

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 23/01/2020.

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo químico-farmacêutico e avaliação da
estabilidade de associações de oxitetraciclina e
anti-inflamatórios não esteroidais em
medicamentos veterinários**

RÚBIA ADRIELI SVERSUT

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Hérica Regina Nunes Salgado

COORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Nájlá Mohamad Kassab

ARARAQUARA – SP

2018

RÚBIA ADRIELI SVERSUT

**Estudo químico-farmacêutico e avaliação da
estabilidade de associações de oxitetraciclina e
anti-inflamatórios não esteroidais em
medicamentos veterinários**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Hérica Regina Nunes Salgado

COORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Nájla Mohamad Kassab

ARARAQUARA – SP

2018

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo químico-farmacêutico e avaliação da estabilidade de associações de oxitetraciclina e anti-inflamatórios não esteroidais em medicamentos veterinários.

AUTORA: RUBIA ADRIELI SVERSUT

ORIENTADORA: HERIDA REGINA NUNES SALGADO

COORIENTADORA: NAJLA MOHAMAD KASSAB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. PAULO CÉSAR PIRES ROSA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP



Profa. Dra. CRISTIANE MASETTO DE GAITANI
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Ribeirão Preto da USP



Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Tudo coopera para bem daqueles que amam a Deus.”

Romanos 8:28

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus que me acompanhou durante toda esta jornada, colocando as pessoas certas em minha vida, dando-me forças e guiando-me em segurança durante as inúmeras viagens a Araraquara-SP.
- ✓ Ao meu esposo James Cabral que esteve ao lado durante toda esta caminhada, compartilhando as angústias e alegrias. Você foi o meu ponto de equilíbrio e o maior incentivador! Com certeza, sem você a concretização deste sonho não seria possível. Te amo, infinitamente!
- ✓ Aos meus familiares, especialmente aos meus pais Clóvis Sversut e Evana T. Sversut, ao meu irmão Reodino Sversut e à minha cunhada Vanessa Fadanelli que, mesmo distantes, sempre acreditaram em mim e incentivaram-me a buscar esse sonho. Eu amo vocês!
- ✓ À professora Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pela orientação, confiança, oportunidade concedida e amizade. Foi um prazer ter conhecido uma pessoa tão inspiradora quanto você!
- ✓ À professora Dra. Nájlá M. Kassab, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS, pela co-orientação, incentivo e amizade.
- ✓ Ao professor Dr. Teófilo F.M. Cardoso e à professora Dra. Aline R. H. Carollo, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS, e ao Professor Dr. Marcos Serrou do Amaral, do Instituto de Física da UFMS, pelo incentivo e amizade.

- ✓ Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS, Vanderlei Paes, Michele Sorgatto e Aline Rosa, pelo apoio e compreensão durante meu afastamento.
- ✓ À professora Dra. Denise Brentan da Silva, do Laboratório de Espectrometria de Massas e Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS, pela fundamental colaboração e orientação durante a execução dos experimentos e interpretação dos resultados das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas. De, você é demais! Admiro-te muito!
- ✓ Às técnicas, Amanda e Nadla, do Laboratório de Espectrometria de Massas e Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS pela ajuda durante os experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas.
- ✓ Ao professor Dr. Lincoln C. Silva de Oliveira, do Instituto de Química da UFMS, por disponibilizar o equipamento e auxiliar na interpretação das análises térmicas.
- ✓ Ao professor Dr. Heberton W. Luiz ds Santos, do Instituto de Física da UFMS, pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.
- ✓ À professora Dra. Renata P. Trentin, do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS, pela realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

- ✓ Aos meus colegas de Pós-Graduação, Eliane Tótolli, Mariana Teixeira, Felipe Hugo Fernandes, Ana Carolina Kogawa, Bianca de Marco, Danilo Rodrigues, Caroline Magnani, Lívia Paganini e Tahisa Pedroso, que me ajudaram inúmeras vezes em diversas situações. Sem a ajuda de cada um de vocês tudo ficaria mais difícil e, apesar de não termos convivido diariamente no laboratório, tenho um carinho enorme por vocês e torço pelo sucesso de todos!
- ✓ À secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, em especial a Cláudia, Daniela, Christiane e Aniele pela simpatia, ajuda e informações fornecidas.
- ✓ Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara pela oportunidade concedida.
- ✓ A todos que me apoiaram e fizeram acreditar na realização desse grande sonho,

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxviii
INTRODUÇÃO	30
OBJETIVOS	33
Objetivo Geral.....	33
Objetivos Específicos.....	33
CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA	38
1.1. PANORAMA DO MERCADO FARMACÊUTICO VETERINÁRIO.....	38
1.2. TETRACICLINAS NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	40
1.2.1. Histórico.....	40
1.2.2. Oxitetraciclina: Principal Tetraciclina na Medicina Veterinária.....	43
1.2.2.1. Propriedades Físico-Químicas.....	43
1.2.2.2. Propriedades Farmacocinéticas.....	44
1.2.2.3. Mecanismo de Ação.....	45
1.2.2.4. Indicações Clínicas.....	46
1.2.2.5. Produtos de Degradação e Estabilidade.....	40
1.2.2.6. Métodos Analíticos.....	51
1.3. MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMO POTENTES POLUENTES AMBIENTAIS.....	70
1.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS.....	73
CAPÍTULO II: ANÁLISE QUALITATIVA	76
2.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1.1. Matérias-Primas.....	78
2.1.2. Reagentes.....	78
2.1.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	78
2.1.4. Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV).....	80
2.1.5. Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV).....	80
2.1.6. Avaliação do Comportamento Térmico.....	81

2.1.7. Difração de Raios X (DRX).....	82
2.1.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	82
2.1.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	83
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	84
2.2.2. Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV).....	87
2.2.3. Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV)....	90
2.2.4. Avaliação do Comportamento Térmico.....	96
2.2.5. Difração de Raios X (DRX).....	103
2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	109
2.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	112
2.3. CONCLUSÃO.....	125
CAPÍTULO III: ANÁLISE QUANTITATIVA – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	126
3.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	128
3.1.1. Substâncias Químicas Características (SQC).....	128
3.1.2. Amostras Comerciais.....	128
3.1.3. Desenvolvimento dos Métodos.....	128
3.1.4. Validação de Métodos.....	129
3.1.5. Aplicabilidade dos Métodos.....	138
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	139
3.2.1. Desenvolvimento dos Métodos.....	139
3.2.2. Validação dos Métodos.....	142
3.2.3. Aplicabilidade dos Métodos.....	151
3.3. CONCLUSÃO.....	153
CAPÍTULO IV: ANÁLISE QUANTITATIVA – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	154
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	156
4.1.1. Substâncias Químicas de Referência Caracterizadas (SQC).....	156
4.1.2. Amostras Comerciais.....	156
4.1.3. Desenvolvimento do Método Cromatográfico.....	156
4.1.4. Conformidade do Sistema Cromatográfico.....	157

4.1.5. Validação do Método.....	158
4.1.6. Aplicabilidade do Método.....	166
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	167
4.2.1. Desenvolvimento do Método Cromatográfico.....	167
4.2.2. Conformidade do Sistema Cromatográfico.....	174
4.2.3. Validação do Método.....	180
4.2.4. Aplicabilidade do Método.....	188
4.2.5. Análise comparativa entre o Método Cromatográfico e os Espectrofotométricos.....	190
4.3. CONCLUSÃO.....	192
CAPÍTULO V: ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	194
5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	196
5.1.1. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos Isolados.....	196
5.1.2. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos em Associação....	197
5.1.3. Isolamento dos Produtos de Degradação.....	199
5.1.4. Identificação dos Principais Produtos de Degradação.....	199
5.1.5. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos Produtos de Degradação Selecionados	200
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	202
5.2.1. Otimização do Protocolo Experimental adotado para Estudo de Degradação Forçada.....	202
5.2.2. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos Isolados.....	203
5.2.3. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos em Associação....	208
5.2.4. Identificação dos Principais Produtos de Degradação.....	212
5.2.4.1. Proposta para o Mecanismo de Fragmentação dos Produtos de Degradação.....	216
5.2.4.2. Proposta para Formação dos Produtos de Degradação.....	219
5.2.5. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos Produtos de Degradação Selecionados.....	221
5.3. CONCLUSÃO.....	225
CAPÍTULO VI: ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA E DE LONGA DURAÇÃO.....	226

6.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	228
6.1.1. Amostras Comerciais.....	228
6.1.2. Condições dos Estudos de Estabilidade.....	228
6.1.3. Análise da Amostras.....	228
6.1.3.1. Determinação do pH.....	229
6.1.3.2. Doseamento.....	229
6.1.4. Determinação da Cinética Reacional de Degradação dos Fármacos.....	229
6.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	230
6.2.1. Avaliação Organoléptica.....	230
6.2.2. Determinação do pH.....	231
6.2.3. Doseamento.....	232
6.2.4. Determinação da Cinética Reacional de Degradação dos Fármacos.....	235
6.3. CONCLUSÃO.....	238
CAPÍTULO VII: AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE FÁRMACO- FÁRMACO.....	240
7.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	242
7.1.1. Preparo das Misturas Binárias.....	242
7.1.2. Métodos Analíticos.....	242
7.1.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG).....	242
7.1.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	242
7.1.2.3. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV).....	243
7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	243
7.2.1. Avaliação da Compatibilidade da Mistura OTC-DICLO.....	244
7.2.2. Avaliação da Compatibilidade da Mistura OTC-PIRO.....	247
7.3. CONCLUSÃO.....	250
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	252
REFERÊNCIAS.....	254
ANEXO I: Artigo Científico Publicado.....	285
ANEXO II: Artigo Científico Submetido.....	287

RESUMO

O mercado farmacêutico veterinário tem crescido acentuadamente nos últimos anos, sendo liderado, principalmente, pelo segmento destinado aos animais de produção. As associações de oxitetraciclina com diclofenaco ou com piroxicam, na forma farmacêutica de soluções injetáveis, são amplamente empregadas na medicina veterinária. Apesar da importância clínica dessas associações, não foi encontrado na literatura científica nenhuma metodologia analítica capaz de quantificar simultaneamente esses fármacos nos medicamentos veterinários. Portanto, este trabalho objetivou desenvolver e validar métodos analíticos para determinação simultânea de oxitetraciclina associada ao diclofenaco de sódio ou ao piroxicam em soluções injetáveis veterinárias, empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrofotometria no ultravioleta (UV). As matérias-primas desses fármacos foram caracterizadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV) e do Infravermelho (IV), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM). O estudo de degradação forçada foi conduzido em condições hidrolíticas (alcalina, ácida, neutra e oxidativa) e fotolíticas, a estabilidade acelerada e de longa duração foram analisadas durante 6 meses ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) e 24 meses ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), respectivamente. A identificação dos produtos de degradação foi por EM e a avaliação da citotoxicidade *in vitro* foi através do ensaio de sulforrodamina B. Além disso, a compatibilidade fármaco-fármaco foi verificada através das técnicas de DSC, TG e espectrofotometria no IV. Os métodos analíticos por CLAE e espectrofotometria permitiram a determinação quantitativa e simultânea das associações avaliadas. Foram identificados seis produtos de degradação, sendo que o produto de degradação 5 apresentou atividade citotóxica moderada. Em relação à estabilidade acelerada e de longa duração, as amostras analisadas mostraram-se termicamente instáveis e os fármacos, na sua maioria, obedeceram à cinética de degradação de ordem zero. A avaliação de compatibilidade fármaco-fármaco sugeriu existir interações físico-químicas entre os fármacos. Os resultados deste trabalho ressaltam a importância das análises químico-farmacêuticas realizadas, pois elas são importantes ferramentas analíticas capazes de serem empregadas na rotina do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas, além de permitirem a previsão de alguns produtos de degradação dos fármacos que podem ser formados no ambiente.

Palavras-chave: Oxitetraciclina. Diclofenaco de sódio. Piroxicam. Controle de qualidade. Estabilidade. Produtos de degradação.

ABSTRACT

The veterinary pharmaceutical market has grown markedly in the last years, being led, mainly, by the segment destined to the production animals. Fixed-dose combinations of oxytetracycline with diclofenac or piroxicam, available as injectable solutions, are widely used in veterinary medicine. Despite the clinical importance of these combinations, no analytical methodology could be found in the scientific literature capable of quantifying these drugs simultaneously in veterinary pharmaceuticals. Therefore, this work aimed to develop and validate analytical methods for the simultaneous determination of the oxytetracycline, diclofenac sodium and piroxicam in injectable veterinary solutions by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and UV spectrophotometry. The raw materials of these drugs were characterized by Thin Layer Chromatography (TLC), Ultraviolet (UV) and Infrared (IR) Spectrophotometry, Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM) and High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS). The forced degradation study was conducted under hydrolytic (alkaline, acid, neutral and oxidative) and photolytic conditions. The accelerated and the long term stability studies were carried out during 6 months ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) and 24 months ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), respectively. The identification of the degradation products was through MS and their in vitro cytotoxicity evaluation was carried out according to sulforhodamine B assay. Moreover, the drug-drug compatibility was verified by DSC, TG and IR spectrophotometry. HPLC and spectrophotometry validated methods allowed the simultaneous determination of the drugs under study. Six degradation products were identified, and the degradation product 5 showed moderate cytotoxic activity. Regarding to the accelerated and long-term stability, the analyzed samples were thermally unstable and the drugs mostly obeyed zero order degradation kinetics. The drug-drug compatibility evaluation suggested that there were physical-chemical interactions between the drugs. The results of this work highlight the importance of the chemical-pharmaceutical analyzes, once they are important analytical tools capable of being used in the routine of quality control in the pharmaceutical industries, contributing to the safety and efficacy of pharmaceutical products, besides allowing the prediction of some drug degradation products that can be formed in the environment.

Keywords: Oxytetracycline. Diclofenac sodium. Piroxicam. Quality control. Stability. Degradation products.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Estrutura química da oxitetraciclina (CAS 79-57-2 – base livre)....44

Figura 1.2. Mecanismo de ação bacteriostático da oxitetraciclina.....45

Figura 1.3. Estrutura química do (a) diclofenaco de sódio (CAS 15307-79-6) e do (b) piroxicam (CAS 36322-90-4).....47

Figura 1.4. Principais rotas de degradação de oxitetraciclina.....49

Figura 1.5. Vias de eliminação de medicamentos de uso veterinário no ecossistema aquático e terrestre.....71

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Cromatoplasmas da matéria-prima de oxitetraciclina e de sua respectiva amostra comercial (Terramicina®).....84

Figura 2.2. Cromatoplasma da matéria-prima de diclofenaco sódico e de sua respectiva amostra comercial (Clofen S®).....86

Figura 2.3. Cromatoplasma da matéria-prima de piroxicam e de sua respectiva amostra comercial (piroxicam Genérico).....86

Figura 2.4. Espectro experimental de absorção na região do UV da (a) matéria-prima de oxitetraciclina na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com o (b) espectro obtido a partir da literatura consultada.....89

Figura 2.5. Espectro experimental de absorção na região do UV da (a) matéria-prima de diclofenaco de sódio na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com o (b) espectro obtido a partir da literatura consultada.....89

Figura 2.6. Espectro experimental de absorção na região do UV da (a) matéria-prima de piroxicam na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com o (b) espectro obtido a partir da literatura consultada.....90

Figura 2.7. Espectro de absorção na região do IV da matéria-prima de oxitetraciclina obtido em pastilha de KBr.....91

- Figura 2.8.** Espectro de absorção na região do IV da matéria-prima de diclofenaco de sódio obtido em pastilha de KBr.....93
- Figura 2.9.** Espectro de absorção na região do IV da matéria-prima de piroxicam obtido em pastilha de KBr.....95
- Figura 2.10.** Curvas DSC e TG/DTG da matéria-prima de oxitetraciclina obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$96
- Figura 2.11.** Mecanismo proposto para degradação térmica de oxitetraciclina (di-hidratada).....98
- Figura 2.12.** Curvas DSC e TG/DTG da matéria-prima de diclofenaco de sódio obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$99
- Figura 2.13.** Ciclização do diclofenaco de sódio devido ao aquecimento.....99
- Figura 2.14.** Curvas DSC da matéria-prima de diclofenaco de sódio obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de 2 e $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$100
- Figura 2.15.** Curvas DSC e TG/DTG da matéria-prima de piroxicam obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$101
- Figura 2.16.** Difratoograma experimental da matéria-prima de oxitetraciclina.....104
- Figura 2.17.** Comparação entre o (a) difratograma experimental de oxitetraciclina e o (b) difratograma simulado a partir da ficha cristalográfica PDF 40-1650.....104
- Figura 2.18.** Difratoograma experimental da matéria-prima de diclofenaco de sódio.....106
- Figura 2.19.** Comparação entre o (b) difratograma experimental de diclofenaco de sódio e os (b) difratogramas simulados a partir das fichas cristalográficas PDF 39-1684 e CSD-AKOTAV.....106
- Figura 2.20.** Difratoograma experimental da matéria-prima de piroxicam.....108

Figura 2.21. Comparação entre o (a) difratograma experimental de piroxicam e os (b) difratogramas simulados a partir das fichas cristalográficas PDF 40-1982 e PDF44-1839.....	108
Figura 2.22. Representação esquemática das ligações de hidrogênio inter e intramolecular das formas polimórficas I (dímero) e II (cadeia infinita) do piroxicam.....	109
Figura 2.23. Microscopia Eletrônica de Varredura de oxitetraciclina, utilizando aumento de 1000x	110
Figura 2.24. Microscopia Eletrônica de Varredura de diclofenaco de sódio, utilizando aumento de 1500x.....	111
Figura 2.25. Microscopia Eletrônica de Varredura de piroxicam, utilizando aumento de 1000x.....	112
Figura 2.26. Cromatograma de íons totais e espectros de massas de alta resolução de OTC (oxitetraciclina) e de suas impurezas relacionadas: 4-EOTC (4-epi-oxitetraciclina), TC (tetraciclina) e 2-ADOTC (2-acetil-2-descarboxamida-oxitetraciclina).....	114
Figura 2.27. Representação esquemática da obtenção de 4-EOTC (4-epi-oxitetraciclina), TC (tetraciclina) e 2-ADOTC (2-acetil-2-descarboxamida-oxitetraciclina), a partir de OTC (oxitetraciclina).....	115
Figura 2.28. Proposta do mecanismo de fragmentação de OTC para formação dos íons m/z 443,1458, 426,1211 e 381,0630.....	117
Figura 2.29. Proposta do mecanismo de fragmentação de OTC a partir do íon fragmento m/z 426,1211.....	118
Figura 2.30. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de alta resolução de diclofenaco de sódio (DICLO).....	119
Figura 2.31. Proposta do mecanismo de fragmentação de diclofenaco de sódio.....	122

Figura 2.32. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de alta resolução de piroxicam (PIRO).....122

Figura 2.33. Proposta do mecanismo de fragmentação de piroxicam.....123

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Sobreposição dos espectros de absorção na ordem zero de (a) OTC e DICLO, bem como de (b) OTC e PIRO, obtidos a partir das soluções das SQC preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5.....140

Figura 3.2. Sobreposição dos espectros de absorção na primeira derivada de (a) OTC e DICLO, bem como de (b) OTC e PIRO, obtidos a partir das soluções das SQC preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5.....141

Figura 3.3. Gráficos de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica de (a) DICLO na derivada de primeira ordem em 298,5 nm, (b) OTC na derivada de primeira ordem em 339 nm, (c) PIRO na derivada de primeira ordem em 198,5 nm e (d) OTC na ordem zero em 360 nm.....145

Figura 3.4. Espectros na (a) ordem zero e (b) primeira derivada da solução da amostra comercial A sobrepostos aos respectivos espectros da solução placebo.....148

Figura 3.5. Espectros na primeira derivada da solução da amostra comercial B sobreposto ao espectro da solução placebo.....149

Figura 3.6. Efeitos observados no ensaio de robustez da associação de (a) oxitetraciclina e diclofenaco de sódio e (b) oxitetraciclina e piroxicam, obtidos através do teste de Youden-Steiner.....150

CAPÍTULO IV

Figura 4.1. Representação gráfica da relação entre pH x concentração de oxitetraciclina no intervalo de pH de 1 – 10, evidenciando as estruturas químicas das formas prevalentes no intervalo de pH 1 – 2,5.....171

- Figura 4.2.** Representação gráfica da relação entre pH x concentração de diclofenaco de sódio no intervalo de pH de 1 – 10, com destaque na estrutura química da forma prevalente no intervalo de pH 1 – 2,5.....172
- Figura 4.3.** Representação gráfica da relação entre pH x concentração de piroxicam no intervalo de pH de 1 – 10, com destaque na estrutura química da forma prevalente no intervalo de pH 1 – 2,5.....172
- Figura 4.4.** Análise da pureza do pico de oxitetraciclina, obtida pelo detector DAD, através da avaliação da similaridade dos espectros UV extraídos de três pontos do pico cromatográfico (ápice, parte frontal e parte posterior).....178
- Figura 4.5.** Cromatograma da solução das SQC de oxitetraciclina (OTC), piroxicam (PIRO) e diclofenaco de sódio (DICLO) preparada para análise da conformidade do sistema e analisada sob as condições cromatográficas desenvolvidas.....179
- Figura 4.6.** Gráficos de distribuição dos resíduos para oxitetraciclina (OTC), diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO) em função da resposta analítica.....181
- Figura 4.7.** Cromatogramas da solução dos adjuvantes sobrepostos aos cromatogramas das soluções das amostras comerciais A (Oxirat La Plus® - a) e B (Terracam Plus® - b) preparadas em fase móvel e analisadas através do método cromatográfico proposto.....184
- Figura 4.8.** Ensaio de robustez da associação de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio obtidos através do modelo fatorial de Plackett-Burman.....185
- Figura 4.9.** Ensaio de robustez da associação de oxitetraciclina e piroxicam obtidos através do modelo fatorial de Plackett-Burman.....186
- CAPÍTULO V**
- Figura 5.1.** Protocolo experimental utilizado para a realização do estudo de degradação forçada dos fármacos em associação.....198

- Figura 5.2.** Perfis de decaimento de teor de OTC (oxitetraciclina), DICLO (diclofenaco de sódio) e PIRO (piroxicam), submetidos à hidrólise ácida (HCl 0,1M), básica (NaOH 0,01M), oxidativa (H₂O₂ 0,03%), neutra e fotólise.....204
- Figura 5.3.** Mudança na coloração das soluções de OTC (oxitetraciclina) submetida à hidrólise neutra e de diclofenaco de sódio (DICLO) à fotólise, em comparação com as soluções não degradadas (tempo zero).....205
- Figura 5.4.** Cromatogramas da associação de oxitetraciclina (OTC, 10,0 µg mL⁻¹) e diclofenaco de sódio (DICLO, 1,0 µg mL⁻¹) e de seus produtos de degradação (PD).....209
- Figura 5.5.** Cromatogramas da associação de oxitetraciclina (OTC, 10,0 µg mL⁻¹) e piroxicam (PIRO, 1,0 µg mL⁻¹) sem degradar e de seus produtos de degradação (PD).....210
- Figura 5.6.** Perfis espectrais na região do ultravioleta dos produtos de degradação (PD) 4 e PD 5, sob diferentes condições de degradação.....212
- Figura 5.7.** Espectros de massa de alta resolução dos produtos de degradação isolados, obtidos em modo de ionização positivo..... 212
- Figura 5.8.** Estruturas químicas propostas para os produtos de degradação (PD) 1 a 5, oriundos de OTC, sob diferentes condições de degradação.....215
- Figura 5.9.** Estrutura química proposta para o produto de degradação 6 (PD 6), oriundo da fotólise de DICLO.....216
- Figura 5.10.** Proposta do mecanismo de fragmentação dos produtos de degradação (PD) identificados.....218
- Figura 5.11.** Proposta para formação do produto de degradação 4 (PD 4) a partir da hidrólise neutra de oxitetraciclina (OTC).....220
- Figura 5.12.** Proposta para formação do produto de degradação 6 (PD 6) a partir da fotodegradação de diclofenaco de sódio (DICLO).....221

Figura 5.13. Porcentagem de crescimento da linhagem celular NIH/3T3 exposta às concentrações (0,25 - 2,5 - 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos produtos de degradação (PD) 4, 5 e oxitetraciclina (OTC).....223

CAPÍTULO VI

Figura 6.1. Avaliação das características organolépticas das amostras comerciais antes (tempo zero) e depois término do estudo de estabilidade acelerada (6 meses) e de longa duração (24 meses).....231

Figura 6.2. Perfis de decaimento do teor dos fármacos presentes nas amostras comerciais Oxitrat La Plus[®] e Terracam Plus[®], submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração.....232

Figura 6.3. Cromatogramas dos fármacos presentes nas amostras comerciais Oxitrat La Plus[®] e Terracam Plus[®], submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração.....234

CAPÍTULO VII

Figura 7.1. Curvas DSC dos fármacos OTC e DICLO isolados e da mistura binária OTC-DICLO (1:1, m/m), obtidas em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$244

Figura 7.2. Curvas TG dos fármacos OTC e DICLO isolados e da mistura binária OTC-DICLO (1:1, m/m), obtidas em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$245

Figura 7.3. Espectros de absorção na região do IV dos fármacos OTC e DICLO isolados e da mistura binária OTC-DICLO (1:1, m/m), obtidos em pastilha de KBr.....246

Figura 7.4. Curvas DSC dos fármacos OTC e PIRO isolados e da mistura binária OTC-PIRO (1:1, m/m), obtidas em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$247

Figura 7.5. Curvas TG dos fármacos OTC e PIRO isolados e da mistura binária OTC-PIRO (1:1, m/m), obtidas em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$248

Figura 7.6. Espectros de absorção na região do IV dos fármacos OTC e PIRO isolados e da mistura binária OTC-PIRO (1:1, m/m), obtidos em pastilha de KBr.....249

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.1. Principais tetraciclinas descritas na literatura.....42

Tabela 1.2. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em matrizes biológicas.....54

Tabela 1.3. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em produtos farmacêuticos.....59

Tabela 1.4. Métodos espectrofotométricos utilizados para análise de oxitetraciclina em várias matrizes.....64

CAPÍTULO II

Tabela 2.1. Metodologias utilizadas na identificação das matérias-primas por CCD.....79

Tabela 2.2. Amostras comerciais utilizadas para comparação da eluição das matérias-primas analisadas por CCD.....79

Tabela 2.3. Valores de R_f encontrados para cada matéria-prima e sua respectiva amostra comercial.....87

Tabela 2.4. Comprimentos de ondas máximos e absorvâncias dos fármacos nos solventes utilizados.....88

Tabela 2.5. Eventos térmicos observados nas curvas termoanalíticas das matérias-primas analisadas.....102

Tabela 2.6. Dados obtidos a partir do espectro de massas de alta resolução de oxitetraciclina e de suas impurezas relacionadas.....116

CAPÍTULO III

Tabela 3.1. Amostras comerciais (soluções injetáveis) utilizadas no desenvolvimento e validação dos métodos espectrofotométricos.....128

Tabela 3.2. Preparo das soluções amostras de diclofenaco de sódio e piroxicam para avaliação da repetibilidade dos métodos espectrofotométricos propostos, empregando a técnica de fortificação da amostra.....	132
Tabela 3.3. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de oxitetraciclina para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial A.....	133
Tabela 3.4. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de diclofenaco de sódio para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial A.....	134
Tabela 3.5. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de oxitetraciclina para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial B.....	134
Tabela 3.6. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de piroxicam para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial B.....	134
Tabela 3.7. Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez dos métodos espectrofotométricos propostos para avaliação das associações em estudo.....	136
Tabela 3.8. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden e Steiner.....	137
Tabela 3.9. Condições espectrofotométricas desenvolvidas para quantificação simultânea de oxitetraciclina (OTC) associada ao diclofenaco de sódio (DICLO) ou ao piroxicam (PIRO) nos medicamentos veterinários.....	139
Tabela 3.10. Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas dos fármacos em estudo.....	143
Tabela 3.11. Resultados da análise estatística para linearidade dos métodos espectrofotométricos propostos.....	144
Tabela 3.12. Ensaio de precisão dos fármacos analisados através dos métodos espectrofotométricos propostos.....	146

Tabela 3.13. Ensaio de exatidão dos fármacos analisados através dos métodos espectrofotométricos propostos.....147

Tabela 3.14. Teores obtidos no teste de robustez para as condições normal (N) e alterada (A).....151

Tabela 3.15. Análise dos medicamentos através dos métodos espectrofotométricos propostos.....151

CAPÍTULO IV

Tabela 4.1. Amostras comerciais (soluções injetáveis) utilizadas no desenvolvimento e validação do método cromatográfico.....156

Tabela 4.2. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de oxitetraciclina para avaliação da exatidão do método cromatográfico proposto, empregando amostra comercial A.....161

Tabela 4.3. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de diclofenaco de sódio para avaliação da exatidão do método cromatográfico proposto, empregando amostra comercial A.....162

Tabela 4.4. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de oxitetraciclina para avaliação da exatidão do método cromatográfico proposto, empregando amostra comercial B.....163

Tabela 4.5. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de piroxicam para avaliação da exatidão do método cromatográfico proposto, empregando amostra comercial B.....163

Tabela 4.6. Modelo Fatorial de Plackett-Burman empregado no ensaio de robustez.....165

Tabela 4.7. Parâmetros selecionados e níveis de variações testados no ensaio de robustez.....165

Tabela 4.8. Condições cromatográficas estabelecidas para determinação simultânea de oxitetraciclina combinada com diclofenaco de sódio ou com piroxicam nos medicamentos veterinários.....168

Tabela 4.9. Colunas cromatográficas C ₈ selecionadas para o desenvolvimento do método analítico.....	169
Tabela 4.10. Parâmetros avaliados para determinação da conformidade do sistema cromatográfico e recomendações descritas na literatura.....	175
Tabela 4.11. Análise da conformidade do sistema cromatográfico para determinação simultânea de OTC associada com DICLO ou com PIRO em soluções injetáveis para uso animal por CLAE.....	176
Tabela 4.12. Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas dos fármacos em estudo.....	180
Tabela 4.13. Resultados da análise estatística para linearidade do método cromatográfico proposto.....	181
Tabela 4.14. Valores dos teores dos fármacos obtidos para determinação da precisão método cromatográfico proposto.....	182
Tabela 4.15. Ensaio de exatidão dos fármacos analisados através do método cromatográfico proposto.....	183
Tabela 4.16. Teores obtidos no teste de robustez para as condições normal (0) e alterada (1).....	188
Tabela 4.17. Teores obtidos no teste de robustez para as condições normal (0) e alterada (-1).....	188
Tabela 4.18. Análise dos medicamentos através do método cromatográfico proposto.....	189
Tabela 4.19. Teores dos fármacos, presentes nas soluções injetáveis para uso animal, analisados através dos métodos analíticos propostos.....	190
Tabela 4.20. Análise estatística, empregando o teste- <i>t</i> bicaudal, dos resultados obtidos para o doseamento dos fármacos presentes nas soluções injetáveis para uso animal através dos métodos propostos.....	191

CAPÍTULO V

Tabela 5.1. Condições de degradação testadas durante estudo de degradação forçada dos fármacos isolados.....	196
Tabela 5.2. Modelos matemáticos empregados na determinação de k , $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ de acordo com a ordem de reação analisada.....	197
Tabela 5.3. Condições empregadas para a identificação dos produtos de degradação por CLAE-EM.....	200
Tabela 5.4. Coeficientes de determinação (R^2) dos modelos cinéticos de degradação dos fármacos.....	206
Tabela 5.5. Constante de degradação (k), meia vida ($t_{50\%}$) e $t_{90\%}$ dos fármacos de acordo com o modelo cinético mais adequado.....	207
Tabela 5.6. Porcentagem de degradação dos fármacos, sob as condições selecionadas para realização do estudo de degradação forçada de OTC (oxitetraciclina) combinada com DICLO (diclofenaco de sódio) ou com PIRO (piroxicam).....	208
Tabela 5.7. Produtos de degradação (PD) obtidos e detectados pelo método CLAE-DAD.....	211
Tabela 5.8 Dados dos produtos de degradação (PD) isolados, obtidos a partir dos espectros de massas de alta resolução.....	214
Tabela 5.9. Dados dos íons fragmentos dos produtos de degradação (PD), obtidos a partir dos espectros de massas de alta resolução.....	217
Tabela 5.10. Valores de GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos produtos de degradação 4 e 5, bem como de oxitetraciclina e do controle positivo (doxorubicina) na linhagem celular NIH/3T3.....	222

CAPÍTULO VI

Tabela 6.1. Análise do pH das amostras comerciais antes (tempo zero) e depois término do estudo de estabilidade acelerada (6 meses) e de longa duração (24 meses).....	232
---	-----

Tabela 6.2. Teores dos fármacos nas amostras comerciais Oxitrat La Plus® e Terracam Plus®, submetidas aos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.....233

Tabela 6.3. Cinética das reações de degradação dos fármacos presentes nas amostras comerciais, submetidas aos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.....235

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCDAE – Camada Delgada de Alta Eficiência

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

DICLO – diclofenaco de sódio

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

DRX– Difração de Raios X

DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Exploratória Diferencial)

E – Efeito

EC – Eletroforese Capilar

ED – Espectrofotometria Derivativa

EM – Espectrometria de Massas

EUA – Estados Unidos da América

FDA– *Food and Drug Administration*

FIA – *Flow Injection Analysis* (Análise por Injeção em Fluxo)

IC (95%) – Intervalo de Confiança de 95%

IFAs – Ingredientes Farmacêuticos Ativos

IV – Infravermelho

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

OTC – Oxitetraciclina

PD – Produto de Degradação

PIRO – Piroxicam

pKa – Constante de dissociação

r – coeficiente de correlação linear

r² – coeficiente de determinação

R_f – *Retention factor* (Fator de retenção)

SQC – Substância Química de Referência Caracterizada

TCs – Tetraciclina

TG/DTG – *Thermogravimetry/Thermogravimetry Derivative* (Termogravimetria/
Termogravimetria Derivada)

T_{onset} _{fusão} – Temperatura de fusão

t_R – Tempo de retenção

UV – Ultravioleta

ΔH _{fusão} – Variação de energia (entalpia) do processo de fusão

Δm – Variação de massa

λ – Comprimento de onda

INTRODUÇÃO

A indústria de produtos farmacêuticos veterinários corresponde ao segmento responsável por manter a saúde e a produtividade dos diversos rebanhos em todo o mundo, bem como por garantir a segurança e a abundância do alimento produzido (OMOTE; SLUSZZ, 2013; RATH et al., 2015). O Brasil é um dos cinco maiores mercados veterinários do mundo e o setor vem apresentando franco crescimento sustentado, principalmente, pelos animais de produção (aves, suínos e bovinos), uma vez que esses animais são frequentemente acometidos por infecções, ectoparasitoses e verminoses (CAPANEMA et al., 2007; COSTA; NETTO, 2012).

Os antimicrobianos configuram-se como a classe terapêutica mais prescrita na medicina veterinária, dentro da qual as tetraciclinas ocupam lugar de destaque (RATH et al., 2015; FDA, 2015). Nos últimos anos, os criadores de animais de produção têm utilizado indiscriminadamente os antimicrobianos não apenas para tratar os animais doentes, mas também como promotores de crescimento, sendo intencionalmente adicionados aos alimentos dos animais. Isso tem ocasionado o surgimento de micro-organismos resistentes, tornando ineficaz o tratamento de infecções não somente em animais, mas também em humanos, uma vez que quase todos os antimicrobianos utilizados na medicina veterinária são idênticos aos prescritos na medicina humana (BOTELHO; MONTEIRO; TORNISIELO, 2017; FDA, 2015).

De acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que 23 mil pessoas morrem a cada ano nos EUA devido à resistência de micro-organismos. Diante desse dado alarmante, empresas líderes mundiais do setor alimentício de *fast foods* como Subway® e McDonald's® adotaram políticas de proibição do uso de antimicrobianos por seus fornecedores de carne de frango (QUARTZ, 2017).

Recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa nº 45 de 22 de novembro de 2016 proibiu, em todo o território nacional, a importação e a fabricação do antimicrobiano sulfato de colistina (polimixina), utilizado como aditivo na alimentação animal, sendo intencionalmente adicionado às rações com a finalidade de melhorar o desempenho produtivo. De acordo com o MAPA, essa

proibição é baseada nas recomendações de instituições internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), que afirmam que o uso de polimixina como aditivo zootécnico pode ocasionar o surgimento de resistência microbiana por se tratar de um fármaco criticamente importante para saúde humana (MAPA, 2016).

Neste contexto, o controle de qualidade e o cumprimento das boas práticas de produção e utilização de medicamentos de veterinários, sobretudo de antimicrobianos, são tão importantes quanto os de medicamentos para uso humano. Quando os medicamentos veterinários não apresentam os requisitos mínimos de qualidade, a terapia torna-se ineficaz, acarretando a disseminação de doenças entre os animais, a presença de resíduos nos alimentos acima dos limites máximos permitidos ou o aparecimento de cepas resistentes em decorrência da administração de doses subterapêuticas (RATH et al., 2015).

Além disso, é importante garantir a saúde dos animais, através de intervenções medicamentosas seguras e eficazes, pois os animais, incluindo os de estimação, podem ser reservatórios e vetores zoonoses (SMITH, 2013). Portanto, desvios de qualidade em medicamentos veterinários representam não apenas uma ameaça à saúde dos animais tratados, mas também à saúde pública em geral.

Existem trabalhos descritos na literatura que evidenciam desvios na qualidade de produtos farmacêuticos veterinários. Conforme mencionado por Rath e colaboradores (2015), foi verificado em um estudo realizado na África Subsariana que, respectivamente, 20 e 42% dos produtos veterinários comercializados em Senegal e Camarões apresentaram teores de fármacos abaixo do preconizado. Além disso, 2% dos medicamentos veterinários comercializados no Senegal e 4% em Camarões não continham o fármaco na sua composição ou apresentavam sobredosagem (TEKO-AGBO et al., 2008).

No que diz respeito à fiscalização de medicamentos veterinários no Brasil, existe uma grande lacuna dentro do MAPA quanto à avaliação da conformidade dos produtos que estão sendo comercializados (RATH et al., 2015). O Decreto nº 5.053 de 22 de abril de 2004 aprovou o regulamento que dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que fabricam e comercializam tais produtos. Porém, nesse decreto, ao contrário da legislação que dispõe sobre as Boas Práticas de

Fabricação de Medicamentos para uso humano, fica facultada ao estabelecimento fabricante a terceirização do controle de qualidade dos insumos e do produto acabado (MAPA, 2004).

Em 2011, a Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL/MAPA) publicou o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica de Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários (MAPA, 2011). A publicação desse guia foi uma iniciativa importante do MAPA no sentido de dar início ao controle da qualidade de medicamentos veterinários produzidos no país. Entretanto, algumas limitações foram encontradas, tais como: falta de clareza na descrição dos procedimentos, critérios rígidos de aceitação exigidos, tratamento estatístico trabalhoso e a não recomendação da avaliação dos parâmetros cromatográficos do sistema, o que pode acarretar falhas na otimização do método (RATH et al., 2015).

Outro problema associado aos medicamentos veterinários é que esses produtos são potentes contaminantes ambientais que podem causar prejuízos incalculáveis ao meio ambiente terrestre e aquático como, por exemplo, contaminação de solos, rios e lagos, sendo tóxicos para peixes, aves e plantas (MARGALIDA et al., 2014; AGA et al., 2016).

Assim sendo, considerando o cenário preocupante no que tange à utilização de medicamentos veterinários, objetivou-se neste trabalho o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação simultânea de oxitetraciclina em combinação com anti-inflamatórios não esteroidais em soluções injetáveis, amplamente utilizadas na medicina veterinária, a fim de garantir a segurança e a eficácia desses medicamentos.

Além disso, através dos resultados aqui expostos, pretende-se chamar atenção dos órgãos fiscalizadores em relação à importância do controle de qualidade rigoroso e da utilização racional desses medicamentos, o que, conseqüentemente, contribuirá com a minimização do surgimento de resistência microbiana e da contaminação ambiental. Soma-se a isso o fato de que as associações escolhidas não possuem, até o momento, métodos analíticos descritos na literatura científica para seu controle de qualidade e avaliação da estabilidade.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação quantitativa e simultânea de oxitetraciclina associada ao diclofenaco de sódio ou ao piroxicam, disponíveis na forma de soluções injetáveis para o uso veterinário.

Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar as matérias-primas oxitetraciclina, diclofenaco sódico e piroxicam através do emprego das seguintes técnicas analíticas: Cromatografia em Camada Delgada, Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV) e do Infravermelho (IV), Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Difração de Raios X, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM);
- ✓ Desenvolver e validar métodos analíticos empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a Espectrofotometria na região do UV para a determinação quantitativa e simultânea das associações de oxitetraciclina com diclofenaco de sódio ou com piroxicam;
- ✓ Avaliar a estabilidade acelerada e de longa duração dos medicamentos contendo oxitetraciclina associada aos anti-inflamatórios não esteroidais e, posteriormente, analisar as amostras através do método cromatográfico desenvolvido e validado;
- ✓ Realizar o estudo de degradação forçada com a finalidade de verificar se o método por CLAE-DAD é indicativo de estabilidade para os fármacos em estudo;
- ✓ Isolar os produtos de degradação forçada, empregando metodologia cromatográfica desenvolvida e validada, e identificá-los por Espectrometria de Massas;

- ✓ Propor as estruturas químicas e os mecanismos de reação envolvidos na degradação dos fármacos, bem como determinar a cinética de reação;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos principais produtos de degradação;
- ✓ Realizar o estudo de compatibilidade fármaco-fármaco, empregando as técnicas termoanalíticas (TG/DTG e DSC) e a Espectrofotometria no IV.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo oferece uma revisão bibliográfica sobre o mercado farmacêutico veterinário, destacando a principal classe terapêutica utilizada, isto é, as tetraciclinas. Além disso, o capítulo traz uma ampla revisão da literatura sobre a oxitetraciclina, principal tetraciclina para uso animal, abordando suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, mecanismo de ação, indicações clínicas, relevância de sua associação com anti-inflamatórios não esteroidais, estabilidade e métodos analíticos descritos para quantificação do fármaco em produtos farmacêuticos e em amostras biológicas. Essa revisão da literatura resultou na publicação de um artigo científico no periódico *Critical Reviews of Analytical Chemistry* (Qualis A2, Anexo I). Por último, o capítulo traz considerações acerca da contaminação ambiental por resíduos de medicamentos veterinários e da avaliação da citotoxicidade *in vitro* de produtos de degradação de fármacos.

1.1. PANORAMA DO MERCADO FARMACÊUTICO VETERINÁRIO

O segmento do agronegócio brasileiro tem apresentado vertiginoso crescimento econômico na última década, sendo responsável por aproximadamente 27% do Produto Interno Bruto e 37% da mão-de-obra empregada no país, caracterizando-se pela utilização de tecnologias inovadoras e gestão eficaz de negócio (MAPA, 2016).

A exportação de produtos agropecuários tem exigido esforços significativos para adequar-se às normas e procedimentos legais relativos à garantia e ao controle da qualidade de produtos e/ou processos produtivos. Da mesma maneira, setores tradicionais da pecuária nacional, ou seja, os criadores de animais de produção (bovinos, suínos e ovinos) têm buscado atender às exigências dos mercados externos, a fim de melhorar a produtividade (CALARGE; SATOLO; SATOLO, 2007).

Dentro desta conjuntura de crescimento, qualificação e inovação do segmento do agronegócio no Brasil, as empresas atuantes no setor de produtos e medicamentos veterinários têm se esforçado para aumentarem sua competitividade, fundamentalmente por meio da melhoria na qualidade e diminuição de custos. Essas empresas estão investindo em novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos que minimizem os impactos ambientais, proporcionem eficácia clínica e, conseqüentemente, lucratividade (CALARGE; SATOLO; SATOLO, 2007).

Com o aumento das exportações de produtos de origem animal, intensificou-se a fiscalização sanitária, tornando cada vez mais exigentes os critérios para a comercialização desses produtos. Além disso, a maior preocupação dos criadores em manter a sanidade do rebanho tem alavancado o mercado mundial destinado à saúde animal (CAPANEMA et al., 2007; RATH; MARTINEZ-MEJIA; SCHRODER, 2015).

Os Estados Unidos da América (EUA) e Brasil são os dois maiores produtores de proteína animal e os maiores mercados de produtos de uso veterinário do mundo (IFAH, 2013). De acordo com o Compêndio de Produtos Veterinários, elaborado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), com o apoio da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV) do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), o mercado farmacêutico veterinário nacional movimentou cerca de R\$ 5 milhões em 2016, apresentando um crescimento de cerca de 50% quando comparado ao ano de 2008 (SINDAN, 2017).

Os animais de produção representam mais de 85% do mercado nacional de saúde animal. Os produtos de uso veterinário destinados aos ruminantes compreendem 55% do faturamento desse mercado, seguidos pelo setor de animais de estimação (18%), aves (14%), suínos (11%) e equinos (2%) (SINDAN, 2017). O elevado consumo desses produtos em ruminantes, aves e suínos pode ser atribuído ao interesse por parte dos produtores em aumentar a produtividade, acelerando o ganho de peso e diminuindo o tempo de abate, além de garantir a sanidade do animal (CAPANEMA et al., 2007).

A expressiva demanda de medicamentos veterinários no Brasil pode ser verificada através do elevado número de indústrias instaladas no país, principalmente no estado de São Paulo, que produzem esses medicamentos. Existem, aproximadamente, 2700 produtos de uso veterinário com licença, sendo provenientes de 108 empresas diferentes. Em relação aos grupos de medicamentos, o mercado veterinário brasileiro está dividido em: antiparasitários (31%), biológicos (21%), terapêuticos (15%), antimicrobianos (14%), suplementos (8%) e outros (11%) (SINDAN, 2017).

Indubitavelmente, os antimicrobianos representam a classe terapêutica mais amplamente usada na medicina veterinária, uma vez que são indicados para várias situações, tais como: promoção da proteção, do crescimento e do bem-estar do animal através de sua inclusão na dieta dos animais em dosagens subterapêuticas, além do tratamento de infecções bacterianas (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006). Diante disso, os antimicrobianos são fármacos indispensáveis na medicina veterinária e, em razão da ocorrência crescente de resistência bacteriana são os mais discutidos, tanto por cientistas e pecuaristas, quanto por órgãos governamentais (RATH; MARTINEZ-MEJIA; SCHRODER, 2015).

Em 2004, cerca de 5 toneladas de antimicrobianos foram destinadas à produção animal nos países da União Europeia (MARGALIDA et al., 2014). De acordo como relatório anual de venda e distribuição de antimicrobianos, publicado pelo Centro de Medicamentos Veterinários do *Food and Drug Administration* (FDA) em dezembro de 2015, nos EUA o comércio interno de

antimicrobianos destinados aos animais de produção aumentou 23% entre os anos de 2009 e 2014. Dentre as classes de antimicrobianos citadas nesse relatório, as tetraciclinas representaram 70% dessas vendas, seguidas pelas penicilinas (9%), macrolídeos (7%), aminoglicosídeos (3%), lincosamidas (2%), cefalosporinas e fluoroquinolonas (> 1%). Em 2014, foram consumidos cerca de 7 toneladas de tetraciclinas, representando um aumento de 25% em relação ao ano de 2009 (FDA, 2015).

Esses dados evidenciam a importância das tetraciclinas na medicina veterinária e podem ser explicados pela relação custo-benefício, uma vez que são antimicrobianos de custo acessível, baixa toxicidade e com amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo eficazes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, alguns micro-organismos atípicos e protozoários (CHOPRA; ROBERTS, 2001; ZHANEL et al., 2004; SHLAES, 2006; SPINOSA, GÓRNIAK; BERNARDI, 2006).

1.2. TETRACICLINAS NA MEDICINA VETERINÁRIA

1.2.1. Histórico

Tetraciclinas (TCs) são antibióticos bacteriostáticos, de origem natural produzidos por diversas espécies de *Streptomyces* (bactérias Gram-positivas filamentosas encontradas no solo) ou semi-sintética (NELSON; LEVY, 2011).

O primeiro representante da classe das TCs foi descoberto em 1945 por Benjamin Duggar, professor aposentado da Universidade de Wisconsin (EUA), a partir da fermentação natural de *Streptomyces aureofaciens*, sendo chamado Aureomicina[®] em referência ao micro-organismo precursor. Em dezembro de 1948, esse novo antibiótico foi aprovado pelo FDA para uso clínico, salvando inúmeras vidas e configurando-se como um sucesso terapêutico. Atualmente, é conhecido pelo nome genérico de clortetraciclina (NELSON; LEVY, 2011).

A descoberta da clortetraciclina gerou notoriedade e lucros para Duggar e sua equipe, despertando vertiginoso interesse pela pesquisa e obtenção de novas TCs (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992; ZHANEL et al., 2004; SHLAES, 2006; NELSON; LEVY 2011). Assim sendo, poucos anos depois, em 1950, Alexander Finlay e seu grupo de pesquisa da indústria farmacêutica Pfizer descobriram a oxitetraciclina (OTC), obtida a partir da fermentação

natural de *Streptomyces rimosus*, presente em amostras de solo (FINLAY et al., 1950; NELSON; LEVY, 2011). Em 1953, Robert Woodward estudou a estrutura química da OTC, permitindo que a Pfizer produzisse o medicamento em larga escala com o nome comercial de Terramicina[®]. Esse medicamento tornou-se, em pouco tempo, uma ameaça sobre o monopólio comercial representado pelas vendas de Aureomicina[®], uma vez que apresentou maior eficácia clínica no tratamento de infecções (NELSON; LEVY, 2011). Entre as décadas de 1950 a 1970, vários membros da família das TCs foram desenvolvidos e, nesse mesmo período, essa classe terapêutica configurou-se entre os antibióticos mais usados nos EUA (SPEER, SHOEMAKER; SALYERS, 1992; ZHANEL et al., 2004; SHLAES, 2006).

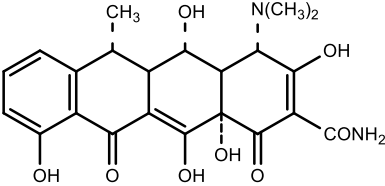
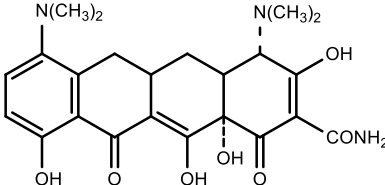
Existem descritas na literatura dez tetraciclina, sendo elas: oxitetraciclina, limeciclina, doxiciclina, minociclina, clortetraciclina, tetraciclina, metaciclina, desmetil-clortetraciclina, rolitetraciclina e clomociclina (Tabela 1.1). Todas podem ser administradas oralmente, porém apenas as quatro primeiras existem em formas farmacêuticas para administração por via parenteral. De modo geral, as preparações orais de TCs, principalmente doxiciclina e minociclina, são utilizadas para o tratamento de infecções em humanos, pois causam potentes efeitos adversos em animais como, por exemplo, a destruição da microflora gástrica e a atenuação de processos digestivos em ruminantes e cavalos (CHOPRA; ROBERTS, 2001; MICHALOVA; NOVOTNA; SCHLEGLOVA, 2004). Assim sendo, as TCs de administração parental são as que se destacam na medicina veterinária e, dentre essas, a oxitetraciclina é o antimicrobiano mais utilizado em animais de produção e em piscicultura (REED; SIEWICKI; SHAH, 2004; PRADO; MACHINSKI-JÚNIOR, 2011).

Tabela 1.1. Principais tetraciclinas descritas na literatura.

Tetraciclina	Estrutura química	Nome comercial	Ano da descoberta	Origem
Clortetraciclina		Aureomicina®	1948	N
Oxitetraciclina		Terramicina®	1951	N
Tetraciclina		Acromicina®	1953	N
Desmetil-clortetraciclina		Declomicina®	1957	N
Rolitetraciclina		Reverin®	1958	SS
Limeciclina		Tetralisal®	1961	SS
Clomociclina		Megaclor®	1963	SS
Metaciclina		Rondomicina®	1965	SS

Continua na próxima página

Tabela 1.1. Principais tetraciclinas descritas na literatura (*continuação*).

Tetraciclina	Estrutura química	Nome comercial	Ano da descoberta	Origem
Doxiciclina		Vibramicina®	1967	SS
Minociclina		Minocin®	1972	SS

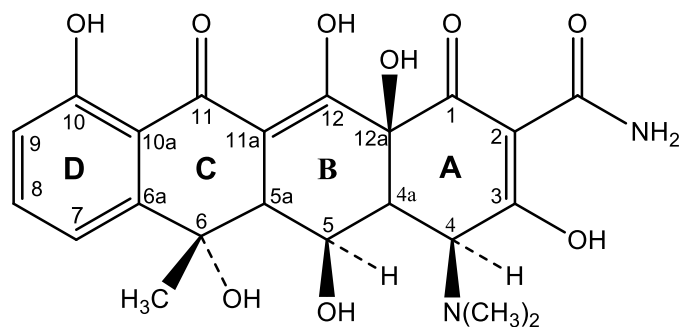
N: natural; SS: Semi-sintética. Fonte: Adaptado de CHOPRA; ROBERTS, 2001.

1.2.2. Oxitetraciclina: Principal Tetraciclina na Medicina Veterinária

1.2.2.1. Propriedades Físico-Químicas

A oxitetraciclina (OTC, Figura 1.1) pertence à classe dos poliketídeos, isto é, compostos aromáticos policíclicos oriundos do metabolismo secundário de algumas espécies de bactérias, fungos e plantas (RIX et al., 2002). Conforme observado na Figura 1.1, existem na estrutura química da OTC quatro anéis condensados que são designados, da direita para esquerda, pelas letras A, B, C e D e numerados de 1 a 12 a partir da região superior do anel A (DUARTE et al., 1999). OTC, quimicamente conhecida como (4S, 4a, 4aR, 5S, 5aR, 6S, 12aS) - 4 - dimetilamino - 1,4,4a, 5,5a,6,11,12a-octahidro-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenocarboxamida ou simplesmente 5-hidroxitetraciclina, apresenta-se como pó cristalino amarelo, inodoro, higroscópico, de sabor amargo, que se funde a 180°C com decomposição (CHOPRA; ROBERTS, 2001; THE MERCK INDEX, 2006; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

Figura 1.1. Estrutura química da oxitetraciclina (CAS 79-57-2 – base livre).



Fonte: DUARTE et al., 1999; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011.

A OTC é solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e clorofórmio (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011). Encontra-se disponível nas formas de base livre ($C_{22}H_{24}N_2O_9$; massa molecular: $460,4 \text{ g mol}^{-1}$), cloridrato ($C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$; massa molar: $496,9 \text{ g mol}^{-1}$), dihidrato ($C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$; massa molar: $496,4 \text{ g mol}^{-1}$) e sal cálcico ($[C_{22}H_{24}N_2O_9]_2 \cdot Ca$; massa molar: $958,9 \text{ g mol}^{-1}$) (YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

A OTC, assim como as demais TCs, atua como agente quelante e suas propriedades antibacterianas e farmacocinéticas são afetadas pela coordenação com íons metálicos, presentes em alimentos e no meio biológico. Esse fármaco forma quelato em várias posições de sua molécula devido à presença de vários grupos doadores de elétrons. Os sítios de coordenação incluem os oxigênios em C-10, C-11 e C-12, o oxigênio enólico em C-3 e os nitrogênios em C-4 e no grupo amida do anel A. A OTC possui três prótons dissociáveis, sendo um no grupo enol em C-3, outro no sistema ceto-fenólico em C-10, C-11 e C-12 e o último no grupo dimetilamônio em C-4, com valores de pKa 3,5; 7,7 e 9,3, respectivamente (DUARTE et al., 1999; CHARTONE-SOUZA et al., 2005).

1.2.2.2. Propriedades Farmacocinéticas

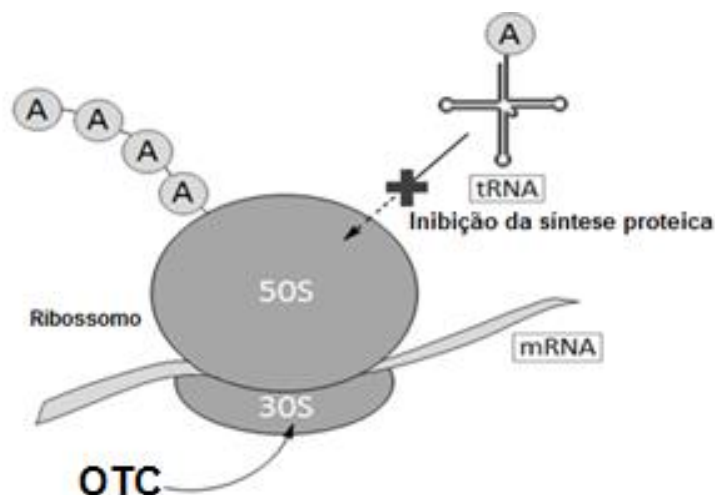
A OTC, devido ao seu caráter hidrossolúvel, apresenta má absorção por via oral (aproximadamente 58%), principalmente após a ingestão de alimentos. A maior parte da absorção ocorre no estômago e no intestino delgado superior. Além disso, a porcentagem de fármaco que não é absorvida cresce à medida que a dose aumenta (AGWUH; MACGOWAN, 2006; PEREIRA-MAIA et al., 2010).

O fármaco possui distribuição relativamente lenta, com um volume de distribuição de 128 L, apresentando-se de 27 a 35% ligada às proteínas plasmáticas. A meia vida no organismo ($t_{1/2}$) é de 9,2 horas, sendo classificada como tetraciclina de ação curta. O fármaco atinge a concentração plasmática máxima (C_{max}) de 2 mg/L em um tempo máximo (t_{max}) de 2 a 4 horas, sendo que cerca de 20% do total absorvido é eliminado na forma inalterada através das fezes e urina (HALLING-SØRENSEN et al., 2006; AGWUH; MACGOWAN, 2006).

1.2.2.3. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação da OTC (Figura 1.2) é bem estabelecido e há um consenso de que se trata de um antibiótico bacteriostático, como as demais TCs. A atividade antibacteriana de OTC está associada à inibição reversível da síntese de proteínas (LASKIN, 1967; KERSTEN; FREY, 1972). Assim sendo, OTC liga-se a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impede a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo e a adição de aminoácidos, resultando na inibição da síntese proteica (SHLAES, 2006; RANG et al., 2016). Algumas bases da subunidade 16S como, por exemplo, G693, A892, U1052, C1054, G1300 e G1138, também são importantes para a ligação de OTC aos ribossomos (CHOPRA; HAWKEY; HINTON, 1992).

Figura 1.2. Mecanismo de ação bacteriostático da oxitetraciclina. OTC: oxitetraciclina; A: aminoácido; tRNA: RNA transportador; mRNA: RNA mensageiro.



Fonte: adaptado de RANG et al., 2016.

1.2.2.4. Indicações Clínicas

Devido aos parâmetros farmacocinéticos desfavoráveis e à resistência apresentada por algumas linhagens bacterianas, OTC não tem sido mais prescrita para tratamento de infecções em humanos em diversos países (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Todavia, é amplamente utilizada na medicina veterinária para o tratamento de infecções em animais destinados à alimentação humana como aves, bovinos, ovinos, suínos e peixes, sendo também empregada em apiários para o combate da doença de Loque que acomete as abelhas (LEVY, 1992; REED; SIEWICKI; SHAH, 2004; PRADO; MACHINSKI-JÚNIOR, 2011).

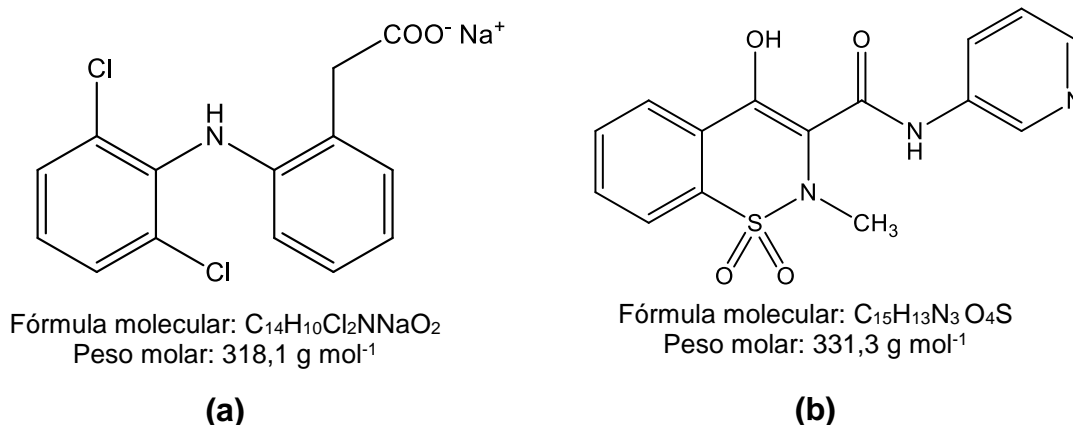
Em 1953, o FDA aprovou nos EUA a utilização de OTC em dosagens subterapêuticas adicionadas, intencionalmente, nos alimentos e na água dos animais com intuito de promover o crescimento do animal, melhorando o desempenho produtivo (CHOPRA; HAWKEY; HINTON, 1992). Entretanto, a utilização de OTC como promotor de crescimento é proibida na União Europeia e República Tcheca (MICHALOVA; NOVOTNA; SCHLEGELOVA, 2004). Além disso, é válido ressaltar que a administração de OTC em animais jovens ou no período de gestação deve ser evitada, pois o antimicrobiano pode formar quelatos com íons cálcio que se depositam sobre a superfície dos ossos, resultando no retardo no desenvolvimento do esqueleto (MOFFIT; COOLEY; OLSEN, 1974).

1.2.2.4.1. Associação de OTC com Anti-inflamatórios Não Esteroidais

Nas últimas décadas, associações, em dose-fixa, de OTC e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido frequentemente empregadas na medicina veterinária para o tratamento de infecções sistêmicas acompanhadas de febre e outras condições inflamatórias que acometem, principalmente, bovinos (CLARKE; BURROWS; AMES, 1991). Dentre essas associações, encontram-se as combinações de oxitetraciclina com diclofenaco de sódio (Oxirat La Plus[®], Reverin Plus[®], Ourotera La Plus[®], Terramicina Mais[®]) ou com piroxicam (Talcin Max[®], Terracam Plus[®] e Terraflan La 200[®]), que estão disponíveis para comercialização no mercado nacional na forma de soluções injetáveis de liberação prolongada (COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS, 2017).

O diclofenaco de sódio (pKa = 4,15) e o piroxicam (pKa = 6,30) são fármacos ácidos fracos e pertencem às classes dos derivados do ácido fenilacético e oxicans, respectivamente (RANG et al., 2016; DRUG BANK, 2017). As estruturas químicas do diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO) encontram-se, respectivamente, nas Figuras 1.3a e 1.3b.

Figura 1.3. Estrutura química do (a) diclofenaco de sódio (CAS 15307-79-6) e do (b) piroxicam (CAS 36322-90-4).



Fonte: MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011.

Estudos clínicos indicam que o DICLO ou o PIRO melhoram a eficácia terapêutica de OTC através de interações farmacocinéticas que proporcionam diminuição da inflamação no local da infecção, melhorando a distribuição do antimicrobiano, o que resulta na maior eficácia terapêutica com a recuperação mais rápida do animal (JOLY et al., 1988; ADAWAL et al., 1992; MESTORINO et al., 2007; MANGERONA et al., 2013).

No estudo desenvolvido por Mangerona e colaboradores (2013) verificou-se que a administração combinada de OTC e DICLO em bovinos, pela via intravenosa (IV), reduziu o período de carência, isto é, o tempo em dias ou horas em que o resíduo do antimicrobiano é liberado no leite durante e após o término do tratamento. Assim sendo, ao contrário dos medicamentos que contêm apenas OTC na composição, a utilização da associação de OTC com diclofenaco é recomendada para o tratamento de animais em lactação. Todavia, a fim de evitar a presença de resíduos nos alimentos, o abate dos animais tratados deve ser realizado oito dias após a última aplicação do medicamento e o leite deve ser destinado ao consumo humano somente quatro dias após a administração da última dose.

A administração simultânea de OTC e PIRO tem sido eficaz para o tratamento de erliquiose canina, popularmente conhecida como doença do carrapato (ADAWAL et al., 1992). PIRO reduz a dor e inchaço no local causado pela injeção de OTC e combate a febre, resultando no rápido restabelecimento dos cães (OGUNKOYA; ADEYANJU; ADBULLAHI, 1985).

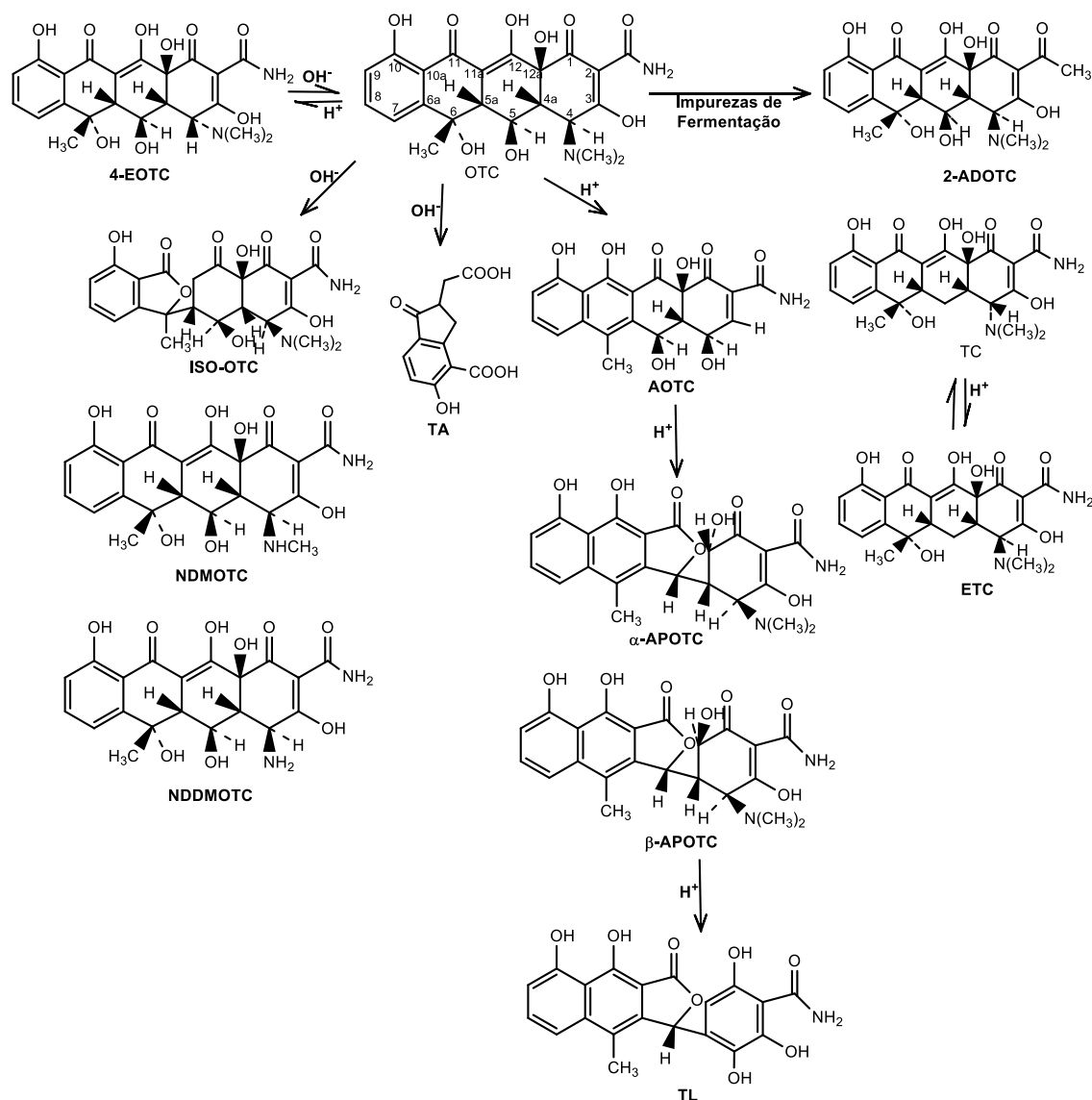
Contudo, salienta-se que por serem AINEs não seletivos, ou seja, que inibem tanto a isoforma 1 e 2 da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), a associação de OTC com esses fármacos pode causar potentes efeitos adversos nos animais, sobretudo naqueles de pequeno porte, como úlceras gástricas, náuseas, inibição da agregação plaquetária e hemorragias (DAVIES et al., 2004; SPINOSA, GÓRNIAK; BERNARDI, 2006). Por esse motivo, não se recomenda a utilização de OTC associada a esses AINEs em cães com histórico de úlceras gástricas ou doença renal (ADAWAL et al., 1992).

1.2.2.5. Produtos de Degradação e Estabilidade

Os produtos de degradação (PDs) de OTC são formados sob diferentes condições de pH e temperatura comumente encontradas no ambiente. O entendimento dos mecanismos das reações envolvidas e a identificação dos PDs formados é importante para prever o comportamento ambiental do fármaco e auxiliar no desenvolvimento de estratégias que possam monitorar a contaminação do ecossistema terrestre e aquático (HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002; HALLING-SØRENSEN et al., 2006).

A Figura 1.4 ilustra as principais rotas de degradação descritas para OTC, bem como a estrutura química dos PDs formados.

Figura 1.4. Principais rotas de degradação de oxitetraciclina. OTC: oxitetraciclina; 4-EOTC: 4-epi-oxitetraciclina; 2-ADOTC: 2-acetil-2-decarboxamido-oxitetraciclina; TC: tetraciclina; ETC: epitetraciclina; ISO-OTC: iso-oxitetraciclina; NDMOTC: N-desmetil-OTC; NDDOTC: N-didesmetil-OTC; AOTC: anidroxitetraciclina; α -APOTC: α -apo-oxitetraciclina; β -APOTC: β -apo-oxitetraciclina; TL: terrinolidina; TA: ácido terranoico.



Fonte: SVERSUT et al., 2017

Conforme descrito por Kahsay e colaboradores (2013), sob condições ácidas a ligeiramente neutras (pH 2 a 6,5), a OTC pode sofrer epimerização reversível em C-4, resultando na formação da 4-epi-oxitetraciclina (4-EOTC) (HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002). A epimerização pode ser inibida elevando-se o pH do produto acabado para valores superiores a 6, através da adição de sais de cálcio ou magnésio (KAPLAN ; GRANATEK;

BUCKWALTER, 1957). Quando comparada às outras TCs, a OTC é menos suscetível à epimerização, pois o grupo hidroxila (-OH) em C-5 pode formar ligações de hidrogênio com o grupamento dimetilamino em C-4, dificultando a reação (HUSSAR et al, 1968).

A presença do grupo hidroxila (-OH) em C-6 favorece a degradação ácida irreversível de OTC, levando à formação da anidroxitetraciclina (AOTC). A AOTC e seu epímero (EAOTC) são instáveis em soluções ácidas e formam dois isômeros aromáticos: α -apo-oxitetraciclina (α -APOTC) e β -apo-oxitetraciclina (β -APOTC) (KAHSAY et al., 2013). Sob condições extremamente ácidas (pH < 2), α -APOTC e β -APOTC podem se degradar através de um processo irreversível, formando a terrinolidina (TL) (HOCHSTEIN et al., 1953).

Durante a síntese de OTC, a fermentação da bactéria *Streptomyces rimosus* pode produzir duas impurezas relacionadas: 2-acetil-2-descarboxamido-oxitetraciclina (2-ADOTC) e tetraciclina (TC) (KHAN et al., 1987). Em condições ácidas, a TC pode converter-se em seu epímero denominado 4-epitetraciclina (ETC). Caso a OTC esteja na forma de cloridrato, os seguintes PDs também podem ser formados durante o processo fermentativo: AOTC, α -APOTC, β -APOTC e TL (DIANA et al., 2002).

OTC é também suscetível à degradação em condições alcalinas, podendo ocorrer relevantes alterações em sua estrutura química (HALLING-SØRENSEN et al., 2002). O principal produto de degradação obtido em meio básico é o ácido terranoico (TA) (HOCHSTEIN et al. 1953). Devido à presença do grupo hidroxila em C-6, em soluções básicas diluídas à temperatura ambiente por 24 horas, OTC se converte em iso-oxitetraciclina (ISO-OTC). Períodos prolongados de exposição de OTC em soluções alcalinas, com a presença de oxigênio, resultam na produção de N-desmetil-OTC (NDMOTC) e N-didesmetil-OTC (NDDMOTC) (WALLER et al., 1952; MITSCHER, 1978). Embora nunca a ISO-OTC, a NDMOTC e a NDDMOTC tenham sido identificadas em amostras ambientais, também se sugere encontrar esses produtos de degradação também em ambientes neutros e levemente alcalinos como alguns tipos de solo, rios e lagos (HALLING-SØRENSEN et al., 2002).

Com exceção de TC, todos os outros produtos de degradação descritos anteriormente não são terapeuticamente úteis (HARVEY, 199; DIANA et al., 2002). A 4-EOTC apresenta 30% da atividade antimicrobiana de OTC, já a

α -APOTC, β -APOTC e ADOTC possuem apenas de 7 a 10% (HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002). Por esse motivo, a Farmacopeia Europeia fixa os limites máximos, em porcentagem (%), que essas substâncias podem estar presentes na Substância Química de Referência (SQR) de OTC, sendo < 0,5% para 4-EATC e < 2,0% para as demais impurezas (EP, 2012).

É válido mencionar que algumas TCs são fotossensíveis, todavia a estabilidade do fármaco é mantida por até 30 dias se o armazenamento for realizado fora do alcance de luz (AL-MOMANI; KANAN, 2008). Além disso, esses antimicrobianos também são sensíveis à alta temperatura e à umidade (MORENO-CEREZO et al., 2001). Soluções de OTC, quando expostas à luz solar intensa ou temperaturas acima de 90°C e umidade, tornam-se escuras, porém sem perda significativa da potência (HARVEY, 1990). Os cristais de OTC, na forma de cloridrato, apresentam aproximadamente 5% de inativação quando aquecidos entre 50 a 60°C. No entanto, suas soluções aquosas são estáveis em valores de pH 1 a 2,5 por até 30 dias a 30°C (THE MERCK INDEX, 2006).

1.2.2.6. Métodos Analíticos

O desenvolvimento de métodos analíticos para detecção de fármacos e/ou seus produtos de degradação (PDs) em medicamentos, matrizes biológicas (plasma, tecido e urina), alimentos e amostras ambientais (solos e água) tem crescido acentuadamente nos últimos anos, uma vez que se buscam cada vez mais metodologias simples, rápidas e sustentáveis que possam ser empregadas na rotina do controle de qualidade de produtos acabados em indústrias farmacêuticas, no monitoramento dos parâmetros farmacocinéticos em hospitais para fins de ajuste de dose e na quantificação de resíduos de fármacos nos alimentos e ambiente (FERNANDEZ-TORRES et al., 2010).

Existem diversos estudos descritos na literatura que empregam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a diferentes detectores para análise de resíduos de OTC em alimentos e no ambiente (OMIJA, 1991; SENYUV; OZDEN; SARICA, 2000; PENA et al., 2005; BISWAS et al., 2007; LI et al., 2008; PRADO; MACHINSKI-JÚNIOR, 2011; KHOSSROKHAVAR et al., 2011; EMIRI et al., 2014; GRUPTA et al., 2014;

OLATUNDE et al., 2014; DZOMBA; KUGARA; ZARANYIKA, 2015). Alguns dos métodos encontrados para monitoramento da presença de OTC em amostras ambientais serão discutidos posteriormente, onde será abordado o assunto referente à contaminação do ambiente por medicamentos veterinários.

Portanto, o foco desta seção será apresentar e discutir os métodos analíticos já existentes para determinação de OTC isolada ou em associação com seus produtos de degradação em produtos farmacêuticos para uso humano ou veterinário e em matrizes biológicas. Apesar da relevância clínica e da ampla utilização na medicina veterinária, não foram encontradas, em artigos científicos ou monografias oficiais, metodologias analíticas capazes de analisar de forma simultânea OTC associada ao diclofenaco de sódio ou ao piroxicam em medicamentos ou amostras biológicas e ambientais.

Os métodos analíticos que serão discutidos compreendem à CLAE, cromatografia planar, espectrofotometria, eletroforese capilar, quimioluminescência, injeção de fluxo e aos ensaios microbiológicos.

1.2.2.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a metodologia de escolha para determinação de OTC em produtos farmacêuticos, sendo inclusive a técnica oficial preconizada pelas Farmacopeias Britânica e Americana para determinação desse fármaco e de suas impurezas relacionadas na substância química de referência, em soluções injetáveis, comprimidos, cápsulas, pomadas e suspensões orais (BP, 2013; USP, 2014).

O emprego de CLAE, como metodologia oficial, pode ser justificado pela alta sensibilidade, seletividade e versatilidade da técnica, uma vez que é capaz de determinar OTC na presença de seus produtos de degradação e impurezas relacionadas (SMYRNIOTAKIS; ARCHONTAKI, 2007; FERNANDEZ-TORRES et al., 2010). Além disso, é a metodologia analítica mais utilizada na indústria farmacêutica para o monitoramento da produção, avaliação da estabilidade e controle de qualidade dos produtos acabados. Todavia, uma importante desvantagem da CLAE é o elevado custo operacional (RODRÍGUEZ, PEZZA; PEZZA, 2016).

Khan e colaboradores (1987) desenvolveram um método por CLAE utilizando uma coluna polimérica como fase estacionária para análise de OTC e

de impurezas relacionadas em produtos farmacêuticos, vindo a servir como modelo para monografia oficial presente na Farmacopeia Europeia (EP, 2012). Contudo, pelo fato desse tipo de coluna fornecer picos largos, a separação cromatográfica entre OTC e suas impurezas relacionadas pode ser pouco eficiente (KAHSAY et al., 2013).

Diversos trabalhos encontrados na literatura demonstraram que a CLAE pode ser empregada com sucesso para determinação de OTC em matrizes biológicas (Tabela 1.2) e produtos farmacêuticos (Tabela 1.3). É válido salientar que as amostras biológicas não devem ser diretamente analisadas por CLAE, sendo necessárias etapas preliminares de processamento para a extração do analito da matriz biológica (*clean-up*). Nesse sentido, antimicrobianos da classe das tetraciclina (TCs) têm sido determinados em fluidos biológicos apenas após a precipitação das proteínas, empregando ácido tricloroacético ou perclórico, acetonitrila ou soluções tamponantes (UDALOVA et al., 2015). Por isso, a análise de OTC e de outras TCs nessas amostras tende a ser trabalhosa, além de onerosa e de difícil reprodução (KNOX; JURAND, 1979; PRABU; SURIYAPRAKASH, 2012).

Tabela 1.2. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em matrizes biológicas.

Matriz biológica	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Detecção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de análise (min)	Referência
Plasma e urina de bovinos, ovinos e suínos	µBondapak Waters™C18 embalada com material de fase octadecilsilano (300 x 4,5 mm)	Isocrático: Fase Móvel A: 0,01 M monohidrato de dihidrogenofosfato de sódio+ 30% acetonitrila em água destilada, pH 2,4 Fase Móvel B: 0,01 M monohidrato de dihidrogenofosfato de sódio + 40% acetonitrila em água, pH 2,4.	UV 355 nm	1,0	~ 5,0	SHARMA; PERKINS; BEVILL,1977
Plasma	Colunas preparadas em laboratório: copolímeros de divinilbenzeno com estireno: Amberlite™ XAD-2 e PRP-1. (100 x 3,0 mm)	Isocrático: Fase Móvel A: acetonitrila: diclorometano 0,2 M tampão acetato (pH 3,6) + 0,025 M EDTA (10:1,0:90, v/v) Fase Móvel B: acetonitrila:diclorometano 0,05 M: tampão acetato (pH 3,6) + 0,025 M EDTA (12,5:1: 87,5, v/v).	UV 268 nm e 357 nm	0,8 (Fase Móvel A) 0,6 (Fase Móvel B)	< 20,0	REEUWIJK; TJADEN, 1986
Plasma de truta arco-íris	Pré-coluna: Cyano Spheri-5 MPLC™ (30 mm x 4,6 mm, 5 µm) Coluna Analítica: Cyano Spheri-5 MPLC™ (100 x 4,6 mm, 5 µm)	0,02 M ácido oxálico (pH 2):metanol: N,N-dimetilformamida (950 : 50: 50, v/v).	UV 350 nm	1,0	4,3	IVERSEN; AANESRUD; KOLSTAD, 1989
Sangue e plasma de bovinos e salmão	Copolímero de poliestireno-divinilbenzeno - PLRP-S™ (150 x 4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:0,005 M ácido heptanossulfônico (sal sódico) com 0,02 M ácido ortofosfórico (23:77, v/v) Gradiente: Fase Móvel A: 0,3 M tampão acetate (pH 6,5) contendo 35 mM cloreto de cálcio e 25 mM de EDTA (tampão A) Fase Móvel B: metanol 0-1,0 min: 67% A e 33% B 1-8,5 min: 45% A e 55% B 8,5 – 15 min: 67% A e 33% B	UV 350 nm	0,70	< 10,0	AGASØSTER; RASMUSSEM, 1991
Tecido de salmão	Capcell™ C18 tipo SG-20 (250 x 4,6 mm, 5µm)		Fluorescência 390 nm (excitação) e 512 nm (emissão)	1,0	~ 5,0	IWAKI; OKUMUR; YAMAZAKI,1992

Continua na próxima página.

Tabela 1.2. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em matrizes biológicas (*continuação*).

Matriz biológica	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Detecção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de análise (min)	Referência
Plasma bovino	Lichrosorb™ C8 (125 x 4 mm, 5 µm)	0,01 M ácido oxálico:metanol: acetonitrila (75:15:10, v/v/v)	UV 357 nm	1,0	~ 4,0	NELIS et al., 1992
Frango, suínos, bovinos e soro sanguíneo da truta arco-íris	Coluna de fase hidrofóbica blindada Hisep™ (150 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna (20 x 4,6 mm), empacotada com o mesmo material	Metanol:0,2M ácido oxálico pH 7,0, ajustado com amônia aquosa a 28% (10:90, v/v).	UV 360 nm	1,0	~ 5,0	UENO, 1992
Soro humano	Capcell™ C18 SG-120 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	metanol:0,1 M tampão acetato de sódio (pH 6,5), contendo 35 mM cloreto de cálcio e 25 mM EDTA (30:70, v/v)	Fluorescência 390 nm (excitação) e 512 nm (emissão)	1,0	~ 5,0	IWAKI; OKUMUR; YAMAZAKI, 1993
Fígado de ovinos e tecidos renais de bovinos	Pré-coluna: suporte polimérico hidrófilo ligado por iminodiacético - Anagel-TSK-Chelate-SPW™ (100 x 6 mm, 10 µm) Coluna Analítica: copolímero de poliestireno-divinilbenzeno- PLRP-S™ (150 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna PLRP-S™ (5 x 3 mm, 5µm)	Gradiente linear: Fase Móvel A: 0,1 M dihidrohenofosfato de potássio aquoso + 0,01 M ácido cítrico + 0,01 M EDTA Fase Móvel B: 0,1 M dihidrogenofosfato de potássio + 0,01 M ácido cítrico + 0,01 M EDTA:metanol: acetonitrila (65:10:25, v/v/v)	UV 350 nm	*	< 25,0	STUBBINGS; TARBIN; SHEARER, 1996
Tecido hepático de bovinos	TSK Gel Octyl™ (100 x 4,6 mm, 2 µm)	acetonitrila:0,05% solução aquosa de ácido trifluoracético (20:80, v/v)	MS-MS m/z 461	0,50	3,90	OKA et al., 1997
Tecido de bovinos, suínos e aves, ovo, leite e produtos marinhos	YMC Pack™ ODS (150 x 6 mm)	tampão fosfato pH 4, contendo EDTA 0,001 M: metanol (77:23, v/v)	Fluorescência 380 nm (excitação) e 520 nm (emissão)	1,0	< 16,0	FUJITA et al., 1997

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

Tabela 1.2. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em matrizes biológicas (*continuação*).

Matriz biológica	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Deteção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de análise (min)	Referência
		Gradiente linear:				
Plasma suíno	Nucleosil™ C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna Pellicular™ ODS (37-53 µm)	Fase Móvel A: 0,01 M ácido oxálico:acetonitrila (90:10, v/v). Fase móvel B: 0,01 M ácido oxálico:acetonitrila (42:58, v/v).	UV 356 nm e 369 nm	0,80	*	WEIMANN; BOJESEN; NIELSEN, 1998
Urina	Comutação de coluna: Coluna 1 (extração): ChromSpher 5 BioMatrix™ (150 x 4,6 mm) Coluna 2 (analítica): Brownlee™ C18, Spheri-5 (30 x 2,1 mm, 5µm)	CLAE 1 (extração): Eluente 1A: 20mM KH ₂ PO ₄ CLAE 2 (analítica): Eluente 2A: 0,1% ácido trifluoracético e eluente 2B: 80% Acetonitrila + 0,1% ácido trifluoracético	UV* EM/EM m/z 426	CLAE 1: 1,0 CLAE 2: 0,3-0,4	< 5,0	WEIMANN; BOJESEN, 1999
Plasma de ovelha	ODS C8*	acetonitrila: água, contendo KH ₂ PO ₄ (0,04 M) com pH 2,5 (10:90, v/v)	UV*	1,0	*	KAYA et al., 2001
Músculo, fígado e rim de bezerro	Copolímero de poliestireno-divinilbenzeno - PLRP-S™ (250 x 4,6 mm, 8 µm) acoplada à pré-coluna do mesmo tipo (5 x 3 mm)	Fase Móvel A: 0,001 M ácido oxálico + 0,5% ácido fórmico + 3% tetrahydrofurano aquoso Fase móvel B: tetrahydrofurano 0–22 min: 100% A; 22,1–30 min: 90% A e 10% B 30,1–37 min: 100% A	EM/EM m/z 443	1,0	37	CHERLET; BAERE; BACKER, 2003
Esterco de suíno	XTerra™ C18 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm) acoplada à pré-coluna XTerra™ C18 (20 x 3,0 mm, 3,5 µm)	Fase Móvel A: 200 mL MeOH + 308 µL ácido fórmico com água Fase Móvel B: 950 mL MeOH + 308 µL ácido fórmico com água 0–3,5 min: 96% A e 4% B, 3,5–5,5 min: 10% A e 90% B, 5,5–13,0 min: 10% A e 90% B, 13,0–13,5 min: gradiente linear até 96% A e 4% B	EM/EM m/z 461 (OTC e EOTC) m/z 443 (α-APOTC e β-APOTC)	0,40	< 12,0	LOKE et al., 2003
Plasma de suíno	OmniSpher™ C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) com cartucho Shimadzu™ C18	acetonitrila: metanol: ácido fórmico pH 2 (17,5:17,5:65, v/v/v)	UV 360 nm	1,4	2,93	KOWALSKI; POMORSKA; SŁAWIK, 2006

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página

Tabela 1.2. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em matrizes biológicas (*continuação*).

Matriz biológica	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Detecção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de análise (min)	Referência
Plasma de suíno	Omni Spher™ C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:metanol:ácido fórmico pH 2	UV 360 nm	1,40	~ 3,0	KOWALSKI; POMORSKA, 2007
Tecido e plasma de gado	LiChrocart™ C18 (125 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna C18 (5 µm)	0,01 M ácido cítrico + 0,01M ortofosfato dipotássico: acetonitrila + 0,005 M cloreto de tetrametilamônio + 0,1 g/L EDTA (72:28, v/v)	UV 365 nm	2,0	*	MESTORINO et al., 2007
Músculo de frango	Zorbax Eclipse™ XDB-Phenyl (150 x 3,0 mm, 3,5 µm), acoplada à pré-coluna Phenomenex C18 (2,0 mm)	Gradiente: Fase Móvel A: 0,1 M malonato + 50 mM Mg ²⁺ pH 6,5, ajustado com NH ₄ OH concentrado Fase Móvel B: metanol 16% B (6 min), 16–40% B (4 min), 40% B (8 min), 40–80% B (3 min), 80% B (2 min), 80–16% B (3 min), 16% B (4 min)	Fluorescência 375 nm (excitação) e 535 nm (emissão)	0,50	~ 5,0	SCHNEIDER et al., 2007
Sangue, plasma e urina de humano	Novapak™ C18 (250 x 4,0 mm, 5 µm)	acetonitrila:trietilamina:tampão de oxalato pH 2,5, ajustado com 0,5 M NaOH (29.5: 0,5: 70, v/v/v)	UV 355 nm	1,0	*	AL-MOMANI; KANAN, 2008
Músculo bovino	Chromolith™ Speed Rod C18 (50 x 4,6 mm)	Gradiente: Fase Móvel A: metanol Fase Móvel B: ácido oxálico 0,01 M (pH 3,0) + 1,5% tetrahydrofurano 0-2,2: 100% B 2,2-3,0: 10% A e 90% B 3,0-6,5: 15% A e 85% B 6,5-10: 100%	DAD 360 nm	4,0 e 4,5	6,64	CRISTOFANI et al., 2009
Urina humana	Phenomenex™ Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna LiChrospher™ 100 C18 (4 x 4 mm, 5µm)	Gradiente: Fase Móvel A: 0,1% ácido fórmico em água Fase Móvel B: acetonitrila 0-7,0 min: fase isocrática 99% A e 1% B 7,0-28min: eluição por gradiente linear de 99% a 70% A e de 1% a 30% B	DAD 280 nm	0,70	18,54	FERNANDEZ-TORRES et al., 2010

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

Tabela 1.2. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em matrizes biológicas (*continuação*).

Matriz biológica	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Deteção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de análise (min)	Referência
Músculo de frango	Pursuit™ C18 (100 x 2,0 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna Polaris™ C18 (2,0 mm, 3 µm)	Gradiente: Fase Móvel A: 0,1% ácido fórmico Fase Móvel B: acetonitrila + 0,1% ácido fórmico 0-3,0 min: 90% A e 10% B 3,0-5,5 min: 25% A e 75% B 5,5 -9,0 min: 90% A e 10% B	EM/EM m/z 461	0,30	< 12,0	UEKANE; NETO; GOMES, 2011
Urina humana	Acquity™ UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) acoplada à pré-coluna XBridge™ C18 (30 x 2,1 mm, 10 µm)	Modo positivo: Metanol e água com 0,1% de ácido fórmico Modo negativo: acetonitrila e água	EM/EM m/z 461	0,30	5,17	WANG et al., 2014
Urina bovina	Raptor™ bifenil (150 x 2,1 mm, 2,7 µm) acoplada à pré-coluna Raptor™ bifenil (5 x 2,1 mm, 2,7 µm)	Gradiente: Fase Móvel A: ácido fórmico aquoso 0,1% Fase Móvel B: metanol 0-5,0 min: 98% A e 2% B 5,0-22 min: 50% A e 50% B 22-29 min: 5% A e 95%	EM/EM m/z 461	0-5 min: 0,10 Restante da corrida: 0,20	*	CHIESA et al., 2015
Esterco de suíno	Kinetex™ C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) com um sistema de cartucho Security Guard Ultra™	Gradiente: Fase Móvel A: água:acetonitrila (95:5, v/v) + 0,5% ácido fórmico + 1% formiato de amônio Fase Móvel B: acetonitrila:0,1% ácido fórmico 0-1,0 min: 95% A e 5% B 1,0-3,0 min: 75% A e 25% B 3,0-7,0 min: 100% 7,0-9,0min: 95% A e 5% B	EM/EM m/z 461	0,40	3,21	MEERSCHÉ et al.,2016

*Dados não disponíveis. OTC: oxitetraciclina; EOTC: epioxitetraciclina; α-APOTC: α-apooxitetraciclina e β-APOTC: β-apooxitetraciclina; DAD:detector de arranjo de fotodiodos; EM/EM: detector de espectrômetro de massas.

Tabela 1.3. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em produtos farmacêuticos.

Produto farmacêutico	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Deteção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de Análise (min)	Referência
SQR e impurezas relacionadas (EOTC e AOTC)	LiChrosorb™ C8 (100 x 4,7 mm, 10 µm)	Isocrático: Fase Móvel A: hidrogenossulfato de tetrabutilamônio 0,5 g/L pH 2,6: acetonitrila (92:8, v/v) Fase Móvel B: hidrogenossulfato de tetrabutilamônio 0,5 g/L pH 2,6: acetonitrila (80:20, v/v)	UV 275 nm	1,0	< 10,0	MOUROT et al., 1980
SQR, cápsulas e comprimidos	Spherisorb™ S5 C8 (200 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada à pré-coluna LiChrosorb™ C8 (30 x 4,5 mm, 10 µm).	oxalato de amônio 0,2 M: Na ₂ EDTA 0,1 M: dimetilformamida (55:20:25, v/v/v)	UV 280 nm	1,0	24,0	BARNES, RAY; BATES, 1985
SQR e impurezas relacionadas (AOTC, EOTC, TC, ADOTC, α-APOTC e β-APOTC)	Copolímero de estireno divinilbenzeno PLRP-S™ (250 x 4,6 mm, 8 µm)	terc-butanol 0,2 M: tampão fosfato pH 8,0: 0,02 M sulfato de tetrabutilamônio: pH 8: 0,0001 M EDTA pH 8: água (5,9:10:5:10:78,1, m/v/v/v/v/v).	UV 254 nm	1,0	< 30,0	KHAN et al., 1987
SQR e cápsulas	Capcell™ C18 tipo SG-120 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	tampão acetato (pH 6,5) 0,1 M, contendo cloreto de cálcio 35 mM + EDTA 25 mM: metanol (45:55, v/v)	Fluorescência 390 nm (excitação) e 512 nm (emissão)	1,0	~ 5,0	IWAKI et al., 1992
SQR e impurezas relacionadas (TC, α-APOTC e β-APOTC), cápsulas e injetável	Coluna A: copolímero de estireno divinilbenzeno PLRP-S™ (250 x 4,6 mm, 5 µm) Coluna B: polímero de polimetacrilato com ligantes C18 PMCIR™ (150 x 4,6 mm, 6 µm)	acetonitrila: perclorato de sódio 0,02 M pH 2,0 (20:80, v/v)	UV 280 nm	1,0	~ 30,0	BRYAN; STEWART, 1994
SQR, comprimidos e pomada	Coluna de carvão empacotado com Hypercarb™ grafite porosa- PGC (100 x 4,6 mm, 7 µm)	tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 2,0: acetonitrila (40:60, v/v)	UV 268 nm	1,0	< 5,0	MONSER; DARGHOUTH, 2000

Continua na próxima página.

Tabela 1.3. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em produtos farmacêuticos (*continuação*).

Produto farmacêutico	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Detecção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de Análise (min)	Referência
SQR, pomadas, pós, comprimidos vaginais e cápsulas	Silasorb™ C8 (250 x 4 mm, 10 µm)	metanol:ácido oxálico 0,01M pH 3,0 (30:70, v/v)	UV 250 nm	0,95	~ 7,0	PAPADOYANNIS; SAMANIDOU; KOVATSI, 2000
SQR e impurezas relacionadas (AOTC, EOTC, TC, ETC, ADOTC, α-APOTC, β-APOTC e TL)	XTerra™ C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático: Fase Móvel A: acetonitrila:hidrogenossulfato de tetrabutylamônio 0,25 M pH 7,5:EDTA 0,25 M pH 7,5: água (11,5:36:16:36,5, v/v/v/v) Fase Móvel B: acetonitrila:hidrogenossulfato de tetrabutylamônio 0,25 M pH 7,5: EDTA 0,25 M pH 7,5: água (34:36:16:14, v/v/v/v).	UV 280 nm	1,0	< 25,0	DIANA et al., 2002
SQR e impurezas relacionadas (EOTC, TC, ETC, ADOTC, α-APOTC e β-APOTC)	XTerra™ MS C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm)	Gradiente: Fase Móvel A: metanol:água (5:95, v/v) com ácido fórmico (0,08 M) Fase Móvel B: metanol:água (95:5, v/v) com ácido fórmico (0,08 M) 0–6 min: 89% A e 11% B 6–11min: gradiente linear de 50% A e 50% B, 11–20 min: 50% A e 50% B 20–25 min: gradiente linear de 89% A e 11%B	EM/EM <i>m/z</i> 461 (OTC e EOTC) <i>m/z</i> 460 (ADOTC) <i>m/z</i> 445 (TC) <i>m/z</i> 426 (α-APOTC e β-APOTC)	0,25	30,0	LYKKEBERG et al., 2004
SQR e impurezas relacionadas (EOTC, TC, α-APOTC e β-APOTC), comprimidos, pós, pomadas e aerossóis	Coluna A: Hypersil BDS™ C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Coluna B: Waters™ C18 Symmetry (150 x 3,9 mm, 5 µm)	Isocrático: Fase Móvel A: metanol:acetonitrila:tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 (12,5:12,5:75, v/v/v) Fase Móvel B: metanol:acetonitrila:tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 (15:15:70, v/v/v)	UV 253 nm	1,0	Coluna A: 15,0 Coluna B: 5,0	SMYRNIOTAKIS; ARCHONTAKI, 2007
SQR e comprimidos	SynergiFusion™ C18 coluna (150 x 4,6 mm; 4 µm)	Gradiente linear: Fase Móvel A: metanol Fase Móvel B: acetonitrila Fase Móvel C: ácido oxálico 5 mM 0–3 min: 9,5% A, 14,5% B e 76% C; 3–10 min: das condições iniciais para 18% A, 30% B e 52% C	UV 277 nm Ressonância (técnica de Rayleigh Scattering): 370 nm (excitação e emissão)	0,80	< 5,0	WANG;PENG, LIU; 2008

Continua na próxima página.

Tabela 1.3. Métodos por CLAE utilizados para a análise de oxitetraciclina em produtos farmacêuticos (*continuação*).

Produto farmacêutico	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Detecção	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo de Análise (min)	Referência
SQR, impurezas relacionadas, pós e injetáveis	Agilent Eclipse™ Plus C18 (50 x 4,6 mm, 1,8 µm)	Gradiente: Fase Móvel A: 0,3% ácido trifluoroacético aquoso Fase móvel B: metanol 0-2 min: 93% A e 7% B 2-14 min: 31% A e 69% B 14-18 min: 100% B	EM/EM m/z 426, 410 e 242	0,40	< 18,0	VUČIČEVIĆ-PRČETIĆ; CSERVENÁK; RADULOVIC, 2011
SQR	Inertsil™ C4 WP-300	100% água	DAD 282 nm	1,0	2,32	FURUSAWA, 2013
SQR, impurezas relacionadas (EOTC, TC, α-APOTC e β-APOTC) e pomadas	Hypersil™ BDS RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:metanol: fosfato dipotássico 80 mM pH 7,5 (17,5: 17,5 : 65 v/v/v)	UV 254 nm	0,7	9,0	GIUGIU, 2013
SQR e impurezas relacionadas (AOTC, EOTC, ADOTC, α-APOTC e β-APOTC)	Inertsil™ C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente: Fase Móvel A: 0,05% ácido trifluoroacético pH 2,2 Fase Móvel B: acetonitrila:metanol: tetra-hidrofurano (80:15:5, v/v/v) 0-5min: 90% A e 10% B 5-20min: 65% A e 35% B 20-25min: 90% A e 10% B	UV 254 nm	1,3	~ 17,0	KAHSAY et al., 2013
Pós veterinários	Nucleosil™ C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	fosfato monobásico de potássio 5 mM pH 2,5: metanol:acetonitrila (70:18:12, v/v/v)	UV 254 nm	1,1	4,15	TAUBER; CHIURCIU, 2014

SQR: Substância Química de Referência; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; EOTC: 4-epioxitetraciclina; ADOTC: Acetil-2-decarboxamido-oxitetraciclina TC: tetraciclina; AOTC: anidro-oxitetraciclina; α-APOTC: α-apo-oxitetraciclina; β-APOTC: β-apo-oxitetraciclina; UV: Ultravioleta; DAD: detector de arranjo de fotodiodos; EM/EM:detector de espectrômetro de massas.

1.2.2.6.2. Cromatografia Planar

A cromatografia em papel foi o primeiro método cromatográfico planar descrito na literatura para determinação de OTC na presença de seus produtos de degradação (SINA et al., 1971). A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) tradicional e a CCD combinada com quantificação densitométrica têm sido descritas para análise quali e quantitativa de OTC em produtos farmacêuticos (KRZEK et al., 2000; WENG et al., 1990). Todavia, algumas dificuldades são encontradas durante a execução desses experimentos, uma vez que a OTC pode complexar-se com íons metálicos adsorvidos na superfície da sílica gel, dificultando a separação cromatográfica. Para evitar esse problema, frequentemente, agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), citrato, oxalato e fosfato são adicionados à fase móvel ou aspergidos sobre a fase estacionária (WENG et al., 1990).

Devido às limitações mencionadas para o emprego de sílica gel na análise de OTC por CCD, alguns autores recomendam a utilização de fases estacionárias que não apresentam sítios de interação com o analito que dificultam a separação cromatográfica. Como exemplo de utilização de uma fase estacionária alternativa, Yuwono e Indrayanto (2005) descreveram em seu trabalho de revisão o emprego da celulose eluída com mistura de álcool isopropílico:acetona:água (75:15:15, v/v/v) para análise de OTC em amostras biológicas.

Meisen e colaboradores (2010) propuseram um método por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) acoplada à Espectrometria de Massas (EM) para análise e identificação de OTC e outras TCs em matérias-primas farmacêuticas. Foram utilizadas placas 10 x 10 cm e testadas duas fases estacionárias: sílica gel normal e fase reversa (RP-18W) preparadas sob um suporte de vidro nas espessuras de 0,20 e 0,25 mm, respectivamente. As placas de sílica gel normal foram eluídas em mistura de clorofórmio: metanol: EDTA 5% (13:4:1 ou 10:4:1, v/v/v). Por outro lado, as placas RP-18W foram desenvolvidas em metanol:acetonitrila:ácido oxálico 0,5 M pH 2,5 (1:1:4, v/v/v). As placas RP-18W permitiram a análise mais eficiente das TCs quando comparadas às de sílica gel normal.

1.2.2.6.3. Espectrofotometria

Vários métodos espectrofotométricos encontram-se descritos na literatura para determinação de OTC em amostras biológicas e produtos farmacêuticos. Esses métodos são baseados em análise derivativa (SALINAS, NEVADO; SPINOSA, 1989; SALINAS; MANSILLA; NEVADO, 1991; TORAL et al., 2011; TORAL et al., 2015), absorção no infravermelho (SZLYK; MARZEC; KOTER, 2007), fluorescência (SALINAS; LA PEÑA; MERÁS, 1990; CARLOTTI; FUOCO; ELISEI, 2010) e técnicas de calibração multivariada (GALLEGO; ARROYO, 2002).

Métodos espectrofotométricos fundamentados em reações colorimétricas que empregam reagentes oxidantes ou quelantes também são frequentemente utilizados para análise de OTC em diversas matrizes (PRIYA; RADHA, 2014). A reação de OTC com esses reagentes resulta em um complexo colorido, permitindo sua determinação, principalmente, na região do visível (400 a 750 nm). Dentre os reagentes colorimétricos empregados para a quantificação de OTC em amostras biológicas e farmacêuticas têm-se: vanadato de amônio (ABDEL-KHALEK; MAHROUS, 1983), cobaltinitrito de sódio (MAHROUS; ABDEL-KHALEK, 1984), molibdato de amônio (MORELLI; PELUSO, 1985), aminoantipirina (AYAD; EL-SADEK; MOSTAFFA, 1986), íons férrico (SULTAN; ALZAMIL; ALARFAJ, 1988), molibdato de sódio (JELIKIĆ-STANKOV et al., 1989), cloreto cúprico (SAHA, 1989), uranil acetato (SAHA et al., 1990), difenil-1-picrihidrazil (EMARA; ASKAL; SALEH, 1991), urânio VI (RAO et al., 1996), ácido cloranílico (FAHELELBOM, 2008) e zircônio IV (PRASAD; RAO, 2010). No entanto, o uso desses reagentes em análises químico-farmacêuticas apresenta algumas desvantagens, tais como: baixa sensibilidade, necessidade de aquecimento ou resfriamento, toxicidade e geração de resíduos de solventes orgânicos (RODRÍGUEZ et al., 2016).

Os métodos espectrofotométricos encontrados na literatura para determinação de OTC em diversas matrizes encontram-se descritos na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Métodos espectrofotométricos utilizados para análise de oxitetraciclina em várias matrizes.

Matriz	Método	Solvente	λ (nm)	Limite de detecção	Coefficiente de correlação	Linearidade	Recuperação (%)	Referência
SQR e Medicamentos (cápsula e pó)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com vanadato de amônio	solução de vanadato de amônio em ácido sulfúrico	750	*	*	20 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	*	ABDEL-KHALEK; MAHROUS, 1983
Medicamentos (cápsula e pó)	Reação colorimétrica com cobaltinitrito de sódio	Solução de cobaltinitrito de sódio em ácido acético aquoso	294	*	0,9999	10 – 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$	99 – 102	MAHROUS; ABDEL-KHALEK, 1984
SQR e Medicamentos (cápsula)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com molibdato de amônio	solução de molibdato de amônio em 50% v/v de ácido sulfúrico	670	0,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,9996	*	*	MORELLI; PELUSO, 1985
Medicamentos (solução injetável)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com aminoantipirina	água, aminoantipirina, ferricianeto de potássio e clorofórmio	440	*	*	40 – 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98 – 101	AYAD; EL-SADEK; MOSTAFFA, 1986
SQR e Medicamentos (cápsula)	Absorção no VIS: reação de complexação com ferro (III)	ácido sulfúrico e solução de sulfato de amônio férrico	435	*	*	10 – 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	103	SULTAN; ALZAMIL; ALARFAJ, 1988
Medicamentos (cápsula e solução injetável), urina e mel	Espectrofotometria derivativa (derivada de primeira ordem)	água e tampão acetato de sódio – ácido acético pH 3,8	medicamentos: 343 and 376 urina: 376 mel: 352	*	0,9999 e 1.0000	*	Medicamentos: 105 – 107 Urina: 100 – 110 Mel: 103 – 109	SALINAS et al., 1989
Medicamentos (cápsula)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com molibdato de sódio	água, molibdato de sódio, nitrato de sódio e tampão acetato pH 5,5	404	2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,9997	2.50 – 34,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$	*	JLIKIĆ-STANKOV et al., 1989

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

Tabela 1.4. Métodos espectrofotométricos utilizados para análise de oxitetraciclina em várias matrizes (*continuação*).

Matriz	Método	Solvente	λ (nm)	Limite de detecção	Coefficiente de correlação	Linearidade	Recuperação (%)	Referência
Medicamentos (pó, solução injetável, cápsula, comprimido, suspensão e pomada)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com acetato de uranilo	acetato de uranilo em solução de dimetilformamida	406	*	0,9998	0 – 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98 – 103,5	SAHA et al., 1990
Medicamentos (solução injetável)	Fluorimetria primeira derivada	tampão ácido cloroacético – cloroacetato pH 3,8 e cloreto de alumínio 0,8 M	λ_{ex} : 390 λ_{em} : 500	$2,0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$	0,9997	0,05 – 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$	99,5	SALINAS et al., 1990
Mel	Espectrofotometria derivativa (derivada de quarta ordem)	tampão acetato pH 3,8	363	*	0,9980	*	89 – 109	SALINAS et al., 1991
Medicamentos (cápsula)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com DHP em MeOH	tampão acetato pH 6, DHP e MeOH	520	*	0,9976	2,5 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	99,9	EMARA; ASKAL; SALEH, 1991
Medicamentos	Absorção no VIS: colorimétrico com urânio (VI)	água, solução tampão pH 6 e 0,01M urânio (VI)	413	*	*	*	99 – 102	RAO et al., 1996
SQR e Medicamentos (pomada)	Espectrofotometria derivativa (derivada de primeira e segunda ordem)	água: etanol: tampão acetato pH 4,5 (79:16:5, v/v/v)	derivada de primeira ordem: 253,4 derivada de segunda ordem: 286	derivada de primeira ordem: $1,85 \times 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ derivada de segunda ordem: $2,16 \mu\text{g mL}^{-1}$	derivada de primeira ordem: 0,9996 derivada de segunda ordem: 0,9999	2,0 – 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$	95 – 105	GALLEGO; ARROYO, 2002

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

Tabela 1.4. Métodos espectrofotométricos utilizados para análise de oxitetraciclina em várias matrizes (*continuação*).

Matriz	Método	Solvente	λ (nm)	Limite de detecção	Coefficiente de correlação	Linearidade	Recuperação (%)	Referência
SQR	Infravermelho próximo (IV), combinada com o método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS)	água	**	0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>IV</i> : 0,9984 <i>PLS</i> : 0,9678	1,0 – 6,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	95,47	SZLYK; MARZEC; KOTER, 2007
SQR e Medicamentos (cápsula e solução injetável)	Absorção no VIS: reação colorimétrica com ácido cloranílico	MeOH, tampão borato pH 9, ácido cloranílico e MeCN	540	0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,9989	5,0 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	99 – 101	FAHELELBOM, 2008
SQR, Medicamentos e urina	Absorção no VIS: reação colorimétrica com zircônio (IV)	solução tampão pH 3, solução zircônio (IV) e água	413,6	*	0,9994	1,0 – 33,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98 – 102	PRASAD; RAO, 2010
SQR	Absorção no UV e fluorescência	água, MeCN, DMSO e EtOH	λ_{abs} : 269 e 354 (H ₂ O); 265 e 364 (MeCN); 265 e 360 (DMSO); 266 e 362 (EtOH) λ_{em} : 515 (H ₂ O)	*	*	*	*	CARLOTTI; FUOCO; ELISEI, 2010
Alimento para peixes	Espectrofotometria derivativa (derivada de primeira ordem)	tampão fosfato pH 7 na presença de EDTA 0,1 M	382,2	5,77 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	0,9992	1,88 x 10 ⁻⁵ – 0,1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	89 – 123	TORAL et al., 2011
Músculo e pele de salmão	Espectrofotometria derivativa (derivada de segunda ordem)	ácido oxálico em MeOH	393	271,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	> 0,997	8,0 – 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$	90 – 105	TORAL et al., 2015

*Dados não disponíveis; **Número de onda: 6200-5500 cm⁻¹; λ : comprimento de onda; DHP: 2,2-difenil-1-picrilhidraxil; DMSO: dimetil sulfóxido; EDTA: ácido etilenediaminotetracético; EtOH: etanol; MeCN: acetonitrila; MeOH: metanol; SQR: Substância Química de Referência; UV: ultravioleta; VIS: visível.

1.2.2.6.4. Análise por Injeção em Fluxo

Análise por Injeção em Fluxo (FIA) é uma técnica amplamente utilizada em análises químico-farmacêuticas e pode ser definida como um processo automatizado, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido carreador que a transporta em direção ao detector. Durante o transporte a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas ou passar por etapas de separação e concentração (REIS; GUINÉ; KRONKA, 1989; WASEEM; YAQOOB; NABI, 2013). A FIA é geralmente acoplada a outras técnicas analíticas que funcionam como sistemas detectores, sendo a quimioluminescência e a espectrofotometria as mais comumente utilizadas.

A FIA acoplada à quimioluminescência é uma poderosa ferramenta de análise, que possui não só as vantagens de automação, miniaturização, versatilidade e baixo custo operacional, mas também alta sensibilidade e ampla faixa de linearidade (WASEEM; YAQOOB; NABI, 2013). Tais vantagens têm aumentado o uso dessa técnica na análise e controle de qualidade de medicamentos. Por exemplo, a aplicação de FIA acoplada à quimioluminescência tem sido descrita para determinação de OTC em produtos farmacêuticos de uso veterinário (HALVATZIS; TIMOTHEOU-POTAMIA; CALOKERINOS, 1993; ZHANG et al., 1995; ZHENG; MEI; ZHANG, 2001; TOWNSHEND et al., 2005) e humano (ANASTASOPOULOS; TIMOTHEOU-POTAMIA, 2011).

A FIA acoplada à espectrofotometria no UV também é uma técnica bastante popular entre os analistas químico-farmacêuticos (TZANAVARAS; THEMELIS, 2007). No entanto, ao desenvolver um método de FIA que emprega detecção espectrofotométrica é necessário atenção na escolha do fluido carreador, uma vez que, dependendo do solvente escolhido, pode haver interferência na análise (efeito matriz), precipitação e entupimento dos canais de fluxo. Por essas razões, os solventes orgânicos etanol e metanol são frequentemente recomendados como carreadores em FIA (TZANAVARAS; THEMELIS, 2007; CAN; ALTIOKKA; ABOUL-ENEIN, 2006; YENICELI; DOGRUKOL-AK; TUNCEL, 2005).

A análise de OTC em produtos farmacêuticos por FIA com detecção espectrofotométrica também é encontrada na literatura (ALWARTHAN;

AL-TAMRAH; SULTAN, 1991; KARLÍČEK; SOLICH, 1994; MEDINA et al., 2000; AL-MOMANI; KANAN, 2008; RUFINO et al., 2009). Recentemente, Rodríguez e colaboradores (2016) desenvolveram um método por injeção em fluxo contínuo acoplado com detector espectrofotométrico para determinação de OTC em medicamentos veterinários. A metodologia analítica proposta foi baseada na reação entre o fármaco e o ácido *p*-sulfanílico diazotizado, em meio básico, resultando na formação de compostos de coloração laranja com máximos de absorvância em 434 nm. As vantagens do método desenvolvido incluem a simplicidade operacional, a alta frequência de amostragem (52 amostras por hora) e a geração mínima de resíduos aquosos que podem ser facilmente tratados (RODRÍGUEZ et al., 2016).

É válido mencionar que o acoplamento de FIA a detectores amperimétricos (PALAHARN et al., 2003) e potenciométricos (COUTO et al., 1998) também foi descrito na literatura para análise de OTC em produtos farmacêuticos de uso veterinário e humano. Esses métodos mostraram sensibilidade e reprodutibilidade para análise de OTC e outras TCs nessas matrizes.

1.2.2.6.5. Eletroforese Capilar

Nos últimos anos, a Eletroforese Capilar (EC) configurou-se como uma técnica amplamente utilizada em análises farmacêuticas devido à sua alta resolução à necessidade de um volume muito pequeno da amostra (YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

Conforme mencionado por Mamani e colaboradores (2006), a EC tem sido empregada para determinação de TCs e suas impurezas relacionadas em produtos farmacêuticos, utilizando diversos eletrólitos como, por exemplo, fosfato, polietilenoglicol, éter terc-octilfenil, tris-(hidroximetil) aminometano, carbonato de sódio, EDTA, ácido cítrico e alanina (TAVARES; MCGUFFIN, 1994; LI et al., 1996; VAN SCHEPDAEL et al., 1996; PESEK; MATYSKA, 1996; LI et al., 1997; GIL et al., 2000).

Tjørnelund e Hansen (1997) desenvolveram um método de EC para análise de OTC em pomadas. O fármaco foi separado, em meio não aquoso, de suas impurezas relacionadas e/ou seus produtos de degradação, utilizando íons Al^{+3} como agente complexante e detector de fluorescência. Esses autores

verificaram que três fatores são importantes para a escolha do agente de complexação utilizado na análise, isto é, o complexante deve ser solúvel no solvente orgânico utilizado, apresentar taxa de complexação suficientemente rápida para não afetar a separação eletroforética e, por último, proporcionar o aumento da intensidade de fluorescência do analito.

Mamani e colaboradores (2006) validaram um método de EC para quantificação da OTC e outras TCs em produtos farmacêuticos, usando um modelo de planejamento experimental para analisar a influência de alguns parâmetros experimentais, tais como: a composição, o pH e a concentração dos eletrólitos, a temperatura e a voltagem aplicada. As condições ideais para análise dos antibióticos foram: solução eletrolítica composta por carbonato de sódio 50 mmol L^{-1} e EDTA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 10), voltagem de 13 kV e temperatura de $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finalmente, a utilização da EC acoplada com detecção voltamétrica também encontra-se descrita na literatura para separação e determinação de OTC e outras TCs. Nesse método foi utilizado como agente complexante solução tampão de tetraborato de sódio - ácido bórico pH 8,7, que forneceu uma boa resolução entre os compostos analisados (ZHOU et al., 1999).

1.2.2.6.6. Quimioluminescência

De acordo com Han, He e Zeng (2000), tem aumentado, nas últimas décadas, o interesse pela utilização da quimioluminescência (CL) para a determinação de OTC em matrizes farmacêuticas devido aos seus baixos limites de detecção e à possibilidade de analisar amplas faixas de concentração. Os mesmos autores propuseram um método de quimioluminescência utilizando o tris (2,2-bipiridina) rutênio (II), um versátil reagente empregado em CL, para a quantificação de OTC em formulações comerciais. O método desenvolvido mostrou-se linear, preciso e sensível com limite de detecção de $0,02 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$.

É válido mencionar que OTC, clortetraciclina e metaciclina apresentam emissão fraca de radiação eletromagnética na presença de cátions divalentes. Essa emissão de radiação eletromagnética é acompanhada da formação de espécies eletricamente excitadas e radicais livres que podem causar danos

celulares como, por exemplo, rupturas no DNA, peroxidação de lipídios e destruição de enzimas (KRUK et al., 1992).

1.2.2.6.7. Métodos Microbiológicos

A atividade dos antibióticos (potência) pode ser demonstrada através da avaliação de sua capacidade em inibir o crescimento de determinados micro-organismos, seguida da comparação da capacidade inibitória de um padrão de referência preparado nas mesmas condições experimentais. Geralmente, os métodos de difusão em ágar e a turbidimetria são empregados nessas análises microbiológicas (USP, 2015). É válido mencionar que, embora os métodos microbiológicos sejam simples, versáteis e de baixo custo operacional, podem apresentar algumas desvantagens com o longo tempo de execução do procedimento experimental, baixa sensibilidade e especificidade (YUWONO; INDRAYANTO, 2005).

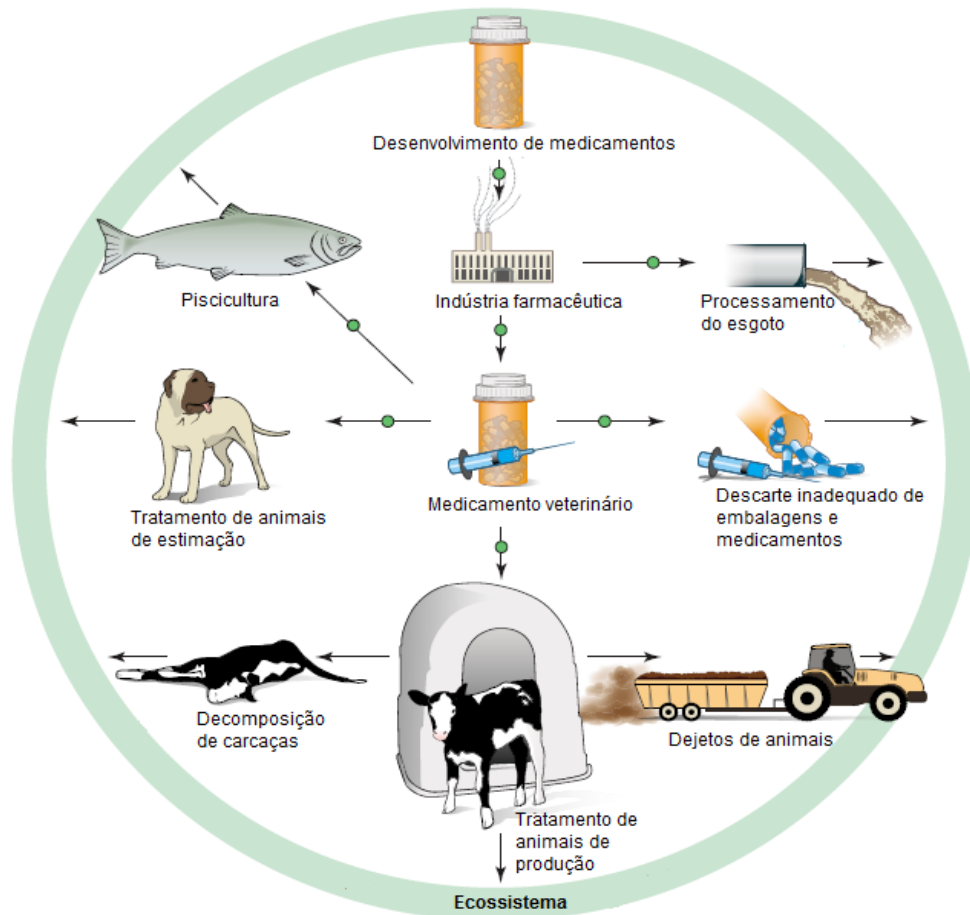
Todavia, apesar das desvantagens anteriormente mencionadas, a Farmacopeia Americana recomenda o emprego de ensaios microbiológicos como metodologia oficial para a avaliação da qualidade de medicamentos (pomadas, suspensões orais ou cápsulas) contendo OTC associada à nistatina, à hidrocortisona ou à polimixina B (USP, 2015). Adicionalmente, encontra-se descrito na literatura um método microbiológico desenvolvido por Limpoka e colaboradores (1987) para a determinação de OTC em plasma de elefante após a administração intravenosa e intramuscular da solução injetável Terramicina®.

1.3. MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMO POTENTES POLUENTES AMBIENTAIS

No Brasil, a venda de medicamentos de uso veterinário não exige controle especial junto aos órgãos fiscalizadores, como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Desse modo, apesar dos benefícios que esses medicamentos exercem sobre a saúde animal, a facilidade de acesso e a falta de controle rigoroso na comercialização são responsáveis pelo consumo exagerado, sobretudo de antimicrobianos, o que pode ocasionar, dentre outras consequências, a contaminação ambiental (MARGALIDA et al., 2014).

Conforme ilustrado na Figura 1.5, os resíduos de medicamentos veterinários podem atingir o ecossistema aquático e terrestre através de vários caminhos.

Figura 1.5. Vias de eliminação de medicamentos de uso veterinário no ecossistema aquático e terrestre. Os pontos (●) indicam as principais vias nas quais o controle pode prevenir ou minimizar a contaminação ambiental.



Fonte: Adaptado de MARGALIDA et al., 2014.

Alguns produtos farmacêuticos para uso animal, após sua administração, são excretados na forma inalterada ou como metabólitos ativos, podendo acumular-se e exercer sua ação sobre os organismos vivos presentes no ambiente (KÜMMERER; AL-AHMAD; MERSCH-SUNDERMANN, 2000). Outra forma de contaminação ambiental por medicamentos de uso veterinário se dá através do descarte inadequado de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas durante o processo de produção, de embalagens, de medicamentos inutilizados ou sobras, e ainda por meio da eliminação de dejetos pelos animais ou durante utilização desses dejetos como fertilizantes em solos aráveis (BOXALL, 2004; CARLSSON et al., 2006; CELIZ; TSO; AGA, 2009).

Também pode ocorrer contaminação das fontes de água por aplicação direta do medicamento, como acontece na piscicultura (BOXALL, 2004; CARLSSON et al., 2006; MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009). É ainda necessário considerar a hipótese de acontecer a liberação de medicamentos no ambiente através da decomposição de carcaças de animais que estavam sob tratamento (MARGALIDA et al., 2014).

Uma vez no ambiente, os resíduos de medicamentos de uso veterinário podem ser tóxicos para plantas e animais (GUINEA et al., 2009; BÁRTÍKOVÁ; PODLIPNÁ; SKÁLOVÁ, 2016; AGA et al., 2016). Os antimicrobianos, particularmente, afetam o sistema endócrino de peixes e acarretam o surgimento de resistência bacteriana que ocorre quando os micro-organismos são expostos aos resíduos de antimicrobianos presentes em matrizes ambientais e sofrem modificações genéticas, tornando o tratamento farmacológico ineficiente (REYES et al., 2006; MITCHELL, et al., 2015).

De acordo com Oaks e colaboradores (2004), a presença de resíduos de diclofenaco em carcaças de bovinos foi a principal causa de morte, por intoxicação renal aguda, de espécies de abutres que se alimentavam dessas carcaças, o que resultou na quase extinção dessas aves na década de 1990 no Paquistão. Por esse motivo, governos de alguns países como Índia, Paquistão, Nepal e Bangladesh proibiram, em 2006, a produção, importação e venda de produtos de uso veterinário contendo diclofenaco (MARGALIDA et al., 2014).

Hawker, Cropp e Boonsaner (2013) relataram a bioconcentração de antimicrobianos, incluindo OTC, clortetraciclina e norfloxacino, em raízes de arroz. Além disso, tem sido demonstrada a presença de OTC em diversas plantas aquáticas destinadas ao consumo humano que foram contaminadas após a fertilização com esterco suíno (BOONSANER; HAWKER, 2013; BOONSANER; HAWKER, 2015; AGA et al., 2016).

Diante desse cenário alarmante de contaminação ambiental por produtos farmacêuticos, principalmente medicamentos veterinários, existem descritos na literatura diversos estudos que empregam metodologias analíticas para quantificar os resíduos dessas substâncias em amostras ambientais (BOTELHO; MONTEIRO; TORNISIELO, 2017). Como exemplo, menciona-se a quantificação de OTC por Li e colaboradores (2008) em águas residuárias do norte da China por CLAE acoplada à Espectrometria de Massas (EM). A CLAE

também foi empregada por pesquisadores africanos que constaram a presença de altas concentrações de OTC em águas de rios (OLATUNDE et al., 2014; DZOMBA, KUGARA; ZARANYIKA, 2015).

Gentili (2007) demonstrou, em seu trabalho de revisão, que diversos métodos cromatográficos e eletroforéticos têm sido descritos na literatura para determinação de AINEs e seus metabólitos em diversas matrizes ambientais. Kuo e colaboradores (2010) utilizaram a Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão para quantificar dez AINEs, entre eles diclofenaco e piroxicam, em diversas amostras de rios e lagos.

Assim sendo, pode-se dizer que nos últimos anos tem aumentado a preocupação e o interesse da comunidade científica em relação aos efeitos dos medicamentos no ambiente, uma vez que esses estão entre os principais contaminantes ambientais da atualidade (BOTELHO; MONTEIRO; TORNISIELO, 2017).

1.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS

O termo citotoxicidade significa efeitos tóxicos, isto é, morte, alterações na permeabilidade da membrana, inibição enzimática em nível celular (ROGERO et al., 2003; CODEVILLA et al., 2013). De acordo com a Organização Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer substância para uso *in vivo*. Após comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, sendo realizados os ensaios necessários em animais de laboratório (ISO, 2009).

Encontram-se descritos na literatura métodos para avaliar a citotoxicidade *in vitro* de produtos de degradação de fármacos ou medicamentos utilizando-se culturas celulares (MENDEZ et al., 2008; STENGER, 2011; CAVALCANTE et al., 2013; CODEVILLA et al., 2013). Esses ensaios de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, tais como:

através da incorporação de corantes vitais (tais de tetrazólio, vermelho neutro, sulforrodamina B, etc) ou da inibição da formação de colônias celulares (CRUZ et al., 1987; ROGERO et al., 2003).

O parâmetro mais utilizado nos testes de citotoxicidade *in vitro* é a avaliação da viabilidade celular que pode ser evidenciada com auxílio de um corante vital, o qual atravessa a membrana celular e concentra-se nos lisossomos. Caso exista toxicidade celular, as substâncias tóxicas danificarão as membranas, causando o decréscimo da captura e ligação do corante. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996; ROGERO et al., 2003).

O ensaio de liberação da desidrogenase láctica também pode ser empregado para avaliação da citotoxicidade *in vitro* de produtos farmacêuticos. Trata-se de uma técnica de custo acessível, fácil execução e reprodução (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; JURISIC; BUMBASIREVIC, 2008). A enzima lactato desidrogenase, presente no citoplasma celular, é liberada para o meio extracelular quando a membrana é danificada (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Portanto, pode-se inferir que o monitoramento *in vitro* do potencial tóxico das formulações farmacêuticas, de suas impurezas relacionadas ou de seus produtos de degradação é muito importante para garantir a segurança e a eficácia do medicamento *in vivo* (ICH, 2006). Além disso, testes de citotoxicidade *in vitro* permitem complementar as informações obtidas nos ensaios de degradação forçada, de estabilidade acelerada e de longa duração de fármacos e medicamentos.

7.3. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através das técnicas termoanalíticas e da espectrofotometria na região do infravermelho sugerem que existem interações físico-químicas entre as associações de fármacos presentes nas soluções injetáveis empregadas neste estudo, sendo observado que nas misturas binárias houve a diminuição da estabilidade térmica dos anti-inflamatórios não esteroidais em relação aos fármacos isolados, além da provável formação de misturas eutéticas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As matérias-primas de oxitetraciclina, diclofenaco de sódio e piroxicam foram caracterizadas através de diversas técnicas analíticas, tais como: cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta e infravermelho, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Portanto, essas matérias-primas podem ser seguramente utilizadas como substâncias químicas de referência durante o desenvolvimento e validação de métodos analíticos empregados na rotina do controle de qualidade de medicamentos.
- Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta, para quantificação simultânea de oxitetraciclina associada ao diclofenaco de sódio ou ao piroxicam em medicamentos veterinários. Esses métodos mostraram-se precisos, exatos e robustos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre eles. Além disso, o método por cromatografia líquida de alta eficiência pode ser considerado indicativo de estabilidade, uma vez que permitiu uma separação satisfatória entre os fármacos e seus produtos de degradação.
- Foi proposto um protocolo experimental detalhado para realização do estudo de degradação forçada de fármacos em associação, sendo observado que as cinéticas de degradação dos fármacos variaram de acordo com sua estabilidade intrínseca frente às condições degradativas empregadas. Foram identificados seis produtos de degradação por espectrometria de massas. Dois dos seis produtos de degradação (PD 4 e PD 5) se repetiram em mais de uma condição degradativa e tiveram como precursor o fármaco oxitetraciclina. O PD 4 foi inativo para linhagem celular NIH/3T3, enquanto o PD 5 apresentou atividade citotóxica moderada.

- Os resultados do ensaio de estabilidade acelerada e de longa duração demonstraram que os fármacos presentes são termicamente instáveis e que as condições de estocagem preconizadas pelos fabricantes devem ser seguidas a fim de evitar a degradação dos mesmos. Além disso, na maioria das situações, as reações de degradação seguiram a lei cinética de ordem zero, o que significa que a decomposição dos fármacos acontece a uma velocidade constante, independente de suas concentrações iniciais.
- As análises das misturas binárias, através das técnicas termoanalíticas e da espectrofotometria na região do infravermelho, sugeriram existir interações físico-químicas entre os fármacos presentes nas soluções injetáveis empregadas neste estudo.
- Os resultados deste trabalho ressaltam a importância do desenvolvimento e validação de métodos analíticos confiáveis, rápidos e de fácil execução que possam ser empregados na rotina de controle de qualidade a fim de garantir a segurança e eficácia dos medicamentos. Adicionalmente, os estudos de degradação forçada, estabilidade acelerada e de longa duração, além de auxiliarem na seleção das condições de embalagem e armazenamento dos medicamentos, possibilitaram prever alguns produtos de degradação que podem estar presentes no ambiente.

REFERÊNCIAS

ABDEL-KHALEK, M.M.; MAHROUS, M.S. Spectrophotometric determination of tetracyclines and cephalosporins with ammonium vanadate. **Talanta**, v.30, p.792-794, 1983.

ADAWAL, D.A.Y.; HASSAN, A.Z.; ADBULLAHL, A.B.; OGUNKOYAL, A.B.; ADEYANJUL, J.B.; OKORO, J.E. Clinical trial of a long-acting oxytetracycline and piroxicam in the treatment of canine ehrlich. **The Veterinary Quarterly**, v.15, p.118-20, 1992.

AGA, D.S.; LENCZEWSKI, M; SNOW, D.; MUURINEN, J.; BRETT SALLACH, J.; WALLACE, J.S. Challenges in the measurement of antibiotics and in evaluating their impacts in agroecosystems: a critical review. **Journal of Environmental Quality**, v.1, p.407-419, 2016.

AGASØSTER, T.; RASMUSSEM, K.E. Fully automated high-performance liquid chromatographic analysis of whole blood and plasma samples using on-line dialysis as sample preparation. **Journal of Chromatography**, v.570, p.99-107, 1991.

AGÜERA, A.; PÉREZ ESTRADA, L.A.; FERRER, I.; THURMAN, E. M.; MALATO, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. **Journal of Mass Spectrometry**, v.40, p.908-915, 2005.

AGUIAR, F.A.; MALVAR, D.C.; KANASHIRO, A.; SEOANE, M.F.; CUFFINI, S. L.; SOUZA, G.E.P.; GAITANI, C.M. Determination of diclofenac sodium in rabbit plasma by HPLC/UV: Evaluation and characterization of its crystalline forms anhydrous and hydrate on the antipyretic effect. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.35, n.17, supl.1, Part 3, p.2408-2424, 2012.

AGWUH, K.N.; MACGOWAN, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.256-265, 2006.

AL-MOMANI, I.F.; KANAN, S.J. Flow-injection spectrophotometric and LC determination of doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline in biological fluids and pharmaceutical preparations. **Journal of Flow Injection Analysis**, v.25, p.29-34, 2008.

ALWARTHAN, A.A.; AL-TAMRAH, S.A.; SULTAN, S.M. Spectrophotometric determination of oxytetracycline by flow injection. **Analyst**, v.116, p.183-186, 1991.

ANASTASOPOULOS, P.; TIMOTHEOU-POTAMIA, M. Chemiluminescence determination of tetracyclines via aluminum sensitized fluorescence. **Analytical Letters**, v.44, p.25-37, 2011.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN-JÚNIOR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Washington, DC, 2005.

ARAÚJO, G.L.B; PITALUGA-JÚNIOR, A.; ANTONIO, S.G.; SANTOS, C.O.P.; MATOS, J.R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p.27-36, 2012.

ASSASSI, A.L.; ROY, C.E.; PEROVITCH, P.; AUZERIE, J.; HAMON, T.; GAUDIN, K. Green analytical method development for statin analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1380, p.104-111, 2015.

AULTON, M. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2016.

AYAD, M.; EL-SADEK, M.; MOSTAFFA, S. 4-Aminoantipyrine as an analytical reagent for the colorimetric determination of tetracycline and oxytetracycline. **Analytical Letters**, v.19, p.2169-2181, 1986.

BAERTSCHI, S.W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. 2. ed. Colchester: Informa Healthcare, 2011.

BARNES, W.N.; RAY, A.; BATES, L.J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the assay of oxytetracycline. **Journal of Chromatography**, v.347, p.173-178, 1985.

BÁRTÍKOVÁ, H.; PODLIPNÁ, R.; SKÁLOVÁ, L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. **Chemosphere**, v.144, p.2290-2301, 2016.

BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, P.; ANTONIELLA, E.; RODOMONTE, A. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.1105-1113, 2006.

BASAN, H.; GÖĞER, N.G.; ERTAS, N.; ORBEY, M.T. Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam- β -cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.26, p.171-178, 2001.

BISWAS, A.K.; RAO, N.; KONDAIAH, N.; ANJANEYULU, A.S.R.; MENDIRATTA, S. K.; PRASAD, R.; MALIK, J.K.A. Simple multi-residue method for determination of oxytetracycline, tetracycline and clortetracycline in export buffalo meat by HPLC-Photodiode Array Detector. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.15, p.278-284, 2007.

BOONSANER, M.; HAWKER, D.W. Evaluation of food chain transfer of the antibiotic oxytetracycline and human risk assessment. **Chemosphere**, v.93, p.1009-1014, 2013.

BOONSANER, M.; HAWKER, D.W. Transfer of oxytetracycline from swine manure to three different aquatic plants: Implications for human exposure. **Chemosphere**, v.122, p.176-182, 2015.

BOTELHO, R.G.; MONTEIRO, S.H.; TORNISIELO, V.L. Veterinary antibiotics in the environment. **Creative Commons**, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/60847>. Acesso em: 18 de outubro de 2017.

BOXALL, A.B.A. The Environmental side effects of medication. **EMBO Reports**, v.5, p.1110-1116, 2004.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 2013. v. I.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de tratamento estatístico para validação analítica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2017b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 166 de julho de 2017: validação de métodos analíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2017a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 ago. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 19 de novembro de 2017.

BRITAIN, H.G. Methods for the characterization of polymorphism and solvates. In: BRITAIN, H. G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, v.95, cap.6, p.227-278, 1999.

BRYAN, P.D.; STEWART, J.T. Chromatographic analysis of selected tetracyclines from dosage forms and bulk drug substance using polymeric columns with acidic mobile phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.12, p.675-692, 1994.

BUGAY, D.E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, p.43-65, 2001.

CALARGE, F.A.; SATOLO, E.G.; SATOLO, L.F. Aplicação do sistema de gestão da qualidade BPF (boas práticas de fabricação) na indústria de produtos farmacêuticos veterinários. **Gestão & Produção**, v.14, p.379-392, 2007.

CAN, N.O.; ALTIOKKA, G.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Determination of cefuroxime axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.576, p.246-252, 2006.

CAPANEMA, L.X.L.; VELASCO, L.O.M.; SOUZA, J.O.B.; NOGUTI, M.B. Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **BNDES Setorial**, n.25, p.157-174, 2007.

CARLOTTI, B.; FUOCO, D.; ELISEI, F. Fast and ultrafast spectroscopic investigation of tetracycline derivatives in organic and aqueous media. **Physical Chemistry**, v.12, p.15580-15591, 2010.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KUHNER, T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, v.364, p.67-87, 2006.

CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. **Drug Stability: Principles and practices**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2000.

CASS, Q.B.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida - Novas tendências e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CAVALCANTE, R.P.; SANDIM, L.R.; BOGO, D.; BARBOSA, A.M.J.; OSUGI, M.E.; BLANCO, M.; OLIVEIRA, S.C.; MATOS, M.F.C.; MACHULEK, A.J.; FERREIRA, V.S. Application of Fenton, photo-Fenton, solar photo-Fenton, and UV/H₂O₂ to degradation of the antineoplastic agent mitoxantrone and toxicological evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, p.2352-2361, 2013.

CELIZ, M.D.; TSO, J.; AGA, D.S. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges e ecological risks. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v.28, p.2473-2484, 2009.

CERVINI, P.; AMBROZINI, B.; MACHADO, L.C.M.; FERREIRA, A.P.G.; CAVALHEIRO, E.T.G. Thermal behavior and decomposition of oxytetracycline hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, DOI: 10.1007/s10973-015-4447-x, 2015.

CHADHA, R.; BALI, A.; BANSAL, G. Identification and characterization of stress degradation products of dronedarone hydrochloride employing LC-UV/PDA, LC-MS/TOF and MS(n) studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.118, p.139-148, 2016.

CHAN, Y.H. Biostatistics 201: Linear regression analysis. **Singapore Medical Journal**, v.45, p.55-61, 2004.

CHARTONE-SOUZA, E.; LOYOLA, T.L.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; MENEZES, M.A.; REY, N.A.; PEREIRA-MAIA, E.C. Synthesis and characterization of a tetracycline-platinum (II) complex active against resistant bacteria. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.95, p.1001-1008, 2005.

CHEMICALIZE. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/search>. Acesso em: 8 de outubro de 2017.

CHERLET, M.; BAERE, S.; BACKER, P. Quantitative analysis of oxytetracycline and its 4-epimer in calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v.128, p.871-878, 2003.

CHIESA, L.; NOBILE, M.; ARIOLI, F.; BRITTI, D.; TRUTIC, N.; PAVLOVIC, R.; PANSERI, S. Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.185, p.7-15, 2015.

CHOPRA I.; HAWKEY P.M.; HINTON M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.29, p.245-277, 1992.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.65, p.232-260, 2001.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amino black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v.17, p.1259-1264, 1996.

CLARKE, C.R.; BURROWS, G.E.; AMES, T.R. Therapy of bovine bacterial pneumonia. **Veterinary Clinics of North America**, v.7, p.669-694, 1991.

CLERC, J., FOURRE, C.; FRAGU, P. SIMS microscopy: methodology, problems and perspectives in mapping drugs and nuclear medicine compounds. **Cell Biology International**, v.21, p.619-633, 1997.

CODEVILLA, C.F.; ALINI, D.C.L.; DE MELLO, J.M.; SEGALIN, A.J.; FROEHLICHA, P.E.; BERGOLDA, A.M. Photodegradation kinetics of Iodenafil carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and in vitro cytotoxicity. **Analytical Methods**, v.5, p.6511-6516, 2013.

COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS (CPVS). Disponível em <<http://www.cpv.com.br/cpv/>>. Acesso em: 18 de setembro de 2017.

COSTA, F.M.; NETTO, A.D.P. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, v.35, p.616-622, 2012.

COUTO, C.M.; LIMA, J.L.; CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO, B.S.; REIS, S. Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline determination by flow injection potentiometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.8, p.527-533, 1998.

CRISTOFANI, E.; ANTONINI, C.; TOVO, G.; FIORONI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R. Confirmatory method for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v.637, p.40-46, 2009.

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O.; GOMES, L.F.S. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.47, p.51-57, 1987.

CUFFINI, S.L.; PITALUGA-JÚNIOR, A.; TAMBARI, D. **Polimorfismo de fármacos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DAVIES, N.M.; GOOD, R.L.; ROUPE, K.A.; YÁÑEZ, J.A. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? Not as easy as 1, 2, 3. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.7, p.217-226, 2004.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. Disponível em: <<http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>>. Acesso em: 25 de maio de 2017.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v.33, p.432-455, 2016.

DIANA, J.; PING, G.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J.V. Development and validation of an improved liquid chromatographic method for the analysis of oxytetracycline. **Chromatographia**, v.56, p.313-318, 2002.

DOI, A.M.; STOSKOPF, M.K. The Kinetics of Oxytetracycline Degradation in Deionized Water under Varying Temperature, pH, Light, Substrate, and Organic. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.12, p.246-253, 2000.

DONATO, E.M.; CANEDO, N.A.P.; ADAMS, A.I.H.; FROEHLICH, P.E.; BERGOLD, A.M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.125-130, 2010.

DRAGOMIROIU, G.T.A.B.; CIMPOIEȘU, A.; GINGHINĂ, O.; BALOESCU, C. BÂRCĂ, M.; POPA, D.E.; CIOBANU, A.; ANUȚA, V. The development and validation of a rapid HPLC method for determination of piroxicam. **Revista Farmacia**, v.63, p.123-131, 2015.

DRUG BANK. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00554>>. Acesso em: 18 de setembro de 2017.

DUARTE, H.A.; CARVALHO, S.; PANIAGO, E.B.; SIMAS, A.M. Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88, p.111-120, 1999.

DZOMBA, P.; KUGARA, J.; ZARANYIKA, M.F. Characterization of microbial degradation of oxytetracycline in river water and sediment using reverse phase high performance liquid chromatographic. **African Journal of Biotechnology**, v.14, p.1-9, 2015.

EL-SAYED, A.A.Y.; EL-SALEM, N.A. Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications. **Analytical Sciences**, v.21, p.595-607, 2005.

ELZAYAT, E.M.; IBRAHIM, M.F.; ABDEL-RAHMAN, A.A.; AHMED, S.M.; ALANAZI, F.K.; HABIB, W.A. A validated stability-indicating UPLC method for determination of diclofenac sodium in its pure form and matrix formulations. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.022>>.

EMARA, K.M.; ASKAL, H.F.; SALEH, G.A. Spectrophotometric determination of tetracycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v.38, p.1219-1221, 1991.

EMIRI, A.; MYFTARI, E.; ÇOÇOLI, S.; TRESKA, E. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in beef meat by HPLC-DAD detector in Albania. **Albanian Journal of Agriculture and Science**, p.489-493, 2014.

EP. European Pharmacopoeia. European Department for the Quality of Medicines. 7.ed. France: Strasbourg, 2012.

ESMAEILZADEH, S.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. A simple, fast, low cost HPLC/UV validated method for determination of flutamide: application protein binding studies. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.6, p.251-256, 2016.

FAHELELBOM, K.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation. **American Journal of Pharmacology Toxicology**, v.3, p.212-218, 2008.

FDA. Food and Drug Administration. **Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-producing Animals**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2015.

FDA. Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2004.

FERNANDEZ-TORRES, R.; CONSENTINO, M.O.; LOPEZ, M.A.B.; MOCHON, M.C. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples. **Talanta**, v.81, p.871-880, 2010.

FINI, A.; GARUTI, M.; FAZIO, G.; ALVAREZ-FUENTES, J., HOLGADO, M.A. Diclofenac salts. I. Fractal and thermal analysis of sodium and potassium diclofenac salts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, p.2049-2057, 2001.

FINLAY, A.C.; HOBBY, G.L.; P'AN, S.Y.; REGNA, P.P.; ROUTIEN J.B.; SEELEY, D.B.; SHULL, G.M.; SOBIN, B.A.; SOLOMONS, I.A.; VINSON, J.W.; KANE, J.H. Terramycin, a new antibiotic. **Science**, v.111, p.85-87, 1950.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

FRESHNEY, I. R. **Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique**. 5. ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

FRIED, B.; SHERMA, J. Thin Layer Chromatography: techniques and applications. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

FRIMPTER, G.W.; TIMPANELLI, A.E.; EISENMENGER, W.J.; STEIN, H.S.; EHRLICH, L.I. Reversible "Fanconi Syndrome" caused by degraded tetracycline. **Journal of the American Medical Association (JAMA)**, v.184, p.111-113, 1963.

FUJITA, K.; ITO, K.; ARAKI, E.; TANNO, K.; MURAYAMA, M.; SAITO, Y. Analytical method for residual oxytetracycline in livestock and marine products. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.38, p.12-15, 1997.

FURUSAWA, N.A. 100% water mobile phase HPLC-PDA analysis of tetracyclines antibiotics. **American Chemical Science Journal**, v.3, p.500-506, 2013.

GALLEGO, J.M.L.; ARROYO, J.P. Spectrophotometric determination of hydrocortisone, nystatin and oxytetracycline in synthetic and pharmaceutical preparations based on various univariate and multivariate methods. **Analytica Chimica Acta**, v.460, p.85-97, 2002.

GALMIER, M. J.; BOUCHON, B.; MADELMONT, J.C.; MERCIER, F.; PILOTAZ, F.; LARTIQUE, C. Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p.790-796, 2005.

GAVEZZOTTI, A. A solid-state chemist's view of the crystal polymorphism of organic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, p.2232-2241, 2007.

GENTILI, A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques. **Bioanalytical Chemistry**, v.387, p.1185-1202, 2007.

GIL, E.C.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis: method development and validation. **Journal of Chromatography**, v.895, p.43-49, 2000.

GIUGIU, V. Simultaneous determination of related substances of oxytetracycline in pharmaceutical semi solid form by High Performance Liquid Chromatography. **Veterinary Drug**, v.7, p.67-73, 2013.

GL SCIENCE. HPLC Columns: InertSustain® C8. Disponível em: <http://www.glsciences.com/c-product/hplc/lc-columns/inertsustain-c8/>. Acesso em 23 de outubro de 2017.

GOMES, E.C.L.; MUSSEL, W.N.; RESENDE, J.M.; FIALHO, S.L.; BARBOSA, J.; YOSHIDA, M.I. Chemical interactions study of antiretroviral drugs efavirenz and lamivudine concerning the development of stable fixed-dose combination formulations for AIDS treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, p.573-579, 2013.

GÓRNIAK, A.; KAROLEWICZ, B.; ZURAWSKA-PŁAKSEJ, E.; PLUTA, J. Thermal, spectroscopic, and dissolution studies of the simvastatin-acetylsalicylic acid mixtures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.111, p.2125-2132, 2013.

GRUPTA, V.; AHLAWAT, S.; PATEL, B.; SHANKAR, O.; KUMAR, K.; SHUKLA, S. K.; SHUKLA, S.; KAUR, N.; DUBEY, M.; SINGH, L. V. High-performance liquid chromatography method validation for determination of tetracycline residues in poultry meat. **Chronicles of Young Scientists**, v.5, p.72-74, 2014.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.T.T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, p.475-482, 2007.

GUINEA, E.; CENTELLAS, F.; BRILLAS, E.; CAÑIZARES, P.; SÁEZ, C.; RODRIGO, M. A. Electrocatalytic properties of diamond in the oxidation of a persistent pollutant. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.89, p.645-650, 2009.

GUNASEKARAN, S.; VARADHAN, S.R.; KARUNANIDHI, N. Qualitative analysis on the infra-red bands tetracycline and ampicillin. **Proceedings Indian National Science Academy - Part A**, v.62, n.4, p.309-316, 1996.

GUPTA, S.; CHADHA, R. Evaluation of compatibility among artemether, pyrimethamine and sulphadoxine using analytical and isothermal calorimetry techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.120, p.759-769, 2015.

HALL, A.M.; BASS, P.; UNWIN, R.J. Drug-induced renal Fanconi syndrome. **QJM An International Journal of Medicine**, v.107, p.261-269, 2014.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; INGERSLEV, F.; JENSEN, L. B. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.44, p.7-16, 2006.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENDELØV, G.; TJØRNELUND, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.42, p.263-271, 2002.

HALVATZIS, S.A.; TIMOTHEOU-POTAMIA, M.M.; CALOKERINOS, A.C. Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with N-bromosuccinimide. **Analyst**, v.118, p.633-637, 1993.

HAN, H.Y, HE, Z; ZENG, Y. Chemiluminescence determination of tetracycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations using Ru (bipy)₃²⁺-Cerium (IV) system. **Wuhan University Journal of Natural Science**, v.5, p.93-97, 2000.

HARVEY, S.C.H. Antimicrobial drugs. In: **Remington's Pharmaceutical Sciences**, REMINGTON, J.P., GENNARO, A.R. 18. Ed. Easton: Mack Publishing Company, p.1163-1241, 1990.

HASSAN, S.S.M.; AMER, M.M.; AHMED, S.A. Composition and stability constants of Iron and Copper-oxytetracycline chelates. **Mikrochimica Acta**, v.3, p.165-175, 1984.

HASSANI, M.; LÁZARO, R.; PÉREZ, C.; CONDÓN, S.; PAGÁN, R. Thermostability of oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline at ultrahigh temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2676-2680, 2008.

HAWKER, D.W.; CROPP, R.; BOONSANER, M. Uptake of zwitterionic antibiotics by rice (*Oryza sativa* L.) in contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.263, p.458-466, 2013.

HOCHSTEIN, F.A.; STEPHENS, C.R.; CONOVER, L.H.; REGNA, P.P.; PASTERNAK, R.; GORDON, P.N.; PILGRIM, F.J.; BRUNINGS, K.J.; WOODWARD, R.B. The structure of terramycin. **Journal of the American Chemical Society**, v.75, p.5455-5475, 1953.

HOLCAPEK, M.; KOLAROVA, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.39, p.59-78, 2008.

HUSSAR, D.A.; NIEBERGALL, P.J.; SUGITA, E.T.; DOLUISIO, J.T. Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.20, p.539-546, 1968.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Impurities in new drug products**. Geneva: IFPMA, 2006.

ICH Q2 (R1) - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Estados Unidos da America, 2005.

IFAH - INTERNATIONAL FEDERATION FOR ANIMAL HEALTH. **Animal Health Industry Global Market Review 2012**. IFAH, 2013.

INTERNATIONAL CENTRE FOR DIFFRACTION DATA (ICDD). **Powder Diffraction File & Related Products**. Disponível em: <<http://www.icdd.com/>>. Acesso em: de 20 de setembro de 2017.

ISO - INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993. **Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

IVERSEN, B.; AANESRUD, A.; KOLSTAD, A.K. Determination of oxytetracycline in plasma from rainbow trout using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography**, v.493, p.217-221, 1989.

IWAKI, K.; OKUMURA, N.; YAMAZAKI, M. Rapid determination of tetracycline antibiotics in by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.619, p.319-323, 1993.

IWAKI, K.; OKUMURA, N.; YAMAZAKI, M. Determination of tetracycline antibiotics by reversed phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.623, p.153-158, 1992.

JELIKIĆ-STANKOV, M.; VESELINOVIĆ, D.; MALESEV, D.; RADOVIĆ, Z. Spectrophotometric determination of oxytetracycline in pharmaceutical preparations using sodium molybdate as analytical reagent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.7, p.1565-1570, 1989.

JOHNSIRANI, P.; VISHNUVARDHAN, Ch.; LINGESH, A.; NAIDU, V. G. M.; NAVEEN, Ch.; SATHEESHKUMAR, N. Isolation, characterization using LC-ESI-QTOF, NMR and in vitro cytotoxicity assay of niclosamide forced degradation products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.136, p.148-155, 2017.

JOLY, V.; PANGON, B.; BRION, N.; VALLOIS, J.M.; CARBON, C. Enhancement of the therapeutic effect of cephalosporins in experimental endocarditis by altering their pharmacokinetics with diclofenac. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.246, p.695-700, 1988.

JURISIC, V.; BUMBASIREVIC, V. In vitro assays for cell death determination. **Archive of Oncology**, v.16, p.49-54, 2008.

KAHSAY, G.; SHRAIM, F.; VILLATT, P.; ROTGER, J.; CASSUS-COUSSÈRE, C.; VAN SCHEPDAEL, A.; HOOGMARTENS J.; ADAMS, E. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of oxytetracycline and related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.75, p.199-206, 2013.

KAMEL, A.M.; FOUDA, H.G.; BROWN, P.R.; MUNSUN, B. Mass spectral characterization of tetracyclines by electrospray ionization, H/D exchange, and multiple stage mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.13, p.543-57, 2002.

KAPLAN, M.A.; GRANATEK, A.P.; BUCKWALTER, F.H. Antibiotics. **Chemotherapy**, v.7, p.569-576, 1957.

KARLÍČEK, R.; SOLICH, P. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v.285, p.9-12, 1994.

KAYA, S.; YARSAN, E.; BAYDAN, E.; AKKAYA, R.; AKSOY, A. Comparison of the pharmacokinetics of conventional and long-acting formulations of oxytetracycline in sheep. **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, v.25, p.173-177, 2001.

KEEN, O.S.; THURMAN, E.M.; FERRER, I.; DOTSON, A.D.; LINDEN, K.G. Dimer formation during UV photolysis of diclofenac. **Chemosphere**, v.93, p.1948-56, 2013.

KENYON, A.S.; FLINN, P.E.; LAYLOFF, T.P. Rapid screening of pharmaceuticals by thin-layer chromatography: Analysis of essential drugs by visual methods. **Journal of AOAC International**, v.78, p.1109-1111 1995.

KERSTEN, H.; FREY, G. **On the mechanism of tetracycline action and resistance**. In: KRCMERY V.; ROSIVAL L.; WATANABE T. Bacterial Plasmids and Antibiotic. Prague: Resistance, 1972.

KHAN, N.H.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J.; VANDERHAEGHE, H. Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.405, p.229-245, 1987.

KHOSSROKHAVAR, R.; HOSSEINI, M. J.; SHOEIBI, S.; JANNAT, B. Detection of oxytetracycline residue in infant formula by high-performance liquid chromatography. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, p.221-224, 2011.

KLEINUBING, S. A.; SERAPHIM, D.C.; VIEIRA, M.G.A.; CANEVESI, R.L.S.; SILVA, E.A.; CÉSAR, C.L.; MEI, L.H.I. Gastro-resistant controlled release of OTC encapsulated in alginate/chitosan matrix coated with acryl-EZE[®] MP in fluidized bed. **Journal of Applied Polymer Science**, v.131, p.1-9, 2014.

KNOX, J.H.; JURAND, J. Mechanism of reversed-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.186, p.763-782, 1979.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Impurities and forced degradation studies: a review. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.12, p.18-24, 2016.

KOWALSKI, C.; POMORSKA, M.; SŁAWIK, T. Development of HPLC with UV-VIS detection for the determination of the level of oxytetracycline in the biological matrix. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.29, p.2721-2731, 2006.

KOWALSKI, C.; POMORSKA, M. Rapid and validated HPLC assay for the determination of oxytetracycline in biological material. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, p.397-400, 2007.

KRZEK, J.; KWIECIEN, A.; STAREK, M.; KIERSZNIEWSKA, A.; RZESZUTKO, W. Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin, and spectinomycin in veterinary preparations by thin-layer chromatography/densitometry. **Journal of AOAC International**, v.83, p.1502-1506, 2000.

KRUK, I.; LICHSZTELD, K.; MICHALSKA, T.; NIZINKIEWICZ, K.; WROŃSKA, J. The extra-weak chemiluminescence generated during oxidation of some tetracycline antibiotics. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.14, p.329-343, 1992.

KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. **Chemosphere**, v.40, p.701-710, 2000.

KUO, Y.L.; LIU, W.L.; HSIEH, S.H.; HUANG, H.Y. Analyses of on-steroidal Anti-inflammatory drugs in environmental water samples with microemulsion electrokinetic chromatography. **Analytical Sciences**, v.26, p.703-707, 2010.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. Cap.26, v.2, p.1277-1255.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, p.35-61, 2009.

LASKIN A. Tetracyclines. In: GOTTLIEB, D.; SHAW, P.D. **Antibiotics**. Heidelberg: Springer, 1967.

LAVOR, P.E.; FREIRE, F.D.; ARAGÃO, C.S.F.; RAFFIN, F.N. MOURA, T.F.A.L. Application of thermal analysis to the study of anti-tuberculosis drug compatibility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.108, p.207-212, 2012.

LAVRIC, Z. PIRNAT, J.; LUZNIK, J.; PUC, U.; TRONTELJ, Z.; SRCIC, S. Nuclear quadrupole resonance study of piroxicam: confirmation of new polymorphic form V. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.104, p.1909-1918, 2015.

LEI, Y.; JI, B.; MA, C.; ZHANG, T.; LI, T. Identification of forced degradation products of tedizolid phosphate by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.139, p.221-231, 2017.

LEVY, S.B. **The antibiotic paradox**: how miracle drugs are destroying the miracle. New York: Plenum Press, 1992.

LI, D.; YANG, M.; HU, J.; REN, L.; ZHANG, Y.; LI, K. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.80-86, 2008.

LI, Y. M.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of demeclocycline by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.740, p.119-123, 1996.

LI, Y. M.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Optimized methods for capillary electrophoresis of tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p.1063-1069, 1997.

LIMPOKA, M.; CHAI-ANAN, P.; SIRIVEJPANDU, S.; KANCHANOMAI, R.; RATTANAMONTHIANCHAI, S.; PUANGKUM, P. Plasma concentrations of oxytetracycline in elephants following intravenous and intramuscular administration of Terramycin/LA injectable solution. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.56, p.173-179, 1987.

LIU, Y.; HE, X.; FU, Y.; DIONYSIOU, D. D. Degradation kinetics and mechanism of oxytetracycline by hydroxyl radical-based advanced oxidation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p.1317-27, 2016.

LOKE, M.L.; JESPERSEN, S.; VREEKEN, R.; HALLING-SØRENSEN, B.; TJORNELUND, J. Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems. **Journal of Chromatography**, v.783, p.11-23, 2003.

LOTFY, H.M.; HAGAZY, M.A.M. Comparative study of novel spectrophotometric methods manipulating ratio spectra: An application on pharmaceutical ternary mixture of omeprazole, tinidazole and clarithromycin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.96, p.259-270, 2012.

LOTFY, H.M.; MOHAMED, D.; MOWAKA, S. A comparative study of smart spectrophotometric methods for simultaneous determination of sitagliptin phosphate and metformin hydrochloride in their binary mixture. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.149, p.441-451, 2015a.

LOTFY, H.M.; SHEREEN, M.T.; FAHMY, N.M.; SHEHATA, M.A. A comparative study of novel spectrophotometric resolution techniques applied for pharmaceutical mixtures with partially or severely overlapped spectra. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.136, p.937-952, 2015b.

LUYPAERT, J.; MASSART, D.L.; HEYDEN, Y.L. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v.72, p.865-883, 2007.

LYKKEBERG, A.K.; HALLING-SØRENSEN, B.; CORNETT, C.; TJORNELUND, J.; HONORÉ HANSEN, S. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, p.325-332, 2004.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v.31, p.117-124, 2010.

MAHESWARAN, R. Scientific consideration of forced degradation studies in ANDA submissions. **Journal of Validation Technology**, [SPRING 2012], p.92-96, 2012.

MAHROUS, M.S.; ABDEL-KHALEK, M.M. Spectrophotometric determination of phenothiazines, tetracyclines and chloramphenicol with sodium cobaltinitrite. **Talanta**, v.31, p.289-291, 1984.

MAIO, G.; STEINER, F.; FRANZ, H.; TRACY, M.; LIU, X.; ARNOLD, F. Total solution for explosives analysis by reverse-phase HPLC with a parallel HPLC system. **HPLC Presentation, Dionex Corporation**, CA, USA, 2006.

MAMANI, M.C.V.; FARFÁN, J.A.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. **Talanta**, v.70, p.236-243, 2006.

MANGERONA, A.M; ARAUJO, A.P.C.; MOZZER, O.D; QUEIROZ JÚNIOR, E. B.; VIEIRA, E.F. Comparação do período de carência em tecidos e leite bovino após administração de oxitetraciclina LA e do diclofenaco sódico (Oxitrat LA Plus®) em duas diferentes vias parenterais. **Hora Veterinária**, ano 33, n.196, 2013.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004: Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2004.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 45 de 22 de novembro de 2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=30/11/2016>. Acesso em: 19 de outubro de 2017.

MARGALIDA, A.; BOGLIANI, G.; BOWDEN, C.G.R.; DONÁZAR, J.A.; GENERO, F.; GILBERT, M.; KARESH, W.B.; KOCK, R.; LUBROTH, J.; MANTECA, X.; NAIDOO, V.; NEIMANIS, A.; SÁNCHEZ-ZAPATA, J.A.; TAGGART, M.A.; VAARTEN, J.; YON, L.; KUIKEN, T.; GREEN, R.E. One health approach to use of veterinary pharmaceuticals. **Science and Regulation**, v.346, p.1296-1298, 2014.

MEDINA, A.R.; MARÍN, M.G.G.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M.L.; DÍAZ, A.M. UV spectrophotometric flow-injection assay of tetracyclines antibiotics retained on Sephadex QAE A-25 in drug formulation. **Microchemistry Journal**, v.65, p.325-331, 2000.

MEERSCHÉ, T.V.; PAMEL, E.V.; POUCKE, C.V.; HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M.; RASSCHAERT, G.; DAESELEIRE, E. Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. **Journal of Chromatography**, v.1429, p.248-257, 2016.

MEISEN, I.; WISHOLZER, S.; SOLTWISCH, J.; DREISEWERD, K.; MORMANN, M.; MÜTHING, J.; KARCH, H.; FRIEDRICH, A. W. Normal silica gel and reversed phase thin-layer chromatography coupled with UV spectroscopy and IR-MALDI-o-TOF-MS for the detection of tetracycline antibiotics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, p.2821-2831, 2010.

MENDEZ, A.; CHAGASTELLES, P.; PALMA, E.; NARDI, N.; SCHAPOVAL E. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.350, p.95-102, 2008.

MESTORINO, N.; HERNÁNDEZ, E.M.; MARCHETTI, L.; ERRECALDE, J.O. Pharmacokinetics and tissue residues of an oxytetracycline/diclofenac combination in cattle. **Revue Scientifique et Technique**, v.23, p.679-690, 2007.

MEYER, V.R. **Practical high performance liquid chromatography**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.

MEYERSON, S. Natural Abundance of Chlorine Isotopes. **Analytical Chemistry**, v.33, p.964-964, 1961.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinary Medicine**, v.49, p.79-100, 2004.

MIHALIC, M., HOFMAN, H.; KUFTINEC, J.; KRILE, B.; CAPLAR, V.; KAJFEZ, F.; BLAZEVIC, N. Piroxicam. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v.15, p.509-531, 1986.

MINKIN, V. I. Glossary of terms used in theoretical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1999). **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p.1919-1981, 1999.

MITCHELL, S.M.; ULLMAN, J.L.; TEEL, A.L.; WATTS, R.J. Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin. **Chemosphere**, v.134, p.504-511, 2015.

MITCHELL, S.M.; ULLMAN, J.L.; TEEL, A.L.; WATTS, R.J. pH and temperature effects on the hydrolysis of three beta-lactam antibiotics: ampicillin, cefalotin and ceftiofur. **Science of the Total Environment**, v.466, p.547-555, 2014.

MITSCHER, L. A. **The chemistry of the tetracycline antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1978.

MODHAVE, D.T.; HANDA, T.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Successful characterization of degradation products of drugs using LC-MS tools: Application to piroxicam and meloxicam. **Analytical Methods**, v.3, p.2864-72, 2011.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material.** 4.ed. London: Pharmaceutical Press, 2011.

MOFFIT J.M.; COOLEY R.O.; OLSEN N.H. Prediction of tetracycline-induced teeth discoloration. **Journal of American Dental Association**, v.88, p.547-552, 1974.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products e by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v.35, p.803-814, 2009.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R. PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, p.757-766, 1991.

MONSER, L.; DARGHOUTH, F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, p.353-362, 2000.

MONTOLIU, J.; CARRERA, M.; DARNELL, A.; REVERT, L. Lactic acidosis and Fanconi's syndrome due to degraded tetracycline. **British Medical Journal**, v.283, p.1576-1577, 1981.

MOREIRA, G.F.; BALBO, A.; ACHETE, C.A.; BARIN, J.S.; NOGUEIRA, R.; BITTENCOURT, C.F.; RODRIGUES, J.M. Aplicação da DSC para determinação da pureza de fármacos. **Produto & Produção**, v.11, p.22-29, 2010.

MORELLI, B.; PELUSO, P. Spectrophotometric determination of tetracyclines in pure form and in pharmaceutical preparations, by a molybdenum blue method. **Analytical Letters**, v.18, p.1865-1886, 1985.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Stability study and degradation kinetics of ceftazidime in pharmaceutical preparations. **Advances in Analytical Chemistry**, v.2, p.1-5, 2012.

MORENO-CEREZO, J.M.; CÓRDOBA-DÍAZ, M.; CÓRDOBA-DÍAZ, D.; CÓRDOBA-BORREGO, M. A stability study of tetracycline and tetracycline cyclodextrins in tablets using a new HPLC method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.26, p.417-426, 2001.

MOUROT, D.; DELÉPINE, B.; BOISSEAU, J.; GAYOT, G. Reversed phase ion-pair chromatography of oxytetracycline, epioxytetracycline and anhydrooxytetracycline. **Journal of Chromatography**, v.190, p.486-488, 1980.

MUANGSIN, N.; PRAJAUBSOOK, M.; CHAICHIT, N.; SIRITAEDMUKUL, K.; HANNONGBUA, S. Crystal structure of a unique sodium distorted linkage in diclofenac sodium pentahydrate. **Analytical Sciences**, v.8, p.967-968, 2002.

MUKHERJEE, A.; BERA, A. A detailed study of validation parameters and system suitability test in HPLC. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemistry Sciences**, v.3, p.426-446, 2012.

NAELAPAA, K. VAN DE STREEK, J.; RANTANEN, J.; BOND, A.D. Complementing high-throughput X-ray powder diffraction data with quantum-chemical calculations: application to piroxicam form III. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, p.4214-4219, 2012.

NELIS, H.J.; VANDENBRANDEN, J.; KRUIF, A.; BELPAIRE, F.; LEENHEER, A.P. Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in bovine plasma by double-phase extraction. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.81, p.1216-1218, 1992.

NELSON, M.L.; LEVY, S.B. The history of the tetracyclines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1241, p.17-32, 2011.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G G. **Fundamentos de Físico-Química**. Porto Alegre: Artmed, 2002, p.203-212.

NEVADO, J.J.B.; LLERENA, M.J.V.; CABANILLAS, C.G.; ROBLEDO, V.R.; BUITRAGO, S. Sensitive capillary GC-MS-SIM determination of selective serotonin reuptake inhibitors: Reliability evaluation by validation and robustness study. **Journal of Separation Science**, v.29, p.103-113, 2006.

NGUYEN, D.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v.29, p.1836-1848, 2006.

NGUYEN, V.; NGUYEN, V.; LI, C.; ZHOU, G. The degradation of oxytetracycline during thermal treatments of chicken and pig meat and the toxic effects of degradation products of oxytetracycline on rats. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p.2842-2850, 2015.

NYSTROM, M.; ROINE, J.; MURTOMAA, M.; MOHAN SANKARAN, R.; SANTOS, H.A.; SALONEN, J. Solid state transformations in consequence of electrospraying – A novel polymorphic form of piroxicam. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.89, p.182-189, 2015.

OAKS, J.L.; GILBERT, M.; VIRANI, M.Z.; WATSON, R.T.; METEYER, C.U.; RIDEOUT, B.A.; SHIVAPRASAD, H.L.; AHMED, S.; CHAUDHRY, M.J.I.; ARSHAD, M.; MAHMOOD, S.; ALI, A.; KHAN, A.A. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature**, v.427, p.630-633, 2004.

OGUNKOYA, A.B.; ADEYANJU, J.B.; ADBULLAHI, R. Experimental and clinical trial of long-acting oxytetracycline in the treatment of canine ehrlichiosis. **The Veterinary Quarterly**, v.7, p.158-161,1985.

OKA, H.; IKAI, Y.; ITO, Y.; HAYAKAWA, J.; HARADA, K. SUZUKI, M.; ODANI, H.; MAEDA, K. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.693, p.337-344,1997.

OLATUNDE, O. J.; OLATUNBOSUN, O.; OLATUNDE, A.; ANYAKORA, C.; CHRISTOPHER, K. Occurrence of selected veterinary pharmaceuticals in water from a fish pond settlement in Ogun state, Nigeria. **International Journal of Environmental Monitoring and Analysis**, v.2, p.226-230, 2014.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.34, p.1224-1230, 2011.

OMIJA, B. **Determination of oxytetracycline residue levels in eggs and meat of chicken using microbiological assay**. Tese (Department of Public Health, Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Veterinary Sciences), University of Nairobi, Nairobi. 1991.

OMOTE, H.S.G.; SLUSZZ, T. **Prospecção de Mercado visando P&D para Medicamentos Veterinários para Bovinocultura no Brasil**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA (SIMTEC), n.1, 2013. Aracaju, 2013. p.444-463.

OUROTETRA OF: dihidrato de oxitetraciclina . Cravinhos – SP: Ourofino Saúde Animal, 2011. Ficha de informação de segurança de produtos químicos.

OXITRAT LA PLUS: oxitetraciclina e diclofenaco de sódio. Montes Claros –MG: Valée, 2001. Bula do medicamento.

PALAHARN, S.; CHAROENRAKS, T.; WANGFUENGGANAGUL, N.; GRUDPAN, K.; CHAILAPAKUL, O. Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v.499, p.191-197, 2003.

PALOMO, M.E.; BALLESTEROS, M.P.; FRUTOS, P. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.21, p.83-94,1999.

PANI, N.R.; NATH, L.K.; ACHARYA, S.; BHUNIYA, B. Application of DSC, IR and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.108, p.219-226, 2012.

PAPADOYANNIS, I.N.; SAMANIDOU, V.F.; KOVATSI, L.A. A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, p.275-280, 2000.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, p.1190-1198, 2008.

PATEL, R.B.; PATEL, P.U.; PATEL, B.G.; PATEL, A.C. Simultaneous estimation of eperisone hydrochloride and diclofenac sodium by ratio spectra derivative spectrophotometry method in synthetic mixture. **Pharmatutor**. Disponível em: <<http://www.pharmatutor.org/articles/simultaneous-estimation-of-eperisone-hydrochloride-and-diclofenac-sodium-by-ratio-spectra-derivative-spectrophotometry>>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclina: relação química entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.47, p.149-154, 1997.

PENA, A.; PELANTOVA, N.; LINO, C.N.; SILVEIRA, M.I.N.; SOLICH, P. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3784-3788, 2005.

PEREIRA, S.V.; COLOMBO, F.B.; MARTINS, R.M.; FREITAS, L.A.P. Spray cooling process factors and quality interactions during the preparation of microparticles containing an active pharmaceutical ingredient. **Drying Technology: An International Journal**, v.32, p.1188-1199, 2014.

PEREIRA-MAIA, E.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v.33, p.700-706, 2010.

PESEK, J.J.; MATYSKA, M.T. Separation of tetracyclines by high-performance capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography**, v.736, p.313-320, 1996.

PINHEIRO, M.S.; VIANA, G.M.; VIEIRA, B.A.; SOUZA, A.M.; RODRIGUES, C. R.; MARINS, R.C.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V. P. Identification, characterization and in silico ADMET prediction of roflumilast degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.126-133, 2017.

PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, p.305-325, 1944.

PRABU, S.L.; SURIYAPRAKASH, T.N.K. Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review. **Applied Biological Engineering - Principles and Practice**, p.479-506, 2012.

PRADO, C.K.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, p.448-456, 2011.

PRADO, L.D.; ROCHA, H.V.A. Estado Sólido na Indústria Farmacêutica: Uma Breve Revisão. **Revista Virtual de Química**, v.7, p.2080-2112, 2015.

PRASAD, A.R.G.; RAO, V.S. Spectrophotometric methods for the microdetermination of oxytetracycline and hostacycline. **Science World Journal**, v.5, p.1-4, 2010.

PRESS, W.H.; TEUKOLSKY, S.A.; VETTERLING, W.T.; FLANNERY, B.P. **Numerical Recipes – The Art of Scientific Computing**. 3. ed. Cambridge University Press: Inglaterra, 2007.

PRIYA, S.S.; RADHA, K.V. Brief review of spectrophotometric methods for the detection of tetracycline antibiotics. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, p.48-51, 2014.

QUARTZ. Atlantic Media Corporation. **The UN just categorized antibiotics in the food system as a crisis on par with AIDS and Ebola**. Nova Iorque, 2016. Disponível em: <http://qz.com/788548/the-united-nations-historic-meeting-on-antibiotic-resistance-puts-the-threat-on-a-level-with-hiv-and-ebola/>. Acesso em: 24 de outubro de 2017.

RAHM, S.; NICHOLAS, G.; NORRGAN, J.; BERGMAN. Hydrolysis of Environmental contaminants as an experimental tool for indication of their persistency. **Environment Science Technology**, v.39, p.3128-3133, 2005.

RAMESH, T.; NAGESWARA, R.P.; NAGESWARA, R.R. LC-MS/MS characterization of forced degradation products of zofenopril. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.88, p.609-616, 2014.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAO, M.B.; RAMAMURTHY, P.S.; RAO, V.S. Spectrophotometric determination of oxytetracycline in pharmaceutical dosage forms. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, p.254-255, 1996.

RATH, S.; MARTINEZ-MEJIA, M.J; SCHRODER, C.H.K. Considerações e implicações práticas do guia de validação e controle de qualidade analítica de fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. **Química Nova**, v.38, p.697-708, 2015.

RECK, G.; DIETZ, G.; LABAN, G.; GUNTHER, W.; BANNIER, G.; HOHNE, E. X-ray studies on piroxicam modifications. **Pharmazie**, v.43, p.477-481, 1988.

RECK, G.; LABAN, G. Prediction and establishment of a new crystalline piroxicam modification. **Pharmazie**, v.45, p.257-259, 1990.

REED, L.A.; SIEWICKI, T.C.; SHAH, J.C. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. **Aquaculture**, v.232, p.11-28, 2004.

REEUWIJK, H.J.E.M.; TJADEN, U.R. High-performance liquid chromatography of tetracyclines. **Journal of Chromatography**, v.353, p.339-350, 1986.

REIS, B.F.; GUINÉ, M.F.; KRONKA, E.A.M. Continuous flow injection chemical analysis. **Química Nova**, v.12, p.82-91, 1989.

REYES, C.; FERNANDÉZ, J.; FREER, J.; MONDACA, M.A.; ZAROR, C.; MALATO, S.; MANSILLA, H.D. Degradation and inactivation of tetracycline by TiO₂ photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.184, p.141-146, 2006.

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

RIX, U.; FISCHER, C.; REMSING, L.L.; ROHR, J. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. **Natural Product Reports**, v.19, p.542-580, 2002.

ROCHA, W.F.C.; POPPI, R.J. Multivariate control charts based on net analyte signal (NAS) for characterization of polymorphic composition of piroxicam using near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v.96, p.21-26, 2010.

ROCHA, W.F.C.; SABIN, G.P.; MARÇO, P.H.; POPPI, R.J. Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.106, p.198-204, 2011.

RODRÍGUEZ, M.P.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Simple and clean determination of tetracyclines by flow injection analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.153, p.386-392, 2016.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; OKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, p.317-320, 2003.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; MARTINEZ, C.L.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.683-700, 2007.

RUFINO, J.L.; WEINERT, P.L.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T as oxidizing agent. **Química Nova**, v.32, p.1764-1769, 2009.

SAHA, U. Colorimetric determination of tetracycline derivatives in pharmaceutical preparations. **Journal of AOAC International**, v.72, p.242-244, 1989.

SAHA, U.; SEN, A.K.; DAS, T.K.; BHOWAL, S.K. Spectrophotometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations, with uranyl acetate. **Talanta**, v.37, p.1193-1196, 1990.

SALINAS, F.; LA PEÑA, A.M.; MERÁS, I.D. Analysis of mixtures of doxycycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations by first derivative fluorimetry. **Analytical Letters**, v.23, p.863-876, 1990.

SALINAS, F.; MANSILLA, A.E.; NEVADO, J.J.B. Simultaneous determination of sulfathiazole and oxytetracycline in honey by derivative spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v.43, p.244-252, 1991.

SALINAS, F.; NEVADO, J.J.B.; ESPINOSA, A. Determination of oxytetracycline and doxycycline in pharmaceutical compounds, urine and honey by derivative spectrophotometry. **Analyst**, v.14, p.1141-1145, 1989.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v.65, p.725-759, 2006.

SASTRY, R.V.R.P.; VENKATESAN, C.S.; SASTRY, B.S.; MAHESH, K. Identification and characterization of forced degradation products of pralatrexate injection by LC-PDA and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.131, p.400-409, 2016.

SCHNEIDER, M.J.; BRADEN, S.E.; REYES-HERRERA, I.; DONOGHUE, D.J. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.846, p.8-13, 2007.

SENYUV, H.; OZDEN, T.; SARICA, D.Y. High-Performance Liquid Chromatographic determination of oxytetracycline residue in cured meat products. **Journal of Chemistry**, v.24, p.395-400, 2000.

SHAALAN, R.A.; BELAL, T.S. Validated stability-indicating HPLC-DAD method for the simultaneous determination of diclofenac sodium and diflunisal in their combined dosage form. **Scientia Pharmaceutica**, v.81, p.713-731, 2013.

SHARMA J.P.; PERKINS, E.G.; BEVILL, R.F. Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatographic determination of tetracyclines in urine and plasma. **Journal of Chromatography**, v.134, p.441-450, 1977.

SHETH, A.R.; BATES, S.; MULLER, F.X.; GRANT, D.J.W. Polymorphism in piroxicam. **Crystal Growth & Design**, v.4, p.1091-1098, 2004.

SHLAES, D.M. An update on tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.7, p.167-171, 2006.

SINA, A.; YOUSSEF, M.K.; KASSEM, A.A.; ATTIA, I.A. Paper chromatographic determination of oxytetracycline. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.60, p.1544-1547, 1971.

SINDAN - SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=17>>. Acesso em: 15 de novembro de 2017.

SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N.; SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.49, p.71-88, 2013.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.1107-1112, 1990.

SKIBINSKI, R.; TRAWINSKI, J.; KOMSTA, L.; BAJDA, K. Characterization of forced degradation products of clozapine by LC-DAD/ESI-Q-TOF. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.131, p.272-280, 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, L. C. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Thomson, 2006.

SMITH, M.V. The role of veterinary medicine regulatory agencies. **Revue Scientifique et Technique**, v.32, p.393-408, 2013.

SMYRNIOTAKIS, C.G.; ARCHONTAKI, H.A.C. 18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.506-514, 2007.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2010.

SOARES, M.F.L.R.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; GRANGEIROS-JUNIOR, S.; SILVA, K.E.R.; ROLIM-NETO, P.J. Métodos de determinação do ornidazol em comprimidos revestidos: desenvolvimento, validação e comparação estatística. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, p.129-134, 2003.

SPEER, B.S.; SHOEMAKER, N.B.; SALYERS, A.A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, p.387-399, 1992.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SPONG, B.R.; PRICEB, C.P.; JAYASANKARA, A.; MATZGERB, A.J.; HORNEDOA, N.R. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.241-274, 2004.

STAHL, M. Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. **Application: Agilent Technologies**, p.1-16, 2003.

STAREK, M.; KRZEK, J.; TARSA, M.; ZYLEWSKI, M. Determination of piroxicam and degradation products in drugs by TLC. **Chromatographia**, v.69, p.351-356, 2009.

STAVIZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differential of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, v.36, n.8, p.1627-1639, 1964.

STENGER, F.C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade do cloridrato de metformina em comprimidos e estudo da citotoxicidade dos produtos de degradação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.

STUBBINGS, G.; TARBIN, J.A.; SHEARER, G. On-line metal chelate affinity chromatography clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal tissues. **Journal of Chromatography**, v.639, p.137-145, 1996.

SULTAN, S.M.; ALZAMIL, I.Z.; ALARFAJ, N.A. Complexometric-spectrophotometric assay of tetracyclines in drug formulations. **Talanta**, v.35, p.375-378, 1988.

SUN, P.; YAO, H.; MINAKATA, D.; CRITTENDEN, J.C.; PAVLOSTATHIS, S.G.; HUANG, C.H. Acid-catalyzed transformation of ionophore veterinary antibiotics: reaction mechanism and product implications. **Environmental Science and Technology**, v.47, p.6781-6789, 2013.

SVERSUT, R.A.; SILVA, A.A.; CARDOSO, T.F.M.; KASSAB, N.M.; AMARAL, M.S.; SALGADO, H.R.N. A critical review of properties and analytical methods for the determination of oxytetracycline in biological and pharmaceutical matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.57, p.154-171, 2017.

SWAIN, D.; SAMANTHULA, G. Study on the forced degradation behaviour of ledipasvir: Identification of major degradation products using LC-QTOF-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.138, p.29-42, 2017.

SZLYK, E.; MARZEC, A.K.; KOTER, I. Determination of tetracyclines by near-infrared (NIR) spectroscopy and partial least-squares (PLS) regression method. **Chemia Analityczna**, v.52, p.605-617, 2007.

SZNITOWSKA, A.; STOKROCKA, M. Determination of diclofenac released from suppositories using UV spectrophotometry, spectra derivative spectrophotometry and HPLC. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v.63, p.401-405, 2007.

TADDEI P.; TORREGGIANI A.; SIMONI R. Influence of environment on piroxicam polymorphism: vibrational spectroscopic study. **Biopolymers**, v.62, p.68-78, 2001.

TAUBER, V.; CHIURCIU, V. Development and validation of a HPLC method for determination of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone in veterinary formulation. **Veterinary Drug**, v.8, p.80-83, 2014.

TAVARES, M.F.M.; MCGUFFIN, V.L. Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.686, p.129-142, 1994.

TEKO-AGBO, A.; MESSOMO, F.N.; WALBADET, L.; AKOBA, K.; NIANG, E.H. **Quality of veterinary medicinal products in circulation in Cameroon and Senegal**. In: CONFERENCE ON VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS IN AFRICA. Dakar, 2008, p.2-18.

THE CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE (CSD). Disponível em: <<http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-system/components/csd/>>. Acesso em: 20 de setembro de 2017.

THE MERCK INDEX: **an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 14. ed. Whitehouse Station: Merck & Co., 2006.

THODE, H.G. Sulfur isotope geochemistry and fractionation between coexisting sulfide minerals. **Mineralogical Society of America Special Paper**, n.3, p. 133-144, 1970.

TJØRNELUND, J.; HANSEN, S.H. Use of metal complexation in non-aqueous capillary electrophoresis systems for the separation and improved detection of tetracyclines. **Journal of Chromatography**, v.9, p.235-243, 1997.

TLC Pharmaceutical Standards. Disponível em: <<http://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=O-165&name=OXYTETRACYCLINE>>. Acesso em: 10 out 2017.

TORAL, M.I.; ORELLANA, S.L.; SOTO, C.A.; RICHTER, P. Extraction and determination of oxytetracycline hydrochloride and oxolinic acid in fish feed by derivative spectrophotometry of first order. **Food Analytical Methods**, v.4, p.497-504, 2011.

TORAL, M.I.; SABAY, T.; ORELLANA S.L.; RICHTER, P. Determination of oxytetracycline from salmon muscle and skin by derivative spectrophotometry. **Journal of AOAC International**, v.98, p.559-565, 2015.

TOWNSHEND, A.; RUENGSIAGOON, W.; THONGPOON, C.; LIAWRUANGRATH, S. Flow injection chemiluminescence determination of tetracycline. **Analytica Chimica Acta**, v. 541, p.105-111, 2005.

TSUJI, K.; ROBERTSON, J.H.; BEYER, W.F. High pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines. **Analytical Chemistry**, v.46, p.539-543, 1974.

TUDJA, P.; KHAN, M.Z.I.; MESTROVIC, E.; HORVAT, M.; GOLJA, P. Thermal behaviour of diclofenac sodium: decomposition and melting characteristics. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.1245-1250, 2001.

TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G. Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.588, p.1-9, 2007.

UDALOVA, A.Y.; DMITRIENKO, S.G.; APYARI, V.V. Methods for the separation, preconcentration, and determination of tetracycline antibiotics. **Journal of Analytical Chemistry**, v.70, p.661-676, 2015.

UEKANE, T.M.; NETO, F.R.A.; GOMES, L.N. Development and validation of a method for the analysis of tetracyclines in chicken-muscle by Liquid Chromatography Electro spray Mass Spectrometry in Tandem (LC-ESI-MS/MS). **Química Nova**, v.34, p.43-48, 2011.

UENO, R. Determination of oxytetracycline in blood serum by highperformance liquid chromatography with direct injection. **Journal of Chromatography**, v.573, p.333-335, 1992.

UPADHYAY, P. P.; BOND, A. D. Crystallization and disorder of the polytypic α_1 and α_2 polymorphs of piroxicam. **Cryst Eng Comm**, v.17, p.5266-5272, 2015.

USP 38. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 33). 38 ed. Rockville, MD: United States Pharmacopoeia Convention, 2015.

VAN SCHEPDAEL, A.; VAN DEN BERGH, I.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Purity control of oxytetracycline by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.730, p.305-311, 1996.

VREČER, F.; VRBINC, M.; MEDEN, A. Characterization of piroxicam crystal modifications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, p.3-15, 2003.

VUČIĆEVIĆ-PRČETIĆ, K.; CSERVENÁK, R.; RADULOVIĆ, N. Determination of neomycin and oxytetracycline in the presence of their impurities in veterinary dosage forms by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.94, p.750-757, 2011.

WALLER, C.W.; HUTCHINGS, B.L.; WOLF, C.F.; GOLDMAN, A.A.; BROCHARD, R.W.; WILLIAMS, J.H. Degradation of aureomycin: Isoaureomycin and aureomycin. **Journal of the American Chemical Society**, v.74, p.4981, 1952.

WANG, H.; WANG, B.; ZHOU, Y.; JIANG, Q. Rapid and sensitive screening and selective quantification of antibiotics in human urine by two-dimensional ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p.8049-8058, 2014.

WANG, L.F.; PENG, J.D.; LIU, L.M. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics. **Analytica Chimica Acta**, v.630, p.101-106, 2008.

WASEEM, A.; YAQOOB, M.; NABI, A. Analytical applications of Flow Injection Chemiluminescence for the determination of pharmaceuticals - A Review. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.9, p.363-395, 2013.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v.295, p.101-125, 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Churchill Livingstone: Glasgow, UK, 1999.

WEIMANN, A.; BOJESEN, G.; NIELSEN, P. Analysis of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in plasma extracts by Electrospray Tandem Mass-Spectrometry and by Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v.31, p.2053-2066, 1998.

WEIMANN, A.; BOJESEN, G. Analysis of tetracyclines in raw urine by column-switching high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.721, p.47-54, 1999.

WENG, N.; GEELLEN, S.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Assay and purity control of oxytetracycline and doxycycline by thin-layer chromatography a comparison with liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.8, p.891-898, 1990.

WHO. World Health Organization. **Technical Report Series 953, Annex 2, Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products**. Geneva: Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, 2009.

XUAN, R.; ARISI, L.; WANG, Q.; YATES, S.R.; BISWAS, K.C. Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.45, p.43-81, 2010.

YENICELI, D.; DOGRUKOL-AK, D.; TUNCEL, M. Determination of leflunomide in pharmaceutical tablets by flow-injection analysis. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.28, p.1693-1701, 2005.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. Statistical manual of the association of official analytical chemists; statistical techniques for collaborative tests, planning and analysis of results of collaborative tests. **Association of Official Analytical Chemists International**, 1975.

YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Oxytetracycline: analytical profile. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v.32, p.97-117, 2005.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; TAJERZADEH, H.; AZARMI, Y.; VALIZADEH, H. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, p.624-630, 2005.

ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NOREDDIN, A.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**, v.64, p.63-88, 2004.

ZHANG, X.R.; BAEYENS, W.R.G.; VAN DEN BORRE, A.; VAN DER WEKEN, G.; CALOKERINOS, A.C.; SCHULMAN, S.G. Chemiluminescence determination of tetracyclines based on their reaction with hydrogen peroxide catalysed by the copper ion. **Analyst**, v.120, p.463-466, 1995.

ZHENG, X.; MEI, Y.; ZHANG, Z. Flow-injection chemiluminescence determination of tetracyclines with in situ electrogenerated bromine as the oxidant. **Analytica Chimica Acta**, v.440, p.143-149, 2001.

ZHOU, J.; GERHARDT, G.C.; BARANSKI, A.; CASSIDY, R. Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics coupled with reductive fast cyclic voltammetric detection. **Journal of Chromatography**, v.839, p.193-201, 1999.