**	1,31
Convencional H ₂ O ₂ 0,1% (v/v)	60	60°C± 5°	14,6	0,88
DAM H ₂ O ₂ 0,1%(v/v)	20	100°	14,6	1,79
DAM H ₂ O ₂ 0,1%(v/v)	5	120°	15,0	0,71

* CV% das triplicatas realizadas para cada condição estressante; **Diferença estatisticamente significativa entre estresse convencional por H₂O₂ 0,1% (v/v) a temperatura ambiente e as demais condições de estresse oxidativo na concentração 0,1% ($p < 0,05$).

O fato de o LXN possuir vias de degradação já bem elucidadas, possibilitou realizar avaliação comparativa do comportamento do fármaco frente condições estressantes convencionais e por micro-ondas. Onde perfis cromatográficos como números de picos de PD e fármaco e pureza cromatográfica do mesmo podem ser observadas (Figura 26).

Figura 26. Cromatograma em em varredura dos espectros do produto de degradação referente a oxidação de levofloxacin submetida a aquecimento por irradiação micro-ondas em 20 minutos.



Conforme estudo comparativo realizado por Bojana, Markus e Kappe (2011), o uso de micro-ondas possibilitou alcançar resultados semelhantes aos de estresse convencional tais como, vias de degradação, percentual de degradação e produtos de degradação formados para o fármaco indometacina. Contudo as mesmas reações que antes levavam horas, puderam ser refeitas em poucos minutos graças ao uso de reator de micro-ondas com capacidade de controlar temperatura, pressão, agitação e possibilitando ainda, que as reações ocorressem em pequenos volumes. Da mesma forma, no presente trabalho, o uso de micro-ondas em estudos de estresse se mostrou bastante efetivo na economia de tempo e solventes.

Alguns estudos de estresse já passam a adotar diretamente a nova técnica por irradiação micro-ondas, conforme Bende e colaboradores (2007) e Sonawane e Gide (2011), feitos para mesilato de imatinib e rebamipida, respectivamente. Isso reforça a ideia de que a técnica de irradiação micro-ondas possui aplicação em estudos de estresse e pode ser estendida para várias classes de fármacos.

5.4.2 Degradação forçada assistida por irradiação micro-ondas do norfloxacino

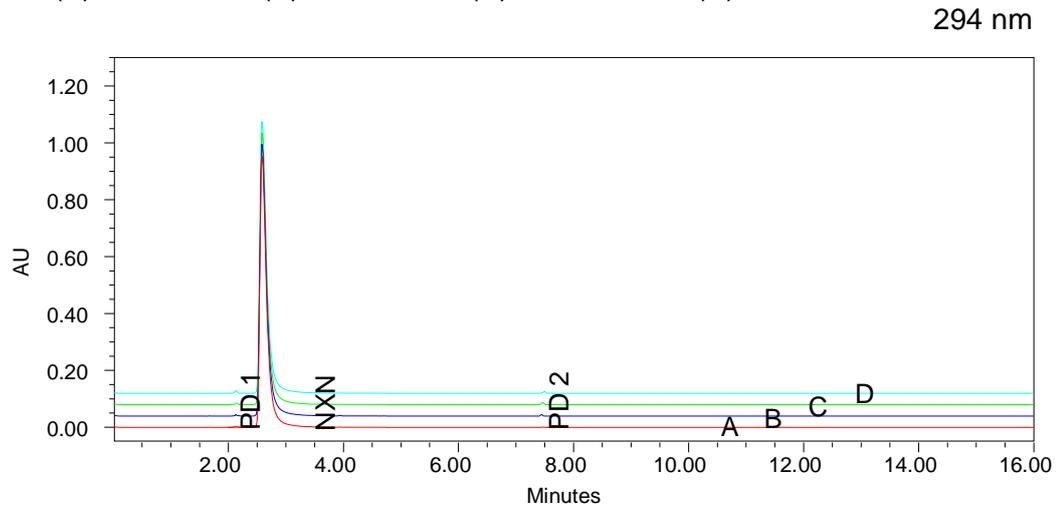
Ainda seguindo os parâmetros iniciais (Tabela 6), verificou-se que os resultados de exposição a DAM (irradiação micro-ondas a 300 W, pressão de até 100 psi e 100°C por até 20 minutos) se mostraram capazes de reproduzir resultados semelhantes aos observados em estresse forçado convencional. A exemplo disso, a solução ácida de NXN (HCl 0,1 mol L⁻¹) mesmo em exposição à irradiação micro-ondas continuou não apresentando nenhum indício de degradação ou quedas no teor do ativo, tal como já havia sido observado em exposição a HCl 0,1 mol L⁻¹ (ambiente e sob aquecimento em estufa) e HCl 1 mol L⁻¹. Situação semelhante também pode ser observada em exposição do NXN inicial (sem agente estressante) a DAM e, sua correlação com simples aquecimento da mesma solução em estufa, que também não foram efetivos na degradação de NXN.

A condição oxidativa (H₂O₂ 1,0% (v/v)) apresentou em 20 minutos de exposição a DAM uma perda de 1,12% da área correspondente ao pico de NXN. Trata-se de uma variação pouco significativa, e que sozinha não poderia ser indício de degradação caso não fosse a detecção cromatográfica de pequenos sinais em, aproximadamente, 2 e 7 minutos. Para a mesma condição oxidativa, mas induzida por aquecimento em estufa, também observou-se a presença de tais picos, cujos tempos de retenção coincidem com picos de PD obtidos por degradação convencional pelo emprego de agente estressante alcalino (Item 5.3.3).

A condição hidrolítica básica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) assistida por irradiação micro-ondas a 300 W, pressão de até 100 psi e 100°C por até 20 minutos forneceu a maior porcentagem de degradação para NXN, com 200,0 µg mL⁻¹ de concentração inicial, reduzindo 10,79% da área (concentração final de 178,4 µg mL⁻¹), quando submetido a 20 minutos de exposição a 100°C. Sendo que, nessas mesmas

condições, mas nos tempos experimentais intermediários de 5, 10 e 15 minutos, a área do pico de NXN foi reduzida em 1,49%, 3,02% e 6,97%, respectivamente (Figura 27). Se observou, ainda, a formação de dois picos possivelmente oriundos dessa degradação e que mantem-se nos mesmos tempos de retenção já observados.

Figura 27. Cromatograma do produto de degradação hidrolítico alcalino de norfloxacino submetida a aquecimento por irradiação de micro-ondas (cromatograma do experimento a 5 minutos (A), 10 minutos (B), 15 minutos (C) e 20 minutos (D)).



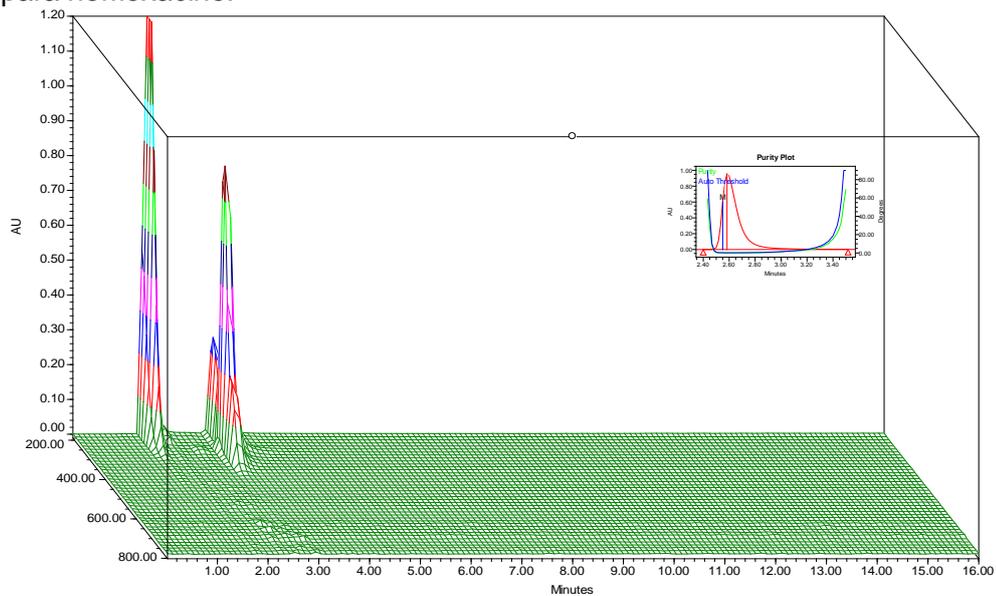
Quando se elevou a temperatura reacional para 120 °C por 5 minutos, obteve-se 10,21% de redução da concentração de NXN (concentração de 179,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), conforme disposto na Tabela 10. Mantiveram-se presentes os mesmos dois picos de possíveis produtos de degradação, já mencionados anteriormente e sem interferência no pico do fármaco (Figura 28), mostrando que pico cromatográfico de NXN é puro para a condição hidrolítica alcalina em micro-ondas.

Tabela 10. Resultados de testes de estresse para norfloxacino.

	Condição	Tempo	Temperatura	% Degradação	Coefficiente de variação (CV%)
Estresse usual	Temperatura	24 horas	60°C± 5°C	-	0,84
	HCl 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	-	0,44
	HCl 1,0 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	-	1,21
	HCl 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	60°C± 5°C	-	0,68
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	6,68%	0,60
	NaOH 1,0 mol L ⁻¹	24 horas	Ambiente	9,72%	0,73
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	60 minutos	60°C± 5°C	11,72%	0,39
	H ₂ O ₂ 1,0% (v/v)	24 horas	Ambiente	0,91%*	0,08
	H ₂ O ₂ 3,0% (v/v)	24 horas	Ambiente	0,87%*	0,08
	H ₂ O ₂ 1,0 (v/v)	24 horas	60°C± 5°C	1,09%	0,13
DAM	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	5 minutos	100°C	1,49%	0,50
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	10 minutos	100°C	3,02%	0,41
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	15 minutos	100°C	6,97%	0,31
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	20 minutos	100°C	10,79%	0,32
	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	5 minutos	120°C	10,21%	0,72
	H ₂ O ₂ 1,0% (v/v)	20 minutos	100°C	1,12%	0,25
	Sem agente estressante	20 minutos	100°C	-	0,26
	HCl 0,1 mol L ⁻¹	20 minutos	100°C	-	0,14

* Resultados de decaimento no teor inferiores a 1% apenas foram considerados em casos onde se observou aparecimento de picos secundários.

Figura 28. Cromatograma em em varredura dos espectros do produto de degradação alcalino (NaOH 0, 1 mol L⁻¹) submetido a aquecimento por irradiação micro-ondas em 20 minutos para norfloxacino.



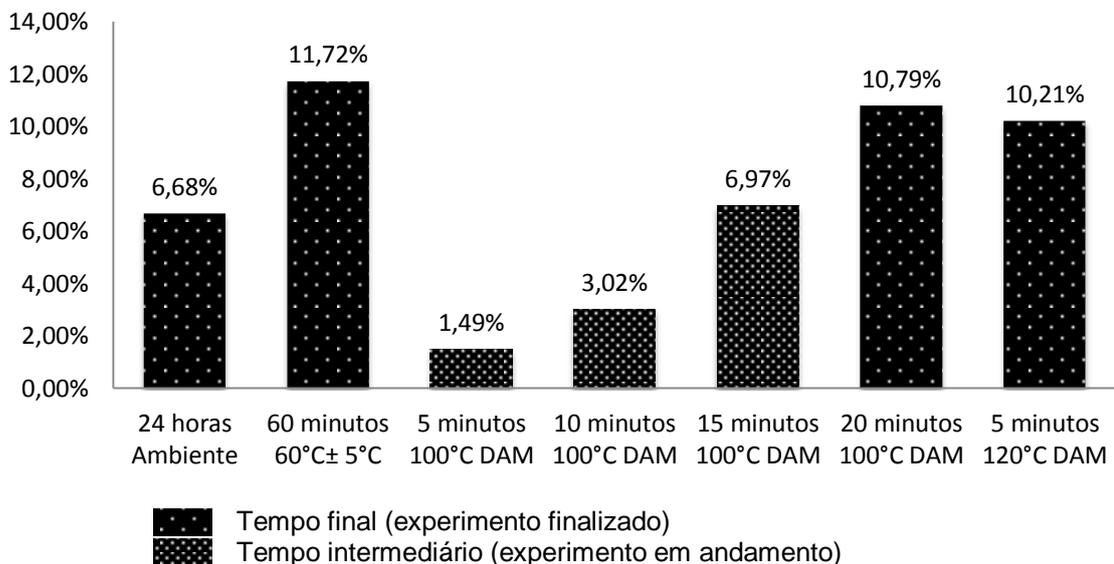
Assim, o NXN mostrou-se estável diante de várias condições de estresse e os resultados de irradiação micro-ondas mostram que o comportamento do fármaco é mantido em relação aos estudos convencionais com aumento na temperatura. Com relação ao teste de estresse convencional apenas por NaOH 0,1 mol L⁻¹ sem aquecimento observou-se o menor decaimento no teor ($p < 0.05$), com relação aos demais testes com NaOH 0,1 mol L⁻¹ (Tabela 11). Os resultados de degradação convencional e por micro-ondas podem ser observados na Figura 29.

Tabela 11. Comparativo dos resultados dos testes de estresse para norfloxacino

Condição de Estresse	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Concentração final de NXN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%*
Convencional NaOH 0,1 mol L ⁻¹	1440	Ambiente	186,6**	0,56
Convencional NaOH 0,1 mol L ⁻¹	60	60 ± 5	176,6	0,34
DAM NaOH 0,1 mol L ⁻¹	20	100	178,4	0,32
DAM NaOH 0,1 mol L ⁻¹	5	120	179,6	0,72

*CV% das triplicatas realizadas para cada condição estressante; **Diferença estatisticamente significativa observada entre estresse convencional por NaOH 0,1mol L⁻¹ à temperatura ambiente e as demais condições de estresse hidrolítico alcalino ($p < 0.05$).

Figura 29. Comparativo das porcentagens de degradação para norfloxacino.



Silva e colaboradores, 2013 avaliaram os perfis de degradação usual e assistida por micro-ondas do fármaco levamisol. Foram preparadas soluções de

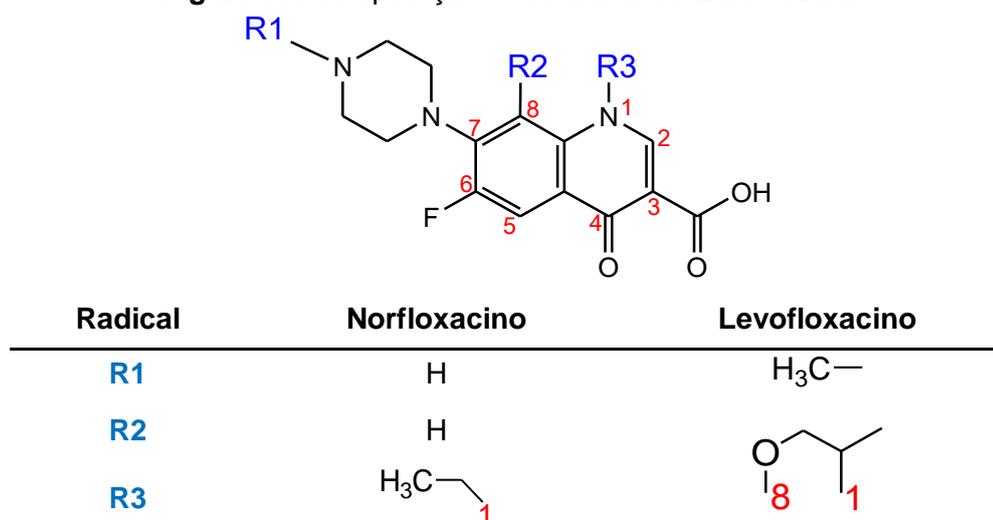
levamisol em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e submetidas à aquecimento de 100 °C em estufa e em reator de micro-ondas. Foi observada uma degradação percentual de aproximadamente 41% para ambos os métodos, contudo, houve uma redução de 2,5 vezes do tempo necessário para a determinação da degradação de levamisol por micro-ondas.

Esses resultados demonstram que a utilização da técnica de degradação forçada assistida por micro-ondas é realmente efetiva na redução de tempo e obtenção de resultados de degradação semelhantes aos observados em relação às técnicas de estresse convencionais.

5.5 DIFERENÇAS NOS PERFIS DE DEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS

As diferenças estruturais entre os dois fármacos (Figura 30) consistem na substituição do grupo 7-piperazina (R1) ligado a um átomo de hidrogênio para o NXN e, no caso do LXN o mesmo grupamento está ligado a uma metila. Além disso, na posição 8 do anel quinolínico enquanto o norfloxacino está ligado a um átomo de hidrogênio, o levofloxacino está ligado a um grupo metoxi que forma anel com o grupamento ligado ao átomo de nitrogênio-1.

Figura 30. Comparação estrutural entre LXN e NXN.



Tais particularidades estruturais além de influenciar espectro bacteriano de ação e farmacocinética dos fármacos, também podem estar envolvidas com o

comportamento dos compostos frente à reações químicas, como o pôde ser evidenciado nos estudos de PD do presente trabalho para os dois compostos.

Apesar de serem moléculas semelhantes, os fármacos apresentaram comportamentos diferentes quando submetidos às mesmas condições de estresse. Pode ser observado que vários experimentos convergem na capacidade de LXN e NXN sofrerem hidrólise e oxidação. Dadas as condições estressantes empregadas no presente experimento, o LXN obteve como via oxidativa como preferencial. Em experimento conduzido por Zheng e Devi (2014), assim como no presente experimento, o LXN formou apenas um PD que foi identificado como levofloxacino N-óxido (composto 3 da Tabela 1).

Para o NXN, Chierentin e Salgado (2013) conseguiram degradá-lo em longos experimentos hidrólise alcalina por meio de NaOH 1 mol L⁻¹ e oxidação por peróxido H₂O₂ 3% (v/v), mas sem elucidação estrutural dos degradantes. No presente experimento dadas as concentrações e agentes estressantes empregados, a via preferencial foi hidrolítica alcalina, embora Mohamed, El-Koussi e Mohamed (2005) tenham observado a formação de degradante (composto 6 da Tabela 1) por via hidrolítica ácida com emprego de HCl 2 mol L⁻¹ a 150°C.

Estudos mais aprofundados devem ser realizados para elucidação dos produtos de degradação formados e para avaliação da cinética de degradação em função da concentração; sem os quais não é possível fazer inferências corretas a cerca das diferenças encontradas. De qualquer forma, as divergências nas vias de degradação dos fármacos com mesma estrutura base não interfere na proposta de se realizar estudos de degradação forçada assistida por irradiação micro-ondas, visto que a mesma resposta foi obtida também nas condições usuais de estresse para os agentes estressantes escolhidos e nas concentrações testadas.

6. CONCLUSÃO

Os estudos de degradação forçada são de grande importância para a administração segura de medicamentos. A possibilidade de uma tecnologia limpa, barata e de fácil manuseio facilita sua condução, sendo apenas um primeiro passo para a busca de novas tecnologias.

O uso de irradiação micro-ondas proposto para os estudos de estresse foi viável, uma vez que o perfil cromatográfico foi bastante semelhante aos obtidos nos resultados de estresse convencional. Em nenhum momento uma mesma condição gerou diferentes picos de possíveis produtos de degradação, ou picos impuros para o insumo ativo quando transferido ao reator de micro-ondas. Confirmando segurança e reprodutibilidade a nova metodologia.

Há de se salientar, ainda, que para os testes de DAM, pequenas quantidades de amostras (2 mL) se mostraram suficientes para realização de tais testes, mostrando-se como um fator positivo, já que proporciona economia de materiais, reagentes e, conseqüentemente, emissão de resíduos.

Os estudos de DAM para LXN e NXN foram ajustados não para gerar uma grande degradação dos fármacos envolvidos, mas sim um estresse seguro entre 10% e 30%. Quantidades acima desse limiar poderiam representar geração de compostos secundários, que não é a proposta do presente trabalho, pois insumos farmacêuticos não encontram no ambiente situações tão severas. O objetivo dos estudos de degradação forçada é prever os possíveis vias de degradação e PD que uma especialidade farmacêutica pode formar ao longo de seu prazo de validade.

Tanto para LXN, quanto para NXN, as condições usadas foram semelhantes e se mostraram suficientes para gerar degradação pretendida para ambos os fármacos, mesmo tratando-se de fármacos diferentes. As variáveis do equipamento (potência, temperatura, pressão e tempo), oferecem uma gama de possibilidades que devem variar conforme a cinética de degradação de cada fármaco. Dessa forma, pode-se gerar bibliotecas de estudos de estresse, facilitando sua realização em estudos futuros.

Por fim, a característica dos estudos de degradação forçada assistida por micro-ondas, que mais se destaca a tecnologia é a redução na duração no tempo

dos ensaios de estresse, que antes levariam de horas a dias e podem ser reduzidos a poucos minutos, como foi observado para LXN e NXN.

REFERÊNCIAS

AHUJA, S. S.; Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 3-11, 2007.

ALLEN, J. L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C.; **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 8. ed. Artmed, 2007

ALSANTE, K. M., et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29–37, 2007.

ASEAN, Guideline on stability study of drug product. Philippines, 2012.

ATKINS, P. W. Físico-Química. V. 1, ed. 6, **L. T. C. Editora S.A.**, 1999.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M; REED, R. A.; Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, **Taylor and Francis Group**, New York, 2005.

BARBOZA, A. C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M. B. et . Aquecimento em forno de microondas, desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 901-904, 2001.

BENDE, G., et al. Development and Validation of an Stability Indicating RP-LC Method for Determination of Imatinib Mesylate. **CHROMATOGRAPHIA**, v. 66, p. 859-866, 2007.

BERGAN, T. Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. **Andriole VT (ed) The quinolones**. p. 119-154, 1988.

BOECKEL, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data, **The Lancet Infectious Diseases**, v.14, n. 8, p. 742 - 750, 2014.

BOJANA, P.; MARKUS, D.; KAPPE C. O.; Microwave-assisted forced degradation using high-throughput microtiter platforms. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v. 56, p 56:867-873, 2011.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fundação Oswaldo Cruz**, ed. 5, Brasília, 2010.

BRASIL, Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005.

BRASIL. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 15 jul. 2008.

Brasil. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003.

BRASIL. Informe técnico sobre a RDC nº20/2011 de 05 de maio de 2011 - Orientações de procedimentos relativos ao controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, Brasília, 17 de junho de 2011.

BRASIL. Instrução normativa nº 1, de 14 de janeiro de 2013. Cronograma e procedimentos para credenciamento de farmácias e drogarias privadas referentes à escrituração dos medicamentos e substâncias contendo antimicrobianos no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 16 jan 2013.

CALVO, J.; MARTINEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27(1), p. 44-52, 2009.

CARVALHO, J. P. et al. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. **Revista Fármacos e Medicamentos**, v. 34 (6), p. 22-27, 2005.

CEM Corporation, Disponível em: <http://cem.com/page130.html>. Acessado em 25 maio 2014.

CHIERENTIN, L.; NUNES SALGADO, H. R. Development and validation of a simple, rapid and stability-indicating high performance liquid chromatography method for quantification of norfloxacin in a pharmaceutical product. **Journal of Chromatography Separation Techniques**, v. 4 (2), p. 1-5, 2013.

DEVI, M. L.; CHANDRASEKHARB, K. B. A validated stability-indicating RP-HPLC method for levofloxacin in the presence of degradation products, its process related impurities and identification of oxidative degradant. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50 (5), p. 710-717, 2009.

DHAKITE, P. A; KADAM, N. S. Microwave Synthesis - A Potential Tool for Green Chemistry, **Online International Interdisciplinary Research Journal**, v. 4, p. 208-214, 2014.

EITENMILLER, R. R.; LANDEN Jr, W. O. Vitamin analysis for the health and food sciences: **CRC Press**, 1999.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia. **Edusp**, 3. ed. São Paulo, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. United States, 1996.

FRENCH, G. L.; Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57 (10), p. 1514-1527, 2005.

GEDYE, R.N.; WEI, J. B. **Canadian Journal of Chemistry**, ed.76(5), p. 525-532, 1998.

GOODMAN, L. S., GILMAN'S, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th Edition, **Mc Graw Hill**, 2006.

HAYASHI, N.; NAKATA, Y.; YAZAKI, A. New Findings on the Structure-Phototoxicity Relationship and Photostability of Fluoroquinolones with Various Substituents at Position 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 799–803, 2004.

International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1); Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland (1994/1996)

International Conference on Harmonization (ICH), Q6A; Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A, October, 1999.

International Conference on Harmonization (ICH), Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference harmonization, IFPMA, Geneva, Switzerland, 1993.

International Conference on Harmonization (ICH), Q1A(R2); Stability Testing of New Drug Substances and Products, Geneva, Switzerland, 2003.

International Conference on Harmonization (ICH), Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Geneva, Switzerland, 1996.

International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for Industry Q3B (R2): Impurities in new drug products. IFPMA, Geneva, Switzerland, 2003b.

International Conference on Harmonization (ICH), Q3A(R2), Impurities in New Drug Substances and Products (Step 4), Geneva, Switzerland, 2006.

JUNWAL, M., et al. ICH guidance in practice: Degradation behaviour of oseltamivir phosphate under stress conditions, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 48–60, 2012.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S.; Practical Microwave Synthesis for organic chemists, **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, 2009.

KLICK, S. et al. Toward a generic approach stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Tecnology**, v. 29(2), p. 48-66, 2005.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. **Fundação Calouste Gulbenkian**, v. 2, 2001.

LINDSTROM, P.; Tierney J.; Watney B.; et al. Microwave assisted organic synthesis - a review, **Tetrahadron**, v. 57, p. 9225-9283, 2001.

LOPES, H. V. Antibióticos e antibioticoterapia. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R.(Org.) **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 31- 46.

MOHAMED, A. I.; EL-KOUSSI, N. A.; MOHAMED, N. A. Chemometrics assisted spectrophotometric method for simultaneous determination of certain fluoroquinolones and their decarboxylated degradants. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University)**, v. 28(2) , p. 191-198, 2005.

MORIWAKI, C. et al. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Scientiarum**. v. 23(3), p. 651-654, 2001.

RAJULU, G. G. et al. New azetidine-3-carbonyl-N-methyl-Hydrazino derivatives of fluoroquinolones: synthesis and evaluation of antibacterial and anticancer proprieties. **Medicinal Chemistry Research**. V. 23(6), p. 2856-2868, 2014.

RAO, N. R. et al. Pharmaceutical Impurities: An Overview, **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. v.44(3), p. 301-310, 2010.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V.; Separation and determination of synthetic impurities of difloxacin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36(4), p. 729-735, 2004

REPUBLIC OF KENYA, Registration of Drugs: Guidelines to Submission of Applications, Kenya, 2010.

REYNOLDS, D. W. et al. Avaliable Guidance and Best Pratices for Conducting Forced Degradation Studies, **Pharmaceutical Tecnology**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

SANGHI, R. Microwave Irradiation, **Ressonance**, v. 5, n. 3, p. 77-81, 2000.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, **Journal of Chromatography**, ed. 987(1-2), p. 57-66, 2003.

SILVA, F. E. B. et al. Innovative use of microwave radiation in forced degradation of azol pharmaceutical. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94(3). p. 265-272, 2013.

SINGH, S.; BAKSHI, M.; Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, v. 24, p. 1-14, 2000.

SINGH, S.; BAKSHI, M.; Development of validated stability- indicating assay methods- critical review, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v. 28, p. 1011-1040, 2002,

SINGH, S. et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical chemistry**, v. 49, p. 71-88, 2013.

SMITH, R. J.; WEBB, M. L. Analysis of drug impurities. **John Wiley & Sons**, 2008

SONAWANE, S.; GIDE, P. Optimization of forced degradation using experimental design and development of a stability-indicating liquid chromatographic assay method for rebamipide in bulk and tablet dosage form, **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, p. 85-96, 2011.

SONAWANE, S.; GIDE, P., Study on approaches to expedite and simplify forced degradation for eplerone, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, n. 36(15), p. 2156–2165, 2013.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004.

TLC PharmaChem Inc, Disponível em: <http://www.tlcpharmachem.com>. Acessado em: 09 dez 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. I. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 34: The National Formulary: NF-29: Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 35: NF 30: The United States Pharmacopeial Convention, Validation of Compendia Procedures, 2012.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (Draft Guidance), Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1998.

WATERS CORPORATION. Empower PDA Software: Getting Started Guide. Revisão A, Estados Unidos, 2002.

WATKINS, K.W.; CHEN, S. T.; CHIOU, T. H.; WANG, K. T. Heating in microwave ovens. **Journal of Chemical Education**. ed. 60, p. 1043, 1983.

WHO, Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products, **WHO Technical Report Series**, n. 953, 2009.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C.; The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro, **Agents Chemother**, v. 28, p. 581-586, 1985.

ZHAO, et al. DNA Topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, n. 25, p. 13991-13996, 1997.

ZHENG, Y. J. et al. An integrated approach for detection and characterization of the trace impurities in levofloxacin using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 28, p. 1164-1174, 2014.