

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE
HICLATO DE DOXICICLINA EM COMPRIMIDOS
E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Ana Carolina Kogawa

Araraquara - SP

2012

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE
HICLATO DE DOXICICLINA EM COMPRIMIDOS
E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Aluno: Ana Carolina Kogawa

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como exigência para obtenção de
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa
e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado.

Araraquara – SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K88a Kogawa, Ana Carolina
Análise químico-farmacêutica de hiclato de doxiciclina em comprimidos e de seu complexo de inclusão / Ana Carolina Kogawa. – Araraquara, 2012
142 f. + il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Bioensaios. 2. Ciclodextrina. 3. Hiclato de doxiciclina. 4. Espectrofotometria. 5. CLAE. 6. Complexo de inclusão. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE HICLATO DE
DOXICICLINA EM COMPRIMIDOS
E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Araraquara, 07 de Fevereiro de 2012.

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Presidente/orientadora

Profa. Dra. Marcela Raquel Longhi

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Agradeço a aquele, que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida,

é a Ele que dirijo minha maior gratidão.

Deus, mais do que me criar, deu propósito a minha vida.

Vem Dele tudo o que sou, o que tenho e o que espero.

*Aos meus pais, tão queridos,
Lucimar e Antonio Carlos,
pelo amor, apoio, compreensão e incentivo.*

“Eu não existo longe de vocês...”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Doutora *Hérida Regina Nunes Salgado*, pela confiança, compreensão, amizade, incentivo e colaboração.

Às minhas irmãs e aos meus avós, que mesmo longe sempre estavam pertos: *Ana Claudia Kogawa, Ana Paula Kogawa, vó Toninha, Bá e Di*.

Aos meus familiares, que compartilharam comigo minha caminhada: *tia Dalva, tio Lula e Isabel Timóteo*.

Aos meus colegas de laboratório de Araraquara, que dividiram comigo aprendizado, alegrias, conquistas, frustrações, tristezas, anseios que a pesquisa nos proporciona: *Andressa Figueiredo, Bruna, Edith Cristina, Eliane Tótolli, Eliete Von Zuben, Flávia Fiorentino, Jéssica, Josilene Corrêa, Leonardo Perez, Lucas Chierentin, Lucélia Magalhães, Patrícia Alessio, Rudy Bonfilio, Tahisa Pedroso*.

À *Maria de Fátima Rodrigues*, pelo apoio técnico e amizade.

Aos docentes do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, em especial aos professores: Profa. Dra. *Maria Virgínia Scarpa* e Prof. Dr. *Marlus Chorilli*.

Aos docentes da Faculdade de Química de Araraquara, em especial aos professores: Prof. Dr. *Ionashiro Massao* e Prof. Dr. *Wagner Vilegas*.

À Profa. Dra. *Marcela Longhi*, pela colaboração de parte do meu trabalho e sonho.

Aos meus amigos de Córdoba: *Ariana Zoppi, Carolina Aloisio, Fran e Jeremias*.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Córdoba, por permitir a realização do complexo de inclusão e todas as análises térmicas e espectroscópicas.

À secretaria de pós-graduação, em especial a *Claúdia, Sônia, Laura e Joyce*.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre solícitos e dispostos a ajudar.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

Fiz do meu jeito
Veze em que fui impulsivo demais
Mas, em todo momento, quando havia dúvida
Fui decidido e não hesitei
Encarei tudo e me mantive firme
E fiz do meu jeito

Frank Sinatra

RESUMO

O hclato de doxiciclina é um antimicrobiano de amplo espectro derivado sintético da oxitetraciclina utilizado em vários países. Tem sido utilizado no tratamento de doenças infecciosas e como aditivo na alimentação de animais para facilitar o seu crescimento. No Brasil este fármaco é comercializado pela indústria farmacêutica União Química na forma farmacêutica comprimidos de 80 mg e 200 mg com o nome Doxirat[®] e pó liofilizado de 10 mL com o nome Calmium[®]. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologias analíticas mais dinâmicas para o hclato de doxiciclina, incluindo análises espectrofotométricas, cromatográficas e microbiológicas, comparar o teor e a ação antimicrobiana do hclato de doxiciclina e o seu complexo de inclusão com a β -ciclodextrina, realizar estudo de dissolução, bem como dispor de técnicas de identificação qualitativa para a forma farmacêutica comprimido e matéria-prima. A análise qualitativa foi realizada por determinação do ponto de fusão, cinzas sulfatadas, cromatografia em camada delgada e espectrofotometria no ultravioleta (UV) possibilitando a identificação das amostras. Os métodos de análise quantitativos empregados e validados foram: (i) espectrofotometria no UV a 268 nm, na faixa de concentração de 6,0 - 21,0 $\mu\text{g/mL}$ no qual foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limites de detecção e de quantificação e robustez, com teor médio nos comprimidos de 111,34 %; (ii) CLAE, coluna Luna CN e fase móvel composta por água com 0,1% de TFA: acetonitrila com 0,1% de TFA (60:40, v/v), apresentando ampla linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez, com um teor médio obtido nos comprimidos de 110,07 %; (iii) determinação da potência microbiológica, pelo método turbidimétrico, utilizando cepas de

Escherichia coli ATCC 10536 IAL 2393, em que o teor médio nos comprimidos foi 101,90%. Se compararmos os valores de teores das técnicas de UV e CLAE percebemos que são semelhantes, no entanto ao comparar com o teor obtido na análise microbiológica esse valor é diferente. Assim, a importância de se associar uma análise antimicrobiana juntamente com análises de UV e CLAE. O teste de dissolução foi desenvolvido utilizando água, HCl 0,01 M e HCl 0,1 M como meio de dissolução e aparato pá nas rotações de 50 e 75 rpm. Foi observado o longo tempo de análise nestas condições para os comprimidos revestidos de hiclato de doxiciclina, em torno de 90 minutos, e proposta outra forma farmacêutica para o fármaco. O hiclato de doxiciclina foi complexado com a β -ciclodextrina. O complexo de inclusão foi confirmado através de técnicas térmicas, TG e DSC, e estudado por métodos espectroscópicos, RMN e ROESY. Suas propriedades foram comparadas às do fármaco livre; o complexo de inclusão mostrou ser em torno de 20% mais potente e quando exposto à luz UV, o fármaco complexado apresentou ainda maior teor de hiclato de doxiciclina, em torno de 30%.

Palavras-chave: bioensaios, ciclodextrina, CLAE, complexo de inclusão, comprimidos, controle de qualidade, dissolução, espectrofotometria, hiclato de doxiciclina, validação.

ABSTRACT

Doxycycline hyclate is a broad-spectrum antibiotic synthetically derived of oxytetracycline and is used in several countries to treat infectious diseases and additive in animal nutrition to facilitate growth. In Brazil this compound is marketed by União Química Indústria Farmacêutica as 80 mg and 200 mg tablets under the name Doxitrat®. Calmium® is the name of the vial 10 mL. This study aimed to develop and validate analytical methods more dynamic for the doxycycline hyclate, including spectroscopic, chromatographic and microbiological analysis, compare the content and the antimicrobial action of doxycycline hyclate and the inclusion complex with β -cyclodextrin, conduct study of dissolution as well as providing qualitative identification techniques for the dosage form compressed and raw materials. Qualitative analysis was performed by determining the melting point, sulphated ash, thin layer chromatography and spectrophotometry in the ultraviolet (UV) allowing the identification of samples. The quantitative analysis validated methods were: (i) UV spectrophotometry at 268 nm in the concentration range of 6.0 -21.0 $\mu\text{g/mL}$ in which the parameters were evaluated for linearity, precision, accuracy, selectivity, limit of detection, limit of quantification and robustness, with an average content of 111.34% (ii) HPLC Luna CN column and mobile phase consisting of water with 0.1% TFA: acetonitrile with 0.1% TFA (60:40, v/v), with wide linearity, precision, accuracy, specificity and robustness, with an average content in tablets of 110.07%, (iii) determination of microbiological potency, by the turbidimetric method, using strains of *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393, in which the average content in the tablets was 101.90%. If we compare the values of contents of UV and HPLC techniques we find that

are similar, however when comparing with the content obtained in the microbiological analysis this value is different. Thus, the importance of combining an antimicrobial analysis with UV and HPLC analysis. The dissolution test was carried out using water, HCl 0.01 *M* and 0.1 *M* HCl as dissolution medium and paddle at 50 and 75 rpm. The long time of analysis in these conditions was observed for the tablets of doxycycline hyclate, about 90 minutes, so a proposal of pharmaceutical form was made for the drug. The doxycycline hyclate was complexed with β -cyclodextrin. The inclusion complex was confirmed by thermal techniques, TG and DSC, and studied by spectroscopic methods, NMR and ROESY. The properties of the complex formed were compared with the properties of the free drug and the inclusion complex was found to be around 20% more powerful and when the complex was exposed to UV light showed a higher content of doxycycline hyclate, around 30 %.

Keywords: bioassays, cyclodextrin, dissolution, doxycycline hyclate, HPLC, inclusion complex, quality control, spectrophotometry, tablets, validation.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	18
Lista de Tabelas.....	21
Lista de Abreviaturas.....	24
1. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	25
2. CAPÍTULO II – OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. CAPÍTULO III – REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3.1. Modificação estrutural.....	29
3.2. Formas estruturais.....	30
3.3. Estrutura química.....	30
3.4. Mecanismo de ação.....	32
3.5. Farmacocinética.....	32
3.6. Espectro microbiológico.....	33
3.7. Aplicações clínicas.....	34
3.8. Métodos de análise.....	35
4. CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS QUALITATIVOS.....	49
4.1. Introdução.....	49
4.2. Parte experimental.....	51
4.3. Análise qualitativa.....	51

4.3.1.	Determinação do ponto de fusão.....	51
4.3.1.1.	Material.....	51
4.3.1.2.	Método.....	52
4.3.1.3.	Resultados.....	52
4.3.1.4.	Discussão.....	52
4.3.2.	Cinzas sulfatadas.....	53
4.3.2.1.	Material.....	53
4.3.2.2.	Método.....	53
4.3.2.3.	Resultados.....	53
4.3.2.4.	Discussão.....	54
4.3.3.	Cromatografia em camada delgada.....	54
4.3.3.1.	Material.....	54
4.3.3.2.	Método.....	55
4.3.3.3.	Resultados.....	57
4.3.3.4.	Discussão.....	57
4.3.4.	Espectrofotometria na região do ultravioleta	58
4.3.4.1.	Material.....	58
4.3.4.2.	Método.....	58
4.3.4.3.	Resultados.....	60
4.3.4.4.	Discussão.....	61
5.	CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS.....	62

5.1.	Introdução.....	62
5.1.1.	Parâmetros de validação analítica.....	63
5.2.	Parte experimental.....	68
5.3.	Análise quantitativa.....	68
5.3.1.	Espectrofotometria na região ultravioleta.....	68
5.3.1.1.	Material.....	68
5.3.1.2.	Método.....	68
5.3.1.3.	Curva de Ringbom.....	68
5.3.1.4.	Validação.....	69
5.3.1.4.1.	Linearidade.....	69
5.3.1.4.2.	Precisão.....	69
5.3.1.4.3.	Exatidão.....	70
5.3.1.4.4.	Especificidade e seletividade.....	71
5.3.1.4.5.	Limites de detecção e de quantificação.....	71
5.3.1.4.6.	Robustez.....	72
5.3.1.5.	Resultados.....	72
5.3.1.6.	Discussão.....	79
5.3.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	81
5.3.2.1.	Material.....	81
5.3.2.2.	Método.....	81
5.3.2.3.	Validação.....	82

5.3.2.3.1.	Linearidade.....	82
5.3.2.3.2.	Precisão.....	82
5.3.2.3.3.	Exatidão.....	82
5.3.2.3.4.	Especificidade.....	84
5.3.2.3.5.	Limites de detecção e de quantificação.....	84
5.3.2.3.6.	Robustez.....	84
5.3.2.4.	Resultados.....	85
5.3.2.5.	Discussão.....	92
6.	CAPÍTULO VI – TESTE DE DISSOLUÇÃO.....	94
6.1.	Introdução.....	94
6.2.	Parte experimental.....	96
6.3.	Teste de dissolução.....	96
6.3.1.	Determinação das condições <i>sink</i>	96
6.3.2.	Determinação dos perfis de dissolução.....	96
6.4.	Resultados.....	97
6.5.	Discussão.....	98
7.	CAPÍTULO VII – ENSAIO MICROBIOLÓGICO.....	101
7.1.	Introdução.....	101
7.1.1.	Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros.....	101
7.2.	Material.....	103
7.2.1.	Preparo do meio de cultura.....	103

7.2.2.	Preparo do inóculo.....	103
7.2.3.	Preparo da solução de hiclato de doxiciclina SQR.....	104
7.2.4.	Preparo das amostras de hiclato de doxiciclina comprimidos.....	104
7.3.	Métodos.....	104
7.4.	Obtenção da curva analítica.....	105
7.5.	Determinação do hiclato de doxiciclina em comprimidos.....	105
7.6.	Validação.....	106
7.6.1	Linearidade.....	106
7.6.2.	Precisão.....	106
7.6.3.	Exatidão.....	106
7.6.4.	Limite de detecção e de quantificação.....	108
7.6.5.	Robustez.....	108
7.7.	Resultados.....	108
7.8.	Discussão.....	113
8.	CAPÍTULO VIII – COMPLEXAÇÃO	115
8.1.	Introdução.....	115
8.2.	Material.....	116
8.3.	Método.....	117
8.4.	Resultados.....	118
8.4.1.	Verificação da complexação.....	118
8.4.2.	Estudo do complexo.....	119

8.5.	Discussão.....	123
9.	CAPÍTULO IX – COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO.....	125
9.1.	Introdução.....	125
9.2.	Material.....	125
9.3.	Método.....	125
9.4.	Resultado das comparações.....	126
9.4.1.	Comparação da atividade antimicrobiana.....	126
9.4.2.	Comparação do teor.....	131
10.	CAPÍTULO X - CONCLUSÕES.....	133
11.	REFERÊNCIAS.....	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da tetraciclina.....	29
Figura 2	Obtenção de doxiciclina monoidratada e cloridrato de doxiciclina a partir da forma hclato.....	30
Figura 3	Estrutura química do hclato de doxiciclina (CAS 24390-14-5).....	31
Figura 4	Grupos funcionais correspondentes aos valores de pK_a	31
Figura 5	(A) Capilar contendo hclato de doxiciclina SQR antes da análise e (B) Capilar contendo hclato de doxiciclina depois do aquecimento a 201°C.....	52
Figura 6	Perfil cromatográfico do hclato de doxiciclina SQR (A) e do hclato de doxiciclina comprimidos (B) sem solução de EDTA pulverizada na sílica com visualização em câmara de UV a 254 nm, fase estacionária composta por uma camada de sílica-gel e fase móvel contendo diclorometano: metanol: água, 57:33:10 (v/v/v).....	56
Figura 7	Perfil cromatográfico do hclato de doxiciclina SQR (A) e hclato de doxiciclina comprimidos (B), ambos com valor de R_f 0,73 através de visualização em câmara de UV a 254 nm, fase estacionária composta por uma camada de sílica-gel previamente pulverizada com solução de EDTA 10% e fase móvel contendo diclorometano: metanol: água, 57:33:10 (v/v/v).....	57
Figura 8	Espectros de hclato de doxiciclina SQR em água purificada, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M e metanol na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$	60
Figura 9	Espectros de hclato de doxiciclina SQR, comprimidos e excipiente em ácido clorídrico 0,01 M na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$	60
Figura 10	Curva de Ringbom para o hclato de doxiciclina SQR.....	73
Figura 11	Curva analítica de soluções de hclato de doxiciclina SQR, em concentrações de 6, 9, 12, 15, 18 e 21 $\mu\text{g/mL}$, obtida pelo método de espectrofotometria na região do UV a 268 nm.....	74
Figura 12	Curva analítica de soluções de hclato de doxiciclina comprimidos, em concentrações de 6, 9, 12, 15, 18 e 21 $\mu\text{g/mL}$, obtida pelo método de espectrofotometria na região do UV a 268 nm.....	75
Figura 13	Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria na região do UV para as soluções de hclato de doxiciclina SQR e hclato de	

	doxiciclina comprimidos e excipientes preparadas em ácido clorídrico 0,01 <i>M</i> na concentração de 15 µg/mL.....	76
Figura 14	Curvas analíticas de soluções de hiclato de doxiciclina SQR, em concentrações de 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL, obtidas pelo método de CLAE.....	86
Figura 15	Cromatograma da degradação ácida de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL em HCl 0,1 <i>M</i> após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.....	87
Figura 16	Cromatograma da degradação básica de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL em NaOH 0,1 <i>M</i> após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.....	88
Figura 17	Cromatograma da degradação oxidativa de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL em H ₂ O ₂ 3% após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.....	88
Figura 18	Cromatograma da degradação neutra de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL em água purificada após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.....	89
Figura 19	Cromatograma da degradação por exposição à luz UV da solução de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL após 3, 6 e 24 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.....	89
Figura 20	Perfil de dissolução do hiclato de doxiciclina comprimidos em água purificada, HCl 0,1 <i>M</i> e HCl 0,01 <i>M</i> a 50 rpm.....	98
Figura 21	Perfil de dissolução do hiclato de doxiciclina comprimidos em água purificada, HCl 0,1 <i>M</i> e HCl 0,01 <i>M</i> a 75 rpm.....	98
Figura 22	Curvas analíticas de soluções de hiclato de doxiciclina SQR e amostra, em concentrações de 4, 6 e 9 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.....	110

Figura 23	Estrutura química da β -ciclodextrina.....	115
Figura 24	Curvas de DSC (A) e TG (B) de β -cyclodextrin (β CD), hidrato de doxiciclina (DOX), mistura física (DOX: β CD PM) e complexo de inclusão (DOX: β CD Complex).....	119
Figura 25	Energia mínima de conformação da DOX.....	119
Figura 26	Estrutura química da DOX com os anéis identificados.....	120
Figura 27	Conformação 3D do complexo entre a DOX e a β -CD obtido por “docking” molecular.....	120
Figura 28	Identificação dos prótons da β -CD.....	122
Figura 29	Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo DOX: β -CD.....	123
Figura 30	Turbidez dos meios de cultura relacionados com o controle negativo (A), controle positivo (B), solução de DOX na concentração de 9 μ g/mL (C), solução de CI na concentração de 9 μ g/mL (D).....	127
Figura 31	Turbidez dos meios de cultura relacionados com o controle negativo (A), controle positivo (B), solução de β -CD na concentração de 9 μ g/mL (C).....	128
Figura 32	Turbidez dos meios de cultura relacionados com o controle negativo (A), controle positivo (B), solução de DOX na concentração de 9 μ g/mL após exposição UV (C), solução de CI na concentração de 9 μ g/mL após exposição UV (D).....	130
Figura 33	Sobreposição dos cromatogramas das soluções de DOX e CI, ambas na concentração de 80 μ g/mL, após exposição a luz UV por 6 horas e solução de DOX, na concentração de 80 μ g/mL, não exposta à luz UV.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas.....	41
Tabela 2	Classificação dos testes.....	64
Tabela 3	Ensaio necessários para a validação do método analítico.....	64
Tabela 4	Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de espectrofotometria na região do UV.....	71
Tabela 5	Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva de Ringbom do hiclato de doxiciclina SQR.....	72
Tabela 6	Análise de variância dos valores de absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de hiclato de doxiciclina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	75
Tabela 7	Teste F e teste t da seletividade do método espectrofotométrico na região do UV.....	76
Tabela 8	Valores determinados para o doseamento de hiclato de doxiciclina comprimidos pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	77
Tabela 9	Valores do teste F e teste t da precisão inter-analista do método espectrofotométrico na região do UV.....	78
Tabela 10	Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	78
Tabela 11	Valores calculados nos testes F e t para variações no comprimento de onda no método espectrofotométrico na região do UV para determinação de hiclato de doxiciclina.....	79
Tabela 12	Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de CLAE.....	83
Tabela 13	Valores das áreas de hiclato de doxiciclina determinadas por CLAE para a construção da curva analítica do hiclato de doxiciclina SQR.....	85
Tabela 14	Análise de variância das áreas obtidas na curva analítica de hiclato de doxiciclina por CLAE.....	86
Tabela 15	Valores obtidos no teste de recuperação do hiclato de doxiciclina utilizando o	

	método de CLAE.....	90
Tabela 16	Valores obtidos para a determinação de teor de hiclato de doxiciclina em amostras de comprimidos através do método de CLAE.....	91
Tabela 17	Teste F e teste t da precisão inter-analista do método de CLAE.....	91
Tabela 18	Valores do teste F e teste t para variações no método de CLAE para determinação de hiclato de doxiciclina.....	92
Tabela 19	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para a determinação de hiclato de doxiciclina comprimidos.....	102
Tabela 20	Parâmetros estabelecidos para a determinação de hiclato de doxiciclina comprimidos pelo método turbidimétrico.....	103
Tabela 21	Preparo das soluções para o teste de exatidão do método turbidimétrico para o hiclato de doxiciclina.....	107
Tabela 22	Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva analítica de hiclato de doxiciclina, para o método turbidimétrico.....	109
Tabela 23	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de hiclato de doxiciclina SQR, utilizando o método turbidimétrico.....	110
Tabela 24	Valores determinados para o doseamento de hiclato de doxiciclina comprimidos, pelo método turbidimétrico.....	111
Tabela 25	Valores calculados no teste F e teste t da precisão inter-analista do método turbidimétrico.....	112
Tabela 26	Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico.....	112
Tabela 27	Teste F e teste t para variação no tempo de incubação do micro-organismo no método turbidimétrico para determinação do hiclato de doxiciclina.....	113
Tabela 28	Análise dos componentes energéticos obtidos por MM-PBSA para análise do complexo DOX:β-CD por simulação dinâmica molecular.....	121

Tabela 29	Deslocamento químico para os prótons da β -CD no estado livre e no complexo com a DOX.....	122
Tabela 30	Absorvância de hiclato de doxiciclina nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$ antes da degradação na luz UV.....	127
Tabela 31	Absorvância do complexo de inclusão nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$ antes da degradação na luz UV.....	128
Tabela 32	Absorvância de solução de βCD nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$	129
Tabela 33	Absorvância de hiclato de doxiciclina nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$ expostos à luz UV.....	130
Tabela 34	Absorvância do complexo de inclusão nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$ expostos à luz UV.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Analysis of variance

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD: Cromatografia em camada delgada

CD: Ciclodextrina

CI: Complexo de inclusão

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CQ: Controle de Qualidade

CV: Coeficiente de variação

DPR: Desvio padrão relativo

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

e.p.m.: Erro padrão da média

r: Coeficiente de correlação linear

Rf: Fator de retenção

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ROESY: *Rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy*

SQR: Substância química de referência

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoracético

TG: Termogravimetria

UV: Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

O hclato de doxiciclina é um agente antimicrobiano de amplo espectro derivado sintético da oxitetraciclina utilizado em vários países para o tratamento de doenças infecciosas bem como aditivo na alimentação de animais para facilitar o seu crescimento.

Faz parte da lista de medicamentos do SUS (Sistema Único de Saúde), um modelo de assistência à saúde, e sua entrega é gratuita na rede pública mediante prescrição médica. Assim, é de extrema importância o controle de qualidade deste medicamento para que seja possível assegurar sua eficácia e segurança.

No Brasil este medicamento é comercializado pelas indústrias farmacêuticas Apotex, EMS, Germed, Gross, Hexal, Legrand, Neo química, Neovita, Pfizer, Ranbaxy, Sanval, Teuto e União Química. Nesta o hclato de doxiciclina encontra-se na forma farmacêutica comprimidos de 80 mg e 200 mg com o nome Doxirat[®] e frasco-ampola de 10 mL com o nome Calmium[®].

Várias técnicas analíticas foram discutidas nesta dissertação com foco em aplicação no Controle de Qualidade visando análises eficazes e dinâmicas bem como na pesquisa de formas mais ativas para melhor aproveitamento da atividade antimicrobiana do fármaco.

Foram realizados métodos analíticos para determinação do hclato de doxiciclina, uma vez que não apresenta monografia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010); na F. Portuguesa (2005), USP 33 (2010) e BP (2010) o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrito utiliza tampão e coluna com temperatura controlada de 60°C; na USP 33 (2010) consta a análise de dissolução de comprimidos de hclato de doxiciclina com duração de 90 minutos; na BP (2010) o método espectrofotométrico descrito utiliza

metanol como solvente. Dessa forma, neste trabalho foram discutidos (a) *métodos de separação* como cromatografia em camada delgada (CCD) e CLAE, (b) *métodos de quantificação* como espectrofotometria, CLAE e ensaio microbiológico, (c) *ensaio de dissolução*, (d) *complexação com β -ciclodextrina* e (e) *avaliação do teor e ação antimicrobiana do complexo de inclusão*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa do hclato de doxiciclina em comprimidos e avaliação da complexação do fármaco à β -ciclodextrina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a faixa de fusão do hclato de doxiciclina SQR.
- Determinar o teor de cinzas sulfúricas do hclato de doxiciclina SQR.
- Desenvolver método por CCD para identificação de hclato de doxiciclina em comprimidos.
- Desenvolver método por espectrofotometria na região do UV para identificação de hclato de doxiciclina em comprimidos.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do UV para determinação quantitativa de hclato de doxiciclina em comprimidos.
- Desenvolver e validar método por CLAE para determinação quantitativa de hclato de doxiciclina em comprimidos.
- Desenvolver e avaliar método de dissolução para comprimidos de hclato de doxiciclina.
- Desenvolver e validar método microbiológico para determinação quantitativa de hclato de doxiciclina em comprimidos.

- Realizar a complexação do hclato de doxiciclina com a β -ciclodextrina.
- Realizar análises térmicas e espectroscópicas para caracterização do complexo de inclusão.
- Comparar o complexo de inclusão com o hclato de doxiciclina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Modificação Estrutural

As tetraciclina são um grupo de antimicrobianos de amplo espectro que tem sido utilizadas no tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais. Alguns derivados de tetraciclina: minociclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, são de uso frequente na clínica e são baseados na funcionalidade da estrutura molecular, na qual dominam as propriedades físicas, aparência e característica espectroscópica eletrônica e vibracional dos grupos (YASIN *et al.*, 1988).

Algumas modificações ou manutenção de radicais na estrutura da tetraciclina influenciam na atividade antimicrobiana.

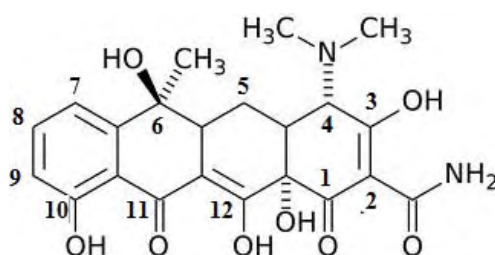


Figura 1. Estrutura química da tetraciclina.

Qualquer mudança no oxigênio do carbono 1 e na hidroxila do carbono 3 torna a estrutura inativa. O grupamento CONH₂ no carbono 2 retém ligeira atividade da molécula. O N(CH₃)₂ no carbono 4 é essencial à atividade antimicrobiana. A inserção de -OH, -CH₃CO, -RCOO no carbono 5 retém a atividade. A remoção de -OH, -CH₂ ou ambos no carbono 6 torna o composto mais estável. A adição de -Cl, -Br, -N(CH₃)₂ no carbono 7 retém a atividade, no entanto, se houver a presença do -Cl a molécula apresentará fototoxicidade. A presença de -Cl ou -CH₃ no carbono 9 diminui a atividade da molécula.

A estrutura da oxitetraciclina (OTC) difere da doxiciclina (DOX) pelo radical do carbono 6. A OTC apresenta uma hidroxila além da metila, enquanto que a DOX apresenta um hidrogênio e a metila.

3.2. Formas estruturais

O fármaco doxiciclina se apresenta de três formas: hiclato, cloridrato e monoidrato. A partir do hiclato de doxiciclina é possível obter as outras formas. A forma hiclato dissolvida em água e neutralizada com hidróxido de sódio se transforma em doxiciclina monoidratada. Esta forma, por sua vez, tendo adição de ácido clorídrico se transforma em cloridrato de doxiciclina. A Figura 2 ilustra o processo acima citado.

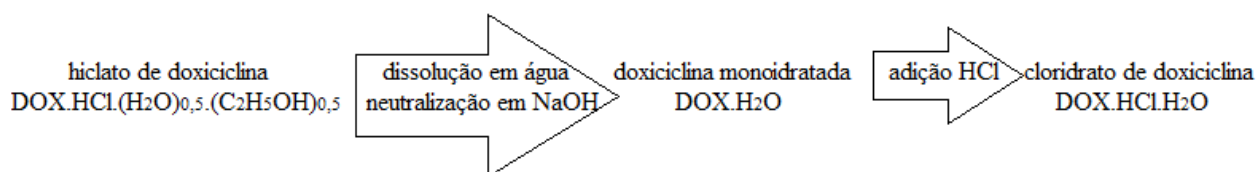


Figura 2. Obtenção de doxiciclina monoidratada e cloridrato de doxiciclina a partir da forma hiclato.

A porcentagem de doxiciclina na forma hiclato é de 86,6%, na forma cloridrato é de 89,1% e na forma monoidratada é de 96,1%.

3.3. Estrutura química

O hiclato de doxiciclina (Figura 3) é a forma hemiidratada e hemietanolada (NAIDONG *et al.*, 1990). Sua descrição é de pó cristalino higroscópico amarelo, devendo ser armazenado em recipientes hermeticamente fechados e protegidos da luz (REYNOLDS, 2007). Possui o nome químico: 4-(dimetilamino)-1,4,4^a,5,5^a,6,11,12^a-octahidro-

3,5,10,12,12^a- pentahidroxi- 6- metil-1,11-dioxo-2-naftaceno-carboxamida monoclóridato monoidratado, combinado com álcool etílico (REYNOLDS, 2007).

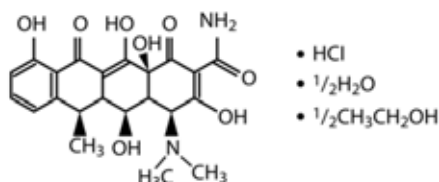


Figura 3. Estrutura química do hclato de doxiciclina (CAS 24390-14-5).

Este fármaco apresenta fórmula molecular $(C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl)_2 \cdot C_2H_6O \cdot H_2O$, CAS 24390-14-5 e massa molecular igual a 1025,89 g/mol (REYNOLDS, 2007). O hclato de doxiciclina queima sem que ocorra fusão em 201°C (O'NEIL, 2006). Os valores de pK_a das tetraciclinas são aproximadamente 3-4, 7-8 e 9-10. SHARIATI e colaboradores (2009) apresentam os seguintes valores de pK_a para o hclato de doxiciclina: pK_{a1} 3,02 ± 0,3; pK_{a2} 7,97 ± 0,15; pK_{a3} 9,15 ± 0,3 (Figura 4). Hclato de doxiciclina é comercializado nas formas farmacêuticas comprimido, drágea, pó liofilizado, cápsula e xarope.

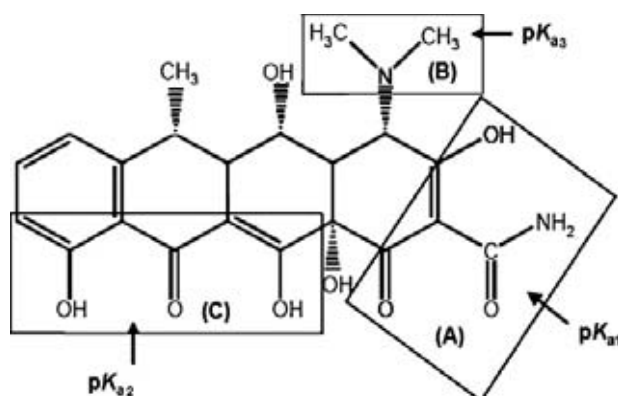


Figura 4. Grupos funcionais correspondentes aos valores de pK_a.

3.4. Mecanismo de ação

As tetraciclinas inibem a síntese de proteínas através de sua ligação ao ribossomo bacteriano 30S, impedindo o acesso do aminoacil-tRNA ao local acceptor no complexo mRNA-ribossomo (BRUNTON *et al.*, 2010). No entanto, a doxiciclina tem sido estudada como inibidor das metaloproteinases da matriz (substância intercelular), uma ação não relacionada com seus efeitos sobre a síntese de proteínas bacterianas (SKÚLASON *et al.*, 2003; BRUNTON *et al.*, 2010).

3.5. Farmacocinética

Irritação gastrointestinal e perturbação da flora bacteriana intestinal ocorrem com menos frequência com a doxiciclina do que com as drogas mais hidrofílicas, que têm de ser dadas em doses mais elevadas para absorção (ARONSON, 2006). Como a doxiciclina não tem sua absorção interferida pela ingestão de alimentos é possível melhorar a tolerabilidade ao administrar o fármaco com alimentos (BRUNTON *et al.*, 2010).

Picos plasmáticos de concentração 2,6 µg/mL foram relatados 2 horas depois de dose oral de 200 mg, caindo para 1,45 µg/mL em 24 horas. Depois de infusão intravenosa de mesma dose o mesmo pico plasmático de concentração foi pouco maior, mas tornou-se muito similar aos observados após dose oral em equilíbrio nos tecidos (MARTINDALE, 2009).

Cerca de 80 a 95% da doxiciclina na circulação estão vinculadas às proteínas plasmáticas.

A meia-vida biológica varia de 12 a 24 horas. A doxiciclina é mais lipossolúvel do que as outras tetraciclinas. É amplamente distribuída nos tecidos e fluidos. Em pacientes

com função renal normal cerca de 40% da dose é lentamente excretada na urina, embora maior quantidade seja excretada por essa via se a urina estiver alcalina. Todavia, a maioria da dose da doxiciclina é excretada nas fezes após quelação no intestino. Embora tenha sido apontada que a doxiciclina sofre inativação parcial no fígado, muitas fontes consideram isto duvidoso; contudo, a cinética da doxiciclina tem sido relatada alterada em pacientes que fazem uso de medicamentos que induzem metabolismo hepático (MARTINDALE, 2009).

A doxiciclina não se acumula significativamente em pacientes com problemas renais, embora a excreção pela urina seja prejudicada; quantidades maiores de doxiciclina são excretadas pelas fezes nestes pacientes. No entanto, tem sido relatado que em pacientes com insuficiência renal existe o acúmulo de doxiciclina. A remoção de doxiciclina por hemodiálise é insignificante (MARTINDALE, 2009).

3.6. Espectro microbiológico

A doxiciclina é mais ativa do que as outras tetraciclinas contra muitas espécies de bactérias incluindo *Streptococcus pyogenes*, enterococci, *Nocardia* spp e várias anaeróbias.

A resistência cruzada é comum, embora alguns *Staphylococcus aureus* resistentes a tetraciclinas respondam à doxiciclina.

A doxiciclina é também mais ativa contra protozoários, particularmente *Plasmodium* spp (MARTINDALE, 2009).

3.7. Aplicações clínicas

As tetraciclinas têm sido extensamente utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, e como aditivas na alimentação de animais para facilitar o seu crescimento (BRUNTON *et al.*, 2010).

Muitas das vezes a doxiciclina é preferida ao invés de outras tetraciclinas no tratamento de infecções por sua melhor absorção e meia-vida longa, que permite menos doses diárias (MARTINDALE, 2009).

A doxiciclina é útil para o tratamento das infecções do trato respiratório, porque proporciona uma cobertura contra micro-organismos atípicos, visto que os patógenos respiratórios estão se tornando cada vez mais resistentes a outras classes de fármacos (BRUNTON *et al.*, 2010). Outra vantagem também é que ela pode ser administrada a pacientes com problemas renais. Porém, doses relativamente altas devem ser administradas por pacientes com infecção no trato urinário por causa da sua baixa excreção renal (MARTINDALE, 2009).

É frequentemente usada no tratamento de prostatite crônica, sinusite, sífilis, clamídia e doença inflamatória pélvica (RAMESH *et al.*, 2010). Tem ação contra protozoários e deve ser administrada em conjunto com quinina na gestão do *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina.

Soluções de doxiciclina são também usadas para efusões malignas (YELLIN, 1994) que ocorrem quando há um aumento na quantidade dos líquidos biológicos, geralmente associadas com malignidades e linfomas de pulmão, mama e ovário (MARTINDALE, 2009).

3.8. Métodos de análise

Em condições anormais (calor, pH, umidade), as tetraciclinas sofrem epimerização reversível na posição C-4 e C-6 (Figura 1) para formar uma mistura de produtos de degradação, os quais são muito similares estruturalmente com a doxiciclina e entre eles. Esses produtos têm muito baixa atividade antibiótica e muitos deles mostram certa toxicidade (MONSER e DARGHOUTH, 2000). Estes compostos podem estar contidos como impurezas em amostras a granel de doxiciclina (FIORI *et al.*, 2004). KAZEMIFARD e MOORE (1997) apontam que os métodos oficiais de análise microbiana são demorados e pobres em termos de sensibilidade e especificidade e outro problema seria o fato de que os produtos de degradação, como 6-epidoxiciclina, que estão presentes em quantidades variáveis nas matérias-primas e produtos acabados também podem ter propriedades antimicrobianas, representando 2-5% da atividade da tetraciclina. Assim, os resultados do bioensaio não seriam necessariamente uma representação fiel da potência antimicrobiana da doxiciclina. As vantagens de CLAE para antibióticos sobre o microbiológico são especificidade, rapidez e precisão (THOMAS, 1987). No entanto, a baixa atividade antimicrobiana dos possíveis contaminantes presentes em uma amostra pode ser detectada por bioensaios, tanto na forma/tamanho do halo de inibição, utilizando método de difusão em ágar, como na turbidez da suspensão de micro-organismos, utilizando método da turbidimetria. A principal vantagem do método turbidimétrico é o menor tempo de análise (F. BRAS. V, 2010). A existência de bioensaios juntamente com análises cromatográficas fornecerá informações importante sobre a qualidade do hiclato de doxiciclina.

NAIDONG e colaboradores (1990) analisaram a oxitetraciclina e a doxiciclina por cromatografia em camada delgada e compararam com a cromatografia líquida de alta

eficiência. Foi obtida excelente correlação ($r > 0,9999$) e o desvio padrão relativo para a análise do principal componente foi $<2\%$ e $<1\%$ para CCD e CLAE, respectivamente. Na comparação, os autores observaram que os diferentes componentes são melhor separados por CLAE.

O EDTA, por ser um agente quelante, se liga aos possíveis metais da camada de sílica e permite a eluição da doxiciclina, por isso ele é imprescindível na análise. A pulverização do EDTA é a forma de aplicação mais rápida e com melhor distribuição. O pH preferencialmente alcalino melhora as propriedades quelantes e evita a formação de 4-epímeros. Com pH 9,0 todas as impurezas de oxitetraciclina ou doxiciclina foram bem separadas do composto principal e entre si (NAIDONG *et al.*, 1990). Os mesmos autores também alertam que o conteúdo baixo de água na fase móvel oferece migração insuficiente, enquanto que conteúdos maiores resultam em difusão aumentada dos pontos.

Existem métodos desenvolvidos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, para detecção de hclato de doxiciclina ou doxiciclina em amostras de fígado e tecido muscular (CROUBELS *et al.*, 1998), plasma de peru (SANTOS *et al.*, 1996), leite (DENOBILO e NASCIMENTO, 2004), pré-misturas medicamentosas para incorporação em alimento medicamentoso (FIORI *et al.*, 2004), produtos farmacêuticos (MONSER e DARGHOUTH, 2000) e pó a granel, comprimidos e urina humana (RAMESH *et al.*, 2010). Tanto MONSER e DARGHOUTH (2000) quanto RAMESH e colaboradores (2010) utilizaram tampão na fase móvel, ajustado para pH 2 e 4, respectivamente, para determinação de doxiciclina por CLAE.

YASIN e JEFFERIES (1988) realizaram a análise de tetraciclina e suas impurezas por CLAE usando coluna polimérica Hamilton PRP-1. A fase móvel utilizada foi tampão

fosfato citrato com 2-propanol, tetraidrofurano como modificador orgânico e diclorometano.

Com o objetivo de diminuir o tempo de análise, HOOGMARTENS e colaboradores (1989) substituíram o tetraidrofurano por 2-metil-2-propanol usando coluna de poliestireno-divinilbenzeno.

NAIDONG e colaboradores (1990) descreveram outra fase móvel para a análise de doxiciclina usando coluna de PS-DVB aquecida a 60°C. A fase móvel utilizada foi 2-metil-2-propanol: tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0: ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M, pH 8,0: EDTA 0,01 M, pH 8,0: água (5,8: 10: 5: 10: 69,2, v/v/v/v/v).

BRYAN e STEWART (1993, 1994) propuseram, para separação de tetraciclinas por CLAE, fase móvel constituída de acetonitrila e perclorato de sódio 0,02 M, pH 2,0, e fase estacionária PS-DVB.

MONSER e DARGHOUTH (2000), em estudo para determinação simultânea por CLAE de tetraciclina e 6-epidoxiciclina em pó a granel e preparações farmacêuticas, usaram coluna de carbono empacotada Hypercarb (*porous graphitic carbon* - PGC) e fase móvel contendo tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 2,0) e ACN na proporção 40:60, v/v. As separações de oxitetraciclina, metaciclina, clortetraciclina, doxiciclina e 6-epidoxiciclina ocorreram em menos de doze minutos.

Para o uso de colunas poliméricas tem sido quase sempre, em conjunto com a temperatura elevada da coluna, necessário o uso de modificador orgânico viscoso e fase móvel alcalina, contendo aditivos como o íon tetrabutilamônio ou EDTA. No estudo de MONSER e DARGHOUTH (2000) foi selecionado pH 2,0 por minimizar a formação de isômeros análogos que ocorrem rapidamente em alcalinidade média. Em pH alcalino estes

compostos são suprimidos e sua hidrofobicidade aumentada e consequentemente estes solutos podem interagir fortemente com a superfície hidrofóbica da PGC, principal motivo pela retenção excessiva. Em pH ácido, estes compostos ficam na forma ionizada, portanto sua hidrofobicidade é diminuída e assim sua retenção. A melhor separação foi alcançada com tampão fosfato de potássio (pH 2,0): acetonitrila (60:40, v/v), pois com 50% de acetonitrila a separação de oxitetraciclina, metaciclina, clortetraciclina, doxiciclina e 6-epi-doxiciclina não foi efetiva (MONSER e DARGHOUTH, 2000).

A PGC apresenta vantagens de estabilidade físico-química e seletividade para diastereômeros e isômeros geométricos. Apresenta eficiência na separação de fármacos e moléculas pequenas ionizáveis que não são retidas na coluna ODS (octadecilsiloxano). A PGC mostrou seletividade para separação de componentes, difícil ou impossível de alcançar na sílica e polimérica (MONSER e DARGHOUTH, 2000).

No desenvolvimento de um método de CLAE simples para separação da doxiciclina, SKÚLASON e colaboradores (2003) propuseram não mais o uso de tampão na fase móvel, mas sim uma mistura de acetonitrila: água: ácido perclórico (26:74:0,25; v/v/v), ajustada para pH 2,5 com NaOH 5 M. O pH continuou ácido (2,5) por dois motivos: a forma ionizada diminui o tempo de retenção e o pH tem que ser menor que o pKa da doxiciclina. A vida útil da fase estacionária é reduzida em pH baixo, especialmente se o pH for inferior a 2,0. A formação de análogos isoméricos é diminuída conforme os valores de pH são reduzidos.

SKÚLASON e colaboradores (2003) testaram cinco colunas. Hypersil ODS C18 (100 x 4,6 mm), Cosmosil C₁₈ (150 e 250 x 4,6 mm) e Phenomenex Luna (5 µm C₈ 150 e 250 x 4,6 mm). O melhor resultado foi encontrado usando Phenomenex Luna (5 µm C₈ 250

x 4,6 mm) com pré-coluna Phenomenex C₈ (4 x 10 mm). No entanto, mesmo com toda a preocupação em diminuir o tempo da análise, o tempo de retenção com os parâmetros citados foi de 25,16 minutos.

FIORI e colaboradores (2004) propuseram o desenvolvimento de método por CLAE para análise de doxiciclina em mistura medicamentosa para incorporação em alimentos. Para isso, testaram duas colunas, Phenomenex Luna C₁₈ 3,5 µm (150 x 2,0 mm) e Phenomenex Synergi Polar-RP 80A (4 µm, 150 x 2,0 mm), com distintas fases móveis, ácido oxálico (pH 2,5; 0,02 M): acetonitrila : metanol (75:17:8, v/v/v) e ácido oxálico (pH 2,5; 0,02 M): acetonitrila (82:18, v/v), respectivamente. Esta última fase móvel foi capaz de melhorar a separação e a simetria do pico.

A coluna Phenomenex Synergi Polar-RP 80A (4 µm, 150 x 2 mm) foi útil para análise de tetraciclina sendo alcançada a separação de metaciclina, 6-epidoxiciclina e doxiciclina. A coluna Phenomenex Luna C₁₈ (3,5 µm 150 x 2 mm) pode ser usada para separar doxiciclina de impurezas (metaciclina e 6-epidoxiciclina) quando isto for objetivo principal. Usando a coluna Luna C₁₈ o tempo de retenção da doxiciclina e das impurezas ocorreram em 12 e 9,5 minutos, respectivamente (FIORI *et al.*, 2004).

Comparando-se as fases móveis e as colunas dos métodos utilizadas por YASIN e JEFFERIES (1988) e por FIORI e colaboradores (2004), percebe-se que o tempo de preparação melhorou, uma vez que ficaram mais fáceis e mais dinâmicas de se prepararem. Em relação ao tempo de corrida da doxiciclina, comparando-se os métodos estudados por BRYAN e STEWART (1993) e por FIORI e colaboradores (2004) observou-se que houve uma diminuição, passando de mais de 30 minutos para 12 minutos. Dessa forma, nota-se que houve uma evolução no sentido de pesquisar métodos de análise mais rápidos e que

exijam fácil manuseio dos reagentes e preparação das soluções, sem perder os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez de uma análise.

Na farmacopeia britânica (BP, 2010) consta a análise espectrofotométrica do hclato de doxiciclina utilizando metanol como solvente, enquanto que em outros compêndios oficiais (F. PORTUGUESA, 2005; USP 33, 2010) este método não é citado na monografia do fármaco.

A Tabela 1 mostra alguns métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas.

Tabela 1. Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Coluna Nova-Pak Waters RP8 (150 mm x 3,9 mm). Fase móvel “A” contendo ácido oxálico 0,01 M: acetonitrila (ACN): TEA (90:9:0,1, v/v/v) e fase móvel “B” contendo ACN.	Ultravioleta em 363 nm	Leite	DENOBILE e NASCIMENTO, 2004
CLAE	Coluna Nucleosil 100-5 C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm) e pré-coluna (10 mm x 4,6 mm). Fase móvel contendo ACN:fosfato dissódico hidrogenado 0,01 M (20:80, v/v) e sal sódico octanosulfonato 5 mM, sulfato hidrogenado de tetrabutilamônio 3 mM e 0,01% de EDTA, com pH ajustado para 3,8 com ácido fosfórico	Ultravioleta em 370 nm	Leite de ovelha	FLETOURIS <i>et al.</i> , 2008
CLAE	Coluna Zorbax SB C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel contendo tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 5.1):metanol (95:5, v/v)	Ultravioleta em 230 nm	Padrões comprimidos	GAUDIANO <i>et al.</i> , 2008

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Coluna Phenomenex Luna C ₁₈ (150 mm × 4,5 mm) e pré-coluna μBondapak C ₁₈ . Fase móvel contendo ACN : tampão fosfato 0,023 M (25:75, v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido 1-octanossulfônico 4 mM	Ultravioleta em 244 e 350 nm	Soro humano	LI <i>et al.</i> , 2004
CLAE	Coluna de C18 (300 mm x 4,6 mm) e fase móvel contendo fosfato ácido de potássio 0,05 M (pH 2,5): ACN (84:16, v/v)	Eletroquímica 1,2 V	Pó a granel, comprimidos e cápsulas	KAZEMIFARD <i>et al.</i> , 1997
CLAE	Coluna Phenomenex Synergi Polar-RP 80-A (150 mm x 2 mm). A fase móvel contendo ácido oxálico 0,02 M (pH 2,5): ACN (82:18, v/v)	Ultravioleta em 346 nm	Mistura medicamentosa para alimentos	FIORI <i>et al.</i> , 2004

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Coluna PS-DVB, de poli (estireno-divinilbenzeno) (250 mm x 4,6 mm). 2-metil-2-propanol: tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 8): sulfato hidrogenado de tetrabutilamônio 0,02 M (pH 8): EDTA 0,01 M (pH 8): água (5,8:10:5:10:69,2, v/v/v/v/v) como fase móvel	Ultravioleta em 254 nm	Amostras comerciais e padrões	NAIDONG <i>et al.</i> , 1990
CLAE	Coluna Symmetry Shield RP8 (150 mm x 4,6 mm) e pré-coluna Brownlee RP-8. Fase móvel contendo fosfato ácido de potássio 0,01 M: metanol: ACN (72,1:20:5 v/v) e EDTA sódico 0,03 mM, com 60% de ácido perclórico (2,9 mL), pH ajustado para 2,5 com hidróxido de potássio	Ultravioleta em 350 nm	Plasma de cérebro de rato	COLOVIC <i>et al.</i> , 2003

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Coluna Hamilton PRP-1. Tampão fosfato -citrato 0,07 M (pH 5): 2-propanol: tetraidrofurano: diclorometano (81:11:7:1, v/v/v/v) como fase móvel	Ultravioleta em 272 nm	Mistura farmacêutica	YASIN <i>et al.</i> , 1988
CLAE	Coluna C ₁₈ PLRP-S (PSDVB) (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e coluna PM-C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm). ACN: perclorato de sódio 0,02 M (pH 2) (15:85, v/v) como fase móvel	Ultravioleta em 280 nm	Padrões e pó a granel	BRYAN <i>et al.</i> , 1993 e 1994
CLAE	Coluna RoGel (RSL) (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel contendo tetraidrofurano: dimetilformamida: ácido acético: água: EDTA (72:10:16:2:0,0015, v/v/v/v/m).	Ultravioleta em 280 nm	Padrões	HOOGMARTENS <i>et al.</i> , 1989
CLAE	Coluna PGC (100 mm x 4,6 mm). Tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 2): ACN (40:60, v/v)	Ultravioleta em 268 nm	Pó a granel e comprimido	MONSER <i>et al.</i> , 2000

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Pré-coluna e coluna PLRP-S e PRP-1 (Hamilton) (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel contendo 2-metil-2-propanol: tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 8): sulfato de tetrabutilamônio 0,02 M (pH 8): EDTA 0,1 M (pH 8): água (6:10:5:1;78, v/v/v/v/v)	Ultravioleta em 254 nm	Padrões	HOOGMARTENS <i>et al.</i> , 1989
CLAE	Coluna Phenomenex Luna C ₈ (250 mm x 4,6 mm) com pré-coluna Phenomenex C ₈ (4 mm x 10 mm). Fase móvel contendo ACN: água: ácido perclórico (26: 74: 0,25, v/v/v) ajustado para pH 2,5 com hidróxido de sódio 5 M	Ultravioleta em 350 nm	Padrão	SKULASON <i>et al.</i> , 2003
CLAE	Coluna de copolímero estireno-divinilbenzeno (250 mm x 4,6) mantida a 60°C. Fase móvel contendo 2-metil-2-propanol, hidrogenossulfato de tetrabutilamônio, edetato de sódio, com pH ajustado para 8	Ultravioleta em 254 nm	Padrão	BP, 2010

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Coluna de copolímero estireno-divinilbenzeno (250 x 4,6 mm) mantida a 60°C. Fase móvel contendo 2-metil-2-propanol, hidrogenossulfato de tetrabutilamônio, edetato de sódio, com pH ajustado para 8	Ultravioleta em 254 nm	Padrão	FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005
CLAE	Coluna contendo empacotamento C ₁₈ e mantida a 60°C. Fase móvel contendo 2,72 g de fosfato de potássio monobásico, 0,74 g de NaOH, 0,50 g de hidrogenossulfato de tetrabutilamônio e 0,40 g de edetato de sódio para 1000 mL de água. Adição de 60 g de álcool butil terciário com o pH ajustado para 8 utilizando NaOH 1 M	Ultravioleta em 270 nm	Padrão	USP 33, 2010

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de hclato de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CLAE	Coluna e pré-coluna polimérica PLRP-S (250 mm x 4,6 mm e 5 mm x 3 mm, respectivamente). Fase móvel contendo ácido oxálico 0,01 M; ACN: metanol (80:15:5, v/v/v)	Fluorescência (excitação em 406 nm e emissão em 515 nm)	Amostra de fígado e tecido muscular	CROUBELS, 1998
CLAE	Coluna Hypersil BDS C ₈ (250 mm x 4 mm). Fase móvel contendo tampão dihidrogenofosfato de potássio 0,01 M com pH ajustado para 4 com hidróxido de potássio 0,1 M; ACN (60:40, v/v)	Ultravioleta em 325 nm	Plasma de peru	RAMESH <i>et al.</i> , 2010
CLAE	Coluna Supelcosil™ C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm). Ácido oxálico 0,005 M ajustado para pH 2,4; ACN: metanol (71:16:13, v/v) como fase móvel	Ultravioleta em 360 nm	Leite bovino, plasma humano e amostras de água	SHARIATI <i>et al.</i> , 2009

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação). Métodos para determinação de hclato de doxiciclina em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Referência
CCD	Diclorometano: metanol: água (59:35:6, v/v/v). Sílica pulverizada com EDTA 10% pH ajustado para 9 com hidróxido de sódio 42%	Ultravioleta	Amostras comerciais e padrões	NAIDONG <i>et al.</i> , 1990
UV	Dissolução de 25 mg em 50 mL da mistura de 0,5 volume de HCl 1 M e 99,5 volumes de metanol. Diluição de 2 mL da solução anterior para 100 mL e completar com o mesmo solvente.	Ultravioleta entre 325 e 363 nm com máxima absorção em 349 nm	Padrão	BP, 2010

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência, CCD = cromatografia em camada delgada, UV = ultravioleta, ACN = acetonitrila.

4. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

4.1. Introdução

O Controle de Qualidade (CQ) deve acompanhar todo o processo desde a aquisição da matéria-prima até sua transformação em produto acabado que ficarão à disposição do consumidor (WATSON, 2005) assegurando sua qualidade e conseqüentemente sua eficácia até o término do prazo de validade.

Na indústria farmacêutica o recebimento da matéria-prima é seguido de conferência da etiqueta com o nome do produto requerido no recipiente, número de lote, número de nota fiscal, condições de transporte, condições do recipiente e armazenagem. Logo após, uma amostra do produto é levada para o setor de CQ realizar testes de identificação e teor. Enquanto a matéria-prima é analisada, os recipientes são acondicionados em local apropriado com a identificação “quarentena” escrita em etiqueta amarela. Ao término das análises e liberação dos resultados dos testes realizados pelo CQ, se estiverem dentro das especificações, a matéria-prima é aprovada e passa a estar disponível para o setor de Produção. A etiqueta amarela de “quarentena” é substituída por uma etiqueta verde escrito “aprovado”. Caso o produto não esteja dentro das especificações recomendadas, o CQ reprova a matéria-prima que recebe uma etiqueta vermelha escrito “reprovado”. Este procedimento evita a utilização incorreta de matéria-prima reprovada. Durante a produção do produto acabado, amostras dos núcleos dos comprimidos são encaminhadas ao CQ para análise de teor. Se o lote for aprovado, o setor de Produção recebe a permissão para continuar o processo. Após o revestimento do núcleo, uma nova amostra é levada ao CQ para análise e posterior aprovação ou não do lote. Enquanto as análises são realizadas, os

setores de Produção e Vendas, por exemplo, devem esperar para continuar o processo de fabricação de produto acabado e iniciar procedimento de vendas e liberação para o mercado consumidor, respectivamente. Dessa forma, métodos de análise rápidos, de fácil aplicação e eficazes são de extrema importância pois tornam o trabalho desenvolvido pelos setores mais dinâmico. Na indústria farmacêutica os setores estão interligados e são dependentes entre si. Se o CQ liberar resultados mais rápidos, a produção termina o processo de fabricação do produto acabado mais rapidamente e o setor de vendas coloca o lote no mercado antes. Com esse panorama o desenvolvimento de métodos mais rápidos e de fácil aplicação passa a ser interessante.

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis, para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, é de extrema importância e tem por objetivo fornecer informações quanto à natureza e à composição dos materiais em análise (LA ROCA *et al.*, 2007).

O aumento significativo no número de fármacos disponíveis, assim como o avanço e transformação das tecnologias utilizadas na produção de produtos farmacêuticos contendo estes fármacos têm aumentado o interesse de diferentes seções da sociedade ligadas à área da saúde (agências reguladoras, governos, profissionais farmacêuticos) pela busca de medidas que garantam a integridade do produto disponível ao paciente, ampliando os conceitos do Controle de Qualidade da moldura simplesmente industrial para também reguladora.

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para identificação, determinação do teor e estudo das características físicas e químicas do fármaco e estudos de dissolução

do produto acabado, são de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final.

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram desenvolvidos para determinação qualitativa do hclato de doxiciclina.

4.2. Parte experimental

Substância química de referência (SQR)

A SQR utilizada foi o hclato de doxiciclina, teor de 97,10%, lote 0900002795, gentilmente cedida pela União Química Indústria Farmacêutica.

Forma Farmacêutica

A forma farmacêutica utilizada foi comprimidos de hclato de doxiciclina 80 mg, lote 1002101, também gentilmente cedidos pela União Química Indústria Farmacêutica.

4.3. Análise Qualitativa

A análise qualitativa para identificação do hclato de doxiciclina foi realizada através da determinação do ponto de fusão, teor de cinzas sulfúricas, cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região do ultravioleta.

4.3.1. Determinação do Ponto de Fusão

4.3.1.1. Material

O hclato de doxiciclina SQR foi utilizado para a análise através do equipamento LS Logen Scientific e tubos capilares de 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento.

4.3.1.2.Método

A técnica está baseada na adição de uma pequena quantidade de pó dentro do tubo capilar. O pó deve ser compactado cuidadosamente para garantir o ponto de fusão de todo o material fornecendo um valor mais correto.

O tubo capilar foi colocado na célula de aquecimento e observou-se a decomposição do fármaco através de uma lupa. Um termômetro foi acoplado à célula para acompanhar a temperatura de fusão do fármaco.

4.3.1.3.Resultados

O hiclato de doxiciclina não fundiu, mas se decompôs em torno de 201°C, tornando-se preto nesta temperatura (Figura 5) que representa a média de três determinações.

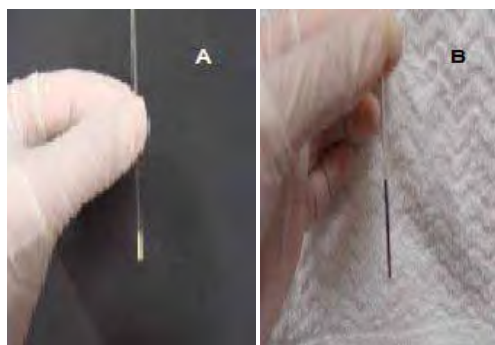


Figura 5. (A) Capilar contendo hiclato de doxiciclina SQR antes da análise e (B) Capilar contendo hiclato de doxiciclina depois do aquecimento a 201°C.

4.3.1.4.Discussão

O ponto ou intervalo de fusão é uma avaliação físico-química útil na identificação de fármacos, pois fornece informações do grau de pureza e é utilizada para pesquisar a presença de possíveis contaminantes na amostra.

Entretanto, esta técnica por si só não possibilita a conclusão definitiva da identidade dos compostos, sendo necessária a execução de testes de identificação complementares (CIENFUEGOS e VAISTMAN, 2000).

Os resultados obtidos neste teste estão de acordo com o valor descrito na literatura, que refere que a substância carboniza sem fundir a temperatura de 201°C (O'NEIL, 2006), o que indica a identidade da amostra de hiclato de doxiciclina na SQR.

4.3.2. Cinzas sulfatadas

4.3.2.1. Material

Foram utilizados para esta análise hiclato de doxiciclina SQR, cadinho de porcelana, dessecador, ácido sulfúrico (SYNTH) e mufla Heraeus Instruments.

4.3.2.2. Método

A amostra foi exatamente pesada em cadinho de porcelana, previamente tarado, e dessecada em forno mufla Heraeus Instruments a 800 °C. Após este processo, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico na amostra e em seguida os cadinhos foram colocados sobre a chama de Bico de Bunsen, para que a amostra fosse queimada. Quando foi cessada a liberação de fumaça branca da amostra, os cadinhos foram levados para a mufla. Após 60 minutos, os cadinhos foram dispostos em dessecador para atingir a temperatura ambiente e novamente pesados.

4.3.2.3. Resultados

Segundo a Farmacopeia Portuguesa (2005) e a BP (2010) a quantidade de cinzas sulfatadas deve ser menor que 0,4 %. O ensaio foi realizado em triplicata.

O valor médio encontrado na amostra foi de 0,27%, segundo o cálculo:

$$\text{Cinzas sulfúricas (\%)} = (P_p/P_a) \times 100 \quad \text{Equação I}$$

Em que:

P_p = peso do precipitado seco

P_a = peso da amostra

4.3.2.4. Discussão

A técnica de cinzas sulfatadas é utilizada na rotina do Controle de Qualidade de matérias-primas para verificação de impurezas inorgânicas. A amostra apresentou teor de cinzas sulfúricas ou resíduos dentro das especificações (F. PORTUGUESA, 2005; BP, 2010). A cromatografia em camada delgada permite investigar, além da identidade da amostra, a existência de impurezas orgânicas.

4.3.3. Cromatografia em Camada Delgada

4.3.3.1. Material

Foram analisadas as amostras de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos de hiclato de doxiciclina, descritos no item 4.2.

O sistema eluente constituiu-se de uma mistura de diclorometano (QUIMEX), metanol (SYNTH), ambos grau analítico e água purificada. Para o preparo das amostras foi utilizado água purificada.

A migração cromatográfica foi realizada em placas com sílica-gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), espessura de 0,25 mm (MERCK).

O revelador utilizado foi lâmpada ultravioleta a 254 nm.

4.3.3.2.Método

As amostras de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos de hiclato de doxiciclina foram preparadas em metanol na concentração de 100 µg/mL. O sistema de fase móvel proposto foi preparado a partir da mistura de diclorometano, metanol e água na proporção de 57:33:10 (v/v/v), respectivamente.

Para o ensaio, inicialmente, procedeu-se a saturação da cuba de vidro com o sistema de fase móvel.

As placas com sílica-gel foram primeiramente pulverizadas com solução de EDTA 10% e pH 9,0 ajustado com solução de NaOH 42%. Posteriormente, foram secas na horizontal por, pelo menos uma hora, em temperatura ambiente e depois em estufa a 110°C por uma hora.

Com auxílio de seringa de 100 µL, foram transferidas alíquotas da SQR e amostra para as placas.

Após migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, deixando o solvente evaporar. As placas foram reveladas na câmara UV a 254 nm, para a comparação das manchas quanto à forma, posição e tamanho. Foram determinados os Rfs do hiclato de doxiciclina SQR e da amostra. O valor de Rf foi obtido através do quociente entre a distância de migração do fármaco e a distância percorrida pelo eluente.

4.3.3.3.Resultados

Para a realização do método de CCD foi efetuado um extenso levantamento bibliográfico. Na Farmacopeia Portuguesa (2005), USP 33 (2010) e B.P. (2010) não consta a técnica de CCD para o hiclato de doxiciclina. Assim, elegeu-se a fase móvel estudada por Naidong e colaboradores (1990) que descreveram diclorometano, metanol e água (59:35:6,

v/v/v), mas com maior proporção de água, no caso, diclorometano, metanol e água (57:33:10, v/v/v) como a mais apropriada, como também o uso de EDTA 10% pulverizado na sílica.

A maior quantidade de água na fase móvel aumenta o valor do Rf de 0,30 para 0,73 e, dessa forma, possibilita a visualização de possíveis contaminantes através do aparecimento de outras manchas.

Quando o EDTA não era pulverizado na placa no início do teste o fármaco não apresentava eluição, permanecendo no local de aplicação.



Figura 6. Perfil cromatográfico do hiclato de doxiciclina SQR (A) e hiclato de doxiciclina comprimidos (B) sem solução de EDTA pulverizada na sílica com visualização em câmara de UV a 254 nm, fase estacionária composta por uma camada de sílica-gel e fase móvel contendo diclorometano: metanol: água, 57:33:10 (v/v/v).

A escolha da pulverização do EDTA na sílica realmente é mais rápida, promove sua distribuição homogênea e permite com que haja eluição do hiclato de doxiciclina. Os valores de Rfs obtidos após a migração cromatográfica foram de 0,73, tanto para o hiclato

de doxiciclina SQR quanto para o hiclato de doxiciclina comprimido. Foram realizadas três análises, obtendo-se o mesmo resultado em todas as placas.

Os perfis cromatográficos das amostras após visualização em câmara UV a 254 nm podem ser observados na Figura 7.

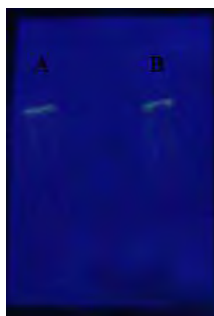


Figura 7. Perfil cromatográfico do hiclato de doxiciclina SQR (A) e hiclato de doxiciclina comprimidos (B), ambos com valor de Rf 0,73 através de visualização em câmara de UV a 254 nm, fase estacionária composta por uma camada de sílica-gel previamente pulverizada com solução de EDTA 10% e fase móvel contendo diclorometano: metanol: água, 57:33:10 (v/v/v).

4.3.3.4. Discussão

A CCD é uma técnica flexível, pois permite a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores. Apresenta-se como uma importante ferramenta capaz de identificar compostos, sendo de fácil execução, versátil e de baixo custo. Outra aplicação da CCD refere-se à possibilidade de verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (WATSON, 2005).

A visualização das manchas foi facilmente observada em câmara de UV, sendo o método adequado, não havendo dificuldades para o cálculo do valor do Rf.

O resultado obtido sugere que o hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos possuem a mesma identidade e em ambos não ocorre a presença de impurezas de doxiciclina, pois não há o aparecimento de outras manchas, exceto as do fármaco em questão. Assim, o resultado do ensaio de CCD juntamente com o resultado de cinzas sulfúricas mostram a ausência de impurezas e de resíduos na amostra.

O método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação do hiclato de doxiciclina na forma farmacêutica em estudo.

4.3.4. Espectrofotometria na região do UV

4.3.4.1. Material

Foram analisadas as amostras de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos, descritos no item 4.2. As soluções das amostras foram preparadas em água purificada, ácido clorídrico 0,01 M, hidróxido de sódio 0,01 M e metanol.

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Shimadzu UV mini – 1240 e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

4.3.4.2. Método

Foram pesados, 0,0103 g de hiclato de doxiciclina SQR, previamente dessecados em estufa a 105°C durante uma hora e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em cada um dos solventes citados acima e mantida em ultrassom por 5 minutos. O volume do balão foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 100,0 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 2 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL.

O peso médio de 20 comprimidos de hiclato de doxiciclina foi de 364,64 mg. Posteriormente, os comprimidos foram triturados e foi pesado o equivalente a 1 peso médio dos comprimidos e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em cada um dos solventes citados acima e mantida em ultrassom por 5 minutos. O volume do balão volumétrico foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 100,0 µg/mL. Cerca de 50 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 2 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL.

Foi realizada uma mistura de excipientes presentes na amostra de comprimidos, nas concentrações usuais (PRISTA *et al.*, 2003), para avaliar sua influência na análise espectrofotométrica de hiclato de doxiciclina na região do UV. Na pesagem, foram utilizadas hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol 4000, manitol, talco, amido, celulose microcristalina, croscamelose e estearato de magnésio. Foi preparada uma solução com a mistura de excipientes na concentração de 356 µg/mL e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro na região do UV.

Os espectros foram obtidos a partir da varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

A identificação do hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos foi realizada através da sobreposição dos espectros obtidos e comparação quanto ao seu perfil característico e comprimentos de onda de máxima absorção.

4.3.4.3. Resultados

Os espectros de absorção na região do UV referentes as soluções de hiclato de doxiciclina SQR preparadas em água purificada, ácido clorídrico 0,01 M, hidróxido de sódio 0,01 M e metanol na concentração de 20 µg/mL estão representados na Figura 8.

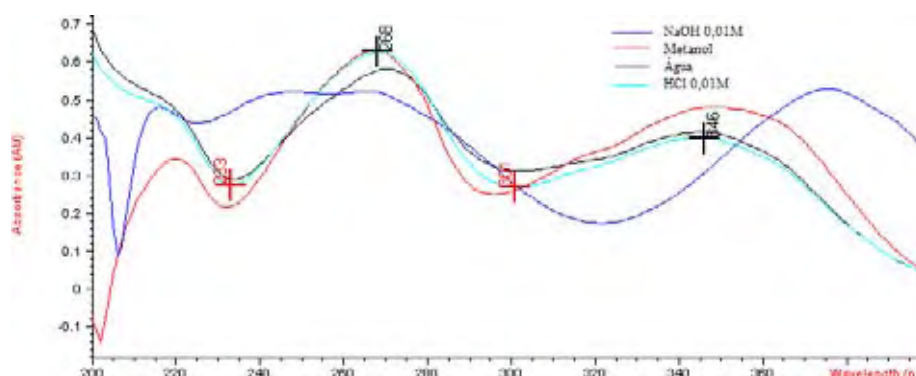


Figura 8. Espectros de hiclato de doxiciclina SQR em água purificada, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M e metanol na concentração de 20 µg/mL.

A Figura 9 apresenta a sobreposição dos espectros de hiclato de doxiciclina SQR, comprimidos e excipiente, em ácido clorídrico 0,01 M na concentração de 20 µg/mL, mostrando que os excipientes dos comprimidos não possuem absorção no comprimento de onda utilizado na análise espectrofotométrica de hiclato de doxiciclina na região do UV.

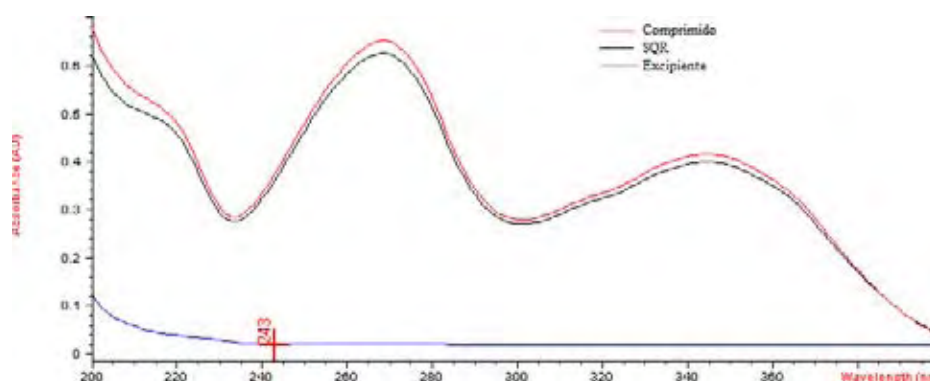


Figura 9. Espectros de hiclato de doxiciclina SQR, comprimidos e excipiente em ácido clorídrico 0,01 M na concentração de 20 µg/mL.

4.3.4.4. Discussão

A espectrofotometria na região do UV apresenta uma série de aplicações nas análises farmacêuticas. É um método útil na identificação e quantificação de fármacos, além de ser um ensaio rápido, simples e de fácil execução.

Os espectros de absorção obtidos nas análises de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos demonstraram perfis semelhantes nos solventes utilizados, sugerindo a mesma identidade das amostras. Tanto a SQR como a amostra apresentaram máxima absorção em 268 nm quando foi utilizado solução de ácido clorídrico 0,01 M e metanol.

Assim, o método demonstrou ser útil na identificação de hiclato de doxiciclina nas formas farmacêuticas estudadas.

5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

5.1. Introdução

As universidades têm executado um papel fundamental servindo como centros de pesquisa para o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, contribuindo às atividades de controle sanitário e ao enriquecimento científico na área (IFPMA, 1997).

O desenvolvimento de métodos analíticos exige a adoção de procedimentos de validação que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação. O desenvolvimento de metodologias que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade destes produtos tanto no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional como em farmácias magistrais públicas e privadas.

Segundo a RDC nº17, de 16 de abril de 2010, validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente e consistentemente leva aos resultados esperados. A validação é parte essencial de Boas Práticas de Fabricação (BPF), um elemento da garantia da qualidade associado a um produto ou processo em particular.

Desta forma, a validação é parte importante do programa de garantia de qualidade e tem por objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para a proposta pretendida e é seguro ao ser executado (ICH, 2005). A validação é, assim, a ferramenta usada para demonstrar que um método analítico específico mede realmente o que foi destinado a medir, e, portanto, é adequada para a sua função/finalidade (TAVERNIERS *et al.*, 2004).

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram desenvolvidos e validados para determinação quantitativa do hidrato de doxiciclina em comprimidos.

5.1.1. Parâmetros da validação analítica

Segundo a RE nº899, de 23 de maio de 2003, no caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os seguintes parâmetros relacionados:

- Especificidade e Seletividade
- Linearidade
- Intervalo
- Precisão
- Limite de detecção (sensibilidade)
- Limite de quantificação
- Exatidão
- Robustez

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar características adequadas à análise (BRASIL, 2003). Portanto, a escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada em determinada forma farmacêutica. Precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade são características fundamentais de um método analítico (ERMER, 2001),

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional também devem ser considerados.

Os testes são classificados em 4 categorias. Para cada categoria é exigido um conjunto de testes. Na Tabela 2 encontra-se a classificação dos testes e na Tabela 3 os ensaios necessários para a validação de um método analítico.

Tabela 2. Classificação dos testes

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: RE 899, de 29 de maio de 2003.

Tabela 3. Ensaios necessários para a validação do método analítico

Parâmetros	Categoria II				
	Categoria I	Quantitativo	Ensaio limite	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	sim	sim	sim	*	sim
Linearidade	sim	sim	não	*	não
Intervalo	sim	sim	*	*	não
Repetibilidade	sim	sim	não	sim	não
Precisão					
Intermediária	**	**	não	**	não
Limite de detecção	não	não	sim	*	não
Limite de quantificação	não	sim	não	*	não
Exatidão	sim	sim	*	*	não
Robustez	sim	sim	sim	não	não

Fonte: RE 899, de 29 de maio de 2003.

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Assim, para os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste trabalho os parâmetros analisados foram:

Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.

Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, interseção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$.

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra.

Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

Precisão intermediária (precisão intercorrida): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação II:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação II}$$

Em que:

DP = é o desvio padrão

CMD = a concentração média determinada

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Foi utilizada a análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas do padrão de referência ao medicamento. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão de referência adicionado à amostra.

A porcentagem de hiclato de doxiciclina recuperada foi calculada pela Equação III.

$$\%R = [(C_r - C_a)/C_p] \times 100 \quad \text{Equação III}$$

Em que:

C_r = concentração da solução amostra adicionada da SQR ($\mu\text{g/mL}$)

C_a = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_p = concentração teórica da SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso rotineiro.

Na avaliação da robustez constata-se a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas e, assim, as precauções que devem ser incluídas no procedimento para controlar o processo.

5.2. Parte experimental

Como indicado no item 4.2. com relação a substância química de referência e a forma farmacêutica utilizada.

5.3. Análise Quantitativa

A análise quantitativa foi realizada através do desenvolvimento e validação dos métodos espectrofotometria na região UV e cromatografia líquida de alta eficiência.

5.3.1. Espectrofotometria na região do UV

5.3.1.1. Material

Hiclato de doxiciclina SQR e hiclato de doxiciclina comprimidos (descritos no item 5.2) foram submetidos à análise. Foi utilizado para o preparo das soluções das amostras ácido clorídrico 0,01 M. O método foi desenvolvido utilizando espectrofotômetro descrito no item 4.3.4.1.

5.3.1.2. Método

Os parâmetros analíticos linearidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez foram avaliados para a validação do método, segundo a RE n°899.

5.3.1.3. Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi obtida pela determinação da absorvância de 33 concentrações de hiclato de doxiciclina SQR. Foram realizadas três curvas.

Foram pesados, 0,0103 g de hiclato de doxiciclina SR, previamente dessecados em estufa a 105°C durante uma hora e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em HCl 0,01 M e mantida em ultrassom por 5 minutos. O volume do balão foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 100,0 µg/mL. A

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

partir desta solução, foram transferidas alíquotas para balões volumétricos, obtendo-se a curva com 33 pontos, com concentrações variando de 0,5 a 60,0 µg/mL de hiclato de doxiciclina.

A partir da curva de Ringbom foram escolhidos 6 pontos para avaliação da linearidade do método. Para isso foram pesados 0,0103 g de hiclato de doxiciclina SQR, previamente dessecados em estufa a 105°C durante uma hora, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos em HCl 0,01 M e mantidos em aparelho de ultrassom por 5 minutos. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas soluções com concentrações de 6,0 a 21,0 µg/mL de hiclato de doxiciclina SQR. As leituras das soluções foram efetuadas a 268 nm, utilizando HCl 0,01 M como branco. A curva analítica foi construída em três dias diferentes e em triplicata.

5.3.1.4. Validação

5.3.1.4.1. Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item acima 5.3.1.3, foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

5.3.1.4.2. Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios de doseamento de hiclato de doxiciclina comprimidos na concentração de 15 µg/mL. Este teste foi realizado em triplicata para avaliação da precisão intradia e calculado o coeficiente de variação. E durante três dias seguidos, para avaliação da precisão inter-analista, o teste foi realizado por analistas diferentes e os resultados foram analisados estatisticamente.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos de hiclato de doxiciclina, 364,64 mg. Posteriormente, os comprimidos foram triturados e foi pesado o equivalente ao peso médio sendo transferido para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em HCl 0,01 M e mantida em ultrassom por 5 minutos. O volume do balão volumétrico foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 100,0 µg/mL. Cerca de 50 mL desta solução estoque foi filtrada em papel de filtro e a partir desta solução, foi transferida alíquota de 1,5 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma concentração final de 15 µg/mL.

5.3.1.4.3. Exatidão

A exatidão do método de adição foi determinada pelo cálculo de recuperação.

Foram preparadas soluções estoque de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos na concentração de 100 µg/mL. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 600 µL de cada uma e transferidas para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se dois balões volumétricos com 600 µL cada, um de SQR e o outro de produto acabado. Foram completados com HCl 0,01 M e obtidas soluções com concentrações teóricas de 6 µg/mL. A partir da solução estoque de hiclato de doxiciclina comprimidos, foram retiradas alíquotas de 600 µL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL adicionadas de 600 µL de solução estoque de hiclato de doxiciclina SQR, completados com HCl 0,01 M para obtenção de solução com concentração teórica de 12 µg/mL. Alterando apenas o volume da solução estoque de SQR, procedeu-se da mesma forma para obtenção de mais duas soluções através de alíquotas de 900 µL (concentração teórica de 15 µg/mL) e 1200 µL (concentração teórica de 18 µg/mL).

As preparações das amostras estão exemplificadas na Tabela 4.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 4. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de espectrofotometria na região do UV

	<i>Volume adicionado de DOX amostra de concentração 100 µg/mL (µL)</i>	<i>Volume adicionado de DOX SQR de concentração 100 µg/mL (µL)</i>	<i>Concentração teórica final (µg/mL)^{a,b}</i>
Amostra	600	-	6
R1	600	600	12
R2	600	900	15
R3	600	1200	18
Padrão	-	600	6

^adiluída em balão volumétrico de 10 mL

^bcada nível de concentração foi preparado em triplicata

5.3.1.4.4. Especificidade e Seletividade

A especificidade do método proposto foi comprovada pela comparação da resposta obtida para a substância ativa na ausência dos excipientes (SQR) e na presença dos excipientes (comprimidos).

A seletividade do método proposto foi comprovada pelo teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e *t* (Student) de comparação de médias (INMETRO, 2007).

5.3.1.4.5. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) do hiclato de doxiciclina foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (*s*) e inclinação média (*l*), conforme a Equação IV:

$$LD = (3,3s)/l \quad \text{Equação IV}$$

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

O limite de quantificação (LQ) do hclato de doxiciclina foi obtido com base nos mesmos dados descritos acima, segundo a Equação V:

$$LQ = (10s)/l \quad \text{Equação V}$$

5.3.1.4.6. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de duas unidades de comprimento de onda acima e abaixo de 268 nm, 266 e 270 nm. Os resultados obtidos pela variação deste parâmetro operacional foram analisados por teste F (Snedecor) e teste t (Student).

5.3.1.5. Resultados

Curva de Ringbom

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de hclato de doxiciclina SQR para a obtenção da curva de Ringbom são mostrados na Tabela 5 e Figura 10.

Tabela 5. Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva de Ringbom do hclato de doxiciclina SQR

Concentração (µg/mL)	Absorvância	100 - % de Transmitância
0,5	0,0222	4,983288
1	0,0397	8,735895
2	0,0789	16,61268
3	0,1210	24,31671
4	0,1619	31,11891
5	0,2010	37,04938
6	0,2360	41,92356
7	0,2772	47,17981
8	0,3177	51,88284
9	0,3562	55,96480
10	0,3995	60,14342
11	0,4349	63,26331

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 5 (continuação). Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva de Ringbom do hiclato de doxiciclina SQR

Concentração	Absorvância	100 - % de Transmitância
12	0,4747	66,48031
13	0,5032	68,60937
14	0,5450	71,48982
15	0,5865	74,08806
16	0,6250	76,28626
17	0,6667	78,45731
18	0,7067	80,35283
19	0,7494	82,19262
20	0,8018	84,21662
21	0,8403	85,55558
22	0,8912	87,15305
23	0,9000	87,41075
24	0,9269	88,16686
25	0,9738	89,37815
26	1,0057	90,13039
28	1,0853	91,78325
30	1,1743	93,30578
35	1,3591	95,62579
40	1,5687	97,30040
50	1,9237	98,80793
60	2,2919	99,48938

*Cada valor corresponde a média de três determinações.

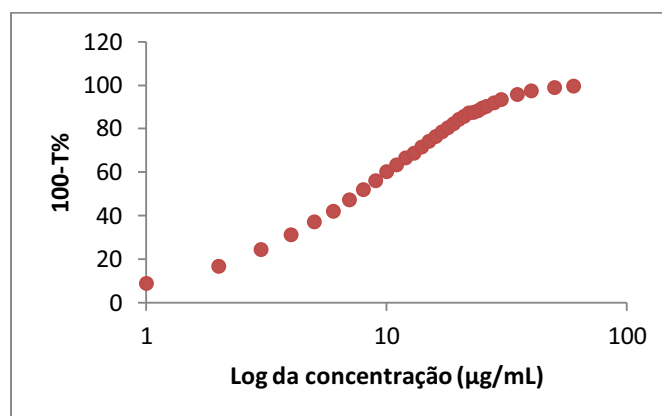


Figura 10. Curva de Ringbom para o hiclato de doxiciclina SQR.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Linearidade

As curvas analíticas de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas com concentrações de 6 a 21 $\mu\text{g/mL}$ obtidas durante os ensaios de linearidade e seletividade, respectivamente.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 0,0387x + 0,0253$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997, para o hiclato de doxiciclina SQR.

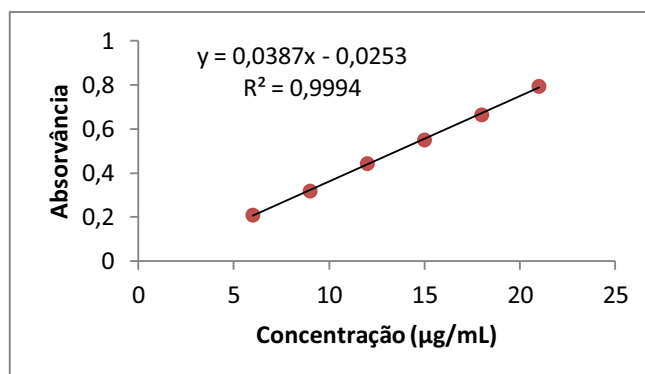


Figura 11. Curva analítica de soluções de hiclato de doxiciclina SQR, em concentrações de 6, 9, 12, 15, 18 e 21 $\mu\text{g/mL}$, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 268 nm.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de hiclato de doxiciclina SQR é mostrada na Tabela 6.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 6. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de hiclato de doxiciclina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fonte de variação	Soma dos		Variância	F _{calc}	F _{tab}
	gl	quadrados			
Entre	5	0,70675	0,14135	192,74*	3,11
Regressão linear	1	0,70672	0,70672	963,64*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,00003	0,75x10 ⁻⁵	0,01	3,26
Resíduo	12	0,0007334	6,11x10 ⁻⁵		
Total	17	0,70748			

*Significativo para p<5%

Especificidade e Seletividade

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 0,0445x + 0,0254$, com r de 0,9997, para a amostra comprimidos.

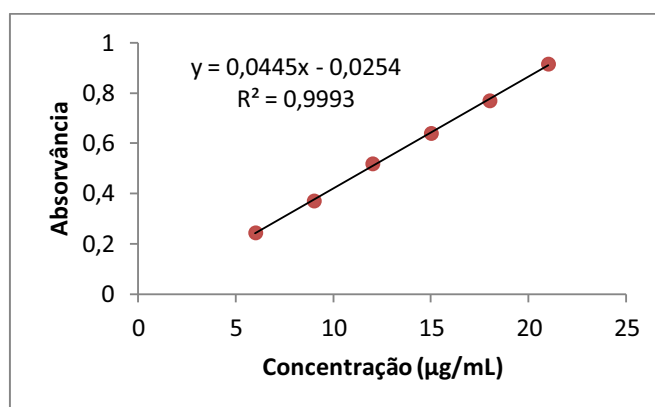


Figura 12. Curva analítica de soluções de hiclato de doxiciclina comprimidos, em concentrações de 6, 9, 12, 15, 18 e 21 µg/mL, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 268 nm.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

A Figura 13 apresenta a comparação dos espectros de absorção das soluções de hiclato de doxiciclina SQR, comprimidos e excipiente, em ácido clorídrico 0,01 M, entre 200 e 400 nm.

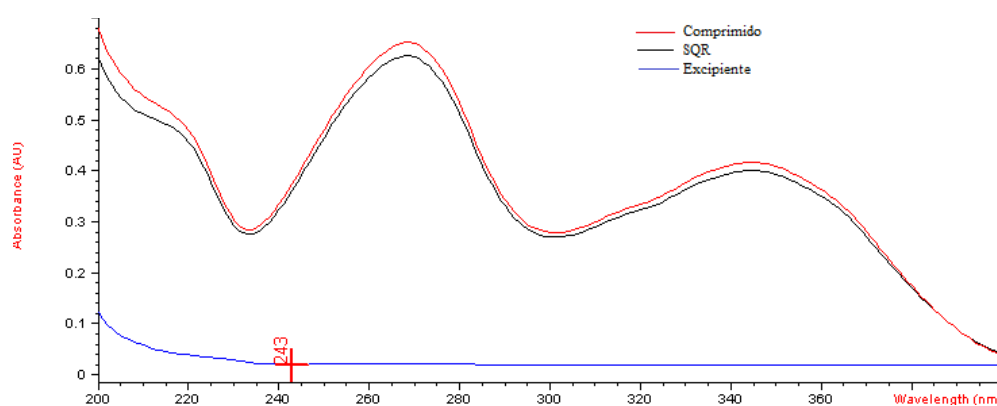


Figura 13. Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria na região do UV para as soluções de hiclato de doxiciclina SQR, hiclato de doxiciclina comprimidos e excipientes preparadas em ácido clorídrico 0,01 M na concentração de 15 µg/mL.

A seletividade do método foi comprovada através de tratamento estatístico com as médias dos valores das curvas analíticas do hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos e o resultado encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7. Teste F e teste t da seletividade do método espectrofotométrico na região do UV

Teste-F: duas amostras para variância	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
F _{cal} 1,07 < F _{tab} 5,05	t _{cal} 0,16 < t _{tab} 2,23
P _{valor} 0,47 > 0,05	P _{valor} 0,88 > 0,05

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 0,12 µg/mL e 0,37 µg/mL, respectivamente.

Precisão e doseamento

Os valores da potência de hiclato de doxiciclina comprimidos – substância de referência, determinados durante o ensaio de precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Valores determinados para o doseamento de hiclato de doxiciclina comprimidos, pelo método espectrofotometria na região do UV

<i>Dia</i>	<i>Teor de hiclato de doxiciclina comprimidos*</i>		<i>Teor médio</i>	<i>CV (%)</i>
	<i>µg/mL</i>	<i>%</i>		
1	16,65	111,01		
2	16,73	111,56	111,34	0,26
3	16,72	111,47		

*Cada valor corresponde a média de seis determinações.

A precisão interanalista foi comprovada através de tratamento estatístico com as médias dos valores obtidos na análise por diferentes analistas e o resultado encontra-se na Tabela 9.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 9. Valores do teste F e teste t da precisão inter-analista do método espectrofotométrico na região do UV

Teste-F: duas amostras para variância	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Fcal 1,31 < Ftab 4,28	tcal 1,40 < ttab 2,18
Pvalor 0,38 > 0,05	Pvalor 0,19 > 0,05

Exatidão

Na Tabela 10 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotometria na região do UV.

Tabela 10. Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	<i>DOX SQR</i> <i>adicionada (µg/mL)</i>	<i>DOX SQR</i> <i>recuperada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação</i> <i>(%)</i>	<i>Recuperação</i> <i>média (%)</i>	<i>CV</i> <i>(%)</i>
R1	6	5,91	98,58		
R2	9	8,96	99,50	98,96	0,49
R3	12	11,86	98,79		

Robustez

As médias das variações no comprimento de onda para avaliar o parâmetro robustez foram analisadas estatisticamente e o resultado encontra-se na Tabela 11.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 11. Valores calculados nos testes F e t para variações no comprimento de onda no método de espectrofotometria na região do UV para determinação de hiclato de doxiciclina

<i>Teste</i>	<i>λ (nm)</i>			
	266	268	268	270
F _{cal}	8,35			1,83
F _{tab}	19			19
P _{valor}	0,11			0,35
t _{cal}	2,64			2,07
t _{tab}	2,78			2,78
P _{valor}	0,06			0,11

5.3.1.6. Discussão

A espectrofotometria na região do UV é uma técnica de fácil execução e custo reduzido. Pode ser utilizada, com boa precisão, para a análise quantitativa de fármacos presentes em formulações farmacêuticas, desde que não ocorra interferência dos excipientes (WATSON, 2005).

A especificidade do método foi confirmada pela comparação das absorvâncias da SQR e da amostra. Os espectros de soluções de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos foram analisados quanto à possível interferência dos excipientes no comprimento de onda de máxima absorção do mesmo. O resultado da sobreposição dos espectros mostrou que os excipientes não interferem nas leituras das análises.

No desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV para o hiclato de doxiciclina foram testadas concentrações que variaram de 0,5 a 60 µg/mL. Foram escolhidas as concentrações de 6 a 21 µg/mL, uma vez que apresentaram linearidade de resposta.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Para avaliar a linearidade e a seletividade do método construiu-se o gráfico de concentração x absorvância, o qual demonstrou proporcionalidade entre estes dois fatores. As equações da reta foram $y = 0,0387x + 0,0253$ e $y = 0,0445x + 0,0254$ e os coeficientes de correlação 0,9997 e 0,9997, para a SQR e comprimidos, respectivamente. A linearidade foi evidenciada pela ANOVA, a qual demonstrou haver regressão linear entre as concentrações e desvio de linearidade não significativo. A seletividade foi comprovada através de um tratamento estatístico entre os valores obtidos nas curvas analíticas do hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos, os quais mostraram que as médias são equivalentes. Com este resultado é possível garantir que os excipientes não têm efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração estudada (INMETRO, 2007). Isto pode ser confirmado ainda pelo valor obtido para o teste de precisão intradia de 0,26% e a não diferença estatisticamente significativa, para um nível de significância de 5%, entre as médias dos valores obtidos no teste de precisão inter-analista, validando assim a precisão do método espectrofotométrico na região do UV para análise do hiclato de doxiciclina.

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do hiclato de doxiciclina ($LD = 0,123 \mu\text{g/mL}$ e $LQ = 0,371 \mu\text{g/mL}$) indicam a boa sensibilidade do método para determinação do fármaco.

A quantidade de hiclato de doxiciclina presente nas amostras analisadas, 111,34%, não está de acordo com a especificação oficial que é de 95,0 a 105,0% (BP, 2010).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada uma média de 98,96%.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

A robustez do método foi confirmada pela variação do comprimento de onda na leitura das análises. Os resultados mostram que não há diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o método pode ser considerado robusto.

Os parâmetros estudados para a validação do método espectrofotométrico na região do UV mostraram ser adequados para a quantificação do hiclato de doxiciclina na forma farmacêutica comprimido.

5.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.3.2.1. Material

Hiclato de doxiciclina SQR e hiclato de doxiciclina comprimidos (descritos no item 4.2) foram submetidos à análise por CLAE. O solvente utilizado para o preparo das soluções foi ácido clorídrico 0,01 M. Foi utilizada coluna Luna CN partícula de 5 µm (250 mm x 4,6 mm) e poro de 10 Å⁰, fase móvel contendo água + 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e leitura em 360 nm. O método foi desenvolvido em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters® composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters® 2487.

5.3.2.2. Método

Os parâmetros analíticos de linearidade, especificidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez foram avaliados para a validação do método, segundo a RE nº 899.

5.3.2.3. Validação

5.3.2.3.1. Linearidade

Foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em três diferentes dias e em triplicata. As concentrações utilizadas foram 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL.

A equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. As áreas utilizadas na determinação da curva analítica foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

5.3.2.3.2. Precisão

Foram realizadas seis soluções estoque de hiclato de doxiciclina, das quais foram retiradas seis alíquotas de cada uma para obtenção de soluções com concentração teórica de 80 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para avaliação da precisão intradia e calculado o coeficiente de variação. Durante três dias seguidos, para avaliação da precisão inter-analista, o teste foi realizado por analistas diferentes e os resultados foram analisados estatisticamente.

Foram pesados 0,0206 g de hiclato de doxiciclina SQR, previamente dessecados em estufa a 105°C por duas horas, e transferidos para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com HCl 0,01 M. Desta solução, foram retiradas alíquotas para a preparação das soluções com concentração de 80 µg/mL, completando-se o volume com HCl 0,01 M.

5.3.2.3.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de adição.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Foram preparadas soluções estoque de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos na concentração de 200 µg/mL. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 2500 µL de cada uma e transferidas para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se dois balões com 2500 µL cada, um de SQR e o outro de produto acabado. Foram completados com HCl 0,01 M e obtidas soluções com concentrações teóricas de 50 µg/mL. A partir da solução estoque de hiclato de doxiciclina comprimidos, foram retiradas alíquotas de 2500 µL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL adicionadas de 300 µL de solução estoque de hiclato de doxiciclina SQR, completados com HCl 0,01 M para obtenção de solução com concentração teórica de 64 µg/mL. Alterando apenas o volume da solução estoque de SQR, procedeu-se da mesma forma para obtenção de mais duas soluções através de alíquotas de 1500 µL (concentração teórica de 80 µg/mL) e 2300 µL (concentração teórica de 96 µg/mL).

As preparações das amostras estão exemplificadas na Tabela 12.

Tabela 12. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método de CLAE

	<i>Volume adicionado de DOX amostra de concentração 200 µg/mL (µL)</i>	<i>Volume adicionado de DOX SQR de concentração 200 µg/mL (µL)</i>	<i>Concentração teórica final (µg/mL)^{a,b}</i>
Amostra	2500	-	50
R1	2500	300	64
R2	2500	1500	80
R3	2500	2300	96
Padrão	-	2500	50

^adiluída em balão volumétrico de 10 mL

^bcada nível de concentração foi preparado em triplicata

5.3.2.3.4. Especificidade

A especificidade do método proposto foi comprovada através da degradação forçada do hiclato de doxiciclina nos comprimidos.

Foram preparadas soluções de hiclato de doxiciclina em HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M, H₂O₂ 3% e H₂O na concentração de 80 µg/mL e submetidas a banho na temperatura de 60°C. Alíquotas destas soluções foram retiradas nos tempos de 30, 90, 180 minutos, 24 e 48 horas e analisadas imediatamente pelo método de CLAE.

Foi preparada também uma solução de hiclato de doxiciclina em água na concentração de 80 µg/mL e submetida à luz UV. Alíquotas desta solução foram retiradas nos tempos 3, 6 e 24 horas e analisadas imediatamente pelo método de CLAE.

5.3.2.3.5. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) do hiclato de doxiciclina foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), conforme a Equação III do item 5.3.1.4.5.

O limite de quantificação (LQ) do hiclato de doxiciclina foi obtido com base nos mesmos dados descritos acima, de acordo com a Equação IV do item 5.3.1.4.5.

5.3.2.3.6. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação da marca de acetonitrila, Tedia e J.T.Baker; variação do comprimento de onda, 358 e 360 nm e variação da proporção da fase móvel, água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA 55:45 v/v e 60:40 v/v.

Os resultados obtidos pela variação destes parâmetros operacionais foram analisados por teste F (Snedecor) e teste t (Student).

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

5.3.2.4. Resultados

Linearidade

A Tabela 13 mostra os valores obtidos na construção da curva analítica para o hiclato de doxiciclina SQR por CLAE e a Figura 14 mostra a curva analítica correspondente.

Tabela 13. Valores das áreas de hiclato de doxiciclina determinadas por CLAE para a construção da curva analítica do hiclato de doxiciclina SQR

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas	Média das áreas	CV(%)
50	1221183	1219776	1,06
	1231897		
	1206247		
60	1470824	1466830	0,56
	1472227		
	1457439		
70	1732534	1718039	0,79
	1715966		
	1705619		
80	1992050	1972547	0,86
	1962580		
	1963012		
90	2255318	2226662	1,12
	2213988		
	2210679		
100	2501842	2489406	0,50
	2489568		
	2476809		

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

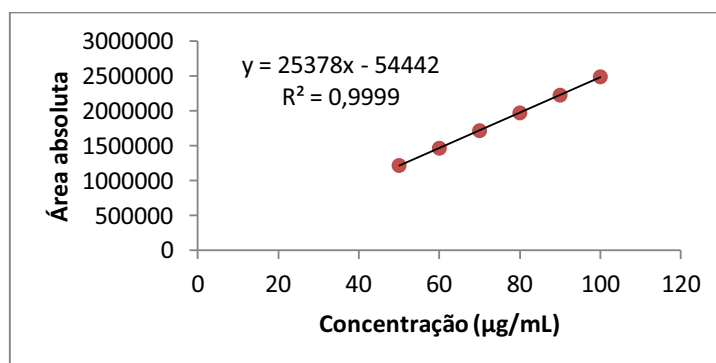


Figura 14. Curva analítica de soluções de hclato de doxiciclina SQR, em concentrações de 50; 60; 70; 80; 90 e 100 µg/mL, obtida pelo método de CLAE.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 25378x - 54442$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, para o hclato de doxiciclina SQR.

A validade da regressão linear da curva analítica média obtida foi calculada através de análise de variância (ANOVA) dos valores das áreas determinadas na obtenção da curva analítica de hclato de doxiciclina por CLAE relacionadas na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de variância das áreas obtidas na curva analítica de hclato de doxiciclina por CLAE

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F_{calc}	F_{tab}
Entre	5	$3,38 \times 10^{12}$	$6,76 \times 10^{11}$	228,85*	3,11
Regressão linear	1	$3,38 \times 10^{12}$	$3,38 \times 10^{12}$	1144,26*	4,75
Desvio de linearidade	4	3×10^{-5}	$7,5 \times 10^{-6}$	0,00	3,26
Resíduo	12	$2,96 \times 10^9$	$2,46 \times 10^{-8}$		
Total	17	$3,38 \times 10^{12}$			

*Significativo para $p < 5\%$

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Especificidade

As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 mostram, respectivamente, os cromatogramas obtidos na degradação ácida, alcalina, oxidativa e aquosa por 30, 90, 180 minutos, 24 e 48 horas em banho a 60°C e degradação pela exposição à luz UV por 3, 6 e 24 horas da solução de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL.

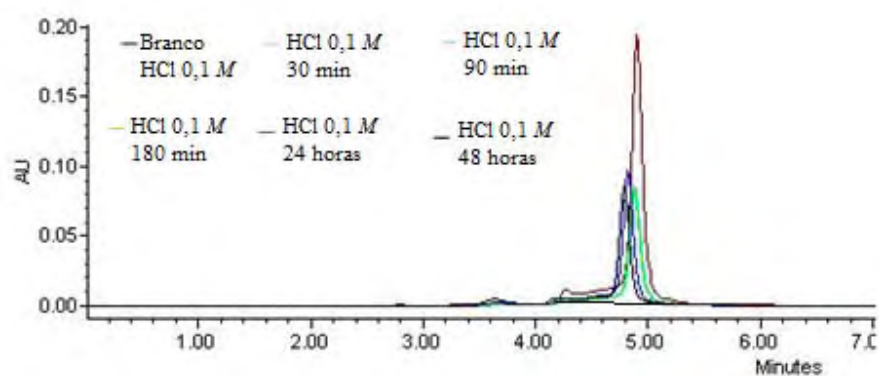


Figura 15. Cromatograma da degradação ácida de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 µg/mL em HCl 0,1 M após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

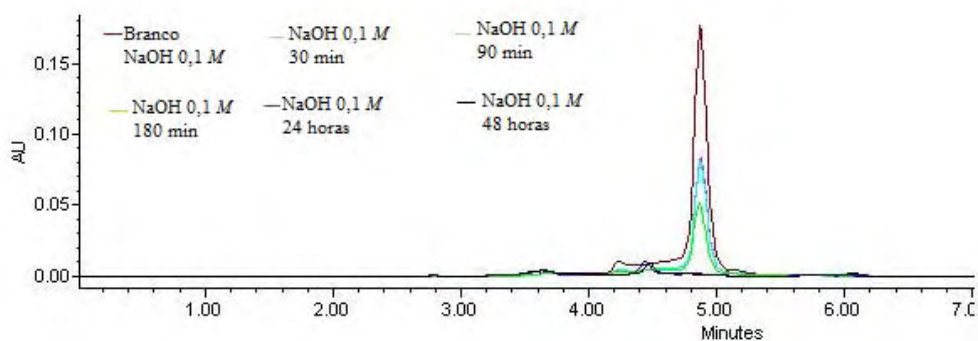


Figura 16. Cromatograma da degradação básica de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1 M após 30, 90 e 180 minutos, 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.

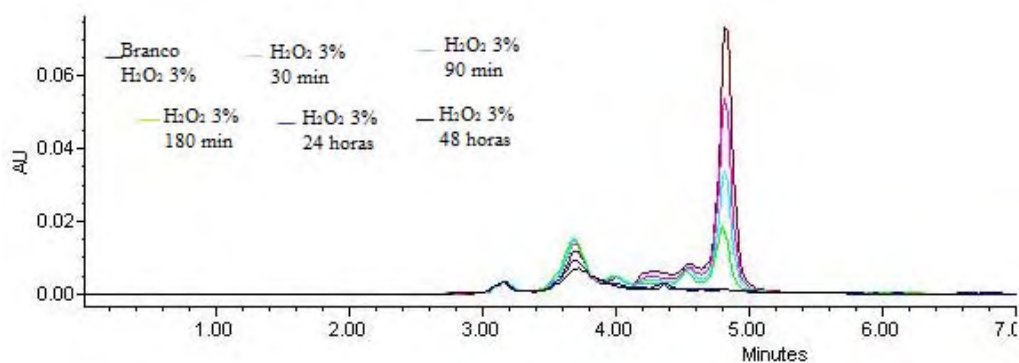


Figura 17. Cromatograma da degradação oxidativa de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O_2 3% após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

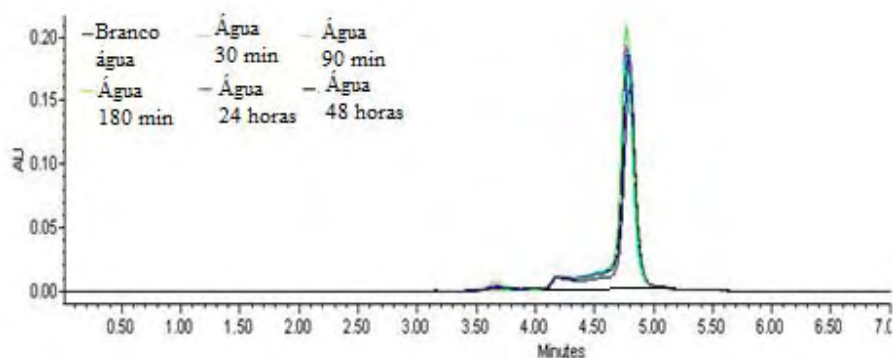


Figura 18. Cromatograma da degradação neutra de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O purificada após 30, 90 e 180 minutos e 24 e 48 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.

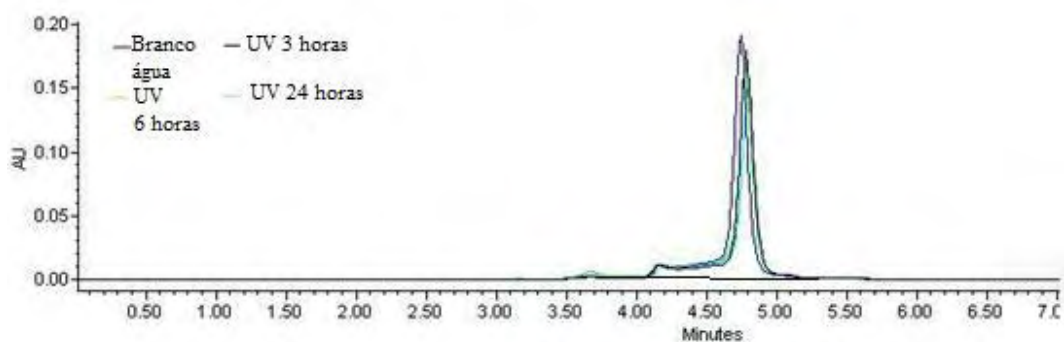


Figura 19. Cromatograma da degradação por exposição à luz UV da solução de hiclato de doxiciclina na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ após 3, 6 e 24 horas utilizando coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm), fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v), vazão de 1 mL/min e leitura em 360 nm.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Exatidão

A Tabela 15 mostra os valores obtidos no teste de recuperação para o hclato de doxiciclina utilizando CLAE.

Tabela 15. Valores obtidos no teste de recuperação do hclato de doxiciclina utilizando o método de CLAE

	<i>DOX SQR</i> <i>adicionada (µg/mL)</i>	<i>DOX SQR</i> <i>recuperada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação</i> <i>(%)</i>	<i>Recuperação</i> <i>média (%)</i>	<i>CV</i> <i>(%)</i>
R1	14	14,12	100,86		
R2	30	30,06	100,20	100,33	0,48
R3	46	45,97	99,93		

Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 2,83 µg/mL e 8,59 µg/mL, respectivamente.

Precisão e doseamento

Os valores da potência de hclato de doxiciclina comprimidos – produto de referência, determinados durante o ensaio de precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 16.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 16. Valores obtidos para determinação de teor de hclato de doxiciclina em amostras de comprimidos através do método de CLAE

Amostra	Teor (%)*
1	109,04
2	110,25
3	111,57
4	109,43
5	109,64
6	110,53
Média	110,07
CV	0,38

*Média de três determinações

A precisão interanalista foi comprovada através de tratamento estatístico com as médias dos valores obtidos na análise por diferentes analistas e o resultado encontra-se na Tabela 17.

Tabela 17. Teste F e teste t da precisão interanalista do método de CLAE

Teste-F: duas amostras para variância	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Fcal 1,29 < Ftab 5,05	tcal 0,07 < ttab 2,23
Pvalor 0,39 > 0,05	Pvalor 0,94 > 0,05

Robustez

As médias das variações na marca de acetonitrila, no comprimento de onda e na proporção da fase móvel para avaliar o parâmetro robustez foram analisadas estatisticamente e o resultado encontra-se na Tabela 18.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
QUANTITATIVOS

Tabela 18. Valores dos testes F e t para variações no método de CLAE para determinação de hiclato de doxiciclina

Teste	Marca da acetonitrila		λ (nm)		Proporção de fase móvel	
	Tedia	J.T.Baker	358	360	55 45	60 40
Fcal	1,47		143,51		3,85	
Ftab	161,45		161,45		161,45	
P valor	0,44		0,053		0,30	
tcal	0,12		3,77		1,30	
ttab	4,30		4,30		4,30	
P valor	0,91		0,06		0,32	

5.3.2.5. Discussão

No desenvolvimento do método de CLAE para o hiclato de doxiciclina foram testadas concentrações que variaram de 20 a 120 $\mu\text{g/mL}$. Foram escolhidas as concentrações de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos na validação do método demonstraram que as soluções de hiclato de doxiciclina apresentaram correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações, no intervalo utilizado. Gráficos de concentração *versus* área absoluta foram plotados e demonstraram linearidade na faixa de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta para o hiclato de doxiciclina foi $y = 25378x - 54442$, com coeficiente de correlação de 0,9999. Os dados de linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA) que demonstrou regressão linear significativa e nenhum desvio de linearidade significativo ($p < 0,05$).

O teste de precisão intradia apresentou valor de 0,38% e a não diferença estatisticamente significativa, para um nível de significância de 5%, entre as médias dos valores obtidos no teste de precisão inter-analista, valida a precisão do método em CLAE para análise do hiclato de doxiciclina.

CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do hiclato de doxiciclina ($LD = 2,83 \mu\text{g/mL}$ e $LQ = 8,59 \mu\text{g/mL}$) indicam a boa sensibilidade do método para determinação do fármaco.

A especificidade do método pode ser determinada com a adição de impurezas e produtos de degradação, obtidos experimentalmente ou induzindo a sua formação (ERMER, 2001). Os comprimidos de hiclato de doxiciclina foram submetidos à degradação em meio ácido, alcalino, oxidativo, aquoso e fotolítico. Em todos ocorreram decréscimo da área absoluta do pico de hiclato de doxiciclina, confirmando a especificidade qualitativa. Estes estudos de degradação forçada mostram a suscetibilidade do fármaco perante a degradação ácida, básica, oxidativa e fotolítica. Sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser utilizado em estudos de estabilidade.

A quantidade de hiclato de doxiciclina presente nas amostras analisadas, 110,07%, não está de acordo com os compêndios oficiais que é de 95,0 a 105,0% (BP, 2010).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada uma média de 100,33%.

Na robustez os valores das médias das áreas obtidos através das variações no método de CLAE mostraram que não há diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o método pode ser considerado robusto.

Os parâmetros estudados para a validação do método em CLAE atenderam às especificações para a adequada quantificação do hiclato de doxiciclina na forma farmacêutica comprimido.

6. TESTE DE DISSOLUÇÃO

6.1. Introdução

O teste de dissolução direciona o desenvolvimento e a avaliação de novas formulações, auxilia na avaliação da estabilidade de formulações, permite realizar a correlação *in vivo/in vitro*, além de auxiliar na aprovação de um novo produto pelas autoridades regulatórias e a entender o processo de liberação para formas farmacêuticas modificadas.

Ao focar a importância do teste de dissolução nos setores de Controle de Qualidade e Produção em uma indústria farmacêutica verificou-se que o teste faz parte das especificações do produto, detecta desvios de produção, assegura consistência e reprodutibilidade dentro de um mesmo lote e lote a lote. Avalia a qualidade da formulação em função do tempo, condições de armazenamento, tipo de material de embalagem primário e modificações no processo, auxiliando na decisão sobre estudos de bioequivalência.

O teste de dissolução deve ser realizado quando a forma farmacêutica for:

- ✓ Comprimidos (mastigáveis, de desintegração oral, revestidos e sublingual)
- ✓ Cápsulas (duras, moles e aquelas com conteúdo líquido)
- ✓ Suspensões (oral, injetável e oftálmica)
- ✓ Supositórios
- ✓ Pomadas, géis e cremes
- ✓ Adesivos transdérmicos
- ✓ Implantes que contenham fármaco

- ✓ Lipossomas, nanoesferas, etc
- ✓ Gomas de mascar contendo medicamento

Um fator determinante para obtenção do efeito terapêutico esperado é a taxa de dissolução de um fármaco a partir da forma farmacêutica, pois a absorção deste fármaco está diretamente relacionada com sua dissolução. Portanto, os ensaios de dissolução são importantes ferramentas para avaliação da influência de diferentes fatores da formulação na absorção de fármacos, tais como propriedades físico-químicas da(s) substância(s) ativa(s), propriedades dos diferentes excipientes e diferentes passos nos processos de fabricação (GRAFFNER, 2006).

Os testes de dissolução para análises de controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, que é o caso dos comprimidos de hiclato de doxiciclina, são apresentados em monografias específicas, descritas em farmacopeias. Estes testes de dissolução são realizados através de um único ponto de amostragem.

O aparato (cesta ou pá), o meio de dissolução (pH de 1 a 6,8) e a velocidade de agitação (50, 75 e 100 rpm) devem ser cuidadosamente determinados. O volume utilizado de meio também deve ser observado (FDA, 2000). Além destes fatores, deve se considerar outras variáveis que podem influenciar no ensaio: posição da haste; posição e método de amostragem; dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam; presença de ar ou gases; temperatura; filtros utilizados e método analítico para quantificação. A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade propostos (MARCOLONGO, 2003).

6.2. Parte experimental

Forma Farmacêutica

A forma farmacêutica utilizada foi comprimido de hiclato de doxiciclina 80 mg, Doxirat® 80 mg, lote 1002101, gentilmente cedidos pela União Química Indústria Farmacêutica (São Paulo, Brasil).

Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: ultrassom Ultrasonic Cleaner (Unique®, Indaiatuba, Brasil), dissolutor Technologies 8000 Dissolution sampling Station (Varian®, VK7025, EUA), membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 µm de poro e 47,0 mm de diâmetro (Millipore®, Bedford, EUA), sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore®, Bedford, EUA), espectrofotômetro (Shimadzu UV mini – 1240, Kyoto, Japão) e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram: ácido clorídrico Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil) e água purificada (água Milli-Q).

6.3. Teste de dissolução

6.3.1. Determinação das condições *sink*

As condições *sink* para o hiclato de doxiciclina foram testadas em água purificada, HCl 0,1 M e HCl 0,01 M. Com a utilização de 900 mL de meio, a concentração de fármaco é próxima a 89 µg/mL, para comprimidos de 80 mg de hiclato de doxiciclina.

6.3.2. Determinação dos perfis de dissolução

Para determinação das condições ótimas para realização de ensaios e perfis de dissolução de comprimidos contendo 80 mg de hiclato de doxiciclina, foram obtidos perfis

de dissolução utilizando os seguintes meios: água purificada, HCl 0,1 M e HCl 0,01 M. Os meios foram desaerados em banho de ultrassom por 30 minutos a temperatura 40° C.

Após a forma farmacêutica atingir o fundo da cuba, a rotação da pá se iniciou. Foi utilizado o aparato pá, por tratar-se de forma farmacêutica comprimido revestido, que não apresenta problemas de flutuação, sob as velocidades de agitação de 50 e 75 rpm, como preconiza a USP (2010) para aparato pá e forma farmacêutica comprimido. Os tempos de coleta selecionados foram desde 5 até 240 minutos. Alíquotas de 10,0 mL foram retiradas de cada cuba e imediatamente filtradas em membrana de 0,45 µm. A retirada da amostra foi realizada em uma área localizada na metade da distância entre a superfície do meio de dissolução e o topo da haste e não menos que 1 cm da parede interna da cuba. O mesmo volume de meio de dissolução retirado das cubas foi repostado, para manter o volume total constante. A cuba permaneceu tampada durante todo o teste. As alíquotas retiradas foram diretamente analisadas utilizando o método desenvolvido e validado no espectrofotômetro na região do UV a 273 nm, quando o solvente utilizado foi água, e 268 nm, quando foi solução de HCl.

6.4. Resultados

Foram testados três meios de dissolução, água purificada, HCl 0,1 M e HCl 0,01 M, em duas rotações específicas, 50 e 75 rpm. Os perfis de dissolução são mostrados nas Figuras 20 e 21.

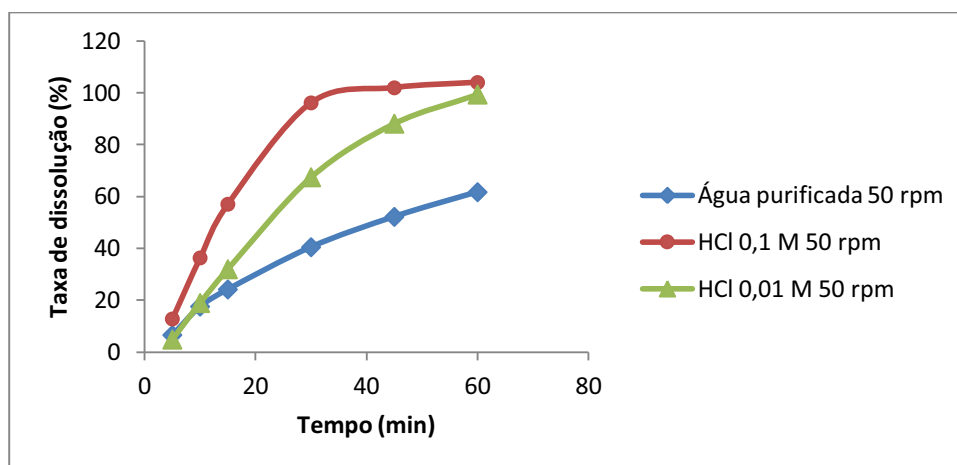


Figura 20. Perfil de dissolução do hclato de doxiciclina comprimido em água purificada, HCl 0,01 M e HCl 0,1 M a 50 rpm.

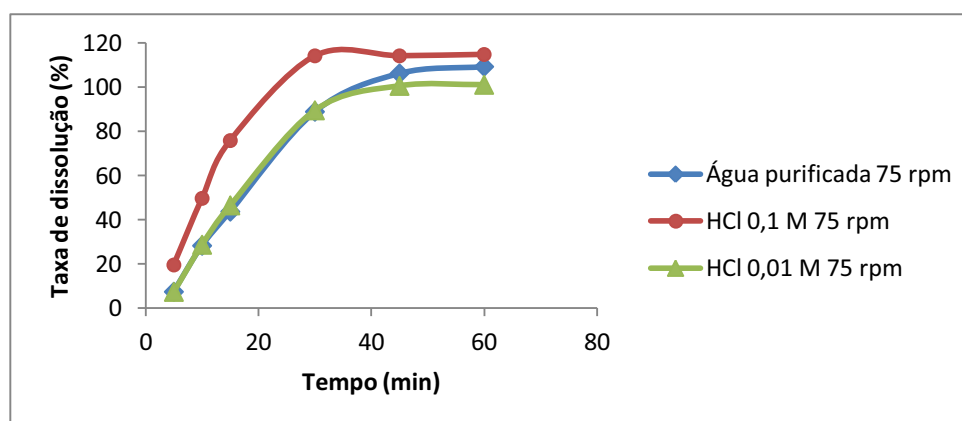


Figura 21. Perfil de dissolução do hclato de doxiciclina comprimido em água purificada, HCl 0,01 M e HCl 0,1 M a 75 rpm.

6.5. Discussão

O hclato de doxiciclina comprimidos apresenta monografia descrita para o teste de dissolução na USP (2010), a qual preconiza os seguintes parâmetros: pá, 75 rpm, 90 minutos e 900 mL de água como meio de dissolução. Mesmo assim, foram testados outros meios de dissolução na tentativa de se utilizar meios os quais se assemelhariam aos meios utilizados nas análises espectrofotométrica e cromatográfica do hclato de doxiciclina,

como o HCl 0,01 *M*, como também outra rotação por minuto, no caso 50 rpm pelo fato desta rotação ser mais discriminativa e fornecer desvios mais baixos e principalmente para tentar diminuir o tempo de análise.

Na análise do comprimido de hiclato de doxiciclina em água a 50 rpm foram necessários 240 minutos para a total dissolução. Este tempo é inviável para a logística de análises do setor de Controle de Qualidade das Indústrias Farmacêuticas.

Na análise do comprimido em HCl 0,01 *M* a 50 rpm foram necessários 150 minutos e em HCl 0,1 *M* a 50 rpm foram necessários 90 minutos. A questão do tempo ainda é o fator limitante para a escolha destes parâmetros.

Em 60 minutos de análise do comprimido de hiclato de doxiciclina em água, HCl 0,01 *M* e HCl 0,1 *M* a 75 rpm o único meio de dissolução no qual o produto acabado estava totalmente dissolvido foi em HCl 0,1 *M*.

A USP (2010) traz monografias de hiclato de doxiciclina em outras formas farmacêuticas como cápsulas, por exemplo, com tempo de análise de 30 minutos. É uma grande diferença, comparada aos 90 minutos de análise da forma comprimido, que permite pensar na adoção de outra forma farmacêutica para a amostra analisada devido às vantagens no tempo de análise e conseqüentemente na quantidade de lotes analisados por dia.

Uma sugestão seria a forma farmacêutica cápsulas de hiclato de doxiciclina que segundo a USP (2010) utiliza-se 900 mL de água como meio de dissolução, 75 rpm, 30 minutos de tempo de análise e quantificação por método espectrofotométrico na região do UV. As cápsulas também se tornam interessantes, pois este projeto desenvolveu o complexo de inclusão do hiclato de doxiciclina com a β -ciclodextrina devido à fotossensibilidade do fármaco frente à luz UV. Assim, ao somar a vantagem do tempo de

análise das cápsulas *versus* dos comprimidos e a complexação desenvolvida neste trabalho, tem-se o interesse de se comparar os benefícios do complexo de inclusão encapsulado *versus* o comprimido revestido.

Acredita-se que serão inúmeras vantagens em termos financeiros, como preço da ciclodextrina, dos excipientes e substâncias de revestimento, maquinário, tempo dispensado para revestimento, tempo de fabricação e liberação do lote para o mercado; bem como industriais, como tempo de preparo no setor de Produção de uma indústria farmacêutica bem como no tempo da análise necessária pelo Controle de Qualidade.

7. ENSAIO MICROBIOLÓGICO

7.1. Introdução

O método turbidimétrico está descrito na Farmacopeia Brasileira (F. BRAS, 2010) não para o hiclato de doxiciclina, mas sim para outros antimicrobianos e uma de suas principais vantagens é o menor tempo de análise.

Este método baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados/sensíveis ao agente antimicrobiano, contidos em um meio de cultura. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa.

7.1.1. Ensaios preliminares para o estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a quantificação de hiclato de doxiciclina, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 19).

Tabela 19. Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico – método turbidimétrico para determinação de hiclato de doxiciclina comprimido

<i>Parâmetros</i>	<i>Descrição</i>
Micro-organismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 IAL 636
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Meios de cultura	Caldo BHI
	Caldo Casoy
	Caldo Müller-Hinton
Concentração do inóculo	4,0%
	8,0%
	10,0%
Solução diluente	água
	solução tampão fosfato pH 8,0
Concentração da solução padrão	4,0; 6,0; 9,0 µg/mL
	6,0; 12,0; 24,0 µg/mL

Realizados os testes preliminares, alguns parâmetros foram estabelecidos por apresentarem melhor desempenho na análise (Tabela 20).

Tabela 20. Parâmetros estabelecidos para a determinação de hiclato de doxiciclina comprimidos pelo método turbidimétrico

<i>Parâmetros</i>	<i>Descrição</i>
Micro-organismo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Meio de cultura	Caldo BHI
Concentração do inóculo	10,0%
Solução diluente	água
Concentração da solução de hiclato de doxiciclina	4,0; 6,0 e 9,0 µg/mL

7.2. Material

Para a incubação dos micro-organismos utilizou-se aparelho incubador Shaker Marconi modelo MA420 e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás). Para as leituras, utilizou-se fotolorímetro Quimis, modelo Q-798 DRM.

7.2.1. Preparo do meio de cultura

Foram utilizados meio de cultura ágar BHI, para a manutenção dos micro-organismos e o caldo BHI para a execução dos ensaios.

Os meios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

7.2.2. Preparo do inóculo

As culturas de *E. coli* foram repicadas com alça de platina para caldo BHI e mantidas para seu desenvolvimento em estufa microbiológica à temperatura de 35°C ± 2°C, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo a 530

nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de $25\% \pm 2\%$. O meio padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (F. BRAS, 2010).

7.2.3. Preparo da solução de hiclato de doxiciclina SQR

Foram pesados, analiticamente, 5,0 mg de hiclato de doxiciclina SQR, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 400; 600 e 900 μL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL que foram completados com água para gerar soluções com concentrações finais de 4,0; 6,0 e 9,0 $\mu\text{g/mL}$.

7.2.4. Preparo das amostras de hiclato de doxiciclina comprimidos

Foi realizado o peso individual de 20 comprimidos contendo 80 mg de hiclato de doxiciclina para o cálculo do peso médio. Os comprimidos foram triturados em gral de porcelana com pistilo. Posteriormente, foi pesado o equivalente ao peso médio dos comprimidos e transferido para balão volumétrico de 50 mL; o volume foi completado com água para a obtenção de solução com concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 400; 600 e 900 μL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL que foram completados com água para gerar soluções com concentrações finais de 4,0; 6,0 e 9,0 $\mu\text{g/mL}$.

7.3. Método

Inicialmente procedeu-se o preparo do inóculo como descrito no item 7.2.2, em seguida, distribuiu-se em tubos idênticos contendo 10,0 mL de caldo estéril, 200 μL de cada uma das soluções do padrão e da amostra descritas nos itens 7.2.3 e 7.2.4, respectivamente.

Adicionou-se em cada tubo 1,0 mL de caldo nutriente inoculado. Foram usados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas 3 X 3. Três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de hiclato de doxiciclina) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas 3 réplicas.

Incubou-se, em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos microorganismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído a 12% em cada tubo.

Determinou-se a absorvância para cada tubo em fotocolorímetro, no comprimento de onda de 530 nm. O aparelho foi padronizado em absorvância zero através de branco contendo 10,0 mL de caldo e 0,5 mL de formaldeído a 12% (controle negativo).

7.4. Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida como descrito no item 7.2.3. Foram feitas três curvas em três dias diferentes.

7.5. Determinação do hiclato de doxiciclina em comprimidos

Para doseamento da forma farmacêutica, adicionaram-se 200 μL das soluções do padrão e da amostra, com concentração de 6,0 $\mu\text{g/mL}$, concentração de referência do ensaio (F. Bras. V, 2010), em séries de seis tubos contendo 10,0 mL de caldo estéril cada. Adicionou-se para cada tubo 1,0 mL de caldo nutriente inoculado. Incubou-se, em banho com agitador orbital, à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos microorganismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído a 12% em cada tubo.

Determinou-se a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm. Em todas as análises controles positivo e negativo foram utilizados. O ensaio foi realizado em três dias.

7.6. Validação

7.6.1. Linearidade

Foi avaliada pela construção de três curvas analíticas desenvolvidas em três diferentes dias e em triplicata. As concentrações utilizadas foram 4, 6 e 9 µg/mL.

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

7.6.2. Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios de doseamento de hiclato de doxiciclina comprimidos, foram realizadas seis soluções estoque de hiclato de doxiciclina, das quais foram retiradas seis alíquotas de cada uma para obtenção de soluções com concentração teórica de 6 µg/mL, no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais para avaliação da precisão intradia e calculado o coeficiente de variação. E durante três dias seguidos, para avaliação da precisão inter-analista, o teste foi realizado por analistas diferentes e os resultados foram analisados estatisticamente.

7.6.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de adição.

Foram preparadas soluções estoque de hiclato de doxiciclina SQR e comprimidos na concentração de 100 µg/mL. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 400 µL de cada uma e transferidas para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se dois balões com 400 µL

cada, um de SQR e o outro de produto acabado. Foram completados com água purificada e obtidas soluções com concentrações teóricas de 4 µg/mL. A partir da solução estoque de hiclato de doxiciclina comprimidos, foram retiradas alíquotas de 400 µL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL adicionadas de 80 µL de solução estoque de hiclato de doxiciclina SQR, completados com água purificada para obtenção de solução com concentração teórica de 4,8 µg/mL. Alterando apenas o volume da solução estoque de SQR, procedeu-se da mesma forma para obtenção de mais duas soluções através de alíquotas de 200 µL (concentração teórica de 6 µg/mL) e 320 µL (concentração teórica de 7,2 µg/mL).

As preparações das amostras estão exemplificadas na Tabela 21.

Tabela 21. Preparo das soluções para o teste de exatidão do método turbidimétrico para o hiclato de doxiciclina

	<i>Volume adicionado de DOX amostra de concentração 100 µg/mL (µL)</i>	<i>Volume adicionado de DOX SQR de concentração 100 µg/mL (µL)</i>	<i>Concentração teórica final (µg/mL)^{a,b}</i>
Amostra	400	-	4,0
R1	400	80	4,8
R2	400	200	6,0
R3	400	320	7,2
Padrão	-	400	4,0

^adiluída em balão volumétrico de 10 mL

^bcada nível de concentração foi preparado em triplicata

7.6.4. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) do hiclato de doxiciclina foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), conforme a Equação III do item 5.3.1.4.5.

O limite de quantificação (LQ) do hiclato de doxiciclina foi obtido com base nos mesmos dados descritos acima, segundo a Equação IV do item 5.3.1.4.5.

7.6.5. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do tempo de incubação do micro-organismo de 24 para 20 horas. Os resultados obtidos pela variação deste parâmetro foram analisados por teste F (Snedecor) e teste t (Student).

7.7. Resultados

Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de hiclato de doxiciclina SQR e amostra são mostradas na Tabela 22.

Tabela 22. Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva analítica de hiclato de doxiciclina, para o método turbidimétrico

<i>Concentração (µg/mL)</i>	<i>Absorvância*</i>	
	<i>P</i>	<i>A</i>
4	0,865	0,853
	0,856	0,836
	0,862	0,857
6	0,640	0,632
	0,619	0,610
	0,621	0,621
9	0,416	0,412
	0,439	0,460
	0,425	0,416

*Cada valor corresponde a média de três determinações.

P = padrão; A = amostra

As curvas analíticas de hiclato de doxiciclina SQR e amostra (Figura 22) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,511\ln(x) + 1,5574$, com um coeficiente de correlação igual a 0,9986, para o hiclato de doxiciclina SQR e $y = -0,517\ln(x) + 1,5595$, com r de 0,9987, para a amostra comprimidos.

CAPÍTULO VII – ENSAIO MICROBIOLÓGICO

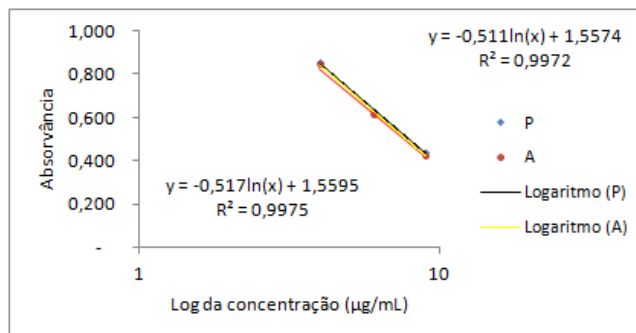


Figura 22. Curvas analíticas de soluções de hclato de doxiciclina SQR e amostra, em concentrações de 4,0; 6,0 e 9,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de hclato de doxiciclina é mostrada na Tabela 23.

Tabela 23. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de hclato de doxiciclina SQR, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	gl	SQ	QM	F _{cal}	F _{tab.}
Preparação	1	0,0001	0,0001	0,32	4,96
Regressão	1	0,5466	0,5466	2408,23 *	4,96
Paralelismo	1	0,0002	0,0002	0,74	4,96
Quadrático	1	0,0010	0,0010	4,47	4,96
Desvio de linearidade					
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,03	4,96
Tratamentos	5	0,55	0,11	446,28 *	3,33
Blocos	2	0,00	0,00	0,07	4,10
Dentro (erro)	10	0,00	0,00	
Total	17	0,55	

*Significativo para $p < 5\%$

Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 0,23 µg/mL e 0,71 µg/mL, respectivamente.

Precisão e doseamento

Os valores da potência de hiclato de doxiciclina comprimidos – produto de referência, determinados durante o ensaio de precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Valores determinados para o doseamento de hiclato de doxiciclina comprimidos, pelo método turbidimétrico

<i>Dia</i>	<i>Teor de hiclato de doxiciclina comprimidos*</i>		<i>Teor médio ± e.p.m.</i>	<i>CV (%)</i>
	<i>µg/mL</i>	<i>%</i>		
	1	6,06		
2	6,10	101,70	101,90 ± 1,09	0,99
3	6,18	103,00		

*Cada valor corresponde a média de seis determinações.

A precisão inter-analista foi comprovada através de tratamento estatístico com as médias dos valores obtidos na análise por diferentes analistas e o resultado encontra-se na Tabela 25.

Tabela 25. Valores calculados no teste F e teste t da precisão inter-analista do método turbidimétrico

Teste-F: duas amostras para variância	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Fcal 4,40 < Ftab 19	tcal 1,48 < ttab 2,78
Pvalor 0,18 > 0,05	Pvalor 0,21 > 0,05

Exatidão

Na Tabela 26 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método turbidimétrico.

Tabela 26. Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico

	<i>DOX SQR</i> <i>adicionada (µg/mL)</i>	<i>DOX SQR</i> <i>recuperada (µg/mL)</i>	<i>Recuperação</i> <i>(%)</i>	<i>Recuperação</i> <i>média (%)</i>	<i>CV</i> <i>(%)</i>
R1	0,8	0,79	98,60		
R2	2,0	1,95	97,44	97,73	0,78
R3	3,2	3,11	97,15		

Robustez

As médias da variação no tempo de incubação do micro-organismo para avaliar o parâmetro robustez foram analisadas estatisticamente e o resultado encontra-se na Tabela 27.

Tabela 27. Testes F e t para variação no tempo de incubação do micro-organismo no método turbidimétrico para determinação de hclato de doxiciclina

<i>Teste</i>	<i>Tempo de incubação (horas)</i>	
	20	24
Fcal	1,73	
Ftab	19	
Pvalor	0,36	
tcal	1,63	
ttab	2,78	
Pvalor	0,18	

7.8. Discussão

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico permite a determinação da potência do fármaco, através da medida da turbidez (absorvância), causada pela inibição do crescimento do micro-organismo pelo antibacteriano.

No desenvolvimento do método turbidimétrico para hclato de doxiciclina foram testadas concentrações da substância química de referência que variaram de 4,0 a 24,0 µg/mL. Finalmente, foram escolhidas as concentrações 4,0; 6,0 e 9,0 µg/mL, com razão de 1,5, uma vez que apresentaram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A utilização do micro-organismo *E. coli* baseia-se na sua sensibilidade frente ao hclato de doxiciclina e pela facilidade de crescimento e manutenção deste micro-organismo.

A linearidade do método foi comprovada pelo coeficiente de correlação e análise de variância dos dados da curva analítica. A análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de correlação são 0,9986 e 0,9987, para a substância química de

referência e comprimidos, respectivamente, valores próximos da unidade, os quais são excelentes tratando-se de um ensaio biológico. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra através da análise de paralelismo.

A precisão intradia se confirma com o valor obtido de 0,99% e a precisão inter-analista se confirma através da não diferença estatisticamente significativa, para um nível de significância de 5%, entre as médias dos valores obtidos no ensaio, validando assim a precisão do método turbidimétrico para análise do hiclato de doxiciclina.

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do hiclato de doxiciclina (LD = 0,23 µg/mL e LQ = 0,71 µg/mL) indicam a boa sensibilidade do método para determinação do fármaco.

A potência dos comprimidos de hiclato de doxiciclina apresentou teor médio de 101,9%.

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo determinada média de 97,73%.

A robustez do método foi confirmada pela variação do tempo de incubação do micro-organismo. Os resultados mostram que não há diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o método pode ser considerado robusto.

Os parâmetros estudados para a validação do método turbidimétrico atenderam às especificações para a adequada quantificação do hiclato de doxiciclina na forma farmacêutica comprimido.

8. COMPLEXAÇÃO

8.1. Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, originados da degradação do amido pelas enzimas glicosiltransferases, sintetizadas por alguns micro-organismos. As que são obtidas com maior rendimento são comumente conhecidas como CDs naturais e contêm seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD), Figura 23, e γ -ciclodextrinas (γ -CD), respectivamente. A β -CD é a mais utilizada nas formulações comerciais atualmente disponíveis (LYRA *et al.*, 2010).

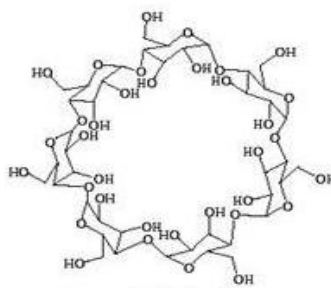


Figura 23. Estrutura química da β -ciclodextrina.

As ciclodextrinas atualmente estão classificadas como excipiente e têm sido utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, as quais proporcionam incremento de solubilidade e consequente aumento da taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, estabilidade, redução de irritações bem como diminuição ou eliminação de odores ou sabores desagradáveis em formulações líquidas (LYRA *et al.*, 2010). Apesar do número crescente

de trabalhos utilizando CDs na formação de complexo de inclusão (CI) neste sentido, a abordagem do projeto foi isolar o fármaco do meio externo, dado a característica do hiclato de doxiciclina ser fotossensível.

Variações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser identificadas através de metodologias analíticas, que permitem detectar a formação dos complexos. Para caracterização da formação de CI em estado sólido pode-se utilizar métodos térmicos, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e análise das propriedades de dissolução; e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de ultravioleta visível e diagrama de solubilidade de fase em complexos de inclusão no estado líquido (LYRA *et al.*, 2010).

A incorporação das CDs em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Os avanços na tecnologia industrial permitem fabricar CDs naturais com elevado grau de pureza. A β -CD é cotada em aproximadamente US\$ 5/kg. É provável que o número de formulações contendo este adjuvante se amplie consideravelmente nos próximos anos (CUNHA-FILHO *et al.*, 2007).

8.2. Material

A SQR utilizada foi o hiclato de doxiciclina, teor de 97,10%, lote 0900002795, gentilmente cedida pela União Química Indústria Farmacêutica. A ciclodextrina utilizada foi a β -ciclodextrina (Roquette, France).

Para o estudo térmico de TG/DTG as curvas foram obtidas no equipamento TGA 2950, da T. A. Instruments, usando cadinho de platina, razão de aquecimento de $\sim 10^{\circ}\text{C}$ e atmosfera dinâmica de N_2 . Para o estudo térmico de DSC foi utilizado o equipamento DSC

2920, da T. A. Instruments, cadinho de alumínio, razão de aquecimento de $\sim 10^{\circ}\text{C}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

Para os estudos de RMN e ROESY (*Rotation Overhauser Effect Spectroscopy*, um RMN bidimensional) foram usadas solução de D_2O , $\text{pD} = 2.3$. Todos os experimentos foram desenvolvidos no Bruker® Avance II High Resolution Spectrometer.

Estudos teóricos foram desenvolvidos aplicando modelagem molecular e técnica de docking usando Gaussian03 e Autodock3. Simulações da dinâmica molecular e análises energéticas foram aplicadas usando o *software* Amber9.

Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Químicas da Universidad Nacional de Córdoba, na cidade de Córdoba, Argentina, sob a supervisão da Profa. Dra. Marcela Longhi.

8.3. Método

Para o processo de preparação do CI de DOX e β -CD foram pesados, baseados nas massas moleculares, 0,250 g de DOX em béquer e 0,277 g de β -CD em outro. Foi acrescentado a β -CD na DOX, colocado aproximadamente 20 mL de água purificada no béquer em que havia β -CD e verteu-se no béquer com DOX e a β -CD. Foi colocado no ultrassom por cerca de 40 minutos. O conteúdo foi dividido em dois tubos de centrifuga, os quais foram liofilizados.

As técnicas escolhidas para verificação do CI em estado sólido foram as análises térmicas: Termogravimetria (TG) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e as técnicas para confirmação do CI em solução foram as análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e ROESY. Todas as técnicas citadas promovem resultados rápidos e precisos.

Nas técnicas de análise térmica, foram analisados a DOX, β -CD, mistura física (MF) da DOX com a β -CD e CI para comparação de seus perfis.

Em RMN e ROESY, o espectro foi obtido em 400,16 MHz e 298 K, com o deslocamento químico do solvente residual de 4,8 ppm sendo usado como referência interna. O $\Delta\delta$ do deslocamento químico do hidrogênio para β -CD e DOX originado da sua complexação, foi calculado usando a seguinte Equação V:

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}} \quad \text{Equação V}$$

8.4. Resultados

8.4.1. Verificação da complexação

O complexo de inclusão foi caracterizado por termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura, o qual confirmou a formação do complexo, dado que as temperaturas de degradação não foram iguais e os valores da mistura física não correspondiam ao resultado da soma das temperaturas de degradação da β -ciclodextrina e do hclato de doxiciclina.

Os comportamentos térmicos da β -ciclodextrina, doxiciclina, mistura física (mistura mecânica de β -CD e DOX) e complexo de inclusão estão representados na Figura 24.

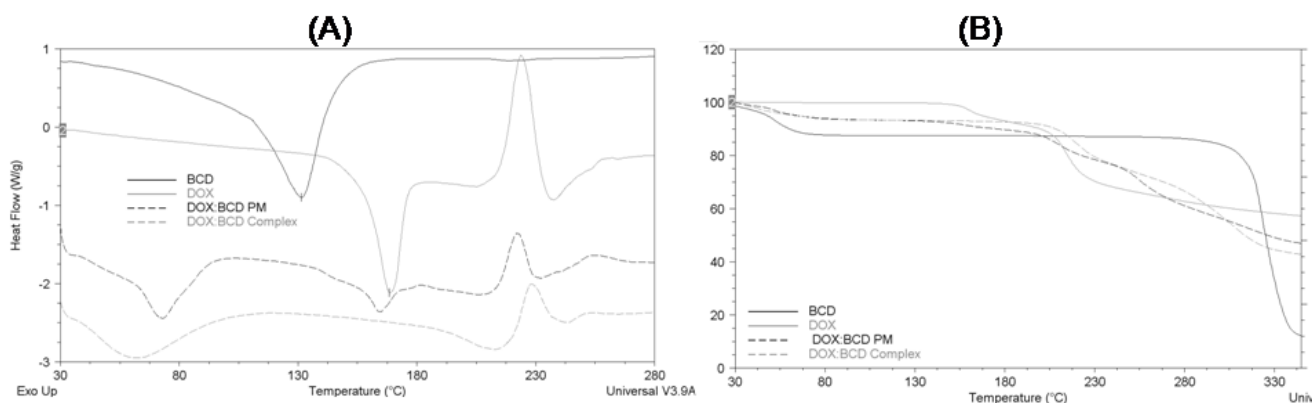


Figura 24. Curvas de DSC (A) e TG (B) de β -ciclodextrina (β CD), hidrato de doxiciclina (DOX), mistura física (DOX: β CD PM) e complexo de inclusão (DOX: β CD Complex).

A curva DSC mostra que o pico endotérmico da DOX a 168°C não está presente no CI, indicando mudanças na forma cristalina do sólido ou no processo de complexação. A curva TG mostra que a decomposição do CI começa em 220°C; a temperatura é maior do que para a DOX (160°C). Este fato indica que o CI apresenta maior estabilidade térmica.

8.4.2. Estudo do complexo

A energia mínima de conformação da DOX (Figura 25) foi obtida por análises de simulação anelar que depois foi utilizada para os cálculos de “docking” molecular.

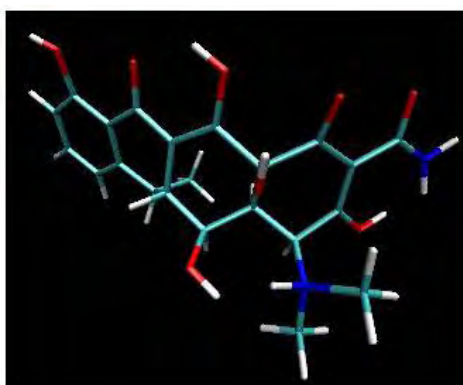


Figura 25. Energia mínima de conformação da DOX.

Resultados de “docking” sugeriram a formação do complexo de inclusão entre DOX e β -CD através de um aglomerado único que estava previsto. Neste modelo, o anel aromático “D” da DOX (Figura 26) foi inserido na cavidade hidrofóbica com energia acoplada média de -11,03 kcal/mol.

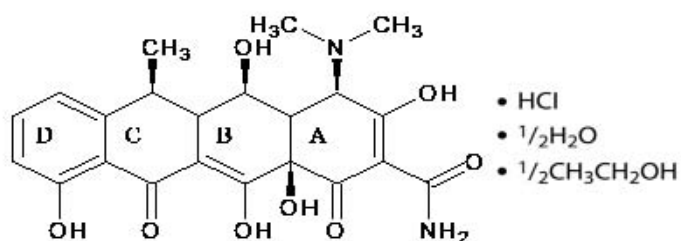


Figura 26. Estrutura química da DOX com os anéis identificados.

Simulações de dinâmica molecular em condições solvente mostrou que o complexo de inclusão é mantido em toda a simulação (5 ns) com anel D profundamente inserido dentro da cavidade da CD e anel A orientado em direção ao largo anel da CD (Figura 27).

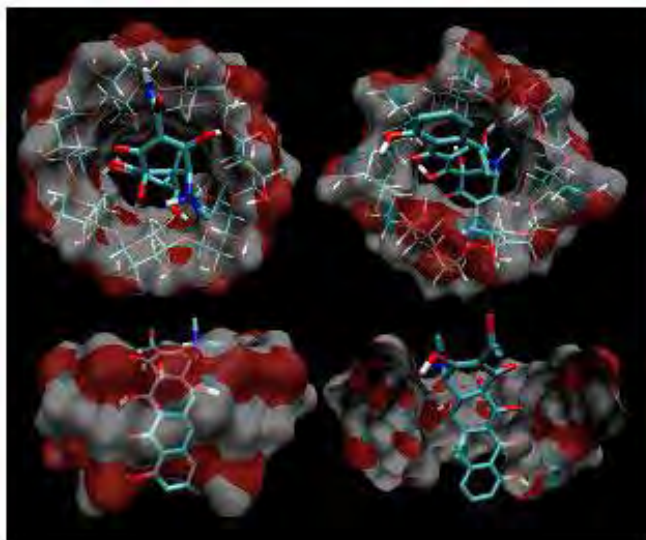


Figura 27. Conformação 3D do complexo entre a DOX e a β -CD obtido por “docking” molecular.

Análises dos componentes energéticos (Tabela 28) foram analisadas por *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA) e demonstraram que o complexo é estabilizado principalmente por contatos hidrofóbicos, com uma menor contribuição de interações eletrostáticas.

Tabela 28. Análise dos componentes energéticos obtidos por MM-PBSA para análise do complexo DOX:β-CD por simulação dinâmica molecular

Componente	Valores (kcal/mol)
Energia eletrostática	-8,43 ± 6,34
Van der Waals	-34,51 ± 3,76
Energia total fase gasosa	-42,94 ± 8,61
Contribuição apolar (solvatação)	-4,06 ± 0,32
Contribuição eletrostática (solvatação)	31,09 ± 8,34
Contribuição solvatação total	27,03 ± 8,13
Energia da estimativa de ligação	-15,91 ± 2,76

Os estudos de H-RMN evidenciaram blindagem marcada do efeito nos prótons internos da CD (Tabela 29), confirmando a formação do complexo de inclusão.

Os prótons internos (H₃ e H₅) mostraram deslocamentos assinalados em campo alto, o que indica a inclusão de uma porção rica em elétrons, bem como é observado na interação com o próton localizado perto da cavidade estreita da βCD.

Tabela 29. Deslocamento químico para os prótons da β -CD no estado livre e no complexo com a DOX

Próton	β -CD (ppm)	DOX: β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H ₁	5,0765	5,0804	0,0039
H ₂	3,6554	-	-
H ₃	3,9729	3,9434	-0,0295
H ₄	3,5908	3,5944	0,0036
H ₅	3,8579	3,8465	-0,0114
H ₆	3,8851	3,9082	0,0231

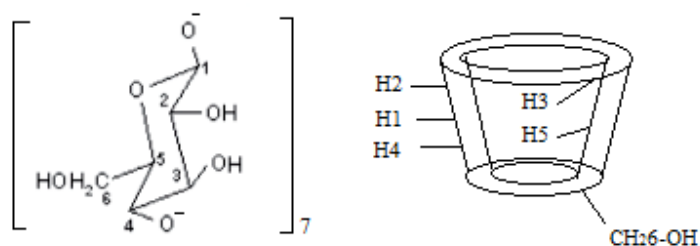


Figura 28. Identificação dos prótons da β -CD.

O ensaio de ROESY 2D permitiu mostrar a correlação entre os prótons internos e externos (H₆) da CD e os prótons aromáticos da DOX, sugerindo que o anel D está inserido dentro da cavidade da CD (Figura 29).

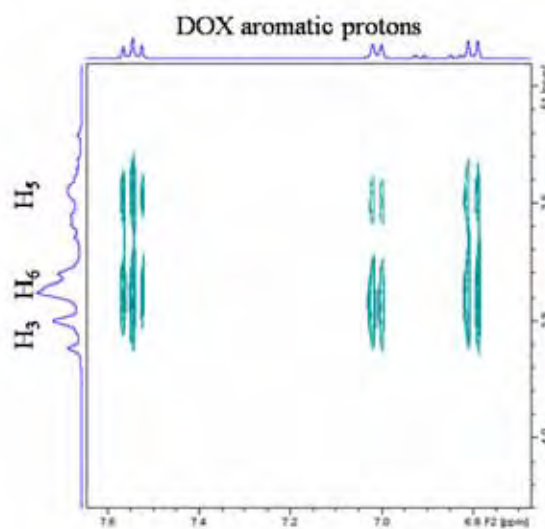


Figura 29. Expansão do espectro de ROESY 2D do complexo DOX:β-CD.

Foi possível combinar estudos de modelagem molecular com estudos espectroscópicos experimentais para elucidar a base molecular da interação DOX-β-CD.

8.5. Discussão

Uma nova gama de possibilidades se abre para a indústria farmacêutica na complexação de substâncias fotossensíveis.

Mesmo quando a complexação não aumentar a potência do fármaco, seria importante avaliar os custos para complexar ao invés de revestir fármacos. Se houver a escolha pela complexação é possível a obtenção da forma farmacêutica cápsula, a qual foi abordada no capítulo Dissolução. Essa ideia de mudança de forma farmacêutica visa à melhora na dinâmica das análises laboratoriais no sentido de aumento de fluxo das etapas industriais farmacêuticas e abre possibilidades para melhor aproveitamento do fármaco em outra forma farmacêutica. A dinâmica do processo industrial deve ser bem avaliada, porque

o tempo é um ponto crítico em todas as áreas da indústria farmacêutica, em que os setores de Produção, Controle de Qualidade e Vendas andam juntos, sendo dependentes de liberação de resultados ou ordens uns dos outros para poderem prosseguir com suas atividades. Estudos adicionais para comparar o tempo dispensado no processo de revestimento *versus* o tempo de complexação deveriam ser realizados para confirmar as vantagens de cada processo.

9. COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO

9.1. Introdução

Este trabalho visa isolar o fármaco do meio externo, por causa da característica fotossensível do hiclato de doxiciclina (DOX). Assim, realizou-se a comparação, através do método microbiológico, turbidimétrico, das atividades antimicrobianas do CI e da DOX (I) e as atividades antimicrobianas do CI e da DOX após exposição à luz UV (II), como também a comparação, através do método de CLAE, do teor de DOX nas formas complexada e livre após serem expostas à luz UV (III).

9.2. Material

Para a realização das comparações foram utilizados o hiclato de doxiciclina SQR, teor de 97,10%, lote 0900002795, gentilmente cedido pela União Química Indústria Farmacêutica e o complexo de inclusão obtido no capítulo VIII.

Na comparação da atividade microbiológica e dos teores foram utilizados os materiais descritos nos itens 5.3.2.1. e 7.2., respectivamente.

9.3. Método

Na comparação da atividade microbiológica e dos teores foram utilizados os métodos desenvolvidos e validados no capítulo VII e no item 5.3.2., respectivamente.

9.4. Resultado das comparações

9.4.1. Comparação da atividade antimicrobiana

O objetivo foi comparar, usando o método microbiológico turbidimétrico, a atividade do CI comparada com a atividade da DOX, como também, comparar a atividade do CI e da DOX depois de ambos terem sido expostos à luz UV.

O método microbiológico permitiu determinar a potência do fármaco através da determinação da turbidimetria (absorvância) causada pela inibição do crescimento dos micro-organismos pelo antimicrobiano.

A validação do método microbiológico turbidimétrico para quantificação da DOX foi essencial para a comparação da atividade antimicrobiana entre a DOX complexada e a DOX livre.

As análises de comparação de atividade entre a DOX e o CI foram realizadas simultaneamente, nas mesmas condições experimentais.

Foram testadas soluções de DOX e CI em três concentrações diferentes. Soluções de β -CD também foram testadas para mostrar que não influenciam nos resultados. Depois do período de incubação, os tubos contendo soluções de DOX apresentaram maior turvação do meio de cultura que os tubos contendo soluções de CI, ou seja, o crescimento microbiano foi maior. O CI mostrou-se, aproximadamente, 20% mais potente do que a DOX.

CAPÍTULO IX – COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO



Figura 30. Turbidez dos meios de cultura relacionados com o controle negativo (A), controle positivo (B), solução de DOX na concentração de 9 µg/mL (C), solução de CI na concentração de 9 µg/mL (D).

As Tabelas 30 e 31 mostram os valores de absorvância do hiclato de doxiciclina e do complexo de inclusão antes da degradação na luz UV.

Tabela 30. Absorvância de hiclato de doxiciclina nas concentrações de 4, 6 e 9 µg/mL antes da degradação na luz UV

Concentrações de DOX (µg/mL)	Absorvâncias	Média	CV %
4	0,804	0,807	2,14
	0,826		
	0,792		
6	0,560	0,584	4,11
	0,583		
	0,608		
9	0,521	0,504	3,48
	0,505		
	0,486		

CAPÍTULO IX – COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO

Tabela 31. Absorvância do complexo de inclusão nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$ antes da degradação na luz UV

Concentrações de CI ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias	Média	CV %
4	0,796	0,806	1,24
	0,816		
	0,805		
6	0,556	0,530	4,27
	0,515		
	0,519		
9	0,394	0,417	4,89
	0,426		
	0,432		

As soluções de β -CD utilizadas no ensaio, após o período de incubação, apresentaram valores de absorvâncias iguais ou até superiores aos valores do controle positivo, demonstrando que a β -CD não interfere na atividade antimicrobiana do CI.



Figura 31. Turbidez dos meios de cultura relacionados com o controle negativo (A), controle positivo (B), solução de β -CD na concentração de 9 $\mu\text{g/mL}$ (C).

CAPÍTULO IX – COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO

A Tabela 32 mostra os valores de absorvância da solução de β -CD nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 32. Absorvância de soluções de β -CD nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$

Concentrações de β CD ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias
4	1,067
	1,095
	1,150
6	1,159
	1,157
	1,160
9	1,163
	1,151
	1,088

As soluções de DOX e CI foram expostas à luz UV por 7 dias e analisadas após estes dias pelo método turbidimétrico. Depois do período de incubação, os tubos contendo soluções de DOX apresentaram maior turvação do meio de cultura, em relação aos tubos contendo soluções de CI. O CI apresentou, aproximadamente, 30% maior atividade antimicrobiana que a DOX.

CAPÍTULO IX – COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO



Figura 32. Turbidez dos meios de cultura relacionados com o controle negativo (A), controle negativo (B), solução de DOX na concentração de 9 $\mu\text{g/mL}$ após exposição UV (C), solução de CI na concentração de 9 $\mu\text{g/mL}$ após exposição UV (D).

As Tabelas 33 e 34 mostram os valores de absorvância do hclato de doxiciclina e do complexo de inclusão expostos a luz UV.

Tabela 33. Absorvância de hclato de doxiciclina nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$ expostos à luz UV

Concentrações de DOX ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias	Média	CV %
4	1,167	1,139	2,26
	1,135		
	1,116		
6	1,035	1,045	3,12
	1,018		
	1,081		
9	0,607	0,609	0,78
	0,614		
	0,605		

Tabela 34. Absorvância do complexo de inclusão nas concentrações de 4, 6 e 9 µg/mL expostos à luz UV

Concentrações de CI (µg/mL)	Absorvâncias	Média	CV %
4	0,885	0,885	0,28
	0,882		
	0,887		
6	0,556	0,684	2,88
	0,702		
	0,663		
9	0,491	0,493	0,88
	0,498		
	0,490		

A partir destes resultados torna-se interessante para a indústria farmacêutica discutir a ideia de trabalhar com CI, pois a atividade antimicrobiana, neste caso, foi melhor do que aquela encontrada no fármaco livre. Ao proteger a DOX de fatores externos foi possível aumentar sua atividade antimicrobiana.

9.4.2. Comparação do teor

O objetivo foi comparar, usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os teores do CI e da DOX depois de ambos terem sido expostos à luz UV.

A validação prévia do método de CLAE para a quantificação da DOX foi essencial para a realização da comparação dos teores, do CI e da DOX, após exposição na luz UV.

As análises de comparação de teor da DOX e do CI foram realizadas simultaneamente, nas mesmas condições experimentais.

CAPÍTULO IX – COMPARAÇÃO DO FÁRMACO LIVRE COM O COMPLEXO DE INCLUSÃO

Foram analisadas por CLAE soluções de DOX e CI nas mesmas concentrações, antes e após exposição à luz UV por 6 horas. Os resultados podem ser vistos na Figura 33.

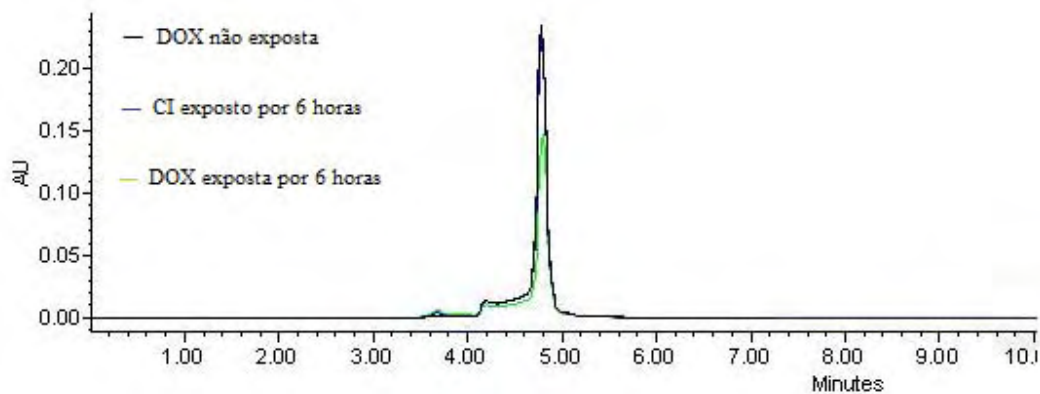


Figura 33. Sobreposição dos cromatogramas das soluções de DOX e CI, ambas na concentração de 80 µg/mL, após exposição a luz UV por 6 horas e solução de DOX, na concentração de 80 µg/mL, não exposta à luz UV.

A área do pico do hiclato de doxiciclina no CI é 29% superior que no fármaco livre, mostrando que a complexação realmente protege o hiclato de doxiciclina da luz UV e, conseqüentemente, garante sua atividade antimicrobiana, fazendo com que continue desempenhando seu papel de forma eficaz.

Comparando a área do pico do hiclato de doxiciclina da solução de DOX não exposta à luz, com a solução de CI exposta à luz, a diferença é de 3%, enquanto que a mesma comparação, agora, com a solução de DOX exposta à luz, a diferença é de 32%.

10. CONCLUSÕES

- O método de espectrofotometria na região do ultravioleta foi considerado adequado para a quantificação de comprimidos de hiclato de doxiciclina em 268 nm. Este método possui fácil execução, baixo custo, é rápido e não gera resíduos tóxicos ou poluentes. No entanto, os produtos de degradação não podem ser quantificados através desta técnica.

- O método por cromatografia líquida de alta eficiência também foi considerado adequado para quantificação de comprimidos de hiclato de doxiciclina, utilizando ácido clorídrico 0,01 M para diluição das amostras, coluna Luna CN (250 mm x 4,6 mm) partícula de 5 µm e poro de 10 Å⁰, fase móvel contendo água + 0,1% de TFA : ACN + 0,1% de TFA (60:40, v/v) e detecção em UV a 360 nm. Este método apresenta a vantagem de permitir a separação e quantificação de produtos de degradação. Todavia, a técnica demanda maior tempo, maior treinamento e gera maior quantidade de solventes em relação ao método espectrofotométrico. Por outro lado, em relação aos métodos cromatográficos descritos na literatura, é o que demanda menor tempo de preparo da fase móvel e apresenta tempo de corrida de aproximadamente 5 minutos.

- O ensaio de dissolução mostrou-se adequado para avaliar a qualidade de comprimidos contendo 80 mg de hiclato de doxiciclina e mostrou que o método descrito em compêndios oficiais pode ser mais dinâmico, dependendo da escolha da forma farmacêutica.

- O ensaio microbiológico turbidimétrico desenvolvido, utilizando *E. coli* ATCC 10536, caldo BHI como meio de cultura, 10% de concentração do inóculo padronizado a 25 ± 2 % de transmitância, água como diluente das amostras e fármaco nas concentrações de 4, 6 e 9 $\mu\text{g/mL}$, mostrou-se adequado para avaliar a potência de comprimidos contendo 80 mg de hiclato de doxiciclina através da medida da turbidez causada pela inibição do crescimento do micro-organismo pelo antimicrobiano.
- Ao comparar os valores de teores das técnicas de UV e CLAE foi possível perceber que são semelhantes, no entanto ao comparar com o teor obtido na análise microbiológica esse valor é diferente. Assim, a importância de se associar uma análise antimicrobiana juntamente com análises de UV e CLAE.
- A complexação do hiclato de doxiciclina com a β -ciclodextrina foi obtida para avaliar suas vantagens frente ao fármaco livre, uma vez que o antimicrobiano é fotossensível. Além disso, foi realizada a verificação e o estudo experimental e teórico do complexo de inclusão através de técnicas térmicas e espectroscópicas.
- As propriedades do complexo de inclusão foram investigadas através da comparação do teor de hiclato de doxiciclina, em CLAE, e da potência, pelo método turbidimétrico. O complexo de inclusão mostrou proteger o fármaco da fotodegradação, proporcionando melhores resultados frente à atividade antimicrobiana.

11. REFERÊNCIAS

ALON YELLIN. Doxycycline for malignant effusions. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 57, p. 1053, 1994.

ARONSON, J.K. Tetracyclines. **Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions**. Oxford: Elsevier, 2006. p.3330-3342.

BP. BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationary Office, 2010. v.1

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução –RDC n.17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 ago 2006.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2010. p.1173-1179.

BRYAN, P.D.; STEWART, J.T. Separation of tetracyclines by liquid chromatography with acidic mobile phases and polymeric columns. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 11, p. 971-976, 1993.

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.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606p.

COLOVIC, M.; CACCIA, S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. **Journal of Chromatography B**, v. 791; p. 337-343, 2003.

CROUBELS, S.; VERMEERSCH, H.; DE BACKER, P.; SANTOS, M. D. F.; REMON, J. P.; VAN PETEGHEM, C. Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 708, p.145-152, 1998.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p.1-9, 2007.

DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p.209-218, 2004.

ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: an integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p.755-767, 2001.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FARMACOPEIA portuguesa. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Analytical procedures and methods validation, 2000. Disponível em <http://www.fda.gov>. Acesso em 25 maio 2011.

FIORI, J.; GRASSIGLI, G.; FILIPPI, P.; GOTTI, R.; CAVRINI, V. HPLC-DAD and LC-ESI-MS analysis of doxycycline and related impurities in doxipan mix, a medicated premix for incorporation in medicated feedstuff. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.979-985, 2004.

FLETOURIS, D.J.; PAPAPANAGIOTOU, E.P.; NAKOS, D.S. Liquid chromatographic determination and depletion profile of oxytetracycline in milk after repeated intramuscular administration in sheep. **Journal of Chromatography B**, v.876, p.148-152, 2008.

GAUDIANO, M.C.; DIMAGGIO, A.; ANTONIELLA, E.; VALVO, L.; BERTOCCHI, P.; MANNA, L.; BARTOLOMEI, M.; ALIMONTI, S.; RODOMONTE, A.L. An LC method for the simultaneous screening of some common counterfeit and sub-standard antibiotics Validation and uncertainty estimation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p.303-309, 2008.

GRAFFNER, C. Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p.288-298, 2006.

HOOGMARTENS, J.; KHAN, N.H.; VANDERHAEGHE, H.; LEEDEN, A.L.; OOSTERBAAN, M.; VELD-TULP, G.L.; PLUGGE, W.; VLIES, C.; MIALANNE, D.; MELAMED, R.; MILLER, J.H. A collaborative study of the analysis of doxycycline hyclate by high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene packing materials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, p.601-610, 1989.

ICH Q2(R1), INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures: text and methodology**, 2005.

IFPMA. IFPA issue paper. **Quality assurance of medicines**. Geneva: International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations. 1997.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

KAZEMIFARD, A.G.; MOORE, D.E. Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p.689-696, 1997.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p.177-180, 2007.

LI, C.; SUTHERLAND, C.A.; NIGHTINGALE, C.H.; NICOLAU, D.P. Quantitation of tigecycline, a novel glycyclcycline, by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 811, p225-229, 2004.

LYRA, M.A M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIN-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n.2, p.117-124, 2010.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica.** 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTINDALE The complete drug reference. 36.th ed. London, Pharmaceutical Press, 2009. p. 257, 659.

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.

NAIDONG, W.; 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.

O'NEIL, M.J.; HECKELMAN, P.E.; KOCH, C.B.; ROMAN, K.J.R. The Merck Index. 14.th ed. Whitehouse Station, Merck & Co, 2006. p582-583.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. **Tecnologia Farmacêutica.** 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. p330–349.

RAMESH, P.J.; BASAVAIHAH, K.; THARPA, K.; VINAY, K.B.; REVANASIDDAPPA, H.D. Development and validation of RP-HPLC method for the determination of doxycycline hyclate in spiked human urine and pharmaceuticals. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 4, p.101-107, 2010.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed). **Martindale the extra pharmacopoeia**. 35.th ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.

SANTOS, M.D.F.; VERMEERSCH, H.; REMON, J.P.; SCHELKENS, M.; DE BACKER, P.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 682, p.301-308, 1996.

SHARIATI, S.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p.393-400, 2009.

SKÚLASON, S.; INGÓLFSSON, E.; KRISTMUNDSDÓTTIR, T. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p.667-672, 2003.

REFERÊNCIAS

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p.535-552, 2004.

THOMAS, A. H. Replacement of microbiological assay by high-performance liquid chromatographic assay for antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 5, p.319-324, 1987.

USP 33. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33.rd ed. Rockville: United States Convention Inc, 2010.

YASIN, A.; JEFFERIES, T. M. Analysis of tetracycline antibiotics and their common impurities by high-performance liquid chromatography using a polymeric column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 6, p.867-873, 1988.

YELLIN, A. Doxycycline for malignant effusions. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 57, p.1053, 1994.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis**: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 382p.