

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

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

RÚBIA ADRIELI SVERSUT

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

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

ARARAQUARA – SP

2018

RÚBIA ADRIELI SVERSUT

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

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

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

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

ARARAQUARA – SP

2018

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: RUBIA ADRIELI SVERSUT

ORIENTADORA: HERIDA REGINA NUNES SALGADO

COORIENTADORA: NAJLA MOHAMAD KASSAB

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



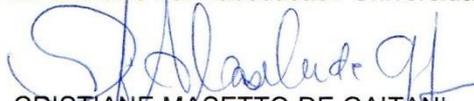
Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. PAULO CÉSAR PIRES ROSA

Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP



Profa. Dra. CRISTIANE MASETTO DE GAITANI

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Ribeirão Preto da USP



Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Tudo coopera para bem daqueles que amam a Deus.”

Romanos 8:28

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

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

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

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

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

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

CAPÍTULO II

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO III

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO IV

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

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

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

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

CAPÍTULO VI

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

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

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

CAPÍTULO VII

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

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

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

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

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

CAPÍTULO II

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO III

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

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

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

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

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

CAPÍTULO IV

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO V

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

CAPÍTULO VI

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCDAE – Camada Delgada de Alta Eficiência

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

DICLO – diclofenaco de sódio

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

DRX– Difração de Raios X

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

E – Efeito

EC – Eletroforese Capilar

ED – Espectrofotometria Derivativa

EM – Espectrometria de Massas

EUA – Estados Unidos da América

FDA– *Food and Drug Administration*

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

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

IFAs – Ingredientes Farmacêuticos Ativos

IV – Infravermelho

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

OTC – Oxitetraciclina

PD – Produto de Degradação

PIRO – Piroxicam

pKa – Constante de dissociação

r – coeficiente de correlação linear

r² – coeficiente de determinação

R_f – *Retention factor* (Fator de retenção)

SQC – Substância Química de Referência Caracterizada

TCs – Tetraciclina

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

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

t_R – Tempo de retenção

UV – Ultravioleta

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

Δm – Variação de massa

λ – Comprimento de onda

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

Objetivo Geral

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

Objetivos Específicos

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

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

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

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

1.1. PANORAMA DO MERCADO FARMACÊUTICO VETERINÁRIO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. TETRACICLINAS NA MEDICINA VETERINÁRIA

1.2.1. Histórico

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

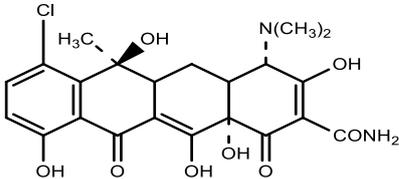
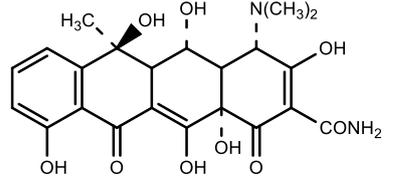
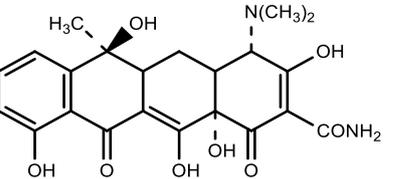
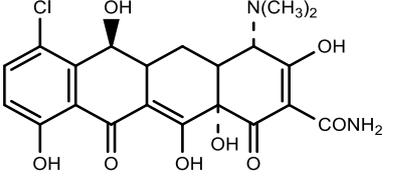
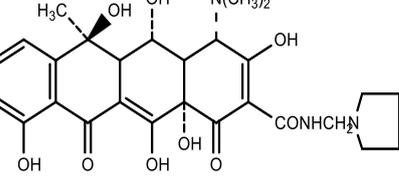
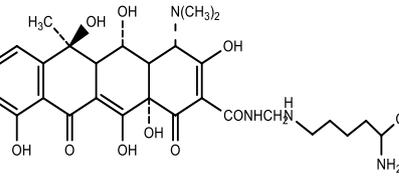
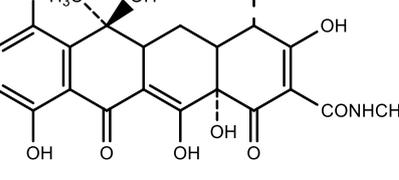
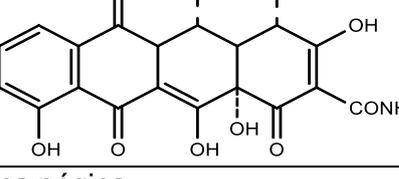
O primeiro representante da classe das TCs foi descoberto em 1945 por Benjamin Duggar, professor aposentado da Universidade de Wisconsin (EUA), a partir da fermentação natural de *Streptomyces aureofaciens*, sendo chamado Aureomicina[®] em referência ao micro-organismo precursor. Em dezembro de 1948,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

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

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

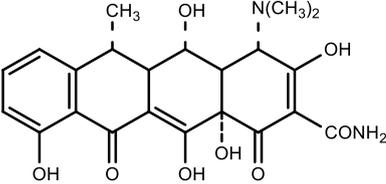
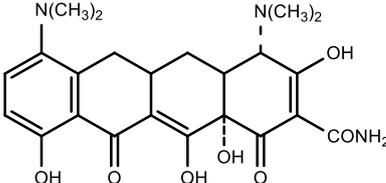
Existem descritas na literatura dez tetraciclina, sendo elas: oxitetraciclina, limeciclina, doxiciclina, minociclina, clortetraciclina, tetraciclina, metaciclina, desmetil-clortetraciclina, rolitetraciclina e clomociclina (Tabela 1.1). Todas podem ser administradas oralmente, porém apenas as quatro primeiras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

Tabela 1.1. Principais tetraciclinas descritas na literatura.

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

Continua na próxima página

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

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

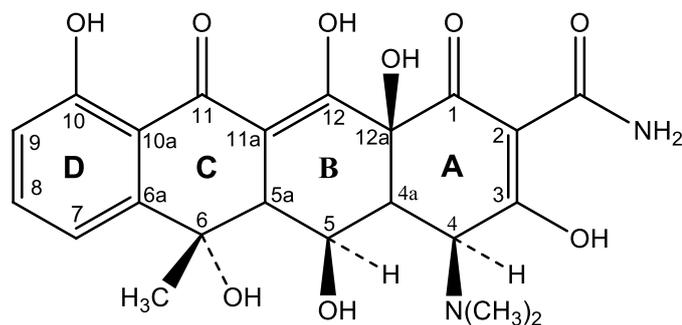
N: natural; SS: Semi-sintética. Fonte: Adaptado de CHOPRA; ROBERTS, 2001.

1.2.2. Oxitetraciclina: Principal Tetraciclina na Medicina Veterinária

1.2.2.1. Propriedades Físico-Químicas

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

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



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

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

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

1.2.2.2. Propriedades Farmacocinéticas

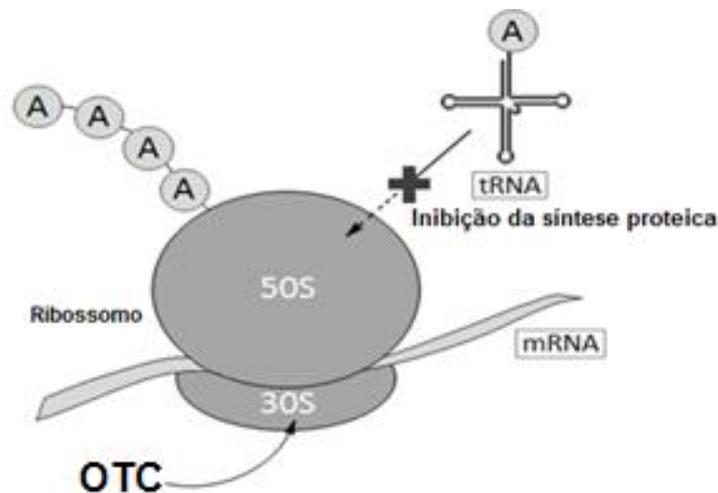
A OTC, devido ao seu caráter hidrossolúvel, apresenta má absorção por via oral (aproximadamente 58%), principalmente após a ingestão de alimentos. A maior parte da absorção ocorre no estômago e no intestino delgado superior. Além disso, a porcentagem de fármaco que não é absorvida cresce à medida que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

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

1.2.2.3. Mecanismo de Ação

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

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



Fonte: adaptado de RANG et al., 2016.

1.2.2.4. Indicações Clínicas

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

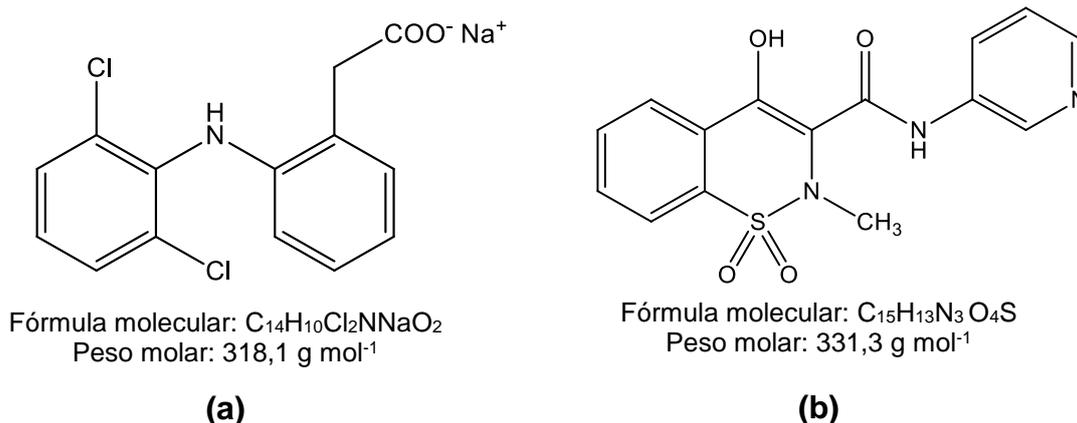
Em 1953, o FDA aprovou nos EUA a utilização de OTC em dosagens subterapêuticas adicionadas, intencionalmente, nos alimentos e na água dos animais com intuito de promover o crescimento do animal, melhorando o desempenho produtivo (CHOPRA; HAWKEY; HINTON, 1992). Entretanto, a utilização de OTC como promotor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

1.2.2.4.1. Associação de OTC com Anti-inflamatórios Não Esteroidais

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

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

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



Fonte: MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011.

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

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

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

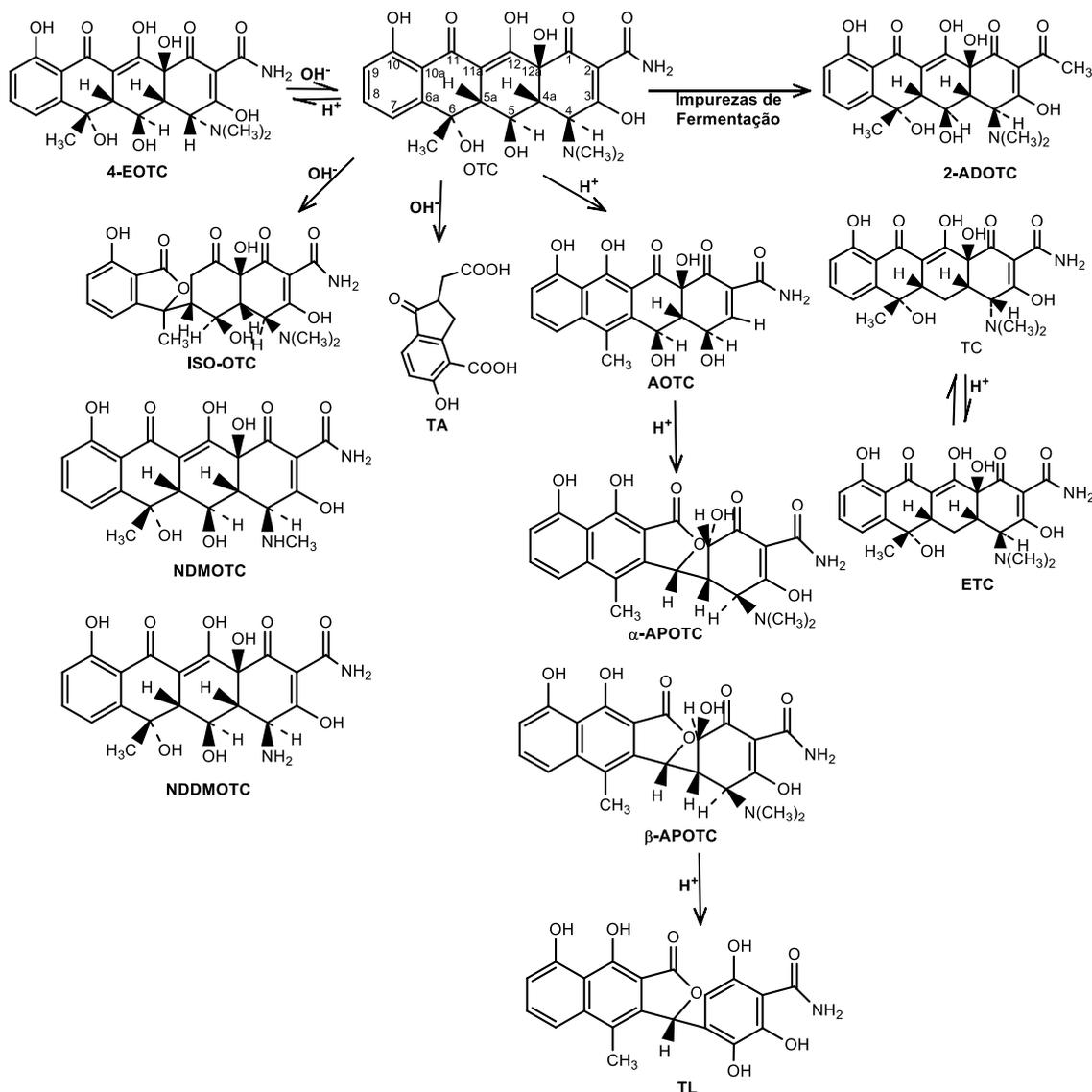
Contudo, salienta-se que por serem AINEs não seletivos, ou seja, que inibem tanto a isoforma 1 e 2 da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), a associação de OTC com esses fármacos pode causar potentes efeitos adversos nos animais, sobretudo naqueles de pequeno porte, como úlceras gástricas, náuseas,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

1.2.2.5. Produtos de Degradação e Estabilidade

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

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

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



Fonte: SVERSUT et al., 2017

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.2.6. Métodos Analíticos

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

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

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

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

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

1.2.2.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

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

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

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

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

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

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

Continua na próxima página.

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

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

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

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

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

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página

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

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

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

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

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

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

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

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

Continua na próxima página.

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

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

Continua na próxima página.

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

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

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

1.2.2.6.2. Cromatografia Planar

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

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

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

1.2.2.6.3. Espectrofotometria

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

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

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

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

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

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

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

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

*Dados não disponíveis. Continua na próxima página.

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

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

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

1.2.2.6.4. Análise por Injeção em Fluxo

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

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

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

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

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

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

1.2.2.6.5. Eletroforese Capilar

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

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

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

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

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

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

1.2.2.6.6. Quimioluminescência

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

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

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

1.2.2.6.7. Métodos Microbiológicos

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

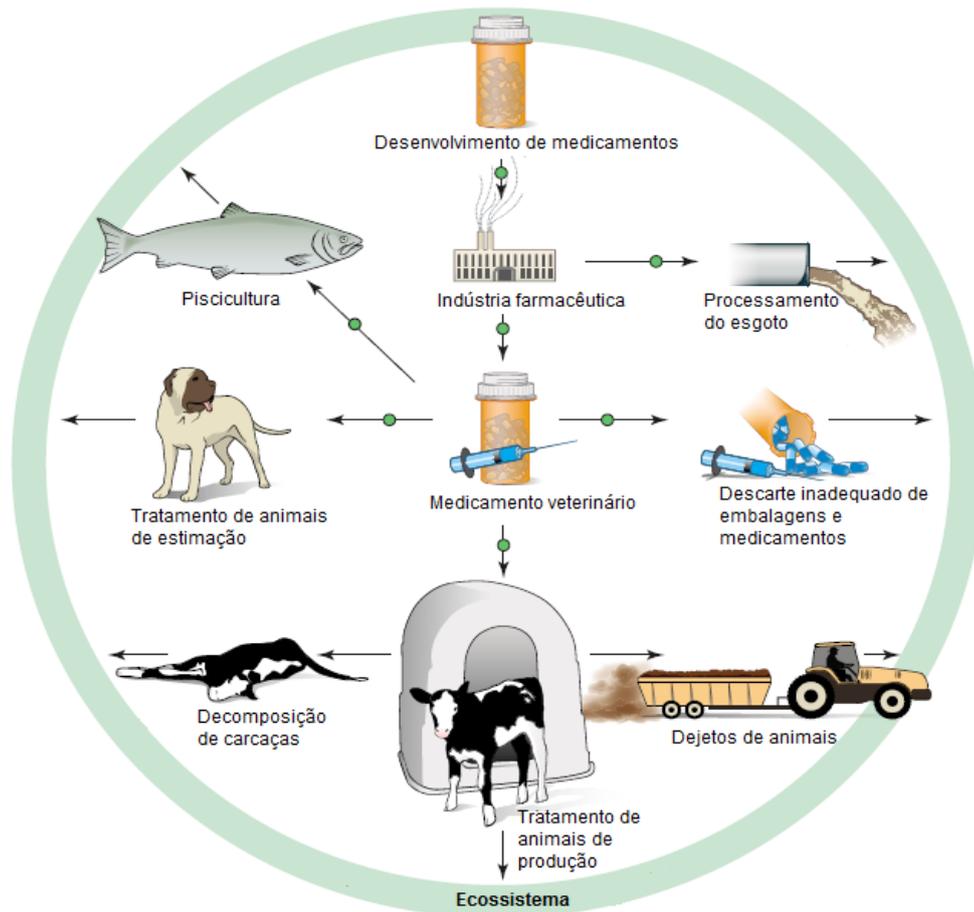
Todavia, apesar das desvantagens anteriormente mencionadas, a Farmacopeia Americana recomenda o emprego de ensaios microbiológicos como metodologia oficial para a avaliação da qualidade de medicamentos (pomadas, suspensões orais ou cápsulas) contendo OTC associada à nistatina, à hidrocortisona ou à polimixina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

1.3. MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMO POTENTES POLUENTES AMBIENTAIS

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

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

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



Fonte: Adaptado de MARGALIDA et al., 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO II

ANÁLISE QUALITATIVA: CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS DOS FÁRMACOS

Este capítulo descreve a caracterização das matérias-primas de oxitetraciclina, diclofenaco de sódio e piroxicam através de metodologias analíticas confiáveis. O objetivo desta parte do estudo foi qualificar tais matérias-primas como substâncias químicas de referência caracterizadas (SQC), assegurando sua utilização no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de medicamentos contendo esses fármacos isolados ou em associação.

2.1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1. Matérias-primas

As matérias-primas de oxitetraciclina dihidrato (OTC; lote: 12092798A, teor declarado: 90,1%), diclofenaco de sódio (DICLO; lote: 1305275; teor declarado: 99,29%) e piroxicam (PIRO; lote: 20120310; teor declarado: 101,7%) foram adquiridas, respectivamente, dos seguintes fornecedores: Pharmanostra[®] (Rio de Janeiro-Brasil), Fragon[®] (São Paulo-Brasil) e Valdequímica Produtos Químicos[®] (São Paulo-Brasil). Todas as matérias-primas vieram acompanhadas do certificado de análise do fornecedor e foram utilizadas sem prévia purificação.

2.1.2. Reagentes

Foram empregados reagentes e solventes de grau analítico (PA), tais como: acetonitrila (Vetec[®]), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Ecibra[®]), diclorometano (Alphatec[®]), metanol (Vetec[®]), etanol (Synth[®]), acetato de etila (Vetec[®]), hidróxido de amônio (Synth[®]), ácido acético glacial (Synth[®]) e tolueno (Synth[®]), ácido clorídrico (Synth[®]) e hidróxido de sódio (Synth[®]). Também foram utilizados solventes de grau HPLC, como acetonitrila (Sigma-Aldrich[®]) e ácido fórmico (Sigma-Aldrich[®]), além da água ultrapura obtida por sistema de filtração Direct-Q 3 UV[®] (18,2 $\mu\Omega$ cm⁻¹, 25°C - Merck Millipore[®]) e brometo de potássio (Sigma-Aldrich[®]).

2.1.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para identificação das matérias-primas de DICLO e PIRO por CCD utilizaram-se as fases estacionárias e móveis preconizadas nas monografias oficiais, isto é, Farmacopeia Britânica (BP, 2013) e Americana (USP, 2015), respectivamente. Porém, para OTC não foi possível desenvolver as metodologias descritas nos compêndios oficiais (BP, 2013; USP, 2015), pois as fases estacionárias de sílica gel octadecilsilanizada (BP, 2013) e eoctilsilanizada (USP, 2015) não estavam disponíveis. Portanto, para a identificação dessa matéria-prima, optou-se pela metodologia descrita por Weng e colaboradores (1990). A Tabela 2.1 sumariza as metodologias utilizadas nos ensaios de CCD de cada matéria-prima.

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

Matéria-prima	Fase estacionária	Fase móvel	Referência
OTC	sílica gel 60 F ₂₅₄ ^a	diclorometano:metanol:água (5,9:3,5:0,6, v/v/v)	WENG, et al., 1990
DICLO	sílica gel 60 F ₂₅₄	acetato de etila: hidróxido de amônio: metanol (80:10:10, v/v/v)	BP, 2013
PIRO	sílica gel 60 F ₂₅₄	tolueno: ácido acético glacial (95:5, v/v)	USP, 2015

^aAntes do uso, foi aspergido sobre a cromatoplaça solução de EDTA 2,5% pH 9, ajustado com solução de NaOH 42%. Em seguida, a cromatoplaça foi seca em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 30 minutos e em estufa a 105 °C por mais 30 minutos. OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

Foram preparadas soluções metanólicas das matérias-primas de OTC, DICLO e PIRO na concentração de 1 mg mL⁻¹. As eluições cromatográficas dessas matérias-primas foram comparadas com as eluições das soluções metanólicas das amostras comerciais, para uso humano, correspondentes (Tabela 2.2), uma vez que não foi possível a obtenção de padrões primários de referência para esse fim. As soluções metanólicas das amostras comerciais, contendo cada um dos fármacos na forma isolada, também foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹

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

Amostra Comercial	Forma farmacêutica	Composição
Terramicina [®]	cápsula	oxitetraciclina 500 mg
Clofen S [®]	comprimido	diclofenaco de sódio 50 mg
Piroxicam (Genérico)	comprimido	piroxicam 20 mg

A fase estacionária utilizada em todas as análises foi sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck[®]) com dimensões de 5,0 x 7,0 cm (largura e comprimento). Os pontos de aplicação estavam a uma distância de aproximadamente 3,0 cm entre si, 1,0 cm da borda lateral e 0,50 cm da borda inferior da cromatoplaça. Após a

evaporação do solvente (metanol), as cromatoplasmas foram inseridas verticalmente em cubas de vidro previamente saturadas com o eluente. Em seguida, depois da secagem do eluente em temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), procedeu-se a revelação das manchas correspondentes à migração das substâncias, a partir dos respectivos pontos de aplicação, em câmara UV Solab[®] modelo SL-204 em 254 nm.

Por fim, os fatores de retenção (R_f) referentes às corridas cromatográficas das matérias-primas e das amostras comerciais foram determinados através da Equação 2.1 e comparados entre si.

$$\text{Equação 2.1: } R_f = \frac{D_x}{D_e}$$

Em que: D_x = distância percorrida pelo composto (matéria-prima e/ou amostra comercial) e D_e = distância percorrida pelo eluente (6,0 cm).

2.1.4. Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)

Foram preparadas soluções de cada matéria-prima na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila, metanol, etanol, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1M. Os espectros de absorção foram registrados na faixa de 200 e 400 nm, empregando o espectrofotômetro UV/Vis Thermo Scientific, modelo Evolution 60[®] (Massachusetts, EUA), operado pelo programa VISIONlite[®]. Os perfis espectrais obtidos foram comparados com os perfis encontrados na literatura.

2.1.5. Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV)

O equipamento de infravermelho empregado foi Thermo Scientific[®], modelo Nicolet IS-5 (Massachusetts, EUA) com transformada de Fourier que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral analisada foi de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 100 *scans*. Os perfis espectrais obtidos foram comparados com os perfis encontrados na literatura.

Utilizou o brometo de potássio, previamente dessecado em estufa a 105°C , para a confecção das pastilhas. Para o preparo das pastilhas, foram

pesados, aproximadamente, 2,0 mg de cada matéria-prima que foram homogeneizados em quantidades ideais de KBr. A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do programa Omnic®.

2.1.6. Avaliação do Comportamento Térmico

2.1.6.1. Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

As curvas de Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG) foram obtidas no termoanalisador TGA-Q50 da TA Instruments® (New Castle, EUA) em atmosfera de nitrogênio com vazão de 40 mL min⁻¹ para a balança e 60 mL min⁻¹ para o forno e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ de 25 a 900°C. As amostras foram colocadas em cadinhos de platina e suas massas iniciais variaram entre 3 e 6 mg. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração da temperatura do instrumento através da determinação da temperatura do ponto de *Curie* do padrão níquel (temperatura experimental = 373,29 °C).

2.1.6.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas no equipamento DSC-Q20, com sistema de refrigeração RCS-90 da TA Instruments® (New Castle, EUA) em atmosfera de nitrogênio com vazão de 60 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 2°C min⁻¹ na faixa de temperatura de 0 a 300 °C. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio tampados e suas massas iniciais variaram entre 1,5 e 5 mg. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios, utilizando o padrão de índio metálico ($T_{onset_{fusão}} = 156,6$ °C e $\Delta H_{fusão} = 28,7$ J g⁻¹).

A partir da análise dos picos de fusão obtidos, calculou-se a pureza das matérias-primas, baseando-se na determinação quantitativa pelo método da Equação de Van't Hoff (Equação 2.2), a qual sugere que a depreciação do ponto de fusão do composto puro é devido à presença de impurezas (MOREIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Essa análise foi realizada através do programa TA Universal Analysis® 2000.

$$\text{Equação 2.2: } T_s = T_0 - \frac{R T_0^2 X_1}{\Delta H_f} \times \frac{1}{F}$$

Em que: T_s = temperatura da amostra (K); T_o = temperatura de fusão teórica do analito puro (K); R = constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); X_1 = fração molar da impureza; ΔH_f = calor de fusão do componente principal puro (J mol^{-1}) e F = fração da amostra que fundiu em T_s .

2.1.7. Difração de Raios X (DRX)

Com intuito de identificar as estruturas cristalinas dos fármacos, as matérias-primas foram analisadas em difratômetro de raios X Bruker AXS Advanced X-ray Solutions[®], modelo D8 Advance (Karlsruhe, Alemanha), com tubo de cobre. Os comprimentos de onda utilizados foram de $K\alpha_1 = 1,5406 \text{ \AA}$ e $K\alpha_2 = 1,5444 \text{ \AA}$, voltagem e corrente iguais a 40 kV e 40 mA, respectivamente. A região de medida de 2θ foi de 3 a 35° com varredura contínua de 0,4°/min ($\Delta 2\theta = 0,02^\circ$). O sistema contava com fendas Soller primária e secundária de 2,5° de divergência, fenda de divergência de 0,3 mm e detector Lynxeye. As amostras foram acondicionadas em um porta-amostra de 2 cm de diâmetro e 1 mm de profundidade.

As análises qualitativas por DRX fundamentaram-se em comparar os difratogramas obtidos com os encontrados nas fichas cristalográficas dos bancos de dados CSD[®] (*The Cambridge Structural Database*[®], 2017) e ICDD-PDF[®] (*International Centre for Diffraction Data-Powder Diffraction File*[®], 2017).

2.1.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras das matérias-primas foram montadas em suportes de amostra (*stubs*) de alumínio, fixadas com fita dupla face de carbono e metalizadas com ouro, por cinco minutos, com auxílio do *Sputter Denton Vacuum*[®], modelo Desk III (Nova Jersey, EUA). As morfologias das amostras foram verificadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol[®], modelo JSM-6380LV (Tóquio, Japão). As micrografias ópticas foram obtidas em câmara com tensão de excitação de 30 kV com aumento de 50 a 1500 vezes.

2.1.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

As amostras das matérias-primas foram preparadas na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila:água (80:20, v/v); ambos solventes continham 0,1% de ácido fórmico, e analisadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu[®], modelo LC-20 AD (Quioto, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas Bruker Daltonics[®], modelo MicroTOF-III (Massachusetts, EUA). O espectrômetro de massas era equipado com fonte de ionização por eletrospray, operando em modo positivo (m/z 120–1300), e analisador de massas híbrido composto por quadrupolo e tempo de voo (*time-of-flight*, TOF). O nitrogênio foi usado como gás de nebulização (4 bar), de secagem (9 L min^{-1} a 200°C) e de colisão. A voltagem do capilar foi de 10 eV.

O volume de injeção das amostras foi de $1 \mu\text{L}$, utilizando coluna Kinetex[®] C18 (150 x 2,1 mm, tamanho de partícula de $2,6 \mu\text{m}$) acondicionada em forno à 50°C , vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e fase móvel composta por água (Fase A) e acetonitrila (Fase B), ambas com 0,1% de ácido fórmico, conforme programação prévia:

- ✓ 0 a 2 minutos: 3% de fase B;
- ✓ 2 a 25 minutos: 25% de fase B;
- ✓ 25 a 43 minutos: 80% de fase B
- ✓ 43 a 48 minutos: 3% de fase B.

Os cromatogramas e espectros de massas obtidos foram analisados e processados com auxílio do programa Data Analysis[®].

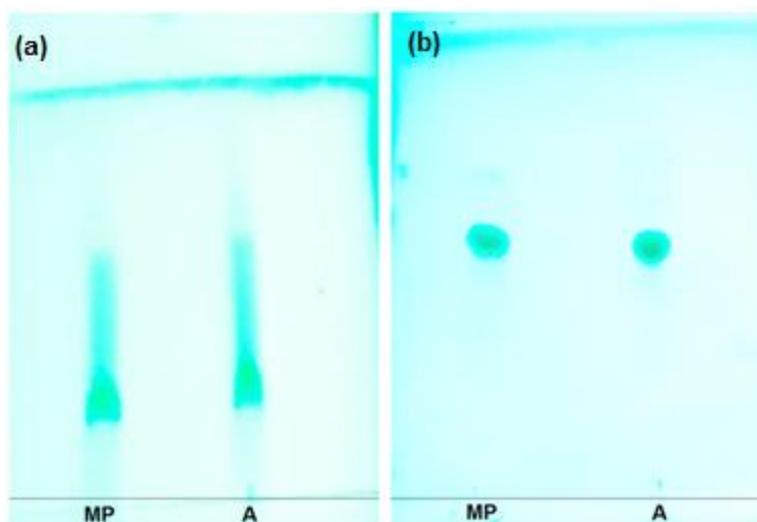
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD permite analisar e caracterizar ampla variedade de substâncias, sendo uma técnica analítica simples, rápida e pouco onerosa (FRIED; SHERMA, 1994; KENYON; FLIN; LAYLOFF, 1995). Devido a essas vantagens, a CCD foi primeira técnica analítica utilizada para presumir a identidade química das matérias-primas empregadas neste estudo.

Para identificação de tetraciclinas por CCD é fundamental a incorporação de agentes quelantes como, por exemplo, o EDTA na fase estacionária, a fim de evitar a forte adsorção do fármaco, o que certamente prejudicaria a eluição (WENG et al., 1990). Nesse sentido, com a finalidade de demonstrar a importância da incorporação do EDTA na fase estacionária durante a análise de OTC por CCD, a Figura 2.1 demonstra as cromatoplasmas da matéria-prima de OTC e de sua respectiva amostra comercial (Terramicina[®]) eluídas em fase móvel composta por diclorometano:metanol:água (5,9:3,5:0,6, v/v/v) sem (a) e com (b) a aspensão prévia de solução de EDTA 2,5% pH 9 sobre a fase estacionária.

Figura 2.1. Cromatoplasmas da matéria-prima de oxitetraciclina e de sua respectiva amostra comercial (Terramicina[®]) desenvolvidas em fase móvel composta por diclorometano:metanol:água (5,9:3,5:0,6, v/v/v) sem (a) e com (b) a aspensão prévia de solução de EDTA 2,5% pH 9 sobre a fase estacionária, reveladas sob luz UV 254 nm. MP: matéria-prima de oxitetraciclina; A: amostra comercial.



Ao comparar essas duas imagens, é possível constatar que, sem a aspersão prévia de EDTA sobre a fase estacionária (Figura 2.1a), as manchas encontram-se arrastadas ao longo da placa cromatográfica devido à forte adsorção do fármaco na sílica gel. Por outro lado, após o tratamento prévio da placa com solução de EDTA 2,5% pH 9 (Figura 2.1b), foi obtida uma eficiente corrida cromatográfica com manchas bem resolvidas, uma vez que o EDTA passou a interagir com os grupos silanóis residuais, o que evitou a formação do complexo analito-fase estacionária.

Apesar de Weng e colaboradores (1990) recomendarem a utilização de solução de EDTA a 10%, resultados satisfatórios foram obtidos com uma solução 4 vezes menos concentrada (2,5%), o que está de acordo com a informação fornecida por esses autores que mencionaram que a concentração de EDTA na solução não é um fator limitante. Por outro lado, o pH da solução de EDTA é um fator crítico. Em pH 9, melhores separações cromatográficas entre tetraciclina e suas impurezas relacionadas são alcançadas, além do pH alcalino evitar a formação de epímeros durante a análise desses antimicrobianos por CCD (WENG et al., 1990).

As Figuras 2.2 e 2.3 ilustram, respectivamente, as cromatoplasmas das matérias-primas de DICLO e PIRO e de suas respectivas amostras comerciais. Conforme se pode observar nestas figuras, os sistemas solventes descritos nas monografias oficiais (Tabela 2.1) foram suficientes para analisar estas matérias-primas, uma vez que permitiram adequada corrida cromatográfica dos analitos, com a obtenção de manchas características de coloração azul arroxeada.

Figura 2.2. Cromatoplaça da matéria-prima de diclofenaco sódico e de sua respectiva amostra comercial (Clofen S[®]) desenvolvida em fase móvel de acetato de etila: hidróxido de amônio: metanol (80:10:10, v/v/v), fase estacionária de sílica-gel e revelada sob luz UV 254 nm. MP: matéria-prima de diclofenaco sódico; A: amostra comercial.

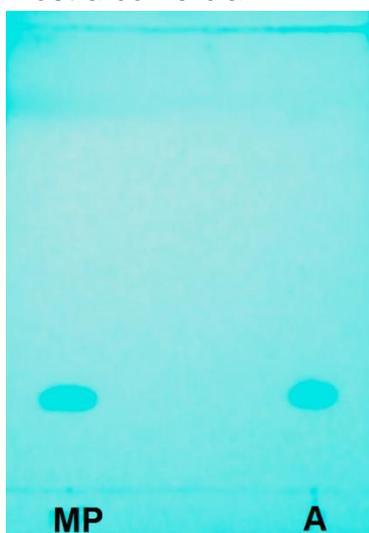
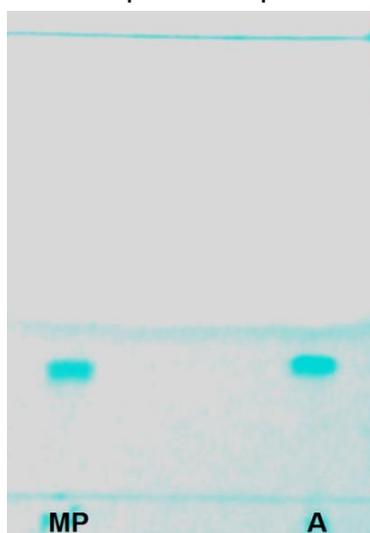


Figura 2.3. Cromatoplaça da matéria-prima de piroxicam e de sua respectiva amostra comercial (piroxicam Genérico) desenvolvida em fase móvel de tolueno: ácido acético glacial (95:5, v/v), estacionária de sílica-gel e revelada sob luz UV 254 nm. MP: matéria-prima de piroxicam; A: amostra comercial.



Ao observar todas as cromatoplaças (Figuras 2.1a, 2.2 e 2.3), nota-se que as manchas obtidas com matérias-primas corresponderam ou estavam muito próximas em posição, cor e intensidade àquelas obtidas com suas respectivas amostras comerciais, que foram utilizadas como parâmetro de comparação devido à ausência de padrões primários de referência. Os valores de R_f de cada matéria-prima e de sua respectiva amostra comercial foram

calculados pela Equação 2.1 e encontram-se demonstrados na Tabela 2.3. Esses valores próximos ou idênticos permitiram a identificação preliminar das matérias-primas analisadas por CCD.

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

Matéria-prima	Rf matéria-prima	Rf amostra comercial
OTC	0,50	0,48
DICLO	0,18	0,18
PIRO	0,25	0,25

Rf: fator de retenção; OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

2.2.2. Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do UV corresponde à faixa de comprimento de onda de 200 a 400nm. Trata-se de uma técnica de grande importância na identificação de fármacos, uma vez que é um método simples, de fácil execução e baixo custo operacional (SOARES et al., 2003; SKOOG et al., 2006; PAVIA et al., 2010).

A maioria dos fármacos possui grupos funcionais como insaturações, carbonilas, carboxilas e anéis aromáticos que conferem interações com a radiação incidente na amostra. Esses grupos são denominados cromóforos e conferem um perfil característico para cada molécula, tornando a análise qualitativa possível. Porém, outras técnicas de análise química devem complementar os espectros de UV, podendo ser elas: infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) (SKOOG et al., 2006; PAVIA et al., 2010).

Os fármacos em estudo possuem grupos cromóforos, permitindo sua análise por espectrofotometria UV em diferentes solventes. Assim sendo, a Tabela 2.4 demonstra os comprimentos de ondas máximos e os valores de absorvâncias dos fármacos nos solventes utilizados, isto é, acetonitrila, etanol e metanol. Conforme observado nessa tabela, as matérias-primas OTC e PIRO apresentaram absorvâncias máximas em HCl 0,1 M nos comprimentos de onda

de em 269 nm e 334 nm, respectivamente. Por outro lado, DICLO apresentou máximo de absorvância em metanol em 283 nm.

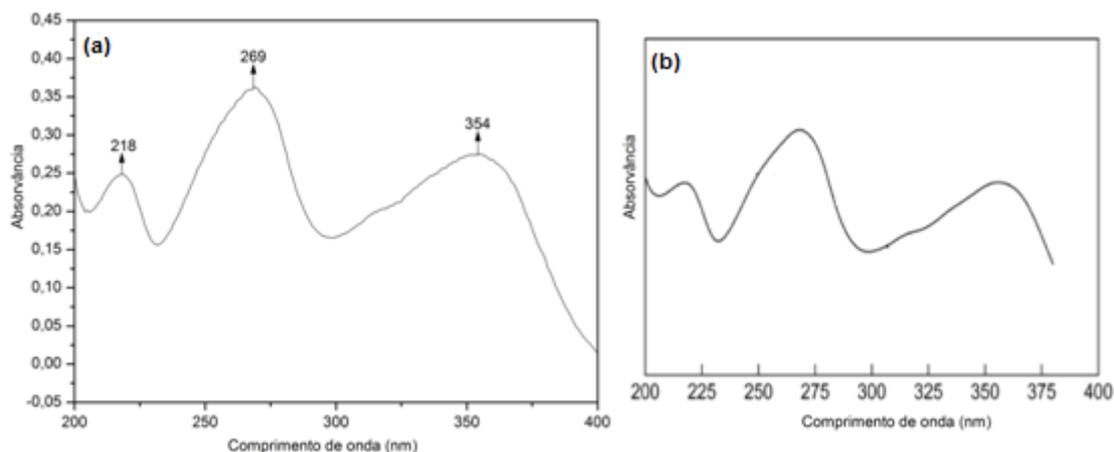
Tabela 2.4. Comprimentos de ondas máximos e absorvâncias dos fármacos nos solventes utilizados.

Matéria-prima	Solvente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorvância
OTC	acetonitrila	264	0,345
	etanol	268	0,304
	metanol	266	0,355
	HCl 0,1M	269	0,363
	NaOH 0,1M	243	0,305
DICLO	acetonitrila	288	0,374
	etanol	280	0,393
	metanol	283	0,425
	HCl 0,1M	276	0,028
	NaOH 0,1M	276	0,367
PIRO	acetonitrila	325	0,577
	etanol	326	0,522
	metanol	350	0,417
	HCl 0,1M	334	1,272
	NaOH 0,1M	353	0,496

OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam; $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): comprimento de onda máximo expresso em nanômetros.

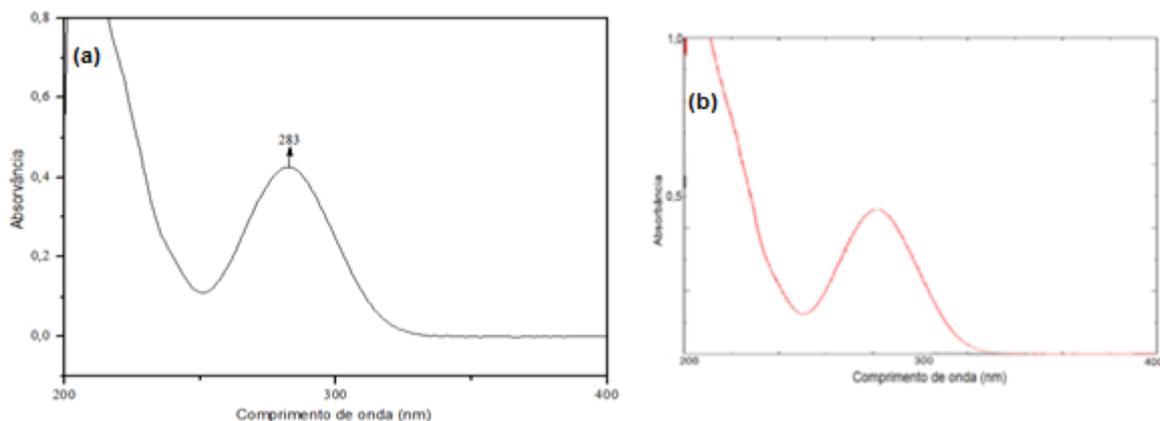
As Figuras 2.4, 2.5 e 2.6 ilustram, respectivamente, os espectros experimentais de absorção na região do UV de OTC, DICLO e PIRO obtidos nos solventes em que os fármacos apresentaram absorvâncias máximas, isto é, em HCl 0,1M para OTC e PIRO e em metanol para DICLO. Nessas mesmas Figuras encontram-se também os respectivos espectros de UV encontrados na literatura para cada um dos fármacos.

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



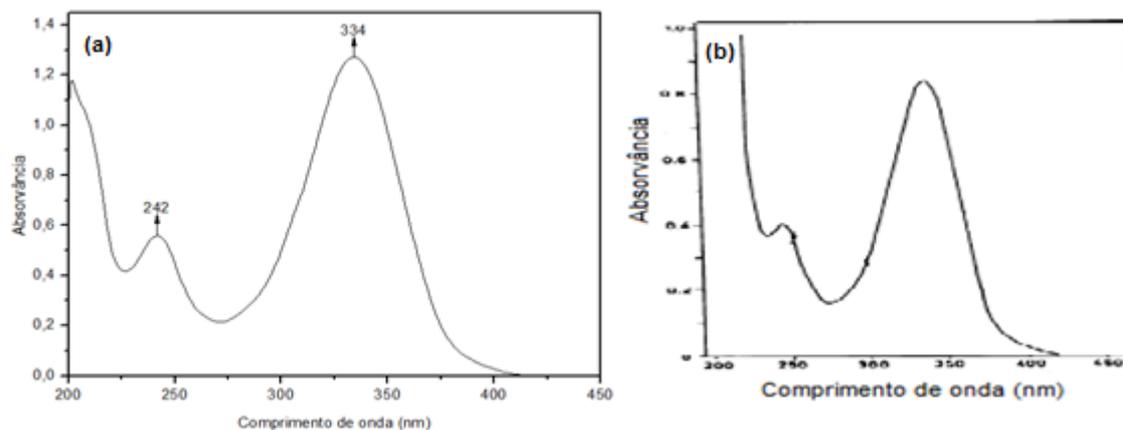
Fonte: * MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011.

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



Fonte: * PATEL et al., 2017

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



Fonte: * MIHALIC et al., 1986

Conforme observado nessa Figura 2.4, o perfil espectral na região do UV de OTC está de acordo com o descrito na base de dados *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011). Do mesmo modo, os perfis espectrais no UV obtidos para DICLO (Figura 2.5) e PIRO (Figura 2.6) estão concordantes com o encontrado nas literaturas consultadas (PATEL et al., 2017; MIHALIC et al., 1986). Além disso, observou-se no espectro de UV de PIRO em HCl 0,1M (Figura 2.6) um efeito hiperacrômico na última banda de absorção (320-360 nm) quando comparado com a absorção do fármaco nos outros solventes utilizados (Tabela 2.4).

2.2.3. Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV)

O espectro de IV ocorre em consequência da absorção de luz, no intervalo de 780 – 4000 nm, que ocasiona vibrações em torno das ligações covalentes que unem os átomos ou grupos de átomos de um composto (WATSON, 1999; LUYPAERT; MASSART; HEYDEN, 2007). Cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração. Por isso, os padrões de absorção no infravermelho de duas moléculas de estruturas químicas diferentes nunca serão idênticos (PAVIA et al., 2010).

A espectrotometria no IV é uma técnica analítica não destrutiva, rápida e de fácil execução que permite a confirmação da identidade química da

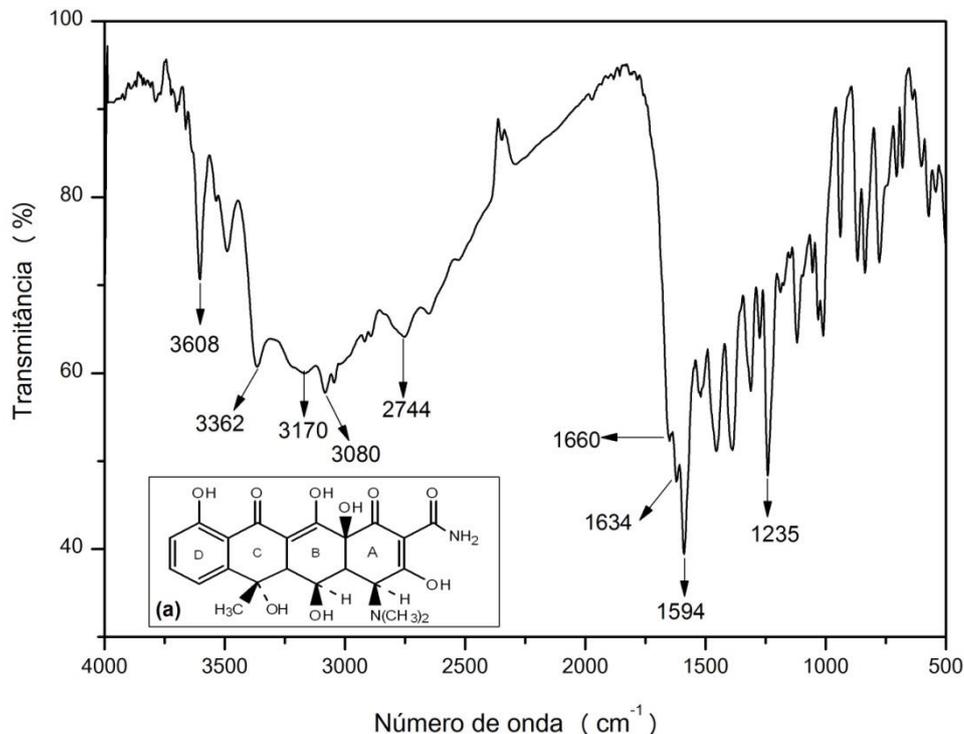
substância. Essas características fazem com que a espectrofotometria no IV seja um dos métodos mais utilizados na identificação de matérias-primas farmacêuticas e na rotina do controle de qualidade de produtos acabados (LUYPAERT; MASSART; HEYDEN, 2007; ROGGO et al., 2007).

Nesse sentido, considerando a importância da espectrofotometria no IV no setor farmacêutico, foram obtidos os perfis espectrais na região do IV das matérias-primas em estudo a fim de complementar as informações obtidas pelas técnicas anteriormente mencionadas.

2.2.3.1. Oxitetraciclina (OTC)

A Figura 2.7 ilustra o espectro de IV de OTC. As principais vibrações encontradas no espectro IV de OTC foram concordantes com descrito em trabalhos publicados anteriormente (HASSAN; AMER; AHMED, 1984; GUNASEKARAN; VARADHAN; KARUNANIHI, 1996).

Figura 2.7. Espectro de absorção na região do IV da matéria-prima de oxitetraciclina obtido em pastilha de KBr. (a) Estrutura química da oxitetraciclina.



O espectro de absorção IV da matéria-prima OTC (Figura 2.7) revelou uma banda de média intensidade em 3608 cm^{-1} característica do estiramento da hidroxila “livre” (sem formação de ligação de hidrogênio) do grupamento

fenol ligado ao anel D (ν O-H fenol). Logo após, observa-se duas bandas em 3362 e 3170 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento da ligação N-H da amida primária (-NH₂) ligada ao anel A. Em 3080 e 2744 cm^{-1} , nota-se bandas de fraca intensidade características, respectivamente, do estiramento da ligação Csp²-H do anel aromático e da ligação Csp³-H dos grupamentos metilas ligados ao anel C e ao grupo amina do anel A.

Outras bandas que correspondem às ligações presentes entre os átomos da estrutura química de OTC são: bandas de forte intensidade em 1660 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C=O do grupamento amida ligado ao anel C, em 1634 cm^{-1} e 1594 cm^{-1} correspondentes à vibração das carbonilas (ν C=O) dos anéis A e C, respectivamente. Finalmente, observa-se uma banda de forte intensidade em 1235 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-N do grupamento amina terciária ligado ao anel A.

Hassan, Amer e Ahmed (1984) utilizaram a espectrofotometria no IV para investigar a composição e estabilidade de complexos formados entre OTC e os metais cobre e ferro. De acordo com esses autores, a carbonila do anel C e a hidroxila do anel B foram responsáveis pela coordenação do fármaco com esses íons metálicos, uma vez que, ao comparar o espectro de IV de OTC livre e OTC coordenada com metal, observaram mudanças na frequência e intensidade das vibrações desses grupamentos.

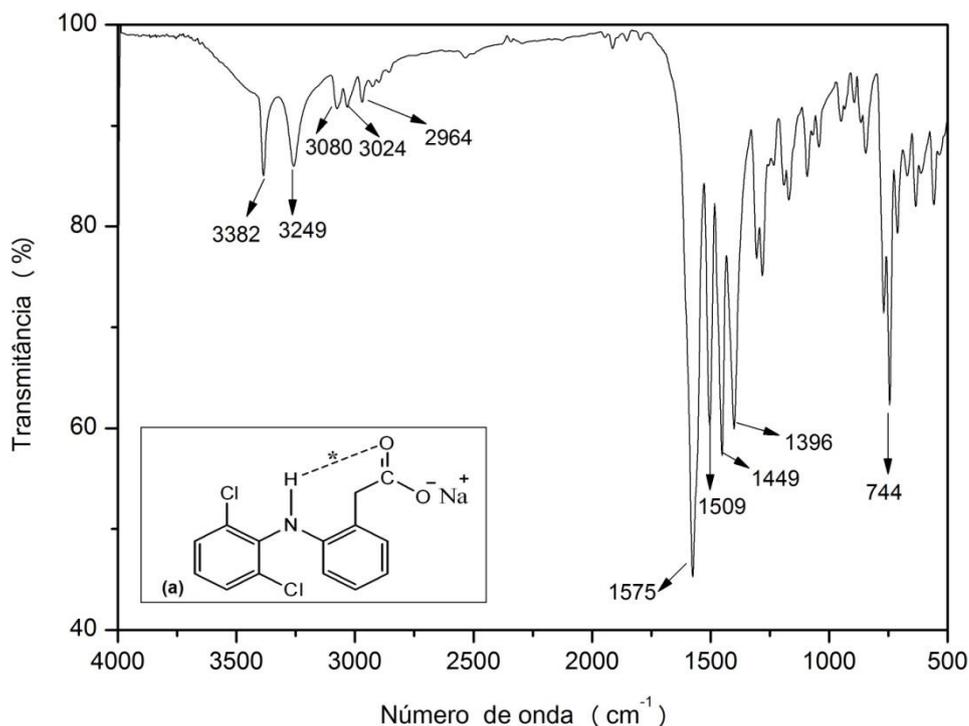
2.2.3.2. Diclofenaco de sódio (DICLO)

A Figura 2.8 ilustra o espectro de IV de DICLO. As atribuições realizadas na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} estiveram de acordo o descrito na literatura para forma anidra do fármaco (BARTOLOMEI et al., 2006).

As duas formas cristalinas de DICLO, anidra e hidrato, apresentam diferenças significativas no perfil espectral de IV nas frequências de 4000 a 2000 cm^{-1} (PALOMO; BELLESTEROS; FRUTOS, 1999; BARTOLOMEI et al., 2006). Assim, conforme demonstrado na Figura 2.8, nota-se duas bandas de média intensidade em 3382 e 3249 cm^{-1} características, respectivamente, das vibrações da ligação entre nitrogênio e hidrogênio (ν N-H) do grupo amina secundária aromática e da ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do grupo amina e o oxigênio da carbonila (ν NH \cdots O) presentes na forma anidra do fármaco. Além disso, outra evidência que sugere ser a forma

anidra de DICLO é a ausência da banda larga de forte intensidade entre 3600 a 3300 cm^{-1} , característica da vibração da ligação entre o oxigênio e hidrogênio ($\nu\text{O-H}$) do grupo hidroxila presente na forma hidratada (BARTOLOMEI et al., 2006; AGUIAR et al., 2012).

Figura 2.8. Espectro de absorção na região do IV da matéria-prima de diclofenaco de sódio obtido em pastilha de KBr. (a) Estrutura química do diclofenaco de sódio.*Ligação de hidrogênio intramolecular.



As bandas de baixa intensidade observadas em 3080 e 3024 cm^{-1} são características do estiramento da ligação $\text{Csp}^2\text{-H}$ do anel aromático, enquanto que a banda em 2964 cm^{-1} , também de baixa intensidade, é atribuída ao estiramento da ligação $\text{Csp}^3\text{-H}$ alifático. As bandas intensas em 1575 e 1449 cm^{-1} correspondem, respectivamente, ao estiramento assimétrico da ligação entre carbono e oxigênio da carbonila ($\nu\text{C=O}$) e ao estiramento simétrico da ligação C-O do íon carboxilato (COO^-). A frequência de absorção típica de C=O de ácidos carboxílicos ($\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$) está reduzida devido à ocorrência de ressonância no íon COO^- (PAVIA et al., 2010).

A banda em 1509 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C=C do anel aromático e a banda de forte intensidade em 1396 cm^{-1} é característica da deformação angular CH_2 . Finalmente, na região de 750 cm^{-1} nota-se uma banda de forte intensidade correspondente à vibração da ligação entre carbono e halogênio ($\nu\text{C-Cl}$) (PAVIA et al., 2010).

2.2.3.3. Piroxicam (PIRO)

O polimorfismo de PIRO tem sido muito estudado nos últimos anos, uma vez que a molécula desse fármaco pode se apresentar sob diferentes formas polimórficas que geralmente são obtidas através de processos de cristalização em soluções saturadas de diferentes solventes orgânicos, a partir do resfriamento ou aquecimento da forma amorfa. No entanto, existe na literatura certo debate e ambiguidade sobre a quantidade e a nomenclatura dos polimorfos de PIRO (MIHALIC et al., 1986; RECK et al., 1988; RECK; LABAN, 1990; TADDEI; TORREGGIANI; SIMONI, 2001; VREČER; VRBINC; MEDEN, 2003; SHETH et al., 2004; ROCHA et al., 2011; LAVRIČ et al., 2015; NYSTRÖM et al., 2015; UPADHYAY; BOND, 2015).

Apesar da ambiguidade acerca da nomenclatura dos polimorfos de PIRO, as formas I (ou β), II (α_1 e α_2), III e mono-hidratada são as mais comumente descritas na literatura (RECK et al., 1988; MIHALIC et al., 1986; TADDEI; TORREGGIANI; SIMONI, 2001; VREČER; VRBINC; MEDEN, 2003; SHETH et al., 2004; ROCHA et al., 2011; NAELAPÄÄ et al., 2012; UPADHYAY; BOND, 2015). Recentemente, Lavrič e colaboradores (2015) propuseram um novo polimorfo, a forma V, obtido a partir da solubilização do fármaco em diclorometano, seguida da evaporação e recristalização. Nyström e colaboradores (2015) também relataram a existência de outro novo polimorfo de piroxicam obtido em clorofórmio com a utilização da técnica de eletrospray.

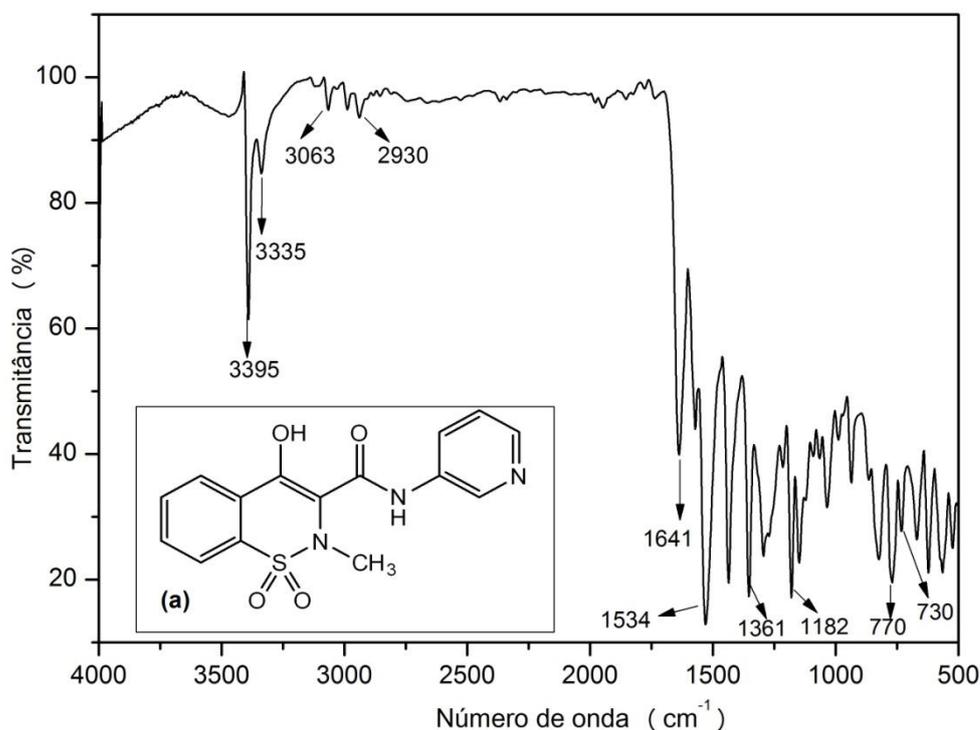
De acordo com Mihalic e colaboradores (1986), a espectrofotometria no IV pode ser utilizada na caracterização das formas polimórficas I e II de PIRO, uma vez que esses polimorfos exibem diferença significativa na frequência vibracional da banda relacionada ao estiramento da amida (ν N-H) ou enol (ν O-H), que tem vibração em 3385 cm^{-1} para a forma II e em 3330 cm^{-1} para a forma I.

O espectro de IV de PIRO é demonstrado na Figura 2.9, o qual apresentou similaridade com o descrito na literatura científica (MIHALIC et al., 1986; VREČER; VRBINC; MEDEN, 2003; SHETH et al., 2004). As bandas relacionadas ao estiramento da amida (ν N-H) ou enol (ν O-H) podem ser observadas a Figura 2.9 da seguinte forma: uma banda de forte intensidade em 3395 cm^{-1} , que provavelmente indica a presença da forma polimórfica II. Também nota-se uma banda de menor intensidade em 3335 cm^{-1} , indicativa da

presença da forma polimórfica I. Assim sendo, sugere a presença dos dois polimorfos no material analisado.

É válido ressaltar que a espectrofotometria no IV não é capaz de distinguir se a forma polimórfica II se trata da forma α_1 ou α_2 , uma vez que essas formas diferem essencialmente em relação aos dados cristalográficos obtidos a partir da difração de raios X (RECK; LABAN, 1990; VREČER; VRBINC; MEDEN, 2003).

Figura 2.9. Espectro de absorção na região do IV da matéria-prima de piroxicam obtido em pastilha de KBr. (a) Estrutura química do piroxicam.



As bandas de baixa intensidade observadas em 3063 e 2290 cm^{-1} são características, respectivamente, do estiramento da ligação $\text{Csp}^2\text{-H}$ do anel aromático e da ligação $\text{Csp}^3\text{-H}$ alifático. Em 1641 cm^{-1} observa-se uma banda de forte intensidade característica da vibração da ligação entre carbono e oxigênio da carbonila ($\nu\text{C=O}$). As bandas de forte intensidade em 1534 e 1361 cm^{-1} podem ser atribuídas, respectivamente, à vibração de dobramento da ligação entre nitrogênio e hidrogênio da amida ($\nu\text{N-H}$) e da ligação entre carbono e nitrogênio ($\nu\text{C-N}$). Verifica-se uma banda característica da deformação simétrica da ligação $\text{S}(\text{O}_2)$ em 1182 cm^{-1} . Por último, as duas bandas de média intensidade em 770 e 730 cm^{-1} são características do grupamento *orto*-fenil dissustituído.

2.2.4. Avaliação do Comportamento Térmico

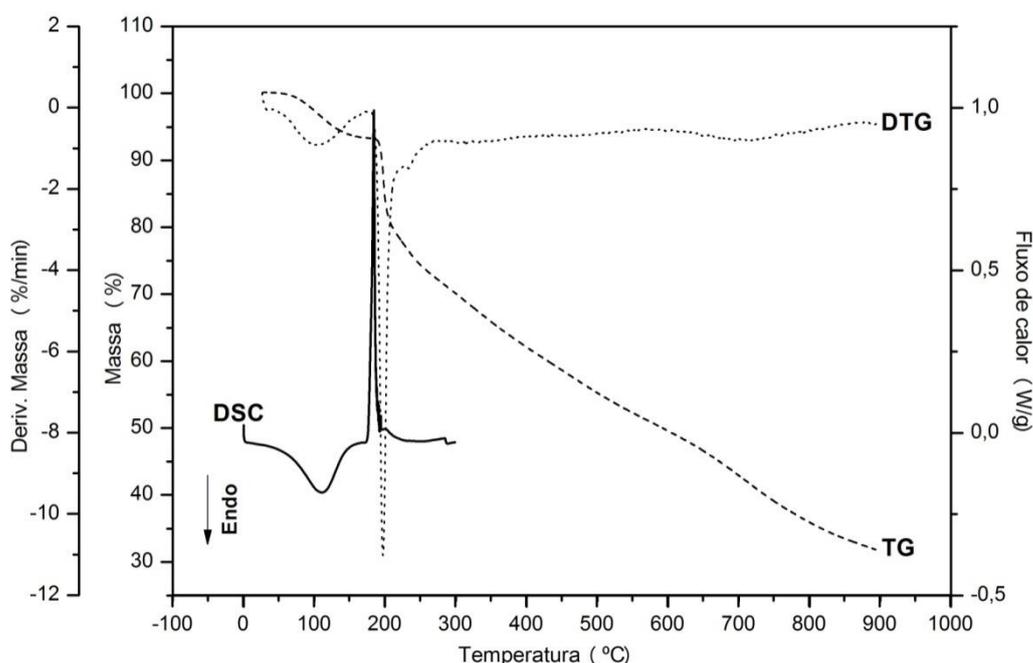
As técnicas termoanalíticas baseadas na termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) e na calorimetria exploratória diferencial (DSC) são ferramentas poderosas para área farmacêutica. No cotidiano de uma indústria farmacêutica essas técnicas são frequentemente empregadas na caracterização de fármacos e adjuvantes, na determinação da pureza de substâncias químicas, na detecção da presença de polimorfismo e na realização de estudos de estabilidade e compatibilidade térmica de produtos farmacêuticos (OLIVEIRA et al., 2011).

Considerando a relevância das técnicas termoanalíticas mencionadas na rotina do controle de qualidade de fármacos e medicamentos, as matérias-primas em estudo foram caracterizadas termicamente através da TG/DTG e DSC, conforme descrito nos itens 2.1.6.1 e 2.1.6.2, respectivamente.

2.2.3.1. Oxitetraciclina (OTC)

A Figura 2.10 ilustra as curvas termoanalíticas de OTC. As curvas TG/DTG mostram perda de massa em três etapas consecutivas no intervalo entre 53 e 730 °C, sem evidenciar nenhuma região de platô característica da formação de intermediários estáveis.

Figura 2.10. Curvas DSC e TG/DTG da matéria-prima de oxitetraciclina obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹.



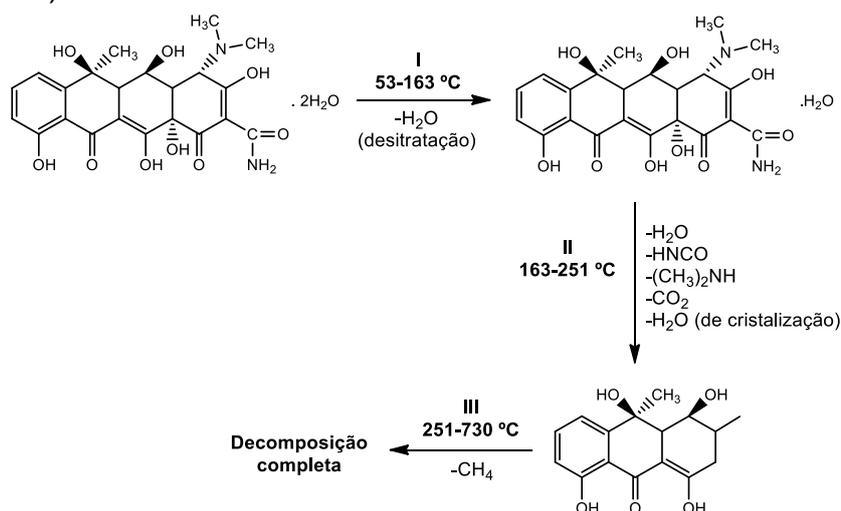
A primeira perda de massa (Δm) de 6,46% no intervalo de 53 a 163 °C foi atribuída à desidratação da molécula. Esse resultado está de acordo com o teor de umidade descrito no laudo do fornecedor que relata que a matéria-prima analisada possui 7% de umidade. Em seguida, observa-se a segunda e a terceira etapas de perdas de massa, nos intervalos de 163 a 251 °C ($\Delta m = 19,14\%$) e 253 a 730 °C ($\Delta m = 35,63\%$). A eliminação da água de cristalização (ou de hidratação) pode ter contribuído com a perda de massa observada na segunda etapa da decomposição térmica de OTC (122 – 253 °C), uma vez que, de acordo com o laudo do fornecedor, a matéria-prima em estudo corresponde à forma di-hidratada do fármaco ($C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$). A perda de massa total foi de, aproximadamente, 62%, produzindo cerca de 30% de resíduo carbonáceo.

Na curva DSC observa-se um largo pico endotérmico entre 67,62 – 151,85 °C atribuído à desidratação, em concordância com a primeira perda de massa evidenciada nas curvas TG/DTG. Em seguida, observa-se um pico exotérmico agudo entre 173,29 – 198,98 °C, característico da cristalização seguida da decomposição térmica do material. Apesar da literatura relatar que a fusão de OTC ocorre simultânea a decomposição entre 181 e 182 °C (THE MERCK INDEX, 2006), não foi possível visualizar o evento endotérmico correspondente à fusão do fármaco na curva DSC, uma vez que, provavelmente, esse evento tenha sido encoberto pelo pico exotérmico atribuído à sua cristalização e decomposição (CERVINI et al., 2015). Por essa razão, não foi calculada a pureza da matéria-prima de OTC através do programa TA Universal Analysis® 2000.

Recentemente, Cervini e colaboradores (2015) observaram um comportamento térmico semelhante para o cloridrato de OTC ($C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$). Esses autores também propuseram, com auxílio da espectrofotometria no IV, o mecanismo de degradação térmica, sob atmosfera de nitrogênio desse fármaco. Acredita-se que por se tratar do mesmo fármaco e do emprego de condições experimentais semelhantes, pode-se sugerir para a matéria-prima analisada um mecanismo de degradação similar ao descrito por esses autores. Assim sendo, a Figura 2.11 ilustra o mecanismo proposto para degradação térmica de OTC. Na primeira etapa (53 a 163 °C) observa-se a desidratação da molécula, estando de acordo com a primeira perda de massa

observada ($\Delta m = 6,47\%$). Em seguida, na segunda etapa (163 a 251 °C), ocorre eliminação de ácido isociânico (HNCO), dimetilamina ($[(CH_3)_2NH]$), água de cristalização e dióxido de carbono (CO_2). Finalmente, na terceira etapa (251 a 730°C), nota-se a eliminação de metano (CH_4).

Figura 2.11. Mecanismo proposto para degradação térmica de oxitetraciclina (di-hidratada). OTC: oxitetraciclina.

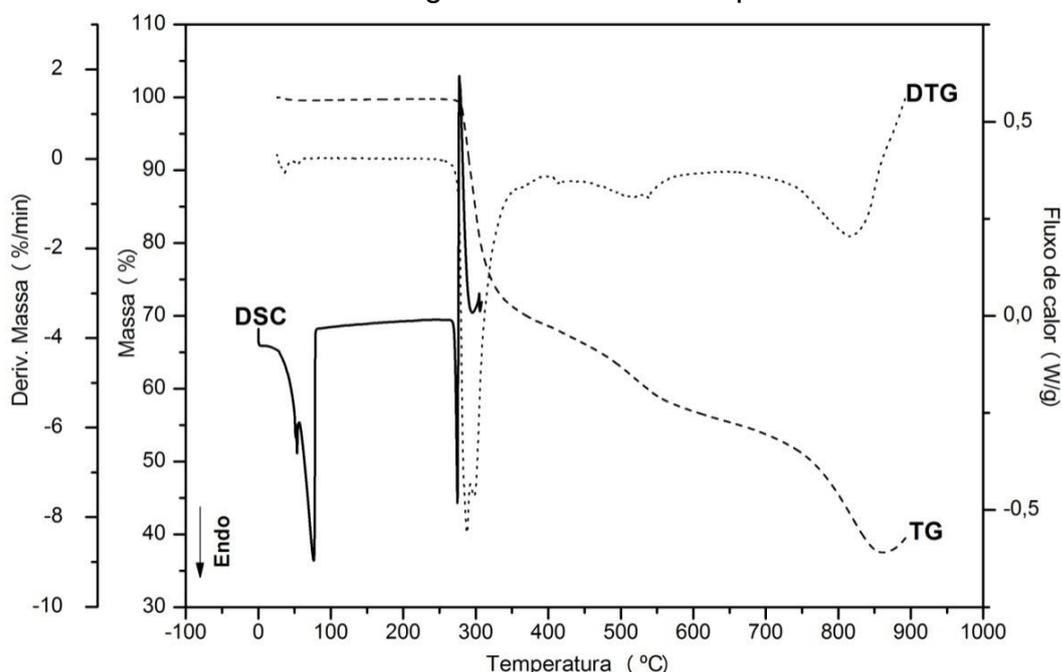


Fonte: adaptado de CERVINI et al., 2015.

2.2.3.2. Diclofenaco de sódio (DICLO)

As curvas termoanalíticas de DICLO podem ser visualizadas na Figura 2.12. Na curva DSC, observa-se dois picos endotérmicos consecutivos entre 18,0 – 84,7 °C atribuído à desidratação, estando de acordo com pequena perda de massa visualizada, com mais detalhe, na curva DTG ($\Delta m = 0,53\%$). Em seguida, a substância mantém-se termicamente estável até 275 °C. O segundo evento endotérmico ocorre na faixa de 265,93 a 276,58 °C e pode ser atribuído à fusão do fármaco. A $T_{onset_{fusão}}$ ocorre em 271,48 °C e envolve uma $\Delta H_{fusão}$ de 58,17 J g⁻¹. Logo após, observa-se um pico exotérmico entre 287 e 322 °C atribuído à cristalização seguida de decomposição térmica, uma vez que ocorre no intervalo de temperatura correspondente à perda de massa a partir de 275 °C. A partir dessa temperatura, DICLO sofre três sucessivas perdas de massa: a primeira na faixa de 275 a 340 °C ($\Delta m = 27,50\%$), a segunda entre 340-530 °C ($\Delta m = 11,68\%$) e terceira entre 340 a 880 °C ($\Delta m = 22,30\%$). A perda de massa total foi de, aproximadamente, 70%, produzindo cerca de 39% de resíduo carbonáceo.

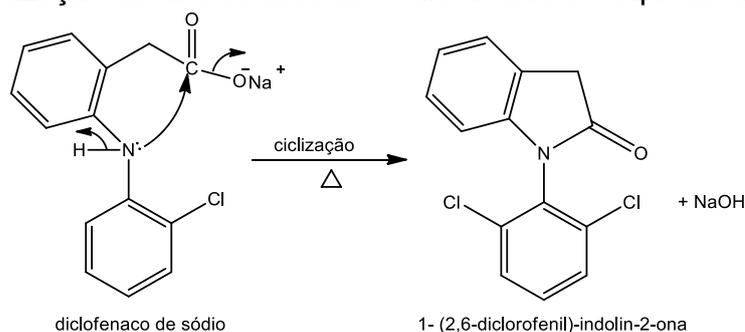
Figura 2.12. Curvas DSC e TG/DTG da matéria-prima de diclofenaco de sódio obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹.



A partir da análise do pico de fusão obtido calculou-se a pureza do material através do programa TA Universal Analysis® 2000 (MOREIRA et al., 2010). O valor obtido para a pureza do fármaco foi de 99,99%, estando dentro do limite estabelecido pela Farmacopeia Britânica que é de 99,0 a 101,0% (BP, 2013).

Tudja e colaboradores (2001) sugeriram a obtenção de um novo composto, oriundo da decomposição térmica de DICLO, que começa a se formar gradualmente a partir de 200 °C. Trata-se da 1-(2,6-diclorofenil)-indolin-2-ona, que também é um intermediário de síntese, obtida a partir da ciclização intramolecular entre o grupo amino e o ânion carboxilato. A Figura 2.13 ilustra a ciclização de DICLO proposta por Tudja e colaboradores (2001).

Figura 2.13. Ciclização do diclofenaco de sódio devido ao aquecimento.

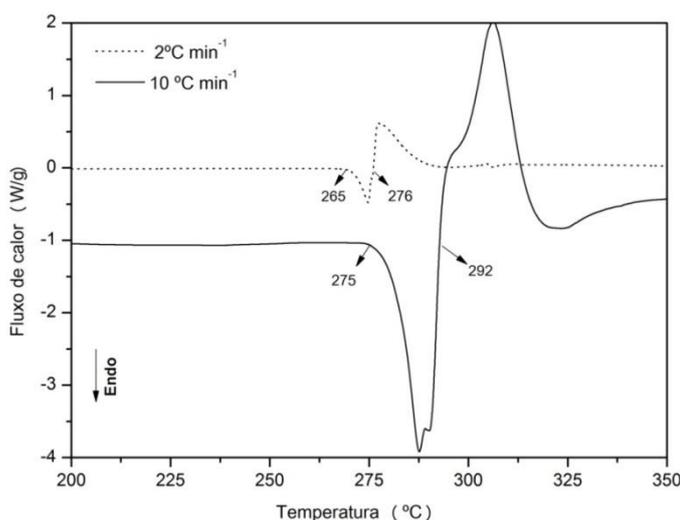


Fonte: adaptado de Tudja et al., 2001.

Conforme mencionado por Tudja e colaboradores (2001), os dados relatados na literatura acerca do comportamento térmico de diclofenaco de sódio são, de certo modo, contraditórios. Por exemplo, a temperatura de fusão mencionada na Farmacopeia Britânica (BP, 2013) é por volta de 280 °C, o que não corresponde ao descrito nas demais literaturas (285 a 289 °C). O intervalo de fusão evidenciado neste estudo (265 a 276 °C), assim como o observado no trabalho de Tudja e colaboradores (2001) que foi de 276 a 288 °C, não esteve de acordo com o intervalo mencionado nas literaturas disponíveis, estando mais próximo do descrito pela Farmacopeia Britânica (BP, 2013). Essas alterações podem ser atribuídas às diferentes razões de aquecimento empregadas durante os estudos termoanalíticos, embora não seja comum ocorrer mudanças na faixa de fusão de fármacos em decorrência das condições experimentais empregadas (TUDJA et al., 2001).

A fim de verificar a influência da razão de aquecimento sobre a faixa de fusão de DICLO, a análise por DSC também foi realizada em razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, mantendo as demais condições experimentais inalteradas (Figura 2.14). Conforme detalhado na Figura 2.14, com escala expandida entre 200 e 350 °C, empregando a razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ verificou-se o deslocamento do evento endotérmico característico da fusão de DICLO de 265 a 276 °C para 275 a 292 °C. Além disso, houve o alargamento e o aumento da intensidade do pico correspondente à fusão. Tudja e colaboradores (2001) também observaram variações na faixa de fusão de DICLO ao empregar razões de aquecimento de 10 °C min⁻¹ (283 a 284 °C) e de 20 °C min⁻¹ (288 a 289 °C).

Figura 2.14. Curvas DSC da matéria-prima de diclofenaco de sódio obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de 2 e 10 °C min⁻¹.

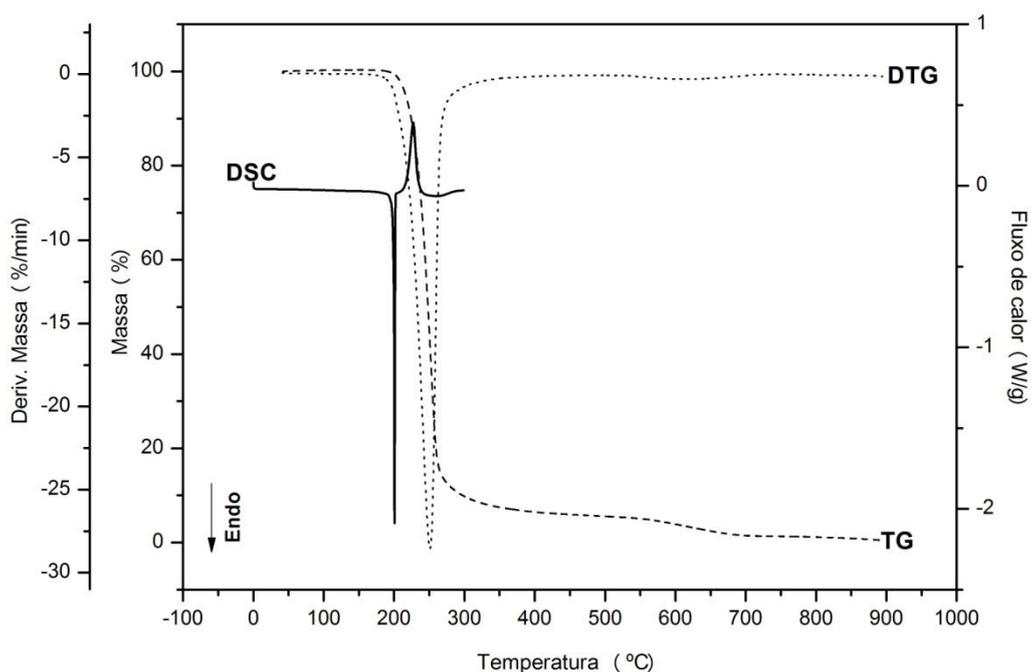


A partir desses resultados, a fim de evitar informações contraditórias, sugere-se que a literatura científica traga, junto com a faixa de fusão do fármaco, a razão de aquecimento empregada, caso essa seja determinada por DSC. Adicionalmente, sugere-se o emprego da análise térmica associada a outras técnicas analíticas como, por exemplo, difração de raios X e espectrofotometria no IV para caracterização inequívoca do fármaco.

2.2.3.3. Piroxicam (PIRO)

A Figura 2.15 ilustra as curvas termoanalíticas obtidas com a matéria-prima de PIRO. Na curva DSC evidencia-se um pico endotérmico fino e estreito entre 192,02 a 202,8 °C, correspondente à fusão do material. A $T_{onset_{fusão}}$ calculada foi de 199,8 °C com $\Delta H_{fusão}$ de 101,51 J g⁻¹, estando mais próximo do ponto de fusão descrito por Upadhyay e Bond (2015) para forma polimórfica II, especificamente a α_2 , que foi de 198,8 °C. Todavia, a fusão do fármaco terminou em 202,8 °C, sendo esse valor bastante próximo dos valores descritos na literatura para a fusão da forma I que foram de 201,2 °C (UPADHYAY; BOND, 2015) e 202,6 °C (VREČER; VRBINC; MEDEN, 2003). Assim sendo, acredita-se que a matéria-prima analisada contenha uma mistura das formas polimórficas I e II, estando coerente com o resultado obtido com a espectrofotometria na região do infravermelho.

Figura 2.15. Curvas DSC e TG/DTG da matéria-prima de piroxicam obtidas em atmosfera de nitrogênio sob razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹.



Conforme observado nas curvas TG/DTG, PIRO mantém-se termicamente estável até 203 °C. O segundo evento observado na curva DSC é um pico exotérmico entre 218,0 e 228,0 °C, característico da decomposição térmica da substância, que é simultânea a perda de massa visualizada nas curvas TG/DTG ($\Delta m = 97,57\%$), resultando na produção de 0,51% de resíduo carbonáceo.

A pureza de PIRO também foi calculada através do programa TA Universal Analysis® 2000 (MOREIRA et al., 2010), obtendo um valor de 102,80% que se encontra dentro do limite estabelecido pela Farmacopeia Americana que é de 97,0 a 103,0% (USP, 2015).

A Tabela 2.5 sumariza os principais eventos observados nas curvas TG/DTG e DSC das matérias-primas analisadas.

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

Matéria-prima	Evento	Intervalo de Temperatura (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	Δm Total (%)	Resíduo (%)
OTC	endotérmico	67 – 152	163,7	62	30
	exotérmico	173 – 199	159,3		
DICLO	endotérmico	18 – 85	370,9	70	39
	endotérmico	266 – 277	58,2		
	exotérmico	287 – 322	103,1		
PIRO	endotérmico	192 – 203	101,5	97,6	0,5
	exotérmico	218 – 228	138,4		

OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam; ΔH : variação de entalpia; Δm total: perda de massa total.

2.2.5. Difração de Raios X (DRX)

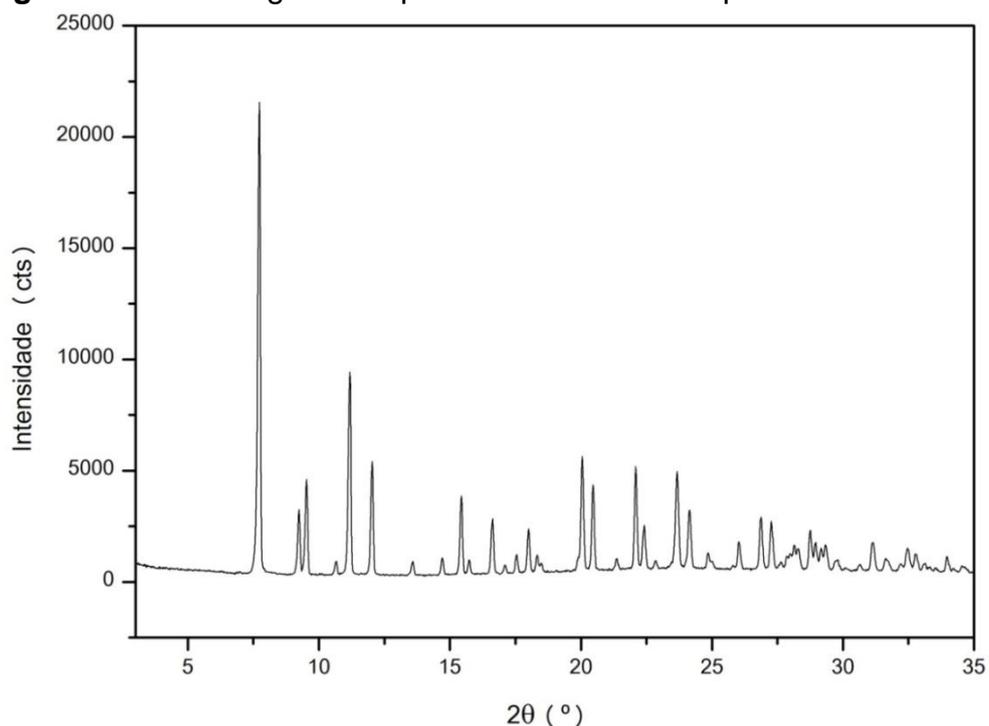
A DRX é uma técnica analítica não destrutível amplamente utilizada na caracterização do estado sólido de produtos farmacêuticos, sobretudo na identificação de materiais polimorfos (PRADO; ROCHA, 2015).

A DRX de monocristais possibilita a determinação do tipo de cela unitária e as dimensões de suas arestas, permitindo a determinação inequívoca da estrutura do cristal. Isso faz com que a DRX de monocristal seja considerada a técnica de escolha para o estudo de polimorfismo. Entretanto, quase sempre não se pode utilizar essa técnica na rotina industrial, pois na maioria das vezes os insumos farmacêuticos cristalinos recebidos pelas indústrias são pós. Por isso, uma alternativa é utilizar a DRX de policristais, uma vez que necessita apenas de uma pequena quantidade do insumo sólido. Na DRX de policristais, o padrão de difração apresenta uma série de reflexões, as quais são identificadas pelo ângulo (2θ) ou pelas distâncias interplanares das moléculas no retículo cristalino (d) contra sua intensidade. Assim, o padrão de difração obtido relaciona-se com a composição química e com o ordenado cristalino das moléculas do cristal (CUFFINI; PITALUGA-JÚNIOR, TAMBARI, 2009).

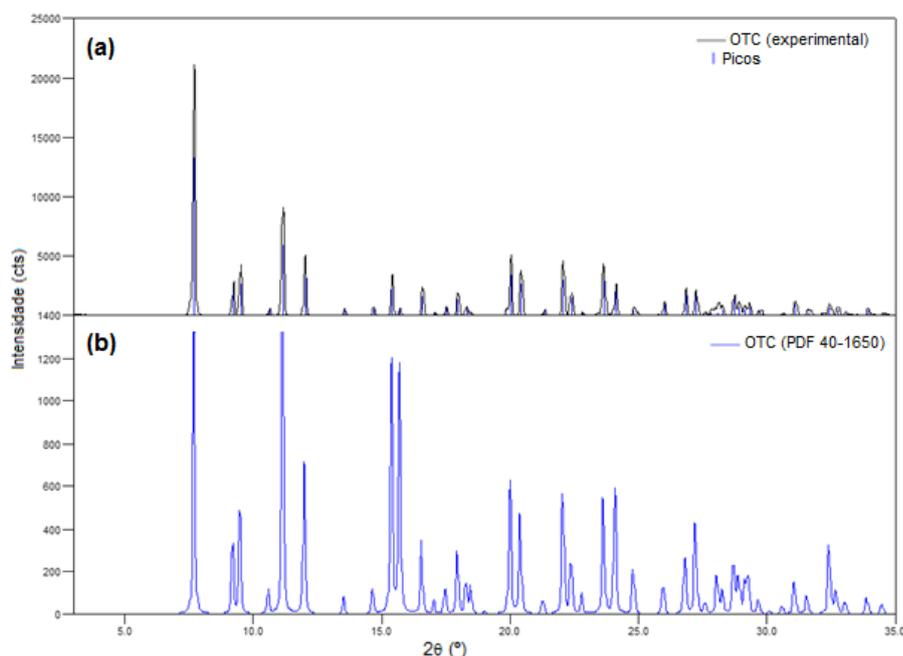
Portanto, devido à sua grande aplicabilidade e sensibilidade, utilizou-se a DRX de policristais para complementar a caracterização das matérias-primas em estudo, a fim de eliminar qualquer dúvida relacionada às estruturas cristalinas, permitindo a identificação inequívoca das mesmas.

2.2.5.1. Oxitetraciclina (OTC)

A Figura 2.16 ilustra o difratograma experimental de OTC. O padrão de difração obtido para os policristais de OTC foi semelhante ao descrito para a determinação da estrutura cristalina, grupo espacial, dimensão da cela unitária e posições atômicas da ficha CSD.OXTETD do banco de dados CSD[®] (*Cambridge Structural Database*[®]) e da ficha cristalográfica PDF 40-1650 do ICDD[®] (*International Centre for Diffraction Data*[®]). Essas fichas cristalográficas trazem a forma di-hidratada do material cristalino organizado em um sistema ortorrômbico.

Figura 2.16. Difratograma experimental da matéria-prima de oxitetraciclina.

A Figura 2.17 mostra a comparação entre o difratograma experimental e o difratograma simulado a partir da ficha cristalográfica PDF 40-1650. Essa figura evidencia que os picos de difração característicos da forma di-hidratada de OTC estão presentes no difratograma simulado, apresentando apenas diferenças em suas intensidades, que pode ser atribuída à orientação preferencial dos cristalitos.

Figura 2.17. Comparação entre o (a) difratograma experimental de oxitetraciclina e o (b) difratograma simulado a partir da ficha cristalográfica PDF 40-1650.

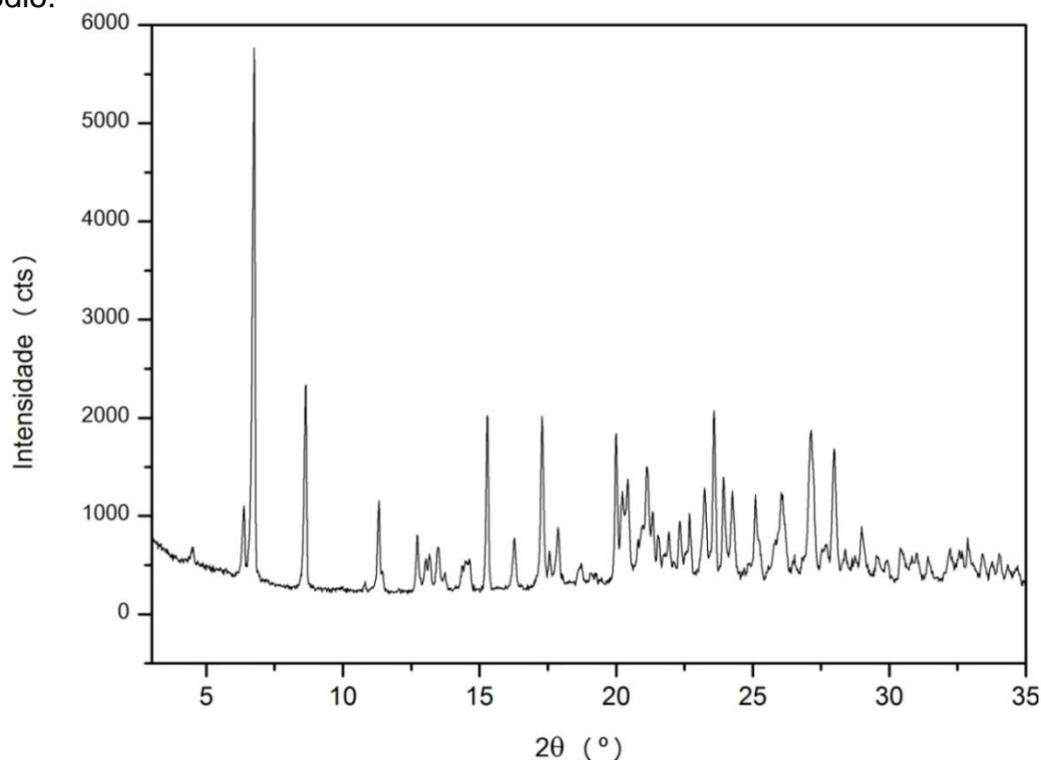
Assim sendo, através do resultado obtido com a DRX de policristais, é possível afirmar que a matéria-prima de OTC em estudo apresenta apenas uma fase cristalina, descartando a existência de polimorfismo. Esse resultado encontra-se de acordo com o observado na espectrofotometria no IV e na análise térmica, uma vez que essas técnicas não presumiram a presença de formas polimórficas.

É válido ressaltar que, de acordo com alguns autores, a forma hidratada do fármaco também é conhecida como pseudo-polimórfica, uma vez que pode mudar suas propriedades físicas e sua estrutura cristalina (SPONG et al., 2004; GAVEZZOTTI, 2007; FLORENCE; ATWOOD, 2011; ARAÚJO et al., 2012). Entretanto, o uso desse termo é controverso, visto que outros autores não concordam com essa denominação, pois os hidratos podem exibir polimorfismo (PRADO; ROCHA, 2015).

2.2.5.2. Diclofenaco de sódio (DICLO)

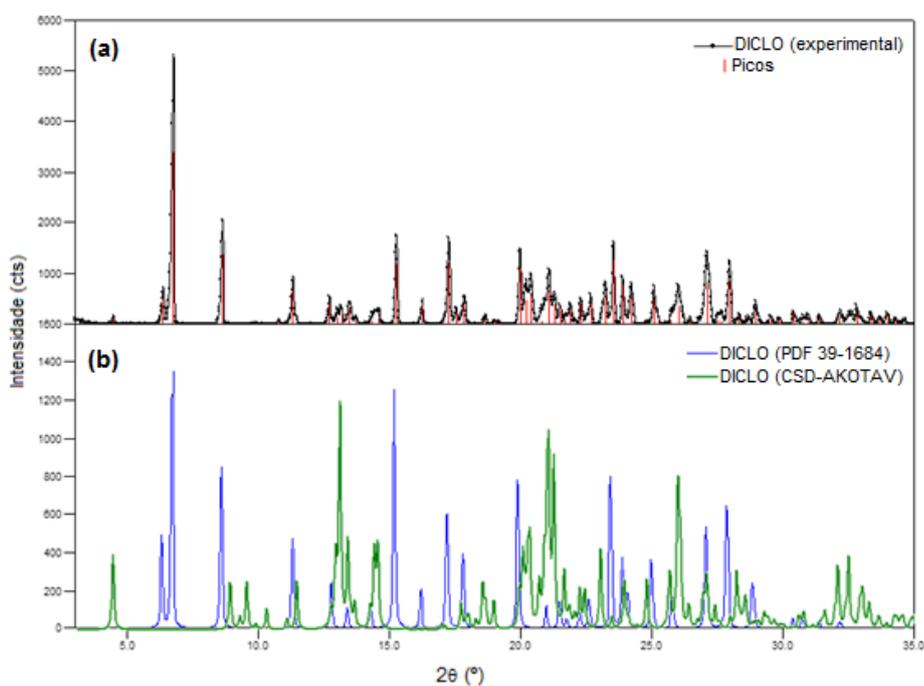
A Figura 2.18 ilustra o difratograma experimental da matéria-prima de DICLO. O padrão de difração obtido foi semelhante ao descrito na ficha PDF 39-1684. Todavia, somente essa ficha não contemplou todos os picos, sendo necessário complementar a buscar na base de dados CSD[®], onde foi encontrada a ficha CSD-AKOTAV que apresentou picos que coincidiram com os anteriormente não identificados. Portanto, a matéria-prima de DICLO apresenta duas formas polimórficas, uma da ficha PDF 39-1684 (forma anidra) e outra, em menor quantidade, da ficha CSD-AKOTAV (forma penta-hidratada). A forma penta-hidratada, descrita por Muangsin e colaboradores (2002), cristaliza em um sistema monoclinico, pertencendo ao grupo espacial $P2_1/m$ (MUANGSIN et al., 2002).

Figura 2.18. Difratoograma experimental da matéria-prima de diclofenaco de sódio.



A Figura 2.19 traz a comparação do difratograma experimental de DICLO com os difratogramas simulados das fichas cristalográficas PDF 39-1684 e CSD-AKOTAV. Conforme observado nessa Figura, o padrão de difração obtido com matéria-prima de DICLO apresenta picos que coincidem com ambas as fichas cristalográficas.

Figura 2.19. Comparação entre o (a) difratograma experimental de diclofenaco de sódio e os (b) difratogramas simulados a partir das fichas cristalográficas PDF 39-1684 e CSD-AKOTAV.

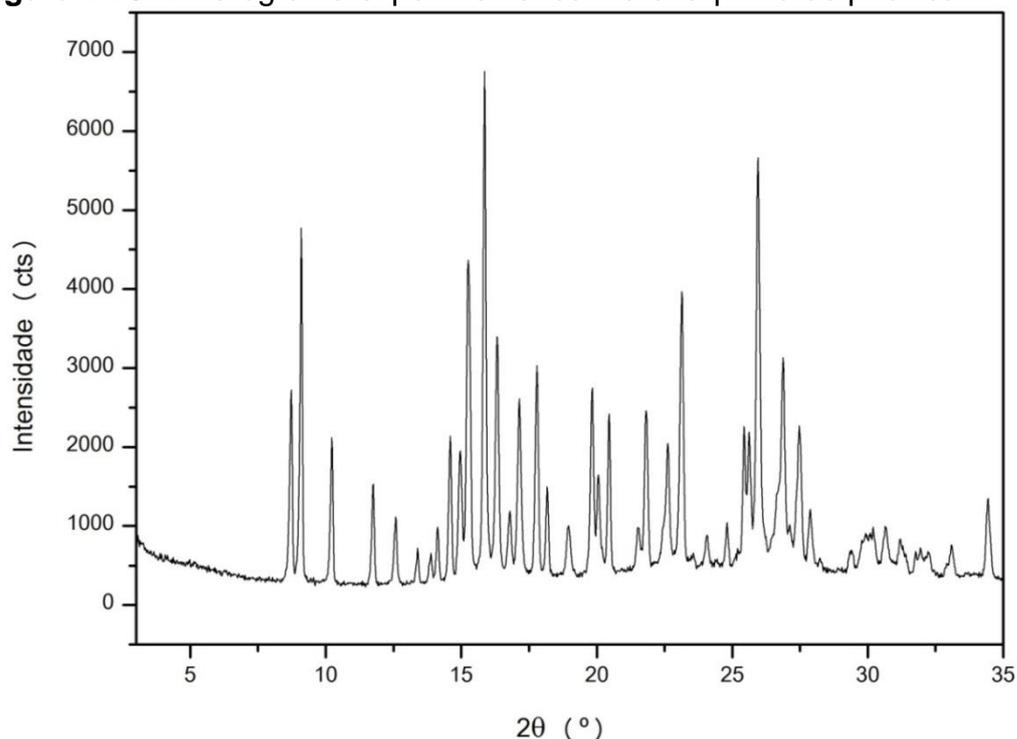


O resultado obtido com a DRX de DICLO complementou os já obtidos com as outras técnicas analíticas (espectrofotometria no IV e DSC) empregadas nesse estudo. Todavia, não esteve totalmente de acordo com o presumido pela espectrofotometria de IV em que se acreditava haver apenas a presença da forma anidra do fármaco. Portanto, fica evidente a importância da utilização da DRX na caracterização de matérias-primas farmacêuticas sólidas.

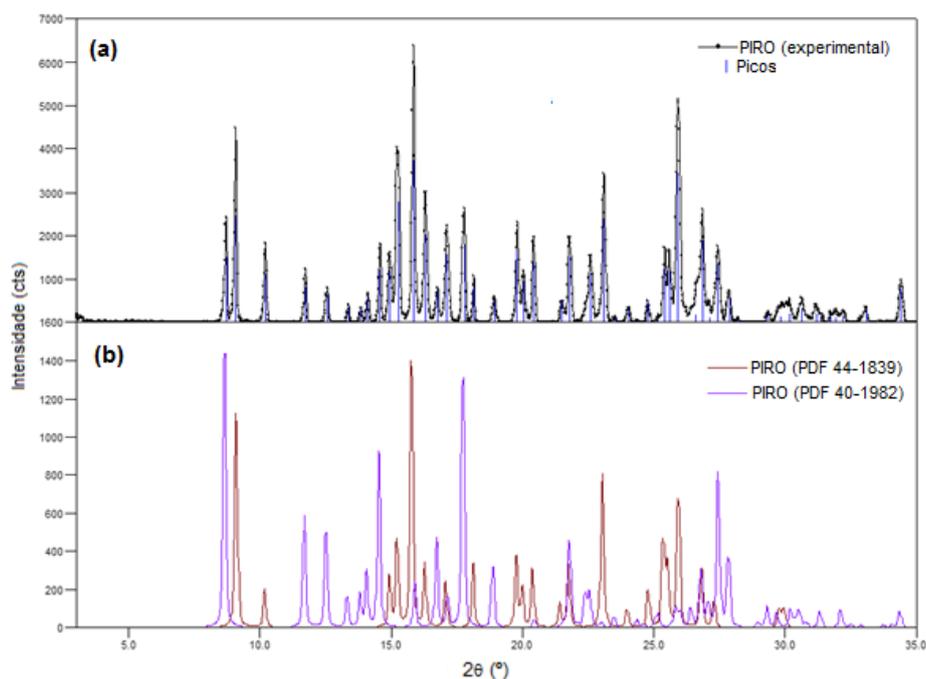
2.2.5.3. Piroxicam (PIRO)

A Figura 2.20 ilustra o difratograma experimental da matéria-prima de PIRO. O padrão de difração obtido foi semelhante ao descrito em duas fichas cristalográficas depositadas no banco de dados ICDD®: PDF 40-1982 e PDF44-1839. Na primeira ficha cristalográfica (PDF 40-1982), encontra-se a descrição da estrutura cristalina da forma polimórfica I (ou β) do fármaco, cujos cristais encontram-se organizados em sistema monoclinico (grupo espacial $P2_1/c$). Na segunda ficha (PDF 44-1839), constam as informações da forma polimórfica II com os cristais organizados em um sistema ortorrômbico (grupo espacial $Pca2_1$). As dimensões da cela unitária relatadas presentes nessa última ficha ($\alpha = 17,357 \text{ \AA}$, $\beta = 11,801 \text{ \AA}$, $c = 6,9801 \text{ \AA}$) foram concordantes com o descrito para a forma α_2 do polimorfo II, proposta por Reck e Laban (1990), e corrobora com o encontrado por Vrečer, Vrbinc e Meden (2003) que atribuíram um hábito cristalino acicular (forma de agulha) para esse polimorfo.

É válido ressaltar que existe na literatura científica certa ambiguidade relacionada aos dados de DRX de PIRO, uma vez que apesar da estrutura cristalina do polimorfo II ser conhecida, os padrões de DRX relatado para as formas α_1 e α_2 para esse polimorfo nas publicações provenientes de diferentes grupos de pesquisa não estão em perfeita concordância (SHETH et al., 2004).

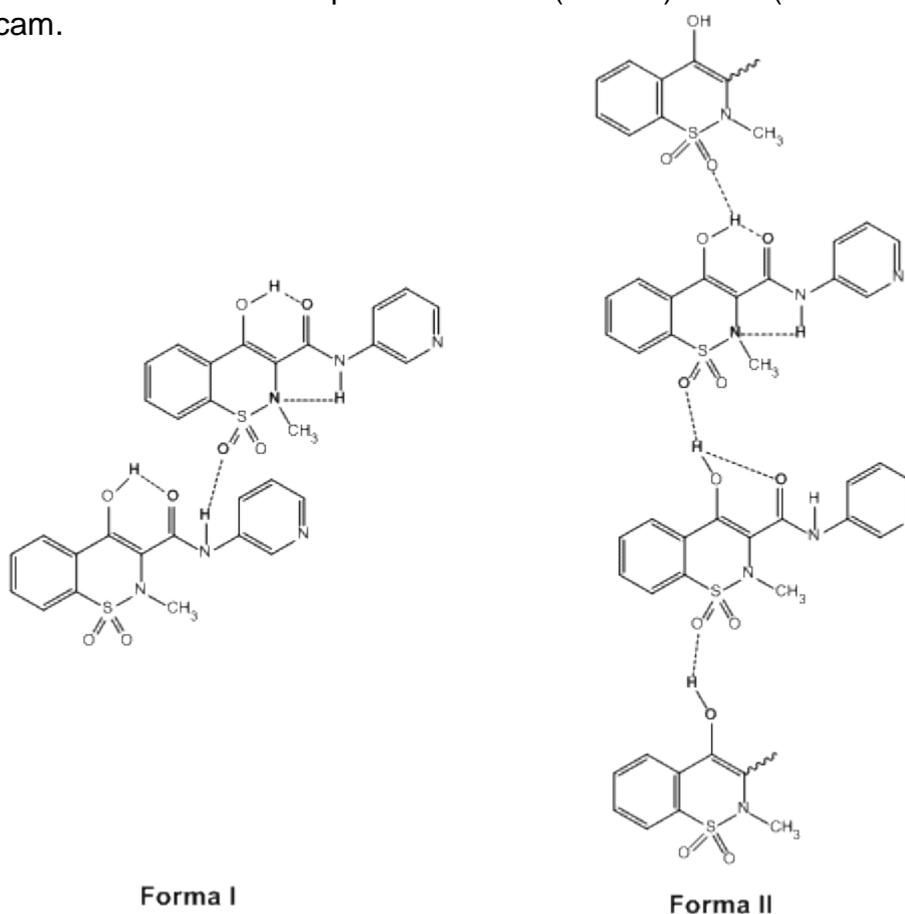
Figura 2.20. Difratograma experimental da matéria-prima de piroxicam.

A Figura 2.21 traz a comparação entre o difratograma experimental de PIRO com os difratogramas simulados das fichas cristalográficas PDF 40-1982 e PDF44-1839, sendo possível notar que o padrão de difração obtido com matéria-prima de PIRO possui picos presentes nas duas fichas.

Figura 2.21. Comparação entre o (a) difratograma experimental de piroxicam e os (b) difratogramas simulados a partir das fichas cristalográficas PDF 40-1982 e PDF44-1839.

A partir desses resultados, é possível afirmar que matéria-prima de PIRO apresenta polimorfismo, sendo constituída por uma mistura dos polímeros I e II, o que está de acordo com o previamente encontrado na espectrofotometria no IV e na DSC, em que já se suspeitava da presença das duas fases polimórficas. A coexistência desses polímeros ocorre, uma vez que, apesar de possuírem a mesma estrutura química, há a formação de diferentes ligações de hidrogênio inter e intramolecular (VREČER; VRBINC; MEDEN, 2003), conforme esquematicamente evidenciado na Figura 2.22.

Figura 2.22. Representação esquemática das ligações de hidrogênio inter e intramolecular das formas polimórficas I (dímero) e II (cadeia infinita) do piroxicam.



Fonte: adaptado de TADDEI; TORREGGIANI; SIMONI, 2001; SHETH et al., 2004.

2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV é amplamente utilizada em várias áreas do conhecimento e é considerada um dos métodos instrumentais mais versáteis disponíveis para a

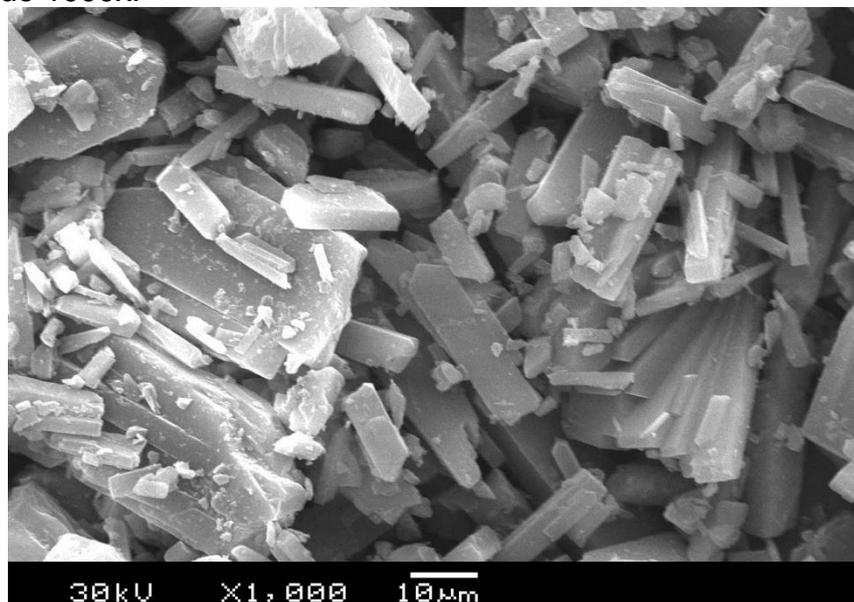
caracterização microestrutural de materiais sólidos, incluindo matérias-primas de grau farmacêutico (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; LYRA et al., 2010). Na área farmacêutica, essa técnica é extremamente útil durante os estudos de pré-formulação, sendo frequentemente usada para aperfeiçoar o tamanho das partículas, a morfologia e a rugosidade dos materiais farmacêuticos, além de permitir a caracterização de polimorfos, uma vez que possibilita a observação do hábito cristalino (BRITAIN, 1999; AULTON, 2016). Nesse contexto, compreender o tamanho e a morfologia das partículas de fármacos ou adjuvantes é fundamental para aprimorar a composição e compreender solubilidade do produto acabado (AULTON, 2016).

Portanto, a MEV foi utilizada neste estudo a fim de complementar a caracterização do estado sólido das matérias-primas de OTC, PIRO e DICLO.

2.2.6.1. Oxitetraciclina (OTC)

A Figura 2.23 ilustra a imagem da morfologia da OTC obtida por MEV, onde se observa hábito cristalino predominante retangular, porém de tamanhos irregulares, evidenciando o certo grau de desordem do material. É possível observar pequenos cristais na superfície dos cristais maiores que podem ser atribuídos à água de hidratação, o que está de acordo com o constatado na DRX que revelou a presença da forma di-hidratada do fármaco e descartou a presença de polimorfismo.

Figura 2.23. Microscopia Eletrônica de Varredura de oxitetraciclina, utilizando aumento de 1000x.

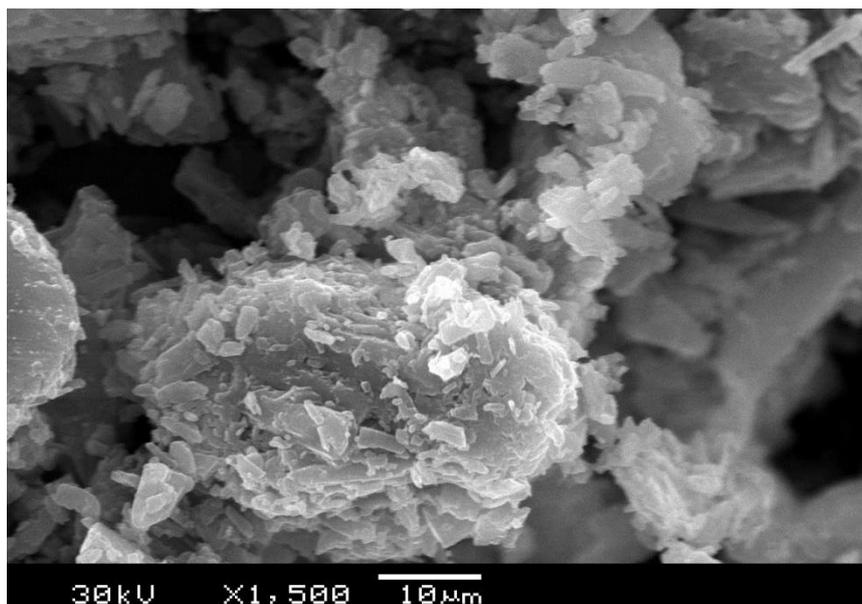


Os dados sobre a caracterização do estado sólido de OTC são escassos na literatura, sobretudo em relação à MEV. Kleinubing e colaboradores (2014) trazem em seu trabalho as imagens de MEV de OTC, porém incorporadas a micropartículas de alginato-quitosana, o que inviabiliza a comparação entre o resultado deste estudo com o encontrado por esses autores.

2.2.6.2. Diclofenaco de sódio (DICLO)

Conforme observado na Figura 2.24 que traz a MEV de DICLO, nota-se a agregação de cristais menores, resultando no formato de placa estratificada que está melhor evidenciado na parte inferior da imagem (FINI et al., 2001).

Figura 2.24. Microscopia Eletrônica de Varredura de diclofenaco de sódio, utilizando aumento de 1500x.



Os pequenos cristais na superfície da matéria-prima de DICLO também decorrentes da presença da água de hidratação. Essa observação corrobora com o evidenciado na DRX que indicou duas formas polimórficas no material analisado, sendo uma delas a forma penta-hidratada. Diferentemente do observado neste estudo, as imagens de MEV dos cristais da forma anidra de DICLO, obtida por Fini e colaboradores (2001), a partir da desidratação à 100 °C da forma tetra-hidratada, possuem uma superfície mais lisa e homogênea.

2.2.6.3. Piroxicam (PIRO)

A Figura 2.25 mostra a imagem, obtida por MEV, dos cristais de PIRO, onde é possível observar cristais de forma e tamanho irregular. No entanto, nota-se o predomínio do hábito cristalino prismático, que é o característico do polimorfo I. Apesar de estar em menor quantidade, é possível notar alguns cristais da forma agulha atribuída ao polimorfo II do fármaco (SHETH et al., 2004; ROCHA; POPPI, 2010). Esse resultado está de acordo com o descrito por Pereira e colaboradores (2014) e também está corente com o evenciado pelas técnicas de espectrofotometria no IV, DSC e DRX, as quais identificaram a presença das duas formas polimórficas na matéria-prima analisada.

Figura 2.25. Microscopia Eletrônica de Varredura de piroxicam, utilizando aumento de 1000x.



2.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

O acoplamento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) é uma ferramenta analítica de ampla aplicabilidade em diversas áreas, tais como: química, bioquímica, farmacêutica, alimentícia, dentre outras (CASS; CASSIANO, 2015). Isso pode ser explicado pela combinação da excelente capacidade de separação da CLAE com o elevado poder de detecção e de fornecimento de informação estrutural da EM. Desse modo, sistemas CLAE-EM oferecem vantagens quando comparados

com sistemas de CLAE acoplados a detectores ópticos clássicos, como os de ultravioleta ou de arranjo de diodos (LANÇAS, 2009; CASS; CASSIANO, 2015).

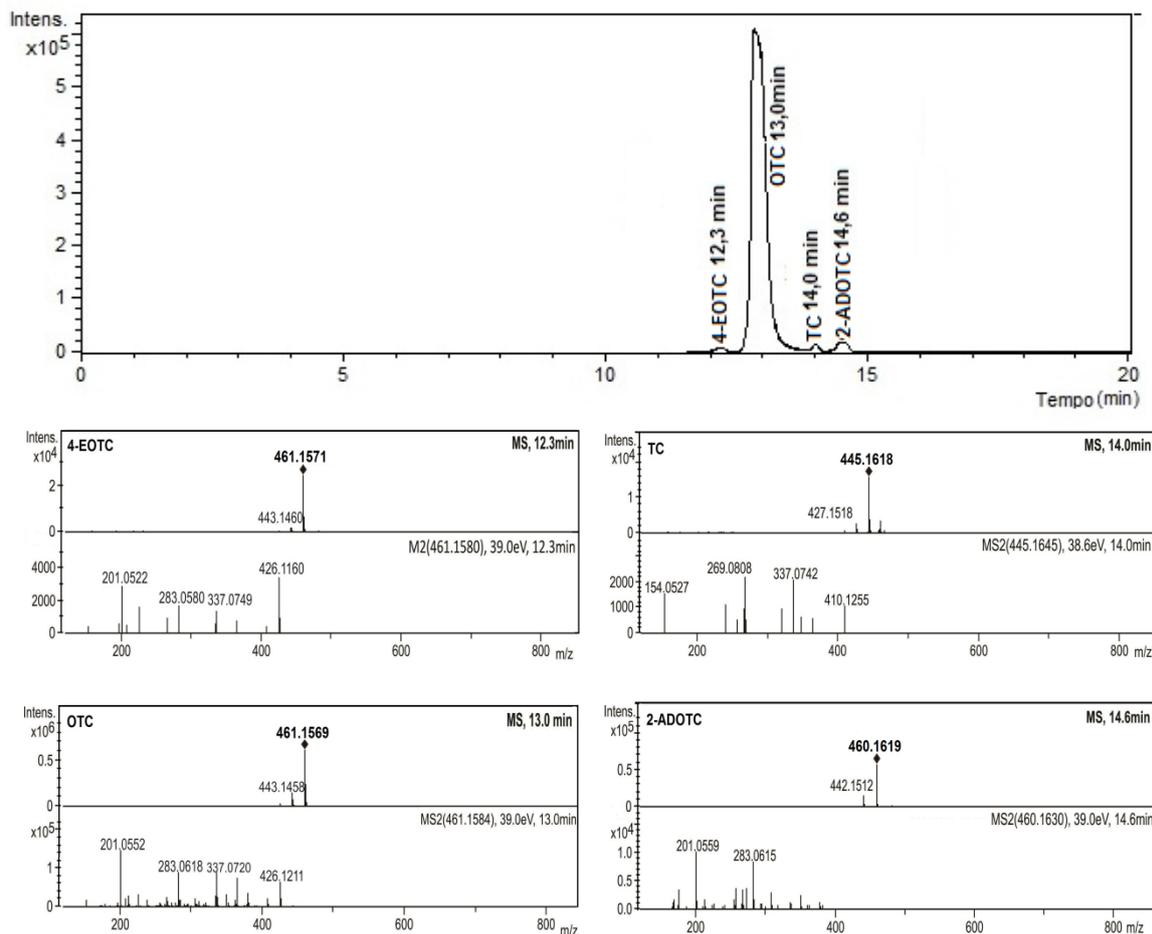
De forma geral, espectrômetros de massas de alta resolução permitem a identificação de compostos em baixas concentrações (picograma/litro e fentograma/litro) através da determinação da massa molar, da composição elementar e isotópica dos elementos, além de possibilitarem a obtenção de informações estruturais a partir de experimentos de fragmentação. Portanto, a EM pode ser considerada como uma importante ferramenta analítica para identificação de compostos orgânicos (HOLČAPEK; KOLÁŘOVÁ; NOBILIS, 2008; CASS; CASSIANO, 2015). Particularmente, a EM equipada com o analisador de tempo de voo (*time-of-flight*, TOF) tem sido incorporada ao arsenal das técnicas espectrométricas destinadas à caracterização de produtos farmacêuticos (CLERC; FOURRE; FRAGU, 1997). Embora a EM-TOF não permita a identificação de formas polimórficas, essa técnica possibilita a identificação inequívoca de impurezas relacionadas e produtos de degradação de fármacos (BUGAY, 2001).

Neste contexto, a CLAE-EM foi utilizada na caracterização das matérias-primas dos fármacos estudados.

2.2.7.1. Oxitetraciclina (OTC)

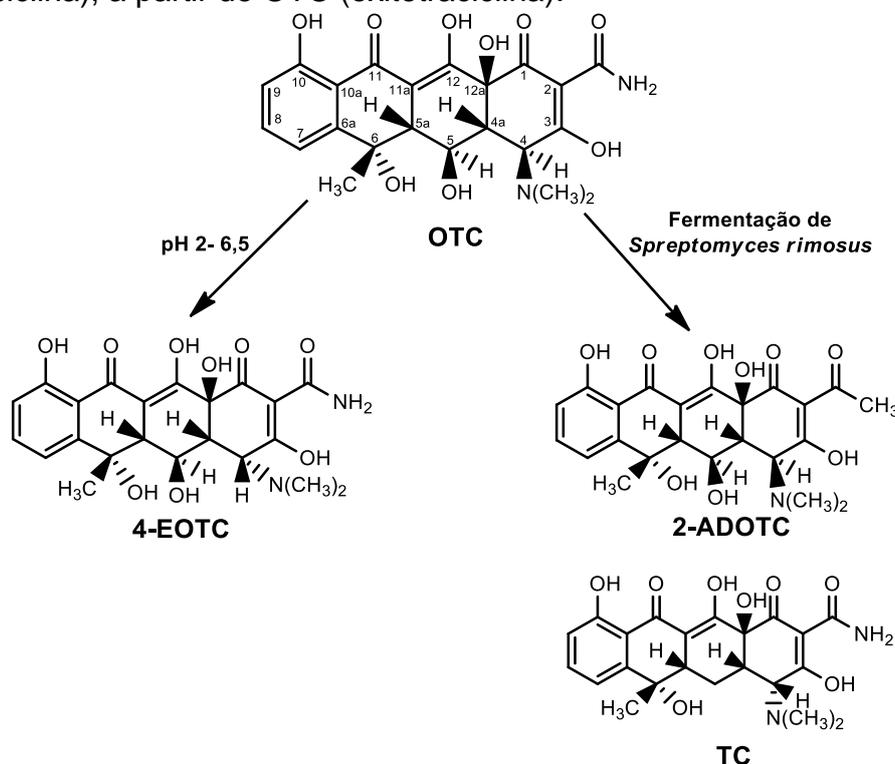
Na Figura 2.26 encontram-se o cromatograma de íons totais e os espectros de massas de alta resolução, obtidos a partir da matéria-prima de OTC analisada. É possível observar no cromatograma que, além do pico principal do fármaco no tempo de retenção (t_R) de 13,0 minutos, existem outros três picos de menor intensidade que foram identificados, através dos espectros de massas, como sendo as seguintes impurezas relacionadas de OTC: 4-epi-oxitetraciclina (EOTC; t_R = 12,3 minutos), tetraciclina (TC; t_R = 14,0 minutos) e 2-acetil-2-descarboxamida-oxitetraciclina (2-ADOTC; t_R = 14,6 minutos).

Figura 2.26. Cromatograma de íons totais e espectros de massas de alta resolução de OTC (oxitetraciclina) e de suas impurezas relacionadas: 4-EOTC (4-epi-oxitetraciclina), TC (tetraciclina) e 2-ADOTC (2-acetil-2-descarboxamida-oxitetraciclina).



A Figura 2.27 traz a representação esquemática da produção de 4-EOTC, TC e 2-ADOTC, sob diferentes condições de síntese, a partir de OTC. Conforme já mencionado no Capítulo I (seção 1.2.2.5), a 4-EOTC é um produto resultante da epimerização em C-4 de OTC, em condições ácidas a levemente neutras (pH 2 a 6,5) (HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; Tjørnelund, 2002). Já TC e 2-ADOTC são descritas como impurezas obtidas durante a fermentação da bactéria *Spreptomyces rimosus*, que é o micro-organismo precursor de OTC (KHAN et al., 1987).

Figura 2.27. Representação esquemática da obtenção de 4-EOTC (4-epi-oxitetraciclina), TC (tetraciclina) e 2-ADOTC (2-acetil-2-descarboxamida-oxitetraciclina), a partir de OTC (oxitetraciclina).



Fonte: adaptado de SVERSUT et al., 2017

A presença dessas impurezas em matérias-primas de OTC é prevista, estando inclusive descrita na Farmacopeia Britânica (BP, 2013) e na base de dados TLC *Pharmaceutical Standards* (TLC, 2017). No entanto, por possuírem atividade antimicrobiana, a Farmacopeia Europeia fixa os limites máximos, em porcentagem (%), que devem ser menores que 0,5% para EOTC e 2,0% para cada uma das demais impurezas (EP, 2012).

Apesar da presença de impurezas relacionadas, a matéria-prima de OTC analisada possui, de acordo com o descrito no certificado de análise do fornecedor, teor declarado de 90,1%, cumprindo as especificações da Farmacopeia Americana que estabelece um teor de não menos que 83,2% (USP, 2015).

Em todos os espectros de massas presentes na Figura 2.26, os picos bases apresentam m/z 461,1571 (4-EOTC), 461,1569 (OTC), 445,1605 (TC) e 460,1619 (2-ADOTC), sendo referentes às respectivas moléculas protonadas $[M+H]^+$. Nesses mesmos espectros, nota-se picos de menor intensidade decorrentes da perda de água a partir das moléculas

protonadas $[M+H-H_2O]^+$ através de reações de dissociação na fonte, produzindo os seguintes íons fragmentos: m/z 443,1360 (4-EOTC), 443,1458 (OTC), 427,1518 (TC) e 442,1512 (2-ADOTC).

A Tabela 2.6 traz os dados obtidos a partir do espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, de OTC e de suas impurezas relacionadas.

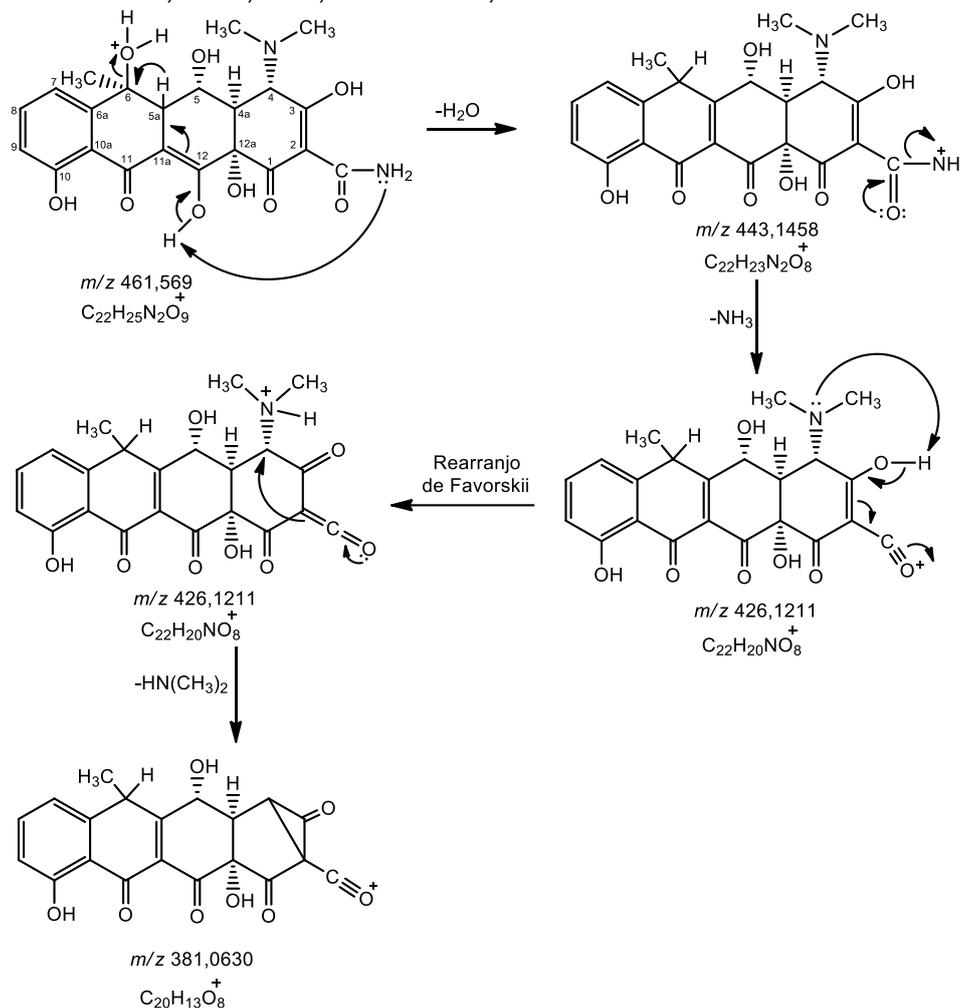
Tabela 2.6. Dados obtidos a partir do espectro de massas de alta resolução de oxitetraciclina e de suas impurezas relacionadas.

Composto	Fórmula molecular	Massa exata $[M+H]^+$	Massa acurada $[M+H]^+$	Erro (ppm)	m/z EM ² $[M+H]^+$
OTC	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461,1555	461,1569	-3,1	426,1211
					408,1102
					381,0630
					365,0672
					337,0720
					283,0618
					201,0552
4-EOTC	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461,1555	461,1571	-3,7	426,1160
					365,0656
					337,0749
					283,0589
TC	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,1618	445,1605	-2,9	201,0522
					410,1255
					337,0742
2-ADOTC	C ₂₃ H ₂₅ NO ₉	460,1602	460,1619	-3,6	269,0808
					154,0527
					283,0615
					201,0615

EOTC: 4-epi-oxitetraciclina; OTC: oxitetraciclina; TC: tetraciclina; 2-ADOTC: 2-acetil-2-descarboxamida-oxitetraciclina.

A Figura 2.28 mostra a proposta do mecanismo de fragmentação de OTC para formação dos íons m/z 443,1458 e 426,1211 e 381,0630.

Figura 2.28. Proposta do mecanismo de fragmentação de OTC para formação dos íons m/z 443,1458, 426,1211 e 381,0630.



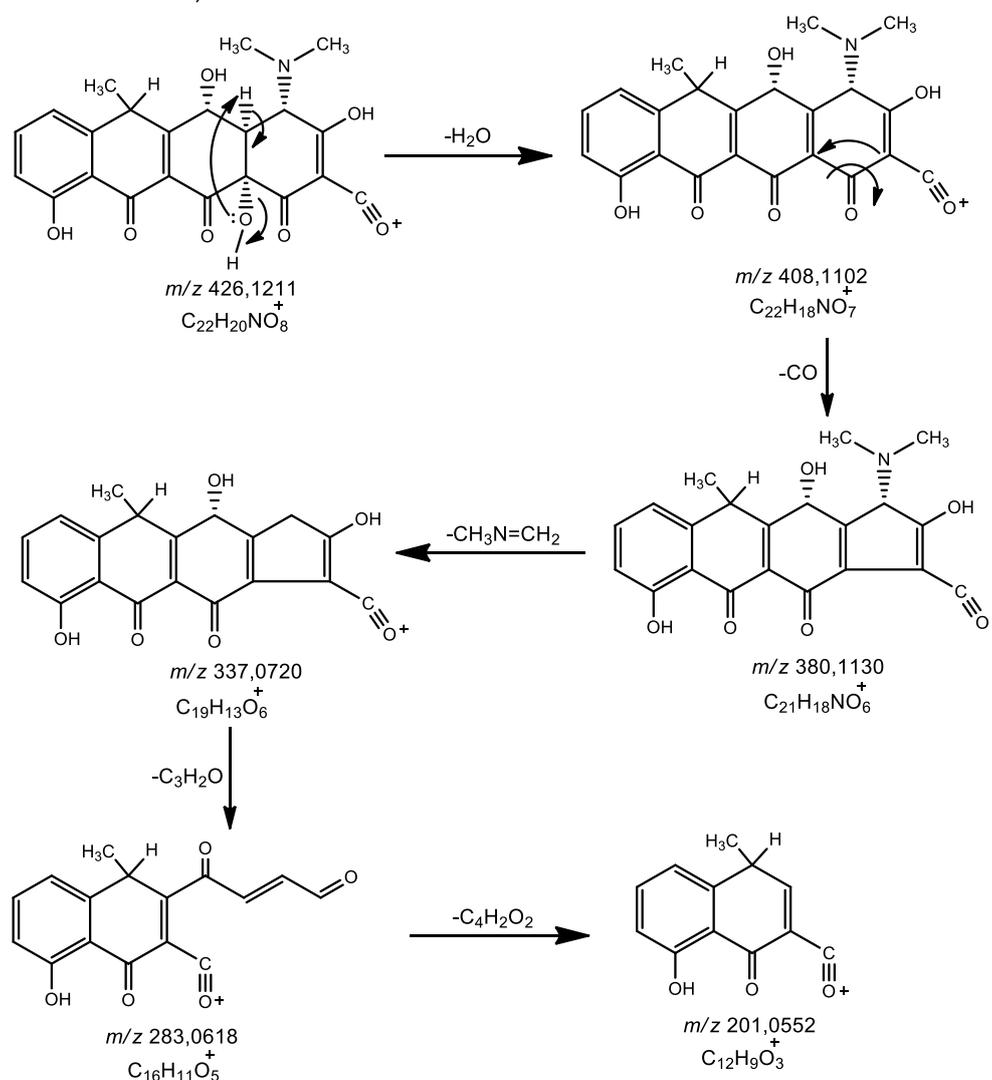
Fonte: adaptado de KAMEL et al., 2002.

Conforme observado na Figura 2.28, a perda de água (H_2O , $18u$) e a formação do íon m/z 443,1458 é uma fragmentação dirigida pela carga e ocorre a partir da protonação da hidroxila em C-6. Apesar desse grupo hidroxila não ser o sítio mais básico da molécula, sua protonação e o mecanismo proposto para formação do fragmento m/z 443,1458 são pertinentes e corroboram com o descrito por Kamel e colaboradores (2002). Esses autores calcularam o grau de basicidade (GB) em fase gasosa dos grupos hidroxilas de OTC e encontraram valor de GB próximo de 785 kJ/mol, que não está muito distante dos valores de GB dos grupos dimetilamino em C-4 e amida em C-2 que foram, respectivamente, 945 kJ/mol e 840 kJ/mol. Sugere-se também que a desidratação das impurezas relacionadas 4-EOTC, TC e ADOTC e a formação dos íons m/z 443,1360 (4-EOTC), 427,1518 (TC) e 442,1512 (2-ADOTC) ocorram por meio deste mesmo mecanismo.

O íon m/z 443,1458 possui o grupo amida em C-2 protonado decorrente da migração de hidreto ocorrido em m/z 461,1584. Portanto, a partir do íon m/z 443,1458 ocorre a perda neutra de amônia (NH_3 , 17u), resultando no íon m/z 426,1211 que, após sofrer rearranjo de Favorskii e perder o grupo dimetilamino em C-4 [$\text{HN}(\text{CH}_3)_2$, 45u], origina o fragmento m/z 381,0630 (KAMEL et al., 2002). Acredita-se que as impurezas 4-EOTC e TC também percam NH_3 a partir dos íons m/z 443,1360 (4-EOTC) e 427,1518 (TC), resultando, respectivamente, nos fragmentos m/z 426,1160 e 410,1255.

Na Figura 2.29 encontra-se a proposta do mecanismo para obtenção dos demais fragmentos de OTC, a partir do íon m/z 426,1211.

Figura 2.29. Proposta do mecanismo de fragmentação de OTC a partir do íon fragmento m/z 426,1211.



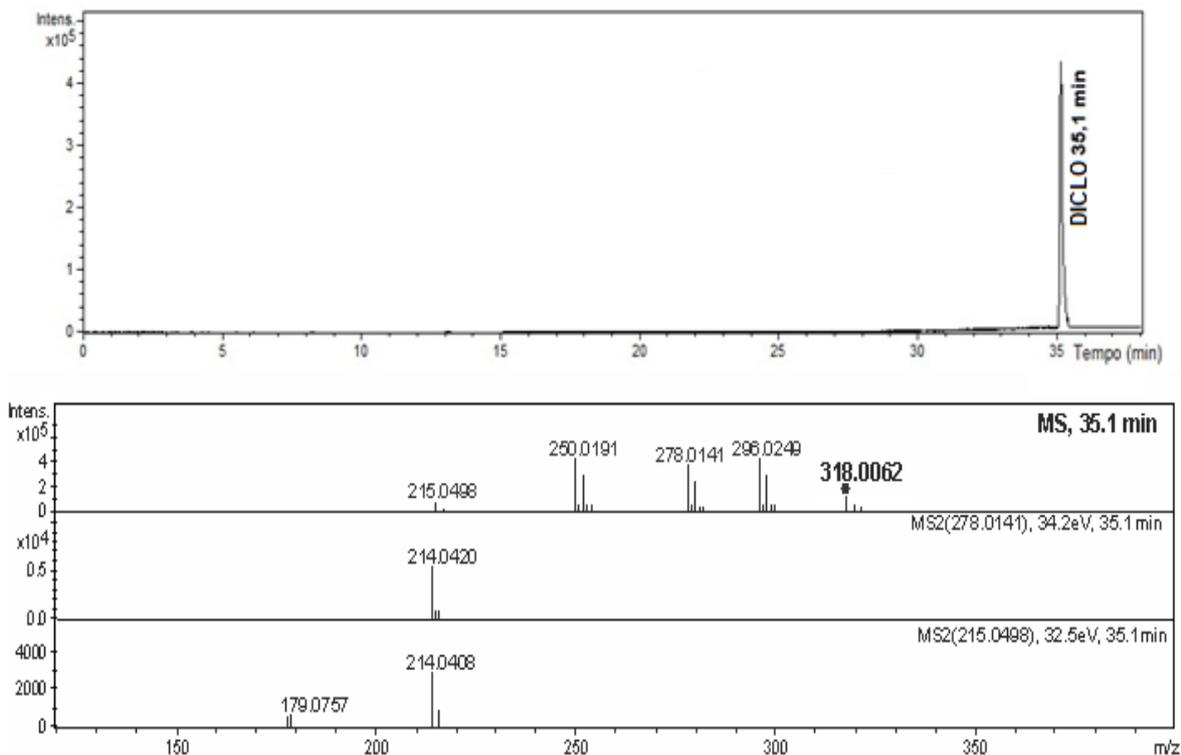
Fonte: adaptado de KAMEL et al., 2002.

Na Figura 2.29 pode-se observar que a partir do íon m/z 426,1211 ocorre uma fragmentação com retenção de carga, resultando em uma segunda desidratação da molécula com a geração do íon m/z 408,1102 que, por sua vez, fragmenta-se no íon m/z 380,1130 em decorrência da perda neutra de monóxido de carbono (CO, 28u). Esse íon é precursor do fragmento m/z 337,0220, resultante da perda de uma imina ($\text{CH}_3\text{N}=\text{CH}_2$, 43u) (KAMEL et al., 2002). As estruturas químicas dos fragmentos m/z 283,0618 e m/z 201,0552 foram propostos pela primeira vez neste estudo e acredita-se que sejam oriundos das perdas neutras de, respectivamente, $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_2$ a partir de seus respectivos íons precursores.

2.2.7.2. Diclofenaco de sódio (DICLO)

A Figura 2.30 traz o cromatograma de íons totais e o espectro de massa de alta resolução, obtidos a partir da matéria-prima de DICLO estudada.

Figura 2.30. Cromatograma de íons totais e espectro de massas de alta resolução de diclofenaco de sódio (DICLO).



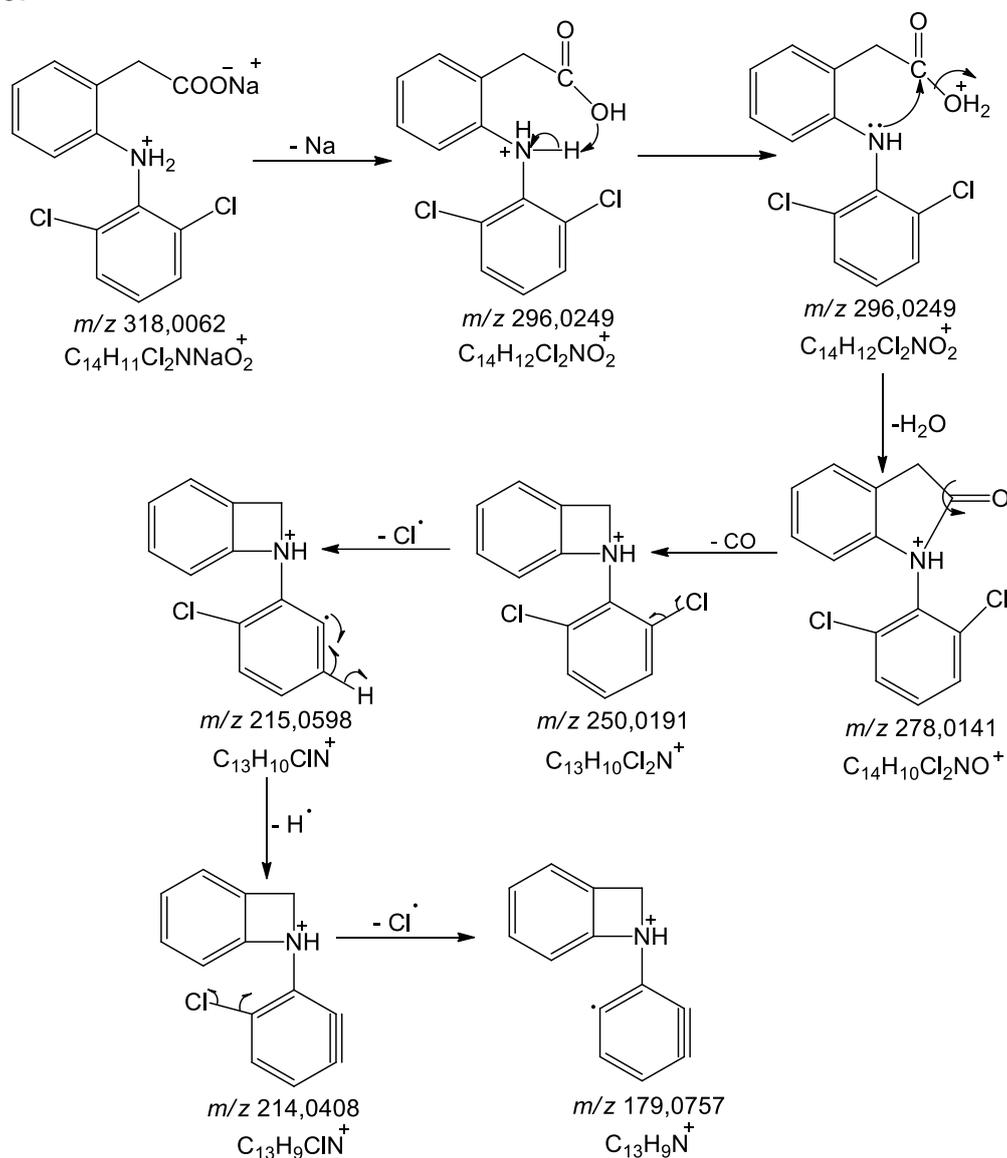
É possível notar no cromatograma o pico em 35,1 minutos atribuído ao fármaco, sendo confirmado através do espectro de massas de alta resolução, onde se observa o pico em m/z 318,0062 referente à molécula protonada

$[M+H]^+$ de DICLO, com fórmula molecular $C_{14}H_{11}Cl_2NNaO_2^+$ (erro: -0,9 ppm), confirmada pelo programa Compass Data Analysis®.

No espectro de massas, além do pico de $[M+H]^+$ existem outros picos, de menor intensidade com m/z 320,0033 e 322,0004 correspondendo, respectivamente, à $[M+H+2]^+$ e $[M+H+4]^+$. A presença desses outros picos é prevista no espectro de massas de DICLO devido à existência de isótopos do átomo de cloro (^{35}Cl e ^{37}Cl) (GALMIER et al., 2005). Portanto, o íon $[M+H]^+$ (m/z 318,0070) é constituído por dois átomos de ^{35}Cl , o isótopo mais abundante na natureza (75,4%) (MEYERSON, 1961). Já o íon $[M+H+2]^+$ (m/z 320,0033) é formado por um átomo de ^{35}Cl e outro de ^{37}Cl , enquanto que o íon $[M+H+4]^+$ (m/z 322,0004) possui dois átomos de ^{37}Cl , o isótopo menos abundante na natureza (24,6%) (MEYERSON, 1961). As intensidades relativas desses íons no espectro de massas de DICLO foram: 17,5%, 11,9% e 2,2%, respectivamente, para $[M+H]^+$, $[M+H+2]^+$ e $[M+H+4]^+$.

Na Figura 2.31 encontra-se a proposta do mecanismo de fragmentação de DICLO. É válido ressaltar que será considerado o íon m/z 318,0062, composto apenas pelo o isótopo mais abundante (^{35}Cl), para propor as fragmentações.

Figura 2.31. Proposta do mecanismo de fragmentação de diclofenaco de sódio.



Fonte: adaptado de GALMIER et al., 2005.

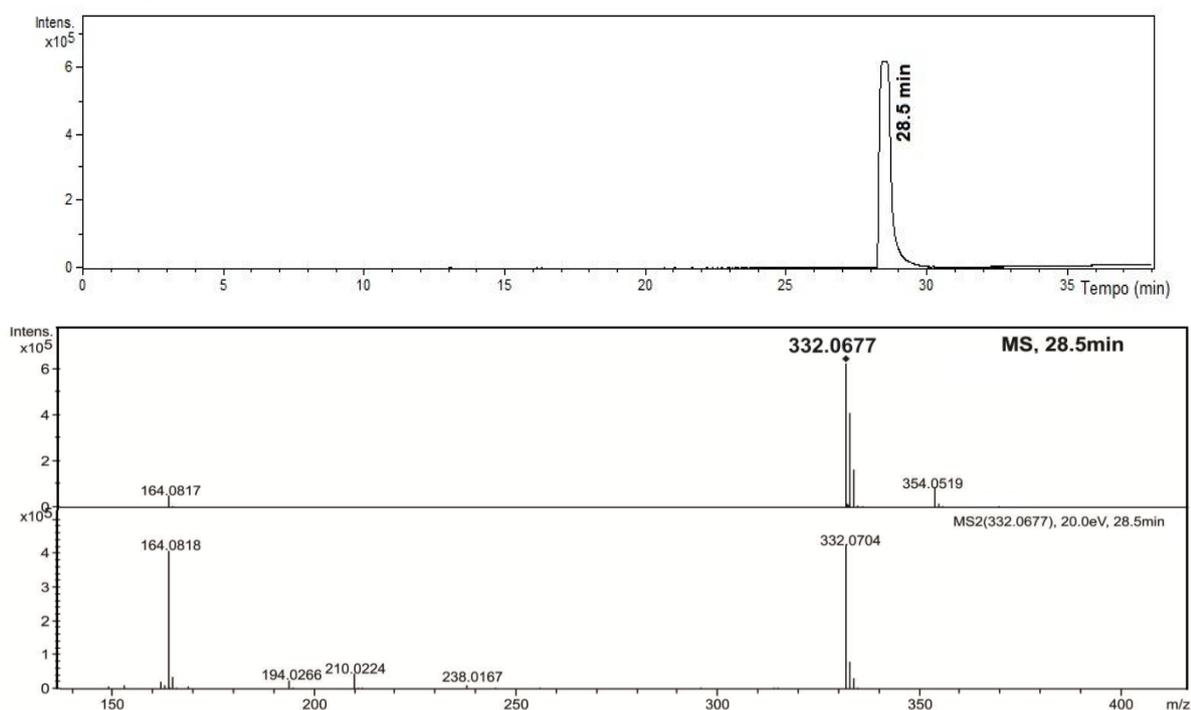
Conforme observado nas Figuras 2.30 e 2.31, o íon em m/z 296,0249 é relativo à perda de sódio (Na, 23u), uma vez que a matéria-prima se tratava do sal sódico do fármaco. Em seguida, o íon fragmento m/z 278,0141 é decorrente da desidratação (H_2O , 18u). A partir desse íon, ocorre uma perda neutra de monóxido de carbono (CO, 28u), resultando do íon m/z 250,0191. O íon em m/z 215,0598 corresponde à perda radicalar de cloro ($\cdot Cl$, 35u), resultando na formação de um cátion-radical, o que corrobora com o observado por Gamier e colaboradores (2005). Posteriormente, ocorre a perda de um hidrogênio radicalar ($\cdot H$, 1u) do anel aromático inferior, produzindo o íon fragmento

m/z 214,0408. Apesar dessa perda não ser comum em ionização por eletrospray, acredita-se que ela ocorre, uma vez que esse íon fragmento foi observado no MS² do íon m/z 215,0598 e também teve sua fórmula molecular (C₁₃H₉ClN, erro: -9 ppm) comprovada com auxílio do programa Compass Data Analysis[®]. Por último, observa-se a perda do segundo cloro, também na forma radicalar, resultando no cátion-radical de m/z 179,0757.

2.2.7.3. Piroxicam (PIRO)

O cromatograma de íons totais e o espectro de massas de alta resolução de PIRO encontram-se na Figura 2.32.

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

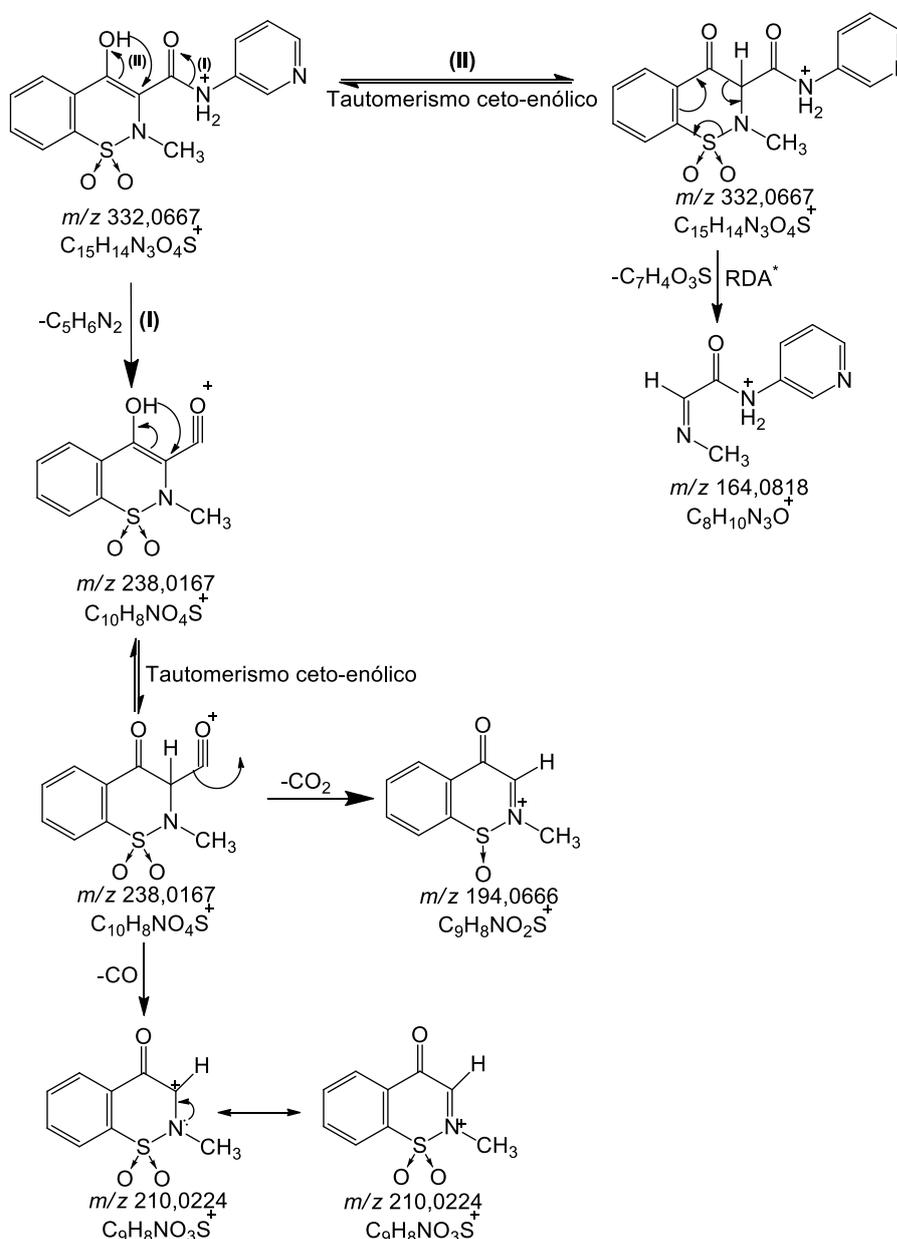


No cromatograma-se nota-se que o t_R do fármaco foi de 28,5 minutos, sendo o pico intenso em m/z 332,0667 correspondente à sua molécula protonada $[M+H]^+$, composta pelo isótopo mais abundante do enxofre (³²S, 95%) e com fórmula molecular C₁₅H₁₄N₃O₄S⁺ (erro: -3,9 ppm). Além disso, com auxílio do programa Compass Data Analysis[®], foram observados os picos em m/z 333,0731 e 334,0686 que correspondem, respectivamente, à $[M+H+1]^+$ e $[M+H+2]^+$. A presença desses picos é devido à existência dos isótopos ³³S e ³⁴S com abundância relativa de 0,75% e 4,21%, respectivamente

(THODE, 1970). As intensidades relativas desses íons no espectro de massas de PIRO foram: 100%, 65,5% e 26,2%, respectivamente, para $[M+H]^+$, $[M+H+1]^+$ e $[M+H+2]^+$. O pico em m/z 354,0519 corresponde ao aduto sodiado de $[M+H]^+$ (MODHAVE et al., 2011).

A Figura 2.33 mostra a proposta do mecanismo de fragmentação de PIRO. É válido ressaltar que apenas o íon m/z 332,0667, composto pelo isótopo de enxofre mais abundante (^{32}S), será considerado propor as fragmentações.

Figura 2.33. Proposta do mecanismo de fragmentação de piroxicam. * RDA: *retro Diels-Alder*.



Fonte: adaptado de MODHAVE et al., 2011.

Conforme visualizado na Figura 2.33, sugere-se que o sítio de protonação mais plausível do íon m/z 332,0667 seja o átomo de nitrogênio do grupo carboxamido. Dessa forma, sua fragmentação origina o íon m/z 238,0167, a partir da perda neutra de $C_5H_6N_2$. Em seguida, após sofrer tautomerismo ceto-enólico, nota-se que o íon m/z 238,0167 perde monóxido de carbono (CO, $28u$) e origina o íon m/z 210,0224, que se estabiliza por ressonância mantendo a carga positiva no nitrogênio do grupo sulfonamido. Além disso, acredita-se que o íon m/z 238,0167 também seja precursor do fragmento m/z 194,0266 pela perda de dióxido de carbono (CO_2 , $46u$). Sugere-se que um dos oxigênios de CO_2 seja oriundo da ruptura da ligação dativa entre enxofre e oxigênio (S→O), pois essa ligação é menos energética que a ligação covalente entre carbono e oxigênio (C=O), sendo comum sua clivagem heterolítica em fase gasosa ou em solventes inertes (MINKIN, 1999).

Finalmente, admite-se que íon m/z 164,0818, que também é formado pelas reações de dissociação na fonte, seja obtido a partir da fragmentação do íon m/z 332,0667 via *retro Diels-Alder*, um mecanismo de fragmentação fundamental de substâncias que contêm anéis de seis membros com duplas ligações (PAVIA et al., 2010; DEMARQUE et al., 2016).

2.3. CONCLUSÃO

As matérias-primas de OTC, DICLO e PIRO foram detalhadamente caracterizadas por diversas técnicas analíticas confiáveis que, apesar de serem específicas, quando utilizadas conjuntamente são complementares e conclusivas. Portanto, cumprindo o estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017, estas matérias-primas foram qualificadas como substâncias químicas de referência caracterizadas (SQC), o que permite sua utilização durante o desenvolvimento e validação de métodos analíticos empregados na rotina do controle de qualidade de medicamentos (BRASIL, 2017a).

CAPÍTULO III

ANÁLISE QUANTITATIVA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Neste capítulo encontram-se descritos os métodos espectrofotométricos desenvolvidos e validados para quantificação simultânea das associações de oxitetraciclina com diclofenaco de sódio ou com piroxicam em soluções injetáveis para uso animal, bem como sua aplicação para a quantificação desses fármacos isolados em medicamentos para uso humano. A partir dos resultados alcançados nesse capítulo, foi redigido um artigo científico que se encontra submetido para apreciação no periódico *Arabian Journal of Chemistry* (Qualis A2, ANEXO II)

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. Substâncias Químicas de Referência Caracterizadas (SQC)

As SQC utilizadas foram oxitetraciclina dihidrato (OTC), diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO). Essas SQC foram previamente descritas (item 2.1.1) e caracterizadas por técnicas analíticas confiáveis que se encontram discutidas no capítulo anterior.

3.1.2. Amostras Comerciais

As amostras comerciais, na forma de soluções injetáveis, utilizadas no desenvolvimento e validação dos métodos espectrofotométricos foram adquiridas no comércio agropecuário de Campo Grande – MS e encontram-se descritas na Tabela 3.1.

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

Nome comercial	Laboratório	Composição	Lote
Terramicina Mais®	Zoetis	OTC 20,0% + DICLO 1,0%	005-14
Terracam Plus®	União Química	OTC 22,0% + PIRO 1,2%	1534700

OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

3.1.3. Desenvolvimento dos Métodos

Os métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos em espectrofotômetro UV/Vis Thermo Fischer Scientific modelo Evolution 60® (Massachusetts, EUA) na faixa de 200 a 400 nm, empregando solução de acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5 como solvente e como branco. A acetonitrila utilizada era de grau analítico da marca Vetec®. O pH da solução foi ajustado para 2,5 com auxílio de ácido *orto*-fosfórico de grau analítico (Synth®), utilizando medidor de pH de bancada da marca MS Tecnopon® modelo mPA210.

3.1.3.1. Seleção dos Comprimentos de Onda

A partir de soluções padrões estoques de cada fármaco preparadas em acetonitrila a 100 µg mL⁻¹, foram obtidas, separadamente, soluções de OTC a

22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, DICLO a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e PIRO a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5 como solvente. Essas soluções foram utilizadas para realização de varreduras espectrais na faixa de 200 a 400 nm, a fim de encontrar os comprimentos de onda apropriados para análise de cada fármaco em associação.

Por se tratarem de misturas binárias de fármacos (OTC + DICLO e OTC + PIRO), foi necessária a derivação de alguns espectros de ordem zero, devido à sobreposição das bandas espectrais no intervalo de 200 a 400 nm. Portanto, determinados espectros foram derivados para a primeira ordem com o auxílio do programa Origin®, versão 8.0. Em seguida, esses espectros foram pré-processados, utilizando o filtro de suavização de Stavitzky e Golay (1964) com janela de 15 a 20 pontos e polinômio de 2ª ordem. Os comprimentos de onda para análise dos fármacos na primeira derivada foram determinados através da técnica do ponto de anulação ou *zero crossing*.

3.1.4. Validação dos Métodos

A validação do método foi realizada de acordo com o preconizado pelos seguintes guias de validação de métodos analíticos: *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005), *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC, 2005) e Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017a).

Os resultados foram analisados estatisticamente através dos programas Microsoft Excel® e Origin®, versão 8.0.

Soluções padrões-estoques e amostras-estoques foram utilizadas nos experimentos de validação do método analítico, sendo preparadas conforme descrito a seguir:

- **Preparo das Soluções Padrões-estoques**

As soluções padrões-estoques foram preparadas pesando-se, analiticamente, 10 mg de cada SQC (OTC, DICLO e PIRO) que foram transferidos, separadamente, para balões volumétricos de 100 mL, adicionando-se, aproximadamente 50 mL de acetonitrila. Em seguida, as soluções foram levadas ao banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente, completaram-se os volumes para 100 mL com acetonitrila, obtendo soluções de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada fármaco.

- **Preparo das Soluções Amostras-estoques**

Foram utilizadas as amostras comerciais Terramicina Mais® (Amostra A) e Terracam Plus® (Amostra B), sendo a primeira utilizada nos experimentos de validação da associação OTC + DICLO e a segunda da associação OTC + PIRO. As especificações desses medicamentos encontram-se previamente descritas na Tabela 3.1.

Com auxílio de uma pipeta automática, transferiu-se, separadamente, 1000 µL das amostras comerciais A e B para balões volumétricos de 100 mL, adicionando, aproximadamente, 50 mL de água ultrapura. Em seguida, as soluções foram levadas ao banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente, completaram-se os volumes para 100 mL com o mesmo solvente, obtendo as seguintes soluções estoques: *Amostra A*: OTC a 2000 µg mL⁻¹ e DICLO a 100 µg mL⁻¹ e *Amostra B*: OTC a 2200 µg mL⁻¹ e PIRO a 120 µg mL⁻¹.

3.1.4.1. Parâmetros Analíticos

3.1.4.1.1. Linearidade

Foi avaliada através da construção de três curvas analíticas para cada fármaco, obtidas a partir de diluições das respectivas soluções padrão-estoque. As curvas analíticas de OTC foram construídas no intervalo de concentração de 10,0 a 80,0 µg mL⁻¹, enquanto que as de DICLO foram obtidas no intervalo de 1,5 a 25,0 µg mL⁻¹ e as de PIRO no intervalo de 2,5 a 30,0 µg mL⁻¹.

Os sinais obtidos (absorvâncias ou derivadas de primeira ordem) foram registrados em triplicata e estatisticamente avaliados de acordo com o preconizado pelo Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica através dos testes de: confirmação da homocedasticidade dos valores em y (teste de Cochran), análise da variância (ANOVA) da regressão linear, avaliação da normalidade dos resíduos através da análise visual do gráfico e do teste estatístico da Shapiro-Wilk (BRASIL, 2017b). As equações da reta foram determinadas pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.1.4.1.2. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de OTC, DICLO e PIRO foram determinados a partir das três curvas analíticas obtidas para cada

fármaco, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (SD) e inclinação média (a). Os LD e LQ foram calculados, respectivamente, conforme as Equações 3.1 e 3.2:

$$\text{Equação 3.1: LD} = 3,3 \times \frac{SD}{a}$$

$$\text{Equação 3.2: LQ} = 10,0 \times \frac{SD}{a}$$

Em que:

SD = desvio padrão do intercepto; a = média dos valores de inclinação das curvas analíticas.

3.1.4.1.3. Precisão

A precisão dos métodos foi avaliada pelos testes intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária).

As repetibilidades foram determinadas por meio da análise das soluções amostras comerciais A e B, obtidas a partir das diluições das soluções amostras-estoques. Os fármacos foram analisados em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) dentro do intervalo linear do método, sendo que as leituras foram realizadas em seis replicatas para cada nível de concentração.

Devido à grande diferença de concentração entre OTC e os AINEs nas soluções injetáveis (20 OTC : 1 DICLO ou 18,3 OTC : 1 PIRO), os ensaios de repetibilidade foram realizados separadamente para cada fármaco. Adicionalmente, após testes prévios, observaram-se desvios na Lei de Lambert-Beer ocasionados pelas baixas concentrações dos AINEs nos medicamentos. Portanto, com a finalidade de contornar esse problema, foi empregada a técnica de enriquecimento ou fortificação da amostra para análise da repetibilidade de DICLO e PIRO. Essa técnica tem sido igualmente empregada por outros autores em trabalhos recentes descritos na literatura (LOFTY et al., 2015a; LOFTY et al., 2015b; LOTFY; HAGAZY, 2012) e baseia-se na adição de quantidade conhecida de SQC na solução de leitura da amostra comercial. Posteriormente, a concentração de SQC adicionada é subtraída antes de calcular o teor de cada fármaco presente no medicamento. A Tabela 3.2 ilustra como foram preparadas as soluções das amostras de

DICLO e PIRO para a avaliação da repetibilidade, utilizando a técnica de fortificação da amostra.

Tabela 3.2. Preparo das soluções amostras de diclofenaco de sódio e piroxicam para avaliação da repetibilidade dos métodos espectrofotométricos propostos, empregando a técnica de fortificação da amostra.

Fármaco	Nível	Solução amostra-estoque (μL) ^a	SQC adicionada (μL) ^b	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^c
DICLO	Baixo	500	750	5,0
	Médio	500	3000	14,0
	Alto	500	4500	20,0
PIRO	Baixo	500	650	5,0
	Médio	500	3000	14,4
	Alto	500	5000	22,4

^aSolução amostra-estoque A (Terramicina Mais[®]), contendo DICLO na concentração teórica de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou solução-amostra estoque B (Terracam Plus[®]) com $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PIRO; ^bConcentração das SQC de DICLO ou PIRO adicionado $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; ^cVolume completado para 25 mL com acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5.

Para os ensaios de repetibilidade de OTC utilizaram-se as amostras comerciais A ou B, dependendo da associação para qual o método estivesse sendo validado. Portanto, foram transferidos, com auxílio de pipeta automática, 500, 1000 e 1500 μL das soluções amostras-estoques A ou B para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com mistura de acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5, obtendo as seguintes concentrações teóricas de OTC para os níveis baixo, médio e alto, respectivamente: *Amostra A*: 20, 40 e $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *Amostra B*: 22, 44 e $66 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A precisão intermediária de OTC, DICLO e PIRO foi avaliada através do preparo de novas soluções amostras-estoques A e B, de acordo com o procedimento descrito previamente. Em seguida, foram realizadas diluições, a fim de obter soluções com as mesmas concentrações finais empregadas nos ensaios de repetibilidade. Na análise da precisão intermediária de DICLO e PIRO também foi utilizada a técnica de enriquecimento, semelhante ao descrito para a repetibilidade (Tabela 3.2). Os ensaios para verificação da precisão intermediária foram realizados durante dois dias consecutivos, por dois

analistas diferentes, e as absorvâncias ou derivadas de primeira ordem obtidas foram registradas em seis replicatas.

Os resultados do ensaio de repetibilidade foram expressos em termos de desvios padrão relativos (%DPR). Já para a análise da precisão intermediária, as médias obtidas para os diferentes níveis de concentração nos dias 1 e 2 foram estatisticamente comparadas, empregando o teste-*t* de Student bicaudal com 95% de intervalo de confiança.

3.1.4.1.4. Exatidão

A exatidão dos métodos espectrofotométricos foi determinada através de ensaios de recuperação, realizados por meio da adição de quantidades conhecidas de soluções padrão às soluções das amostras comerciais. Os ensaios foram realizados separadamente para cada fármaco a fim de contemplar o intervalo linear de concentração do método.

Nos ensaios de recuperação foram utilizadas as soluções padrões e amostras-estoques anteriormente descritas. No entanto, para o ensaio de recuperação de OTC realizou-se diluições das amostras-estoques A e B, resultando, respectivamente, na concentração de 100 e 110 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OTC nessas amostras.

As Tabelas 3.3 e 3.4 representam, respectivamente, o preparo das soluções utilizadas no ensaio de recuperação OTC e DICLO, utilizando a amostra comercial A (Terramicina Mais®). Enquanto que as Tabelas 3.5 e 3.6 trazem o preparo das soluções empregadas no ensaio de recuperação de OTC e PIRO com o emprego da amostra comercial B (Terracam Plus®).

Tabela 3.3. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de oxitetraciclina para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial A^a.

Balão volumétrico (10 mL) ^b	Solução padrão 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μL) ^c	Solução amostra A 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μL) ^c	Concentração final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Amostra	-----	1000	10,0
R1	2000	1000	30,0
R2	4000	1000	50,0
R3	6000	1000	70,0
Padrão	1000	-----	10,0

^aTerramicina Mais®; ^bvolume completado com acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática.

Tabela 3.4. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de diclofenaco de sódio para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial A^a.

Balão volumétrico (25 mL) ^b	Solução padrão 100 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Solução amostra A 100 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Concentração final (µg mL ⁻¹)
Amostra	-----	500	2,0
R1	750	500	5,0
R2	3000	500	14,0
R3	4500	500	20,0
Padrão	500	-----	2,0

^aTerramicina Mais®; ^bvolume completado com acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática.

Tabela 3.5. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de oxitetraciclina para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial B^a.

Balão volumétrico (10 mL) ^b	Solução padrão 100 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Solução amostra B 110 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Concentração final (µg mL ⁻¹)
Amostra	-----	1000	11,0
R1	2000	1000	31,0
R2	4000	1000	51,0
R3	6000	1000	71,0
Padrão	1100	-----	11,0

^aTerracam Plus®; ^bvolume completado com acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática.

Tabela 3.6. Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de piroxicam para avaliação da exatidão do método espectrofotométrico proposto, empregando amostra comercial B^a.

Balão volumétrico (25 mL) ^b	Solução padrão 100 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Solução amostra B 120 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Concentração final (µg mL ⁻¹)
Amostra	-----	500	2,4
R1	650	500	5,0
R2	3000	500	14,4
R3	5000	500	22,4
Padrão	600	-----	2,4

^aTerracam Plus®; ^bvolume completado com acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), empregando solução de acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5 como solvente e branco. As porcentagens de recuperação foram calculadas através da Equação 3.3 (AOAC, 2005):

$$\text{Equação 3.3: } R = [C_A - C_{NA})/C_P] \times 100$$

Em que:

C_A = concentração de fármaco encontrada na amostra adicionada de padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

C_{NA} = concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

C_P = concentração teórica de padrão adicionada na amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.1.4.1.5. Seletividade

A seletividade dos métodos espectrofotométricos foi determinada pela avaliação da interferência dos adjuvantes no comprimento de onda utilizado para determinação quantitativa dos fármacos nas associações em estudo.

No entanto, devido ao sigilo industrial, não foi possível obter a relação de adjuvantes presentes nas amostras Terramicina Mais[®] (amostra A) e Terracam Plus[®] (amostra B). Por isso, utilizou os adjuvantes, bem como suas concentrações descritas na ficha de informação de segurança do medicamento Ourotetra OF[®], uma solução injetável contendo 20% de oxitetraciclina (Ourotetra OF, 2011).

Assim sendo, compararam-se os espectros (ordem zero ou primeira derivada) dos fármacos presentes nas amostras comerciais A e B com o espectro da mistura dos adjuvantes (placebo) composta por: óxido de magnésio (1,9% m/v), 2-pirrolidona (33,3% v/v), álcool benzílico (1,05% v/v) e água ultrapura (qsp para 100 mL) (Ourotetra OF, 2011). As soluções amostras e placebo foram preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5 de modo semelhante ao descrito anteriormente para o preparo das soluções amostras-estoques.

3.1.4.1.6. Robustez

A robustez foi avaliada através do teste de robustez de Youden e Steiner (1975), no qual sete variáveis que podem interferir no resultado analítico foram deliberadamente alteradas, com posterior análise dos dados. As sete variáveis selecionadas foram: proporção de acetonitrila, fornecedor de acetonitrila, pH da mistura de solvente, comprimento de onda, tempo de sonicação, uso de filtro de seringa, temperatura da sala.

As condições normais das variáveis foram designadas pelas letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e, seus valores alterados foram representados pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g, respectivamente. A capacidade do método de se manter inalterado frente a essas alterações é avaliada pelo *Efeito (E)*, que consiste num valor numérico obtido da diferença entre as médias aritméticas dos teores encontrados (*s, t, ..., z*) que empregam o parâmetro em avaliação nas condições normais e nas condições alteradas (YOU DEN; STEINER, 1975).

Os parâmetros analíticos selecionados e suas alterações estão descritos na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez dos métodos espectrofotométricos propostos para avaliação das associações em estudo.

	Parâmetro	Condição Normal	Variação
A/a	Proporção de acetonitrila	A - 50%	a - 55%
B/b	Fornecedor de acetonitrila	B - Dinâmica [®]	b - Vetec [®]
C/c	pH da mistura de solvente	C 2,5	c - 2,3
D/d	Comprimento de onda (nm)	D 298,5 ^a ; 339 ^b ;	d - 297,5 ^a ; 338 ^b ; 358 ^c
E/e	Tempo de sonicação (min)	E - 15	e - 20
F/f	Filtro de seringa^d	F - não	f - sim
G/g	Temperatura da sala (°C)	G 25	g - 28

^a Comprimentos de onda (λ) para análise de DICLO e PIRO na derivada de primeira ordem; ^b λ para análise de OTC na derivada de primeira ordem (na associação com PIRO); ^c λ para análise de OTC na ordem zero (na associação com DICLO); ^d Filtro de seringa com membrana de *nylon* estéril 25 mm x 22 μ m (Saint Vallen[®]).

A combinação fatorial dos parâmetros selecionados para realização dos experimentos e avaliação da robustez pelo teste de Youden e Steiner está representada na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden e Steiner.

Parâmetro Analítico	Combinação Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Proporção de acetonitrila	A	A	A	A	a	a	a	a
Fornecedor de acetonitrila	B	B	b	b	B	B	b	b
pH da mistura de solvente	C	c	C	c	C	c	C	c
Comprimento de onda	D	D	d	d	d	d	D	D
Tempo de sonicação	E	e	E	e	e	E	e	E
Filtro de seringa de nylon	F	f	f	F	F	f	f	F
Temperatura da sala	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

A Equação 3.4 exemplifica como foi calculado o *Efeito* de cada alteração dos parâmetros analíticos selecionados. O exemplo corresponde à alteração no parâmetro pH da mistura de solvente (C/c).

$$\text{Equação 3.4: } Efeito_{C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4}$$

A significância dos *Efeitos* foi avaliada através da Equação 3.5, na qual para um método ser considerado robusto, os valores absolutos de E devem ser menores do que o valor crítico encontrado em $\sqrt{2S}$ (NEVADO et al., 2006).

$$\text{Equação 3.5: } |E| < \sqrt{2S}$$

$$\text{Sendo: } S = \sqrt{\frac{2}{7} (E_{A/a}^2 + E_{B/b}^2 + \dots + E_{G/g}^2)}$$

Conforme observado na Tabela 3.8, foram realizados um total de 8 experimentos para cada associação em estudo. Foram utilizadas nos experimentos as amostras comerciais A e B nas concentrações teóricas de: *Amostra A*: 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OTC e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DICLO e *Amostra B*: 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OTC e 14,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PIRO. Ressalta-se que as concentrações de PIRO e DICLO foram fortificadas através da transferência de alíquotas de 3 mL de suas respectivas SQC a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para balões volumétricos de 25 mL com que já continham as soluções amostras.

3.1.5. Aplicabilidade dos Métodos

As amostras comerciais A (Terramicina Mais[®], composta por OTC 20,0% e DICLO 1,0%) e B (Terracam Plus[®], composta por OTC 22,0% e PIRO 1,2%) foram analisadas através dos métodos espectrofotométricos propostos. As soluções amostras-estoques foram preparadas conforme descrito anteriormente. Em seguida, realizaram-se diluições para balões volumétricos de 25 mL, bem como a fortificação de DICLO e PIRO com suas respectivas soluções de SQC. Os volumes foram completados com acetonitrila:água pH 2,5 (50:50, v/v), obtendo as seguintes concentrações teóricas: Terramicina Mais[®]: OTC 40 µg mL⁻¹ e DICLO 14 µg mL⁻¹ e Terracam Plus[®]: OTC 44 µg mL⁻¹ e PIRO 14,4 µg mL⁻¹. Posteriormente, as concentrações de SQC de DICLO e PIRO adicionadas às suas respectivas amostras foram subtraídas antes de calcular, por intermédio das curvas analíticas, o teor de cada fármaco presente nos medicamentos (LOFTY et al., 2015a; LOFTY et al., 2015b; LOTFY; HAGAŻY, 2012).

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dos métodos espectrofotométricos para a quantificação dos fármacos na forma isolada, foram analisados os seguintes medicamentos para uso humano: Terramicina[®] cápsulas (Pfizer), contendo cloridrato de OTC 500 mg (Amostra C); comprimidos gastro-resistentes diclofenaco de sódio Genérico (EMS), contendo DICLO 50 mg (amostra D); Diclofarma[®] solução injetável (Farmace), contendo DICLO 25 mg mL⁻¹ (Amostra E); cápsulas de piroxicam Genérico (EMS), contendo PIRO 20 mg (amostra F) e Feldene[®] solução injetável (Pfizer), contendo PIRO 20 mg mL⁻¹ (amostra G). Para todas as amostras foram preparadas soluções amostras-estoques a 100 µg mL⁻¹ em água ultrapura. Em seguida, foram realizadas diluições em acetonitrila:água pH 2,5 (50:50, v/v), obtendo as concentrações finais de: 40 µg mL⁻¹ de OTC na amostra B e 15 µg mL⁻¹ de DICLO (amostras D e E) e de PIRO (amostra F e G). É válido ressaltar que para esses medicamentos (amostras D-G) não foi necessário realizar o procedimento de fortificação das amostras com as SQC de DICLO e PIRO.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Desenvolvimento dos Métodos

Após testar diversas condições espectrofotométricas, incluindo diferentes proporções de misturas de solventes e reagentes colorimétricos, foram desenvolvidos dois métodos espectrofotométricos no UV para determinação simultânea de OTC associada ao DICLO ou ao PIRO em soluções injetáveis para uso animal. Esses métodos foram baseados na quantificação desses fármacos na ordem zero ou na primeira derivada em diferentes comprimentos de onda.

Independentemente da ordem e comprimentos de onda empregados na quantificação dos fármacos, a mistura de acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5 foi eleita como solvente ideal, pois propiciou alta solubilidade dos fármacos, além desses reagentes não apresentarem absorção significativa na faixa de comprimento de onda analisada (200 - 400 nm).

A Tabela 3.9 apresenta as condições espectrofotométricas empregadas para determinação simultânea de OTC combinada com DICLO ou com PIRO nos medicamentos veterinários.

Tabela 3.9. Condições espectrofotométricas desenvolvidas para quantificação simultânea de oxitetraciclina (OTC) associada ao diclofenaco de sódio (DICLO) ou ao piroxicam (PIRO) nos medicamentos veterinários.

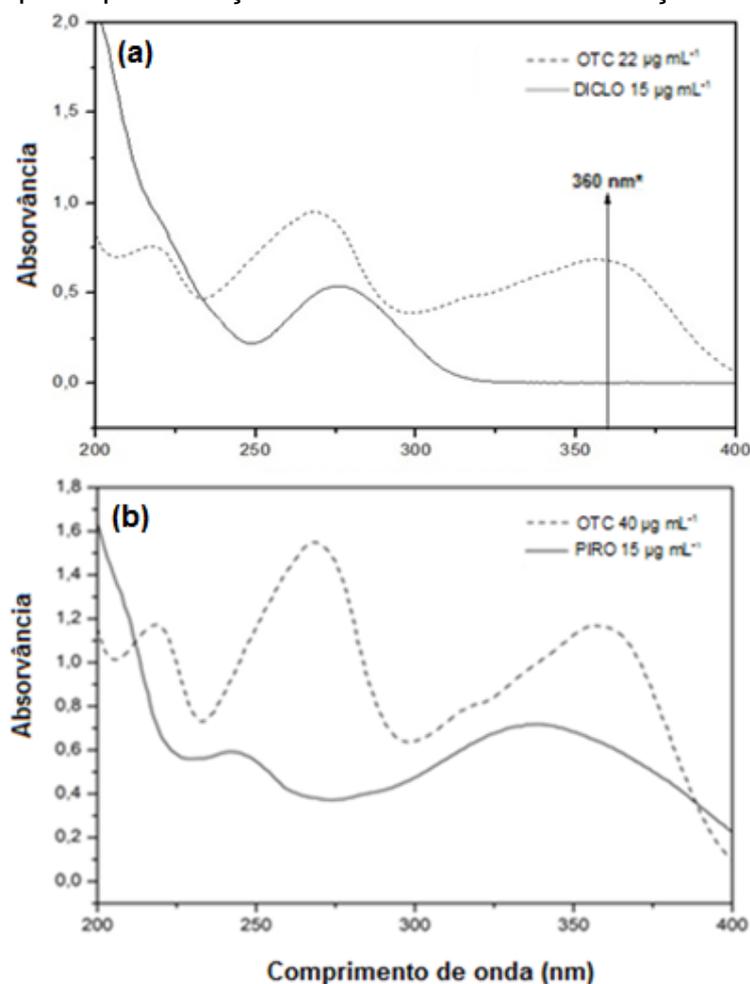
Parâmetros	Associação OTC + DICLO		Associação OTC + PIRO	
	OTC	DICLO	OTC	PIRO
Equipamento	Espectrofotômetro UV/Vis Thermo Scientific modelo Evolution 60®			
Solvente	acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5			
Técnica espectrofotométrica	A/ λ	dA/d λ	dA/d λ	dA/d λ
λ (nm)	360	298,5	339	298,5
Técnica de suavização	-----	Stavitzky e Golay (1964), janela de 15 a 20 pontos e polinômio de 2ª ordem		

A/ λ : espectrofotometria de absorção na ordem zero; dA/d λ : espectrofotometria de absorção na primeira derivada; λ : comprimento de onda.

Conforme observado na Figura 3.1, por serem misturas binárias de fármacos, não foi possível a quantificação direta e simultânea de todos os

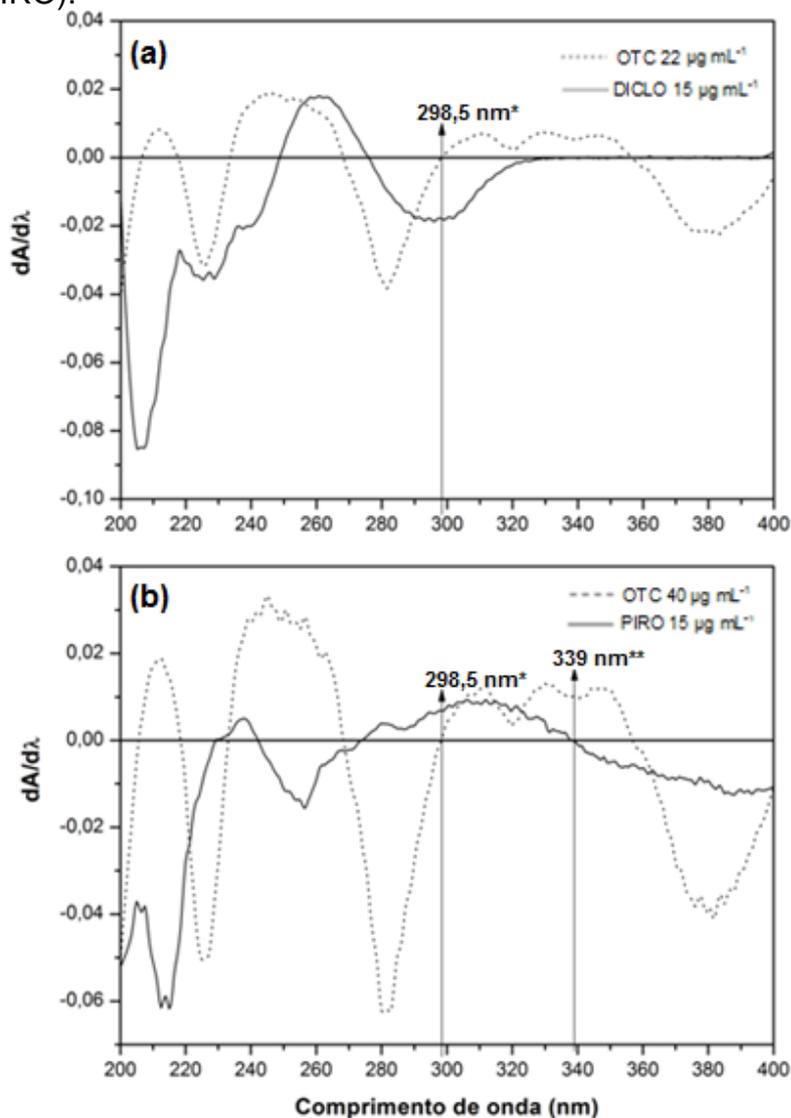
analitos por espectrofotometria de ordem zero devido à sobreposição (*overlapping*) das bandas de transição eletrônica dos espectros de UV. A quantificação de OTC na associação com DICLO foi uma exceção, pois foi realizada na ordem zero em 360 nm, uma vez que DICLO não apresenta absorção significativa nessa região do UV (Figura 3.1a).

Figura 3.1. Sobreposição dos espectros de absorção na ordem zero de (a) OTC e DICLO, bem como de (b) OTC e PIRO, obtidos a partir das soluções das SQC preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5. OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio e PIRO: piroxicam.*Comprimento de onda utilizado para quantificação direta de OTC na associação com DICLO.



Em seguida, os espectros de ordem zero de OTC e DICLO (Figura 3.1a), bem como de OTC e PIRO (Figura 3.1b) foram derivados para primeira ordem, com auxílio do programa Origin®, versão 8.0, com a finalidade de eliminar os problemas de sobreposição das bandas espectrais e estão demonstrados na Figura 3.2.

Figura 3.2. Sobreposição dos espectros de absorção na primeira derivada de (a) OTC e DICLO, bem como de (b) OTC e PIRO, obtidos a partir das soluções das SQC preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) pH 2,5. OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódioe PIRO: piroxicam. *Comprimento de onda utilizado para quantificação de DICLO e PIRO nas suas respectivas associações (ponto de anulação de OTC); **Comprimento de onda utilizado para quantificação de OTC na associação com PIRO (ponto de anulação de PIRO).



A técnica derivativa utilizada para a quantificação dos fármacos foi a do ponto de anulação ou *zero crossing* que consiste em medir o valor absoluto da amplitude do sinal analítico de um componente da mistura no comprimento de onda no qual a resposta do outro componente é nula (DONATO et al., 2010). Essa é a técnica mais utilizada para a quantificação de misturas binárias devido à praticidade e simplicidade (EL-SAYED; EL-SALEM, 2005). Portanto,

conforme observado na Figura 3.2, DICLO e PIRO foram quantificados, em suas respectivas associações com OTC, no comprimento de onda 298,5 nm (ponto de anulação para OTC nas duas misturas binárias). Enquanto que OTC, na associação com PIRO, foi quantificada em 339 nm (ponto de anulação para PIRO).

Embora nos espectros de primeira derivada de OTC (Figuras 3.2) existam outros pontos de anulação (em torno de 210, 220, 230, 270 e 360 nm), optou-se pelo ponto de anulação de 298,5 nm para análise de DICLO e PIRO, pois nos demais comprimentos de onda foram observados desvios na correlação linear entre as concentrações analisadas dos fármacos e os sinais obtidos, além de que abaixo de 260 nm existe a interferência de adjuvantes (ver adiante na avaliação da seletividade do método no item 3.2.2.4). Devido aos mesmos motivos, não foram escolhidos outros pontos de anulação no espectro de PIRO (Figura 3.2b) para análise de OTC.

Adicionalmente, salienta-se que os espectros na primeira derivada foram pré-processados, utilizando o filtro de suavização de Stavitzky e Golay (1964) com janela de 15 a 20 pontos e polinômio de 2ª ordem. Essa ferramenta tem a função de reduzir ruídos espectrais de alta frequência através da subdivisão do espaço amostral em subintervalos ímpares. Em seguida, com o método dos mínimos quadrados, se obtêm uma função polinomial, geralmente quadrática, onde o ponto central do intervalo é substituído pelo valor calculado através da função (PRESS et al., 2007).

3.2.2. Validação dos Métodos

3.2.2.1. Linearidade, Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD)

Conforme demonstrado na Tabela 3.10, os resultados obtidos com as curvas analíticas demonstraram correlação linear entre as concentrações analisadas e os sinais obtidos (absorvâncias ou derivada de primeira ordem), no intervalo de concentração utilizado, uma vez que os coeficientes de correlação linear foram superiores a 0,990 (BRASIL, 2017a,b).

Os valores de LQ e LD, demonstrados na Tabela 3.10, são satisfatórios para determinação simultânea ou isolada de OTC, DICLO e PIRO em medicamentos para uso animal ou humano.

Os métodos espectrofotométricos propostos para determinação de OTC (ordem zero e primeira derivada) apresentaram menores valores de LQ (1,11 e 1,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do que os desenvolvidos por Jelikić-Stankov e colaboradores (1989), bem como por Gallego e Arroyo (2002), uma vez que esses autores encontraram valores de LQ de, respectivamente, 200 e 185 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, esses métodos empregaram uma faixa linear de concentração mais ampla do que os autores anteriormente mencionados, os quais utilizaram o intervalo de concentração de 2,5 a 34,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (JELIKIĆ-STANKOV et al., 1989) e 2 a 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GALLEGO; ARROYO, 2002).

Também foram obtidos coeficientes de correlação linear superiores para DICLO e PIRO em relação aos encontrados em outros métodos espectrofotométricos derivativos descritos na literatura para quantificação desses fármacos em produtos farmacêuticos (BASAN et al., 2001; SZNITOWSKA; STOKROCKA, 2007).

Tabela 3.10. Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas dos fármacos em estudo.

Parâmetros	Associação OTC + DICLO		Associação OTC + PIRO	
	OTC	DICLO	OTC	PIRO
λ (nm)	360,0	298,5	339,0	298,5
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,0 – 80,0	1,5 – 25,0	10,0 – 80,0	2,5 – 30,0
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,03090x - 0,00342$	$y = 0,00121x - 0,00034$	$y = 0,00022x + 0,00010$	$y = 0,00054x - 0,00067$
Inclinação (a) \pm DP	$0,03090 \pm 0,00001$	$0,00121 \pm 0,00006$	$0,00022 \pm 0,00002$	$0,00054 \pm 0,00003$
Intercepto (b) \pm DP	$-0,00644 \pm 0,00342$	$-0,00034 \pm 0,00017$	$0,00010 \pm 0,00009$	$-0,00067 \pm 0,00008$
Coefficiente de correlação (r) \pm DP	$0,9999 \pm 0,00006$	$0,9998 \pm 0,00023$	$0,9997 \pm 0,00017$	$0,9997 \pm 0,00012$
Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,37	0,43	0,47	0,49
Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,11	1,31	1,44	1,47

Os valores são discriminados como Média \pm Desvio Padrão (DP) de três curvas analíticas geradas em três dias consecutivos ($n = 3$). OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam; λ : comprimento de onda.

A análise estatística para avaliação da linearidade dos métodos espectrofotométricos propostos encontra-se descrita na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Resultados da análise estatística para linearidade dos métodos espectrofotométricos propostos.

Testes Estatísticos ($\alpha=5\%$)	Associação OTC + DICLO		Associação OTC + PIRO	
	OTC	DICLO	OTC	PIRO
^a Teste de Cochran				
$C_{\text{calculado}}$	0,462	0,250	0,434	0,247
$C_{\text{crítico}}$	0,516	0,616	0,516	0,561
p -valor da regressão	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
^b p -valor Shapiro-Wilk	0,093	0,649	0,069	0,982

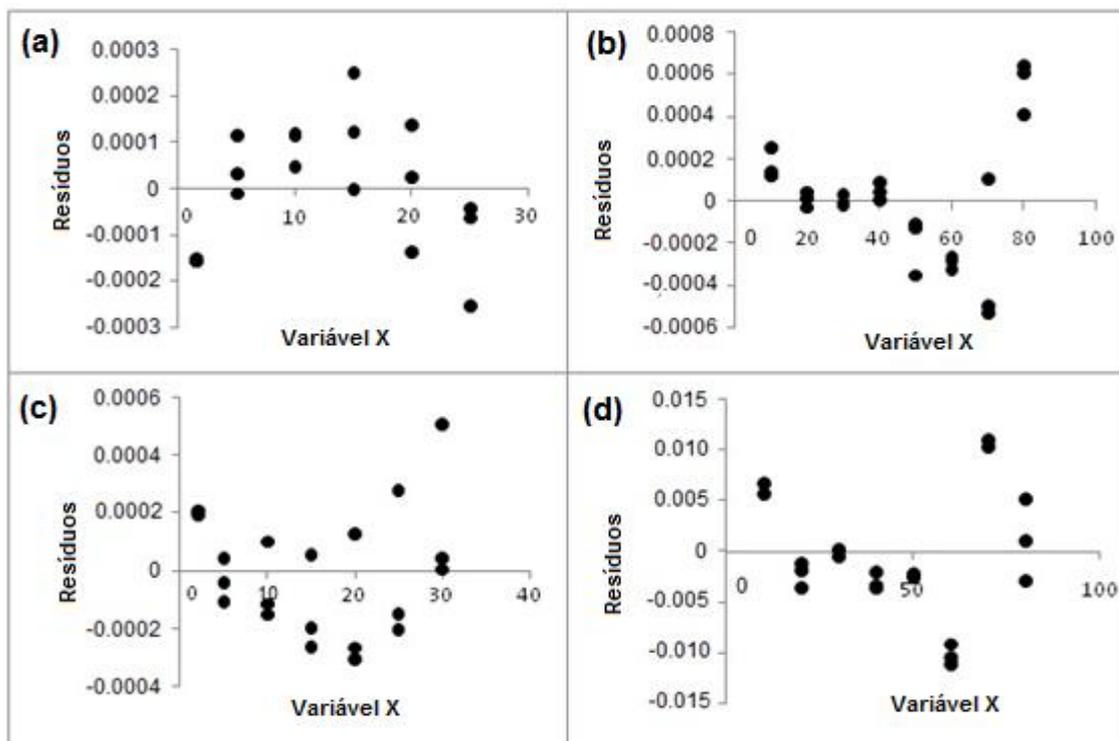
^a Análise da homocedasticidade dos dados obtidos para o eixo y da curva ($C_{\text{crítico}} = 0,561$); ^b Análise da normalidade dos resíduos obtidos a partir da regressão; OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

Os resultados obtidos com o teste de Cochran viabilizaram a aplicação do método dos Mínimos Quadrados Ordinários e demonstraram que dados em y (variável dependente) apresentam homocedasticidade (variância de y constante), uma vez que para os três fármacos os valores de $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$ (BRASIL, 2017b). O valor de p da regressão linear, obtido pelo teste ANOVA das curvas analíticas, foi altamente significativo ($p < 0,0001$), o que confirma a hipótese de proporcionalidade entre as variáveis x (concentração) e y (sinal analítico).

De acordo com o Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica (BRASIL, 2017b), resíduo é a diferença entre o valor encontrado de y e o valor estimado pelo modelo (equação) em um determinado ponto. Quando o erro do modelo é devido apenas às variações comuns de análise, espera-se que os resíduos sejam independentes entre si e tenham distribuição normal. Portanto, conforme mostrado na Tabela 3.11, todos os resíduos tiveram uma distribuição normal de acordo com os resultados obtidos no teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) (ANVISA, 2017b).

Além da utilização de testes estatísticos como o de Shapiro-Wilk, recomenda-se a avaliação visual dos gráficos de resíduos para a avaliação de da normalidade (ANVISA, 2017b). Desse modo, na Figura 3.3 encontram-se os gráficos de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica de cada fármaco, utilizando os métodos espectrofotométricos propostos.

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



Conforme observado na Figura 3.3, todos os gráficos de resíduo apresentam variância constante (homocedasticidade) e os valores obtidos estão próximos de zero, não havendo valores fora da faixa esperada (*outliers*) que é de ± 3 (CHAN, 2004).

3.2.2.2. Precisão

A Tabela 3.12 demonstra os resultados obtidos com o ensaio de precisão dos fármacos analisados através dos métodos espectrofotométricos desenvolvidos. Os valores obtidos para repetibilidade (precisão intradia) foram expressos em termos de Desvios Padrão Relativos (DPR), sendo esses inferiores ao limite máximo preconizado de 5,0% (ICH, 2005). A diferença entre as variâncias obtidas das seis determinações realizadas em dois dias consecutivos para cada nível de concentração demonstrou ser não significativa ($p > 0,05$) pelo teste-*t*. Desta forma, as médias das concentrações obtidas nos dias 1 e 2 não diferem significativamente, podendo considerá-las semelhantes, o que confirma a precisão intermediária dos métodos propostos.

Tabela 3.12. Ensaio de precisão dos fármacos analisados através dos métodos espectrofotométricos propostos.

Fármacos	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração de padrão adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor encontrado \pm DPR (%) ^c		Precisão Intermediária Teste- <i>t</i> ^d
			Repetibilidade		
Associação OTC + DICLO ^a			Dia 1	Dia 2	
	20,00	-----	99,57 \pm 0,20	100,40 \pm 0,24	<i>p</i> = 0,130
OTC	40,00	-----	100,41 \pm 0,33	100,77 \pm 0,29	<i>p</i> = 0,238
	60,00	-----	98,51 \pm 0,005	98,39 \pm 0,13	<i>p</i> = 0,535
	5,00	3,00	100,42 \pm 1,26	100,34 \pm 3,40	<i>p</i> = 0,985
DICLO	14,00	12,00	99,07 \pm 0,20	98,31 \pm 0,42	<i>p</i> = 0,627
	20,00	18,00	100,42 \pm 0,30	100,25 \pm 0,47	<i>p</i> = 0,944
Associação OTC + PIRO ^b					
	22,00	-----	94,20 \pm 0,46	95,42 \pm 1,36	<i>p</i> = 0,097
OTC	44,00	-----	95,76 \pm 0,67	96,46 \pm 0,30	<i>p</i> = 0,055
	66,00	-----	95,51 \pm 1,10	95,05 \pm 1,12	<i>p</i> = 0,599
	5,00	2,60	101,80 \pm 2,35	98,53 \pm 1,57	<i>p</i> = 0,237
PIRO	14,40	12,00	100,98 \pm 3,07	100,33 \pm 1,41	<i>p</i> = 0,949
	22,40	20,00	100,82 \pm 0,32	100,65 \pm 2,32	<i>p</i> = 0,987

^aTerramicina Mais®: oxitetraciclina (OTC) + diclofenaco de sódio (DICLO); ^bTerracam Plus®: OTC + piroxicam (PIRO); ^cMédia \pm Desvio Padrão Relativo (*n* = 6), sendo que para DICLO e PIRO as concentrações de padrão adicionadas foram subtraídas antes de calcular o teor presente na amostra; ^d Teste-*t* de Student bicaudal (IC=95%).

3.2.2.3. Exatidão

Os valores obtidos para a recuperação da quantidade de solução padrão de cada fármaco adicionado às respectivas soluções amostras estão apresentados na Tabela 3.13. As quantidades de OTC, DICLO e PIRO recuperadas encontraram-se dentro dos limites aceitáveis de 98-102% para todos os três níveis de concentração analisados e o DPR da média desses níveis esteve abaixo de 2,0% (AOAC, 2005). Portanto, os métodos espectrofotométricos desenvolvidos possuem exatidão adequada para

determinação simultânea de OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO em medicamentos injetáveis para uso animal.

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

Fármacos	Concentração teórica adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^c	Recuperação (%)	
			Resultado	Média \pm DPR (%)
Associação OTC + DICLO^a				
OTC	20,00	19,84	99,19	100,67 \pm 0,44
	40,00	40,61	101,54	
	60,00	60,78	101,29	
DICLO	3,00	3,05	101,69	100,75 \pm 0,29
	12,00	12,04	100,35	
	18,00	18,03	100,19	
Associação OTC + PIRO^b				
OTC	20,00	19,73	98,64	99,87 \pm 0,74
	40,00	40,45	101,14	
	60,00	59,91	99,85	
PIRO	2,60	2,61	100,30	100,60 \pm 1,05
	12,00	12,22	101,80	
	20,00	19,94	99,71	

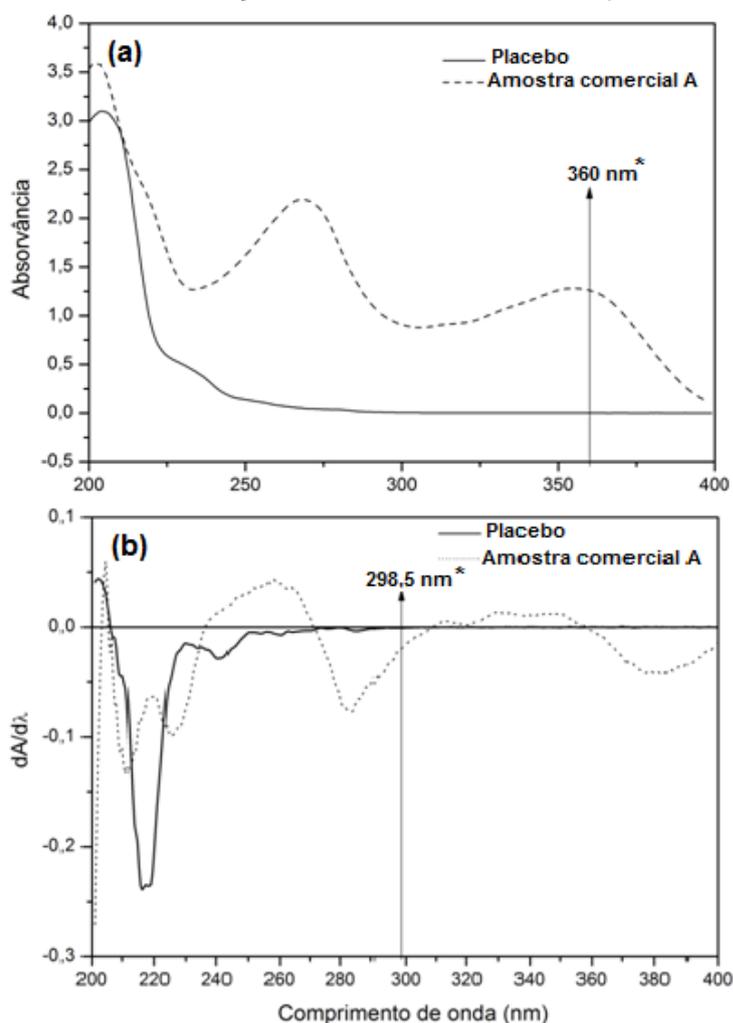
^aTerramicina Mais[®]: oxitetraciclina (OTC) + diclofenaco de sódio (DICLO); ^bTerracam Plus[®]: OTC + piroxicam (PIRO); ^c Média de 3 determinações. DPR: Desvio Padrão Relativo.

3.2.2.4. Seletividade

A Figura 3.4 ilustra os espectros da solução da amostra comercial A (Terramicina Mais[®]) na ordem zero (Figura 3.4a) e na primeira derivada (Figura 3.4b) sobrepostos aos respectivos espectros da solução dos adjuvantes (placebo). É possível observar que os adjuvantes comumente presentes nas soluções injetáveis para uso animal apresentam absorção abaixo de 260 nm. Todavia, não apresentam sinal analítico nos comprimentos de onda nos quais

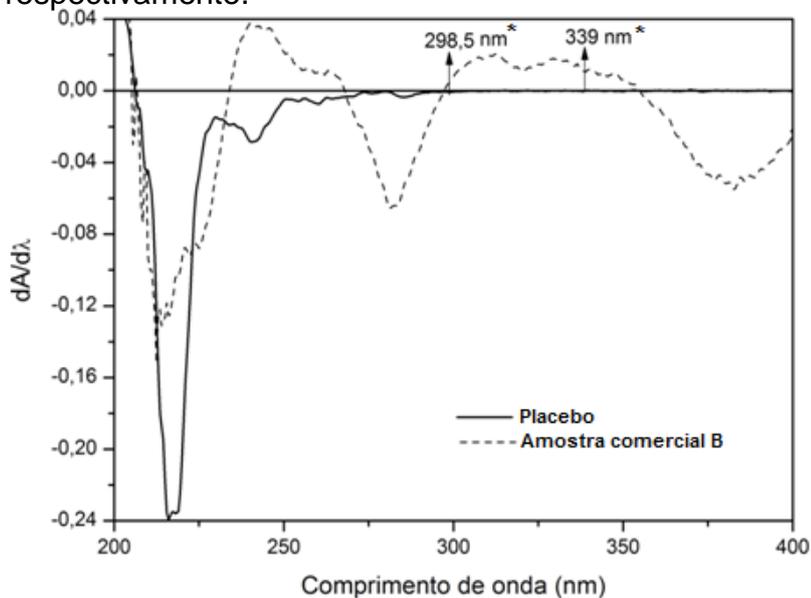
os fármacos são analisados, isto é, na ordem zero em 360 nm (OTC) e na primeira derivada e 298,5 nm (DICLO). Portanto, não interferem na análise espectrofotométrica de OTC e DICLO, respectivamente, no produto acabado.

Figura 3.4. Espectros na (a) ordem zero e (b) primeira derivada da solução da amostra comercial A sobrepostos aos respectivos espectros da solução placebo. Amostra comercial A: Terramicina Mais[®], contendo 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OTC e 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DICLO. *298,5 e 360 nm compreendem aos comprimentos de onda utilizados na determinação de DICLO e OTC, respectivamente.



A Figura 3.5 mostra o espectro na primeira derivada da solução amostra comercial B sobreposto ao espectro da solução placebo. Através da análise dessa figura, é possível constatar que os principais adjuvantes presentes nas soluções injetáveis à base de OTC não apresentam sinal analítico na primeira derivada nos comprimentos de onda onde OTC e PIRO são analisados, ou seja, 339 e 298,5 nm, respectivamente.

Figura 3.5. Espectros na primeira derivada da solução da amostra comercial B sobreposto ao espectro da solução placebo. Amostra comercial B: Terracam Plus®, contendo 44 µg mL⁻¹ de OTC e 14,4 µg mL⁻¹ de PIRO. *298,5 e 339 nm compreendem aos comprimentos de onda utilizados na determinação de PIRO e OTC, respectivamente.



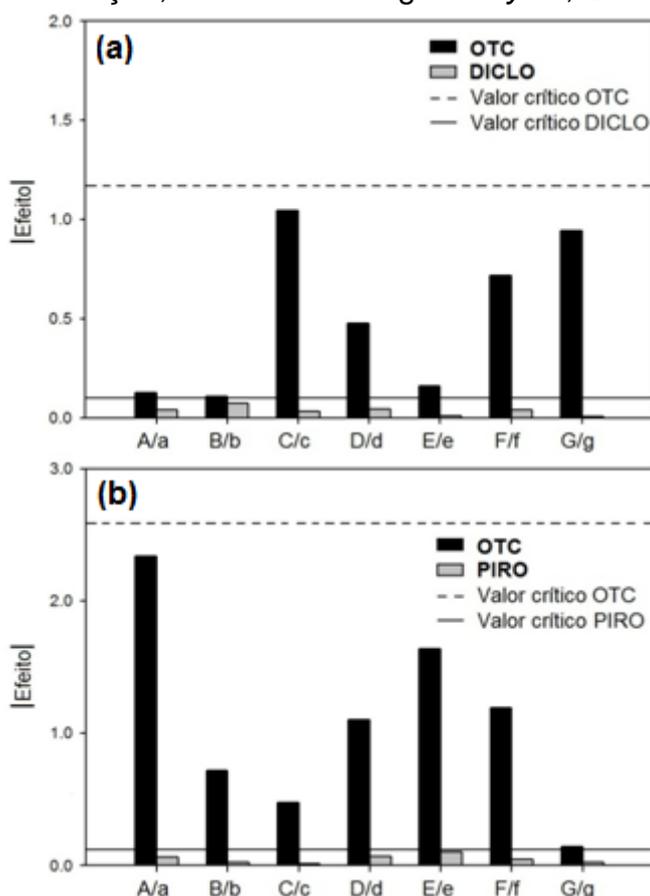
Esses resultados evidenciam a seletividade dos métodos desenvolvidos para quantificação simultânea de OTC e DICLO, bem como de OTC e PIRO em produtos farmacêuticos veterinários.

3.2.2.5. Robustez

A Figura 3.6 mostra os valores absolutos dos *Efeitos* sobre os teores dos fármacos nas amostras analisadas através do teste de Youden-Steiner. Os valores críticos ($\sqrt{2S}$) para OTC e DICLO foram, respectivamente, de 1,17 e 0,10 (Figura 3.6a). Para OTC e PIRO os valores críticos foram, respectivamente, 2,59 e 0,12 (Figura 3.6b).

Nenhuma alteração nos parâmetros selecionados para o método proposto resultou em valores absolutos de *Efeito* acima dos valores críticos para cada fármaco, indicando que o método manteve-se robusto frente às alterações a que foi submetido. No entanto, o efeito que mais se aproximou do valor crítico foi a variação no tempo de sonicação (E) de PIRO. Isso pode ser explicado pelo fato do aumento no tempo de sonicação ter influenciado na solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, no sinal analítico observado na primeira derivada.

Figura 3.6. Efeitos observados no ensaio de robustez da associação de (a) oxitetraciclina e diclofenaco de sódio e (b) oxitetraciclina e piroxicam, obtidos através do teste de Youden-Steiner. Letras de A a G representam os fatores selecionados, sendo as letras maiúsculas as condições normais e as minúsculas as condições alteradas, sendo A: proporção de acetonitrila; B: fornecedor de acetonitrila; C: pH da mistura de solvente; D: comprimento de onda; E: tempo de sonicação; F: filtro de seringa de *nylon*; G: temperatura.



A Tabela 3.14 mostra os resultados dos teores obtidos para os fármacos analisados durante a avaliação da robustez dos métodos espectrofotométricos empregando-se o teste de Youden-Steiner. Conforme é possível observar nessa Tabela, os valores de teores das condições alteradas estiveram próximos daqueles obtidos nas condições normais as quais os métodos foram desenvolvidos, permanecendo na faixa aceitável de variação de 90 a 115% para OTC (USP, 2015), 90 a 110% para DICLO (USP, 2015) e 92,5 a 107,5% para PIRO (USP, 2015).

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

Condição	Teor (%) ^a							
	OTC		DICLO		OTC		PIRO	
	N	A	N	A	N	A	N	A
Proporção de acetonitrila	95,95	96,26	102,65	100,76	97,70	92,38	96,91	99,62
Fornecedor de acetonitrila	96,24	95,97	99,90	103,51	95,85	94,22	98,80	97,73
pH da mistura de solvente	97,41	94,80	103,68	101,13	95,58	94,50	98,23	98,67
Comprimento de onda	95,51	96,70	102,79	100,62	93,78	96,29	96,78	99,75
Tempo de sonicação	96,30	95,90	101,89	101,52	96,90	93,17	96,09	100,44
Filtro seringa de nylon	97,46	95,67	102,72	100,69	93,75	96,46	99,24	97,29
Temperatura da sala	97,28	94,93	101,83	101,58	95,20	94,88	98,74	97,79

^a Média de 3 determinações.

3.2.3. Aplicabilidade dos Métodos

A Tabela 3.15 traz a análise dos medicamentos através dos métodos espectrofotométricos propostos.

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

Medicamentos	Teor ± DPR (%) ^a		
	OTC	DICLO	PIRO
Amostra A	101,55 ± 1,10 ^b	99,66 ± 1,15 ^d	-----
Amostra B	101,80 ± 0,79 ^c	-----	99,88 ± 1,17 ^d
Amostra C	101,65 ± 0,65 ^b 100,94 ± 2,14 ^c	-----	-----
Amostra D	-----	98,32 ± 0,05 ^d	-----
Amostra E	-----	102,41 ± 0,14 ^d	-----
Amostra F	-----	-----	97,73 ± 0,95 ^d
Amostra G	-----	-----	98,39 ± 0,77 ^d

^a Média de 3 determinações ± Desvio Padrão Relativo (DPR); ^b ordem zero (360 nm); ^c primeira derivada (339 nm); ^d primeira derivada (298,5 nm); Amostras A e B: soluções injetáveis para uso animal, sendo a amostra A Oxitrat La Pus[®] (OTC 20,0% + DICLO 1,0%) e a B Terracam Plus[®] (OTC 22,0% + PIRO 1,2%). Amostras C-G: medicamentos para uso humano, sendo a amostra C Terramicina[®] cápsulas 500 mg, a D comprimidos revestidos de diclofenaco de sódio Genérico 50 mg, a E Diclofarma[®] solução injetável 25 mg mL⁻¹, a F cápsulas de piroxicam Genérico 20 mg e a G Feldene[®] solução injetável 20 mg mL⁻¹. As linhas pontilhadas (----) indicam que o fármaco não faz parte da composição do medicamento.

Os teores dos fármacos foram comparados com os estabelecidos nas monografias oficiais individuais de produtos acabados contendo os fármacos na forma isolada. Assim sendo, foram adotados os seguintes limites descritos na Farmacopeia Americana (USP, 2015): 90 a 115% preconizado para OTC em solução injetável, 92,5 a 107,5% para PIRO em cápsulas e 90 a 110% para DICLO em comprimidos de liberação controlada. Conforme consta na Tabela 3.15, todos os medicamentos analisados através dos métodos espectrofotométricos desenvolvidos e validados apresentaram teores de fármacos dentro dos limites preconizados.

Portanto, os métodos espectrofotométricos propostos foram capazes de determinar simultaneamente OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO em soluções injetáveis veterinárias. Além disso, esses métodos também puderam ser aplicados para determinação destes fármacos na forma isolada em medicamentos para uso humano.

3.3. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos, baseados na espectrofotometria de ordem zero e primeira derivada, simples, sensíveis, exatos, robustos e seletivos para determinação simultânea de OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO em soluções injetáveis veterinárias. Além disso, os métodos propostos podem ser utilizados na quantificação isolada desses fármacos em medicamentos para uso humano.

CAPÍTULO IV

ANÁLISE QUANTITATIVA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Neste capítulo encontra-se descrito o desenvolvimento e validação do método analítico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação simultânea das associações de oxitetraciclina com diclofenaco de sódio ou com piroxicam em soluções injetáveis veterinárias, bem como sua aplicação para a quantificação desses fármacos isolados em medicamentos para uso humano. Também será apresentada a comparação estatística entre os métodos espectrofotométricos e o por CLAE a fim de verificar a existência de equivalência analítica.

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. Substâncias Químicas de Referência Caracterizadas (SQC)

Foram utilizadas as mesmas SQC de OTC, DICLO e PIRO empregadas no desenvolvimento e validação dos métodos espectrofotométricos (Capítulo III).

4.1.2. Amostras Comerciais

As amostras comerciais, na forma de soluções injetáveis, utilizadas no desenvolvimento e validação do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram adquiridas no comércio agropecuário de Campo Grande – MS e encontram-se descritas na Tabela 4.1.

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

Nome comercial	Laboratório	Composição	Lote
Oxirat La Plus®	Vallée	OTC 20,0% + DICLO 1,0%	038-14
Terracam Plus®	União Química	OTC 22,0% + PIRO 1,2%	1423270

OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

4.1.3. Desenvolvimento do Método Cromatográfico

Todas as soluções utilizadas no desenvolvimento do método cromatográfico foram previamente filtradas com o auxílio de filtro de seringa constituído por membrana de *nylon* estéril com poro de 0,22 µm e 25 mm de diâmetro (Saint Vallen®).

As fases móveis empregadas foram compostas por diferentes proporções de solvente orgânico de grau espectroscópico (acetonitrila e metanol, Vetec®) e de água ultrapura obtida por sistema de filtração Direct-Q®3 UV (18,2 µΩ cm⁻¹, 25°C - Merck Millipore®). Para o ajuste do pH foram testados os ácidos etilenodiaminotetracético (EDTA, Synth®), *orto*-fosfórico (Synth®), trifluoroacético (Sigma-aldrich®), utilizando medidor de pH de bancada da marca MS Tecnopon® modelo mPA210. Posteriormente, cada solvente foi filtrado em membrana de *nylon* (0,45 µm, Sorbline®), sob vácuo, armazenado

degaseificado durante 15 minutos em banho ultrassônico Unique® modelo Ultracleaner 1400.

A análise por CLAE foi realizada em cromatógrafo a líquido Thermo Fisher Scientific®, modelo Ultimate 3000 UHPLC *focused* (Massachusetts, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) Ultimate 3000 RS, injetor manual com *loop* fixo de 20 μL e bomba gradiente binária Ultimate 3000, conectados a um microcomputador operado pelo programa Chromeleon® 7.1. A separação cromatográfica foi conduzida em condições isocráticas e foram testadas diferentes colunas analíticas de fase reversa (C_8 e C_{18}), bem como vazões entre 0,80 e 1,2 mL min^{-1} a fim de obter uma eficiente separação entre os fármacos em um curto tempo de análise. Para a escolha dos comprimentos de onda apropriados para a quantificação dos fármacos, foram feitas varreduras espectrais no intervalo de 200 a 400 nm, utilizando o detector DAD.

4.1.4. Conformidade do Sistema Cromatográfico

A conformidade do sistema cromatográfico foi verificada de forma simultânea para os três fármacos, injetando seis replicatas da solução, preparada em fase móvel (metanol:acetonitrila:água, 40:35:25, v/v/v, pH 2,5 ajustado com ácido *orto*-fosfórico), contendo, respectivamente, 8,0 1,8 e 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das SQC de OTC, PIRO e DICLO.

Posteriormente, os parâmetros que avaliam a conformidade do sistema, tais como: assimetria (A_s), número de pratos (N), resolução (R_s) e fator de retenção (k') foram automaticamente determinados pelo programa Chromeleon® 7.1. Em seguida, os desvios padrão relativos (DPR) desses parâmetros, das áreas e dos tempos de retenção (t_R) dos picos dos analitos foram calculados com a finalidade de averiguar a repetibilidade das análises.

Além disso, o detector DAD, com auxílio do programa Chromeleon® 7.1, permitiu determinar a pureza do pico cromatográfico de cada fármaco. Esse parâmetro foi avaliado através da sobreposição dos espectros de UV extraídos de três pontos do pico cromatográfico (ápice, parte inicial ou frontal, parte posterior ou cauda). Os valores foram obtidos como fator de similaridade que varia de 0 (absolutamente sem similaridade) a 1000 (espectros idênticos) (STAHL, 2003; MAIO et al., 2006).

4.1.5. Validação do Método

A validação do método foi realizada de acordo com o preconizado pelos seguintes guias de validação de métodos analíticos: *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005), *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC, 2005), *Food and Drug Administration* (FDA, 2004) e Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017a).

Foram avaliados os parâmetros analíticos de linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, seletividade e robustez. Os resultados foram analisados estatisticamente através dos programas Microsoft Excel® (2010) e *Origin Pro 8.0*® (2007).

Soluções padrões-estoques e amostras-estoques foram utilizadas nos experimentos de validação do método analítico, sendo preparadas conforme descrito a seguir:

- **Preparo das Soluções Padrões-estoques**

As soluções padrões-estoques foram preparadas pesando-se, analiticamente, 10 mg de cada SQC (OTC, DICLO e PIRO) que foram transferidos, separadamente, para balões volumétricos de 100 mL, adicionando-se, aproximadamente 50 mL de acetonitrila. Em seguida, as soluções foram levadas ao banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente, completaram-se os volumes para 100 mL com acetonitrila, obtendo soluções de 100 µg mL⁻¹. Para avaliação da exatidão da associação de OTC e PIRO as soluções padrões-estoques foram preparadas do mesmo modo, porém na concentração de 120 µg mL⁻¹. É válido ressaltar que para o preparo da solução padrão de OTC foi considerado o fator de correção, informado no certificado de análise do fornecedor ($f_c = 1,11$).

- **Preparo das Soluções Amostras-estoques**

Foram utilizadas as seguintes amostras comerciais, previamente descritas na Tabela 3.1, para os experimentos de validação do método de CLAE-DAD: Oxitrat La Plus® (Amostra A) e Terracam Plus® (Amostra B). Com auxílio de uma pipeta automática, transferiu-se, separadamente, 500 µL das amostras comerciais A e B para balões volumétricos de 50 mL, adicionando, aproximadamente, 25 mL de água ultrapura. Em seguida, as soluções foram

levadas ao banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente, completaram-se os volumes para 50 mL com o mesmo solvente, obtendo as seguintes soluções-estoques: *Amostra A*: OTC a 2000 µg mL⁻¹ e DICLO a 100 µg mL⁻¹ e *Amostra B*: OTC a 2200 µg mL⁻¹ e PIRO a 120 µg mL⁻¹.

4.1.5.1. Parâmetros Analíticos

4.1.5.1.1. Linearidade

Foi avaliada através de três curvas analíticas construídas, separadamente, para cada fármaco e obtidas através de diluições das respectivas soluções padrão-estoques. As curvas analíticas de OTC foram construídas no intervalo de concentração de 5,0 a 35,0 µg mL⁻¹, enquanto que as de DICLO foram obtidas no intervalo de 0,4 a 1,6 µg mL⁻¹ e as de PIRO no intervalo de 0,6 a 1,8 µg mL⁻¹.

As equações da reta foram determinadas pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A estatística da linearidade foi realizada a partir das seguintes testes: confirmação da homocedasticidade dos valores em y (teste de Cochran), análise da variância (ANOVA) da regressão linear, avaliação da normalidade dos resíduos através da análise visual do gráfico e teste estatístico da Shapiro-Wilk (BRASIL, 2017a,b).

4.1.5.1.2. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de OTC, DICLO e PIRO foram determinados a partir das três curvas analíticas obtidas de cada fármaco, utilizando as equações 4.1 e 4.2, respectivamente, para o cálculo do LD e LQ:

$$\text{Equação 4. 1: LD} = 3,3 \times \frac{SD}{a}$$

$$\text{Equação 4. 2: LQ} = 10,0 \times \frac{SD}{a}$$

Em que:

SD = desvio padrão do intercepto; a = média dos valores de inclinação das curvas analíticas.

4.1.5.1.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada através da precisão intradia (repetibilidade) e precisão interdia (precisão intermediária). A repetibilidade foi determinada através da análise das soluções das amostras comerciais A e B, nas quais os fármacos foram analisados em uma única concentração que contemplou o intervalo linear do método. Assim, alíquotas de 250 μL das soluções amostras-estoques A e B (descritas anteriormente) foram transferidas, separadamente, para balões volumétricos 25 mL. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo as concentrações finais de: *Amostra A*: OTC 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e DICLO 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e *Amostra B*: OTC: 22,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e PIRO 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em dez replicatas em um mesmo dia.

A precisão intermediária foi avaliada através do preparo de novas soluções amostras-estoques A e B. Em seguida, realizaram-se diluições a fim de obter soluções com as mesmas concentrações empregadas no ensaio de repetibilidade. Essa análise foi realizada durante três dias consecutivos, por dois analistas diferentes, e as áreas obtidas foram registradas em dez replicatas.

Os resultados do ensaio de repetibilidade foram expressos em termos de desvios padrão relativos (%DPR) e os da precisão intermediária foram estatisticamente avaliados através da análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%.

4.1.5.1.4. Exatidão

A exatidão do método foi determinada através de ensaios de recuperação, realizados por meio da adição de quantidades conhecidas de soluções padrão às soluções das amostras comerciais. Devido à considerável diferença de concentração entre os fármacos nas soluções injetáveis, em que a OTC é o principal componente e está cerca de 20 vezes mais concentrada que os anti-inflamatórios não esteroidais, os ensaios de exatidão foram realizados separadamente para cada fármaco, a fim de contemplar seus respectivos intervalos lineares de concentração. O preparo das soluções para a avaliação da exatidão das associações encontra-se descrito a seguir:

- **Avaliação da exatidão da associação OTC + DICLO**

Preparo das soluções padrão

A partir de soluções padrões-estoques de OTC e DICLO a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, transferiram-se, separadamente, alíquotas de 20 mL e 5 mL para balões volumétricos de 50 mL, respectivamente. Os volumes dos balões foram completados com fase móvel, obtendo solução padrão com concentração final de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para OTC e com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DICLO.

Preparo das soluções amostras

A partir da solução amostra-estoque A, contendo $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OTC e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DICLO transferiram-se, respectivamente, alíquotas de 500 μL e 5 mL para balões volumétricos de 25 mL e 50 mL. Os volumes dos balões foram completados com fase móvel. O primeiro balão (25 mL) foi utilizado para avaliação da recuperação de OTC na concentração teórica de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o segundo (50 mL) foi usado para o ensaio de recuperação de DICLO na concentração teórica de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As Tabelas 4.2 e 4.3 ilustram, respectivamente, o preparo das soluções empregadas no ensaio de recuperação de OTC e DICLO para avaliação da exatidão do método cromatográfico proposto.

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

Balão volumétrico (10 mL) ^b	Solução padrão $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (μL) ^c	Solução amostra A $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (μL) ^c	Concentração final ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^d
Amostra	-----	2000	8,0
R1	2000	2000	16,0
R2	4000	2000	24,0
R3	6000	2000	32,0
Padrão	2000	-----	8,0

^aOxitrat La Plus[®]; ^bvolume completado com fase móvel; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática; ^dleituras realizadas em triplicata à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

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

Balão volumétrico (10 mL) ^b	Solução padrão 10 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Solução amostra A 10 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Concentração final (µg mL ⁻¹) ^d
Amostra	-----	500	0,50
R1	500	500	1,00
R2	750	500	1,25
R3	1000	500	1,50
Padrão	500	-----	0,50

^aOxitrat La Plus®; ^bvolume completado com fase móvel; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática; ^dleituras realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 2°C).

- **Avaliação da exatidão da associação OTC + PIRO**

Preparo das soluções padrão

A partir de soluções padrões-estoques de OTC e PIRO a 120 µg mL⁻¹, transferiram-se alíquotas de 10 mL e 5 mL para balões volumétricos de 25 mL e 100 mL, respectivamente. Posteriormente, os volumes foram completados com fase móvel, obtendo solução padrão com concentração final de 44 µg mL⁻¹ para OTC e com 6 µg mL⁻¹ para PIRO.

Preparo das soluções amostras

A partir da solução amostra-estoque B, contendo 2200 µg mL⁻¹ de OTC e 120 µg mL⁻¹ de PIRO, transferiram-se, respectivamente, alíquotas de 500 µL e 5 mL para balões volumétricos de 25 mL e 100 mL. Posteriormente, os volumes foram completados com fase móvel. O primeiro balão (25 mL) foi utilizado para avaliação da recuperação de OTC com concentração teórica de 44 µg mL⁻¹, enquanto o segundo (100 mL) foi usado para o ensaio de recuperação de PIRO na concentração teórica de 6 µg mL⁻¹.

As Tabelas 4.4 e 4.5 ilustram, respectivamente, o preparo das soluções utilizadas no ensaio de recuperação de OTC e PIRO para avaliação da exatidão do método cromatográfico proposto.

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

Balão volumétrico (10 mL) ^b	Solução padrão 44 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Solução amostra B 44 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Concentração final (µg mL ⁻¹) ^d
Amostra	-----	1500	6,6
R1	2000	1500	15,4
R2	4000	1500	24,2
R3	6000	1500	33,0
Padrão	1500	-----	6,6

^aTerracam Plus®; ^bvolume completado com fase móvel; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática; ^dleituras realizadas em triplicata à temperatura ambiente (24 ± 2°C).

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

Balão volumétrico (10 mL) ^b	Solução padrão 6 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Solução amostra B 6 µg mL ⁻¹ (µL) ^c	Concentração final (µg mL ⁻¹) ^d
Amostra	-----	1000	0,6
R1	1000	1000	1,2
R2	1500	1000	1,5
R3	2000	1000	1,8
Padrão	1000	-----	0,6

^aTerracam Plus®; ^bvolume completado com fase móvel; ^calíquotas transferidas com auxílio de pipeta automática; ^dleituras realizadas em triplicata à temperatura ambiente (24 ± 2°C).

- **Cálculo da Porcentagem de Recuperação**

As porcentagens de recuperação (R) foram calculadas pela Equação 4.3 (AOAC, 2005).

$$\text{Equação 4.3: } R = [C_A - C_{NA})/C_P] \times 100$$

Em que:

C_A = concentração de fármaco encontrada na amostra adicionada de padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

C_{NA} = concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

C_P = concentração teórica de padrão adicionada na amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.1.5.1.5. Seletividade

A seletividade foi verificada através da avaliação da interferência dos adjuvantes na quantificação dos fármacos presentes nas associações em estudo. Portanto, compararam-se os cromatogramas das amostras industrializadas com o cromatograma da mistura dos adjuvantes (placebo) comumente presentes em soluções injetáveis de uso veterinário à base de oxitetraciclina (Ourotetra OF, 2011).

Desse modo, foram preparadas soluções das amostras comerciais A e B em fase móvel a partir das soluções amostras-estoques, obtendo as concentrações de: *Amostra A*: OTC 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e DICLO 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e *Amostra B*: OTC 22,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e PIRO 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Paralelamente, foi preparada, em fase móvel, uma solução contendo a mistura dos seguintes adjuvantes: óxido de magnésio (1,9% m/v), 2-pirrolidona (33,3% v/v), álcool benzílico (1,05% v/v) e água ultrapura (qsp para 100 mL) (Ourotetra OF, 2011). O preparo da solução placebo seguiu o mesmo procedimento experimental descrito para as soluções amostras.

A seletividade do método por CLAE-DAD também foi analisada através da realização do estudo de degradação forçada que se encontra detalhadamente descrito no próximo capítulo (Capítulo V).

4.1.5.1.6. Robustez

A robustez foi avaliada através do modelo fatorial proposto por Plackett-Burman (1944), no qual se utiliza uma matriz composta de 15 experimentos, variando sete parâmetros em três níveis: normal (0), superior (+1) e inferior (-1). Na Tabela 3.6 é apresentado o modelo fatorial de Plackett-Burman, em que as letras de A a G representam os parâmetros selecionados, e os

números de 1 a 15 representam os de experimentos realizados ($2n + 1$), sendo que n é o número de parâmetros ($n=7$).

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

Parâmetro	Combinação Fatorial														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0
B	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0
C	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1
D	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0
E	0	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1
F	1	0	1	0	0	1	1	0	-1	0	-1	0	0	-1	-1
G	1	1	0	1	0	0	1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1

A-G: fatores selecionados; 1-15: número de experimentos $2n + 1$, em que n = número de fatores; 1, 0 e -1: níveis superiores, normais e inferiores, respectivamente.

A Tabela 4.7 mostra a relação dos sete parâmetros selecionados, bem como os níveis de variações testados.

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

Fatores	Unidade	Limite	Varição (-1)	Normal (0)	Varição (1)
A. Proporção de metanol na fase móvel	% (v/v)	± 2	38	40	42
B. Fornecedor de metanol	-----	-----	J.T.Baker®	Vetec®	J.T.Baker®
C. pH da fase móvel	-----	± 1	2,4	2,5	2,6
D. Vazão da fase móvel	mL min ⁻¹	± 1	0,9	1,0	1,1
E. Comprimento de onda	nm	± 1	274 ^a 349 ^b	275 ^a 350 ^b	276 ^a 351 ^b
F. Fornecedor da coluna	-----	-----	Thermo Hypersil® (Thermo Fischer)	InertSustain® (GL Science)	Thermo Hypersil® (Thermo Fischer)
G. Temperatura da sala	°C	± 2	22	25	28

^a Comprimentos de onda utilizados para análise da robustez de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio; ^b Comprimentos de onda utilizados para análise da robustez de piroxicam; 1, 0 e -1: níveis superiores, normais e inferiores, respectivamente.

Para a avaliação da robustez utilizou-se soluções das amostras comerciais A e B preparadas, em fase móvel, nas concentrações de: *Amostra A*: OTC 20,0 µg mL⁻¹ e DICLO 1,0 µg mL⁻¹ e *Amostra B*: OTC 22,0 µg mL⁻¹ e PIRO 1,2 µg mL⁻¹. Os resultados obtidos foram calculados usando a metodologia proposta por Youden e Steiner (1975), que se baseia na capacidade do método de se manter inalterado frente às deliberadas alterações dos parâmetros analíticos. Essas alterações são avaliadas pelo *Efeito (E)*, que consiste num valor numérico obtido da diferença entre as médias aritméticas dos teores obtidos nos experimentos que empregam o parâmetro em avaliação nas condições normais (0) e nas condições alteradas (-1 ou 1).

A Equação 4.4 exemplifica o cálculo do *Efeito* correspondente à alteração no parâmetro pH da fase móvel (C) para o nível 1 (superior), em que os numeradores 1, 2, 6 e 8 correspondem às médias aritméticas dos teores obtidos para cada experimento no nível normal (0). Já os numeradores 3,4,5 e 7, são as médias aritméticas dos teores encontrados no nível superior (1).

$$\text{Equação 4.4: } E_{C/c} = \frac{1 + 2 + 6 + 8}{4} - \frac{3 + 4 + 5 + 7}{4}$$

A significância dos *Efeitos (E)* foi avaliada conforme Equação 4.5, na qual, para um método ser considerado robusto, os valores em absoluto de *E* devem ser menores do que o valor crítico encontrado em $\sqrt{2S}$ (NEVADO et al., 2006).

$$\text{Equação 4.5: } |E| < \sqrt{2S}$$

$$\text{Sendo: } S = \sqrt{\frac{2}{7} (E_{A/a}^2 + E_{B/b}^2 + \dots + E_{G/g}^2)}$$

3.1.6. Aplicabilidade do Método

Além das amostras comerciais A (Oxitrat La Plus[®], composta por OTC 20,0% e DICLO 1,0%) e B (Terracam Plus[®], composta por OTC 22,0% e PIRO 1,2%), outras duas soluções injetáveis para uso animal foram analisadas com o método cromatográfico proposto, sendo elas: Terramicina Mais[®] (Zoetis, amostra C) e Ourotetra Plus La[®] (Ourofino Saúde Animal, amostra D), ambas compostas pela associação de OTC 20,0% e DICLO 1,0%.

Com a finalidade de verificar a aplicabilidade do método por CLAE-DAD para quantificação dos fármacos isolados, os seguintes medicamentos para uso humano foram analisados: cápsulas de Terramicina[®] (Pfizer), contendo cloridrato de OTC 500 mg (amostra E); comprimidos revestidos de diclofenaco de sódio Genérico 50 mg (EMS, amostra F); solução injetável Diclofarma[®] (Farmace), contendo 25 mg mL⁻¹ de DICLO (amostra G); cápsulas de piroxicam Genérico 20 mg (EMS, amostra H) e solução injetável Feldene[®] (Pfizer), contendo 20 mg mL⁻¹ de PIRO (amostra I).

A partir das soluções amostras-estoques descritas anteriormente, preparadas em água, foram realizadas diluições, em fase móvel, obtendo as seguintes concentrações teóricas: amostras A, C e D contendo OTC a 20,0 µg mL⁻¹ e DICLO a 1,0 µg mL⁻¹; amostra B contendo OTC a 22,0 µg mL⁻¹ e PIRO a 1,2 µg mL⁻¹; amostra E contendo OTC a 20,0 µg mL⁻¹; amostras F e G contendo DICLO a 1,0 µg mL⁻¹ e amostras H e I contendo PIRO a 1,2 µg mL⁻¹. As quantidades de cada fármaco, tanto nos medicamentos para uso animal quanto nos para uso humano, foram determinadas, em triplicata, a partir das respectivas curvas analíticas.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1. Desenvolvimento do Método Cromatográfico

Durante a etapa de desenvolvimento do método de CLAE encontrou-se dificuldade na separação cromatográfica de oxitetraciclina (OTC), uma vez que esse fármaco, quando comparado com o diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO), apresenta o mecanismo de separação mais complexo devido à existência de diferentes grupos funcionais que interagem com a sílica presente na maioria das fases estacionárias empregadas em CLAE (PENA; LINO; SILVEIRA, 1997).

Os antimicrobianos da classe das tetraciclinas frequentemente formam complexos com íons metálicos adsorvidos no material de enchimento das colunas de fase reversa, resultando em mecanismos complicados de separação cromatográfica e na obtenção de picos assimétricos (PENA; LINO; SILVEIRA, 1997). Assim sendo, a obtenção de uma eficiente análise cromatográfica de OTC foi o fator limitante que norteou a escolha das fases

estacionária e móvel empregadas na quantificação simultânea desse fármaco em associação com DICLO ou PIRO em soluções injetáveis para o uso animal.

Na Tabela 4.8 estão dispostas as condições cromatográficas estabelecidas como ideais para determinação simultânea de OTC combinada com DICLO ou com PIRO nos produtos acabados. Nas seções seguintes encontram-se os resultados e a fundamentação teórica que justificam a escolha dessas condições para a análise pretendida.

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

Condição	Especificação
Equipamento	cromatógrafo a líquido Thermo Fischer Scientific®, modelo Ultimate 3000 UHPLC <i>focused</i>
Coluna	InertSustain® HP C ₈ (150 x 4,6 mm, tamanho de partícula: 3 µm)
Detecção	DAD
Comprimento de onda	275 nm ^a e 350 nm ^b
Fase móvel	metanol:acetonitrila:água (40:35:25, v/v/v), pH 2,5 ajustado com ácido <i>orto</i> -fosfórico
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Modo de eluição	isocrático
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 ± 2°C

^a 275 nm: detecção de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio e ^b 350 nm: detecção de piroxicam. DAD: detector de arranjo de diodos.

3.2.1.1. Seleção da Fase Estacionária

Conforme previamente testado no início deste estudo, os resultados obtidos com as colunas C₁₈ não foram promissores, provavelmente devido à aparente adsorção irreversível de OTC nos grupos silanóis residuais do material de enchimento dessas colunas, resultando em elevada retenção desse fármaco (PENA; LINO; SILVEIRA, 1997). Resultados semelhantes também foram encontrados por Kahsay e colaboradores (2013), os quais desenvolveram e validaram um método por CLAE para determinação

simultânea de OTC e seus produtos de degradação, empregando coluna cromatográfica C₈.

Assim sendo, durante o desenvolvimento do método cromatográfico focou-se na utilização de colunas C₈ que, por possuírem cadeias alquílicas menores ligadas à sílica, apresentaram menor retenção de OTC. A Tabela 4.9 traz a relação das colunas cromatográficas C₈ selecionadas para o desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea OTC, DICLO e PIRO.

Tabela 4.9. Colunas cromatográficas C₈ selecionadas para o desenvolvimento do método analítico.

Coluna	Dimensão (mm)	Tamanho de partícula (µm)	Revestimento	Faixa de pH	Limite de pressão (bar)
InertSustain® HP	150 x 4,6	3	Sim	1 - 10	500
Phenomenex®	250 x 2,0	5	Sim	2 - 8	300
Merck Lichrosorb®	125 x 4,0	5	Não	2 - 8	300
Thermo Hypersil®	150 x 4,6	5	Sim	2 - 8	400
Zorbax Eclipse XDB®	150 x 4,6	5	Sim	2 - 8	400

Conforme evidenciado na Tabela 4.9, foram avaliadas colunas C₈ de diferentes dimensões e tamanhos de partículas. A coluna InertSustain® HP apresenta algumas vantagens, sob o ponto de vista técnico, quando comparada com as outras colunas cromatográficas selecionadas. Segundo os fabricantes, o material de enchimento dessa coluna é um novo tipo de sílica de elevada pureza (*Evolved Surface Silica*®) que possui os grupos octil totalmente revestidos (*end-capping*), proporcionando menor retenção de compostos apolares. Além disso, a coluna InertSustain® HP apresenta maior estabilidade frente à ampla faixa de pH (1 a 10) e de pressão do sistema cromatográfico (≤ 500 bar), o que assegura maior tempo de vida útil da fase estacionária e preservação do sistema cromatográfico (GL SCIENCE, 2017).

Outro benefício da coluna InertSustain® HP em relação às demais colunas é que a primeira possui o menor tamanho de partícula. Colunas com partículas pequenas (≤ 3 µm) apresentam como vantagem em relação às convencionais (partículas ≥ 5 µm) a maior velocidade de transferência de massa, o que resulta em uma separação cromatográfica eficiente com obtenção de picos simétricos e com boa resolução, em um menor tempo de

análise (NGUYEN et al., 2006; GUILLARME et al., 2007; ASSASSI et al., 2015). No entanto, quando vazões altas são aplicadas sob colunas com partículas pequenas pode ocorrer elevação da pressão do sistema cromatográfico (>400 bar), o que pode não ser compatível com os equipamentos e colunas tradicionais. Nesse sentido, novos equipamentos e colunas capazes de operar sob elevada pressão estão sendo comercializados (GUILLARME et al., 2007).

Diante dessas evidências, a coluna InertSustain® HP foi escolhida para otimização das demais condições cromatográficas como, por exemplo, composição da fase móvel e vazão.

4.2.1.2. Seleção da Fase Móvel

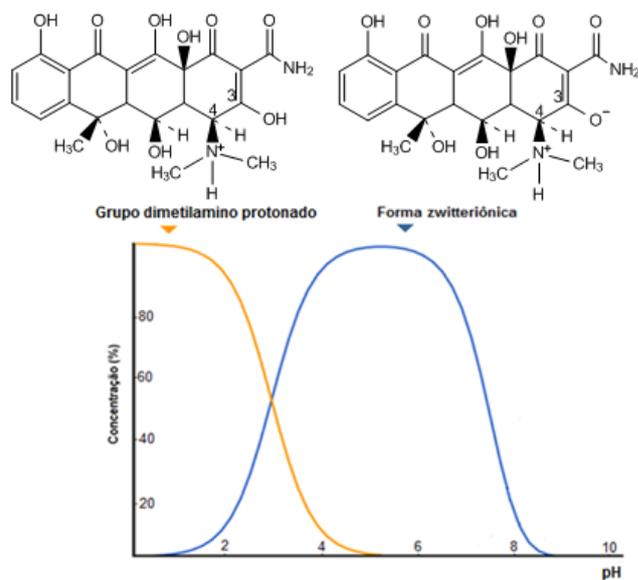
Para separações cromatográficas de tetraciclinas frequentemente são adicionados ácidos à fase móvel como, por exemplo, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), trifluoroacético, *orto*-fosfórico, cítrico ou oxálico, a fim de evitar a formação do complexo fármaco-fase estacionária (PENA; LINO; SILVEIRA, 1997). Os três primeiros ácidos foram testados durante a otimização do método cromatográfico. No entanto, a utilização de ácido *orto*-fosfórico forneceu melhores resultados para a separação cromatográfica de OTC.

A escolha do pH da fase móvel foi baseada nas informações contidas no trabalho de Knox e Juran (1979) que descreveram que eficientes separações cromatográficas de tetraciclinas são obtidas em valores de pH ácidos que variam entre 1 a 2,5. Em concordância com esses autores, trabalhos recentes descritos na literatura empregam valores de pH dentro desse intervalo para análise de OTC em produtos farmacêuticos por CLAE (KAHSAY et al., 2013; TAUBER; CHIURCIU, 2014).

Em valores de pH próximos a 2,5, a molécula de OTC encontra-se na forma *zwitteriônica*, isto é, com o grupo dimetilamino em C-4 protonado e a hidroxila em C-3 ionizada, e também na forma em que apenas o grupo dimetilamino está protonado (Figura 4.1). Como consequência, há a formação de pares iônicos entre ânion do ácido contido na fase móvel e o cátion do fármaco (grupo dimetilamino protonado). Isso evita a forte adsorção do fármaco

na fase estacionária reversa (KNOX; JURAN, 1979; PENA; LINO; SILVEIRA, 1997).

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



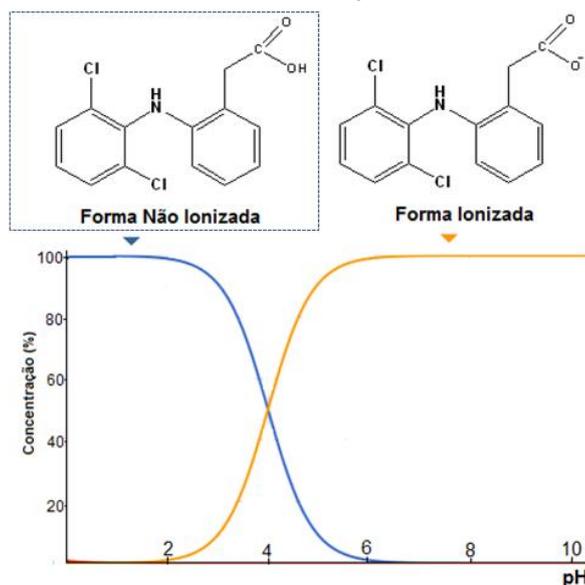
Fonte: adaptado de CHEMICALIZE.ORG, 2017.

Diante dessas informações, o valor de pH selecionado para fase móvel foi de 2,5. Apesar da coluna cromatográfica selecionada (InertSustain[®] HP C₈) ser estável na faixa de pH de 1 a 10, optou-se pelo valor de pH mais alto dentro da faixa preconizada para análise de tetraciclina (pH de 1 a 2,5), a fim de resguardar a integridade da coluna e do sistema cromatográfico. Todavia, é válido ressaltar que a maioria das colunas cromatográficas de fases reversas convencionais são instáveis em valores de pH inferiores a 3,0. Portanto, como regra geral recomenda-se a utilização de pré-colunas ou a lavagem da coluna cromatográfica com solvente neutro como acetonitrila:água (50:50, v/v) durante uma hora, ao final de cada dia de trabalho (PENA; LINO; SILVEIRA, 1997).

O grau de ionização dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) em pH 2,5 também foi analisado com a finalidade de complementar o estudo de seleção da fase móvel e compreender o mecanismo de separação cromatográfica desses fármacos. Foi observado que no intervalo de pH de 1 a 2,5, o diclofenaco de sódio (DICLO) prevalece na forma não ionizada (Figura 4.2), o que resulta em uma maior interação com fases estacionárias C₈. Por outro lado, conforme evidenciado na Figura 4.3, o piroxicam (PIRO) prevalece,

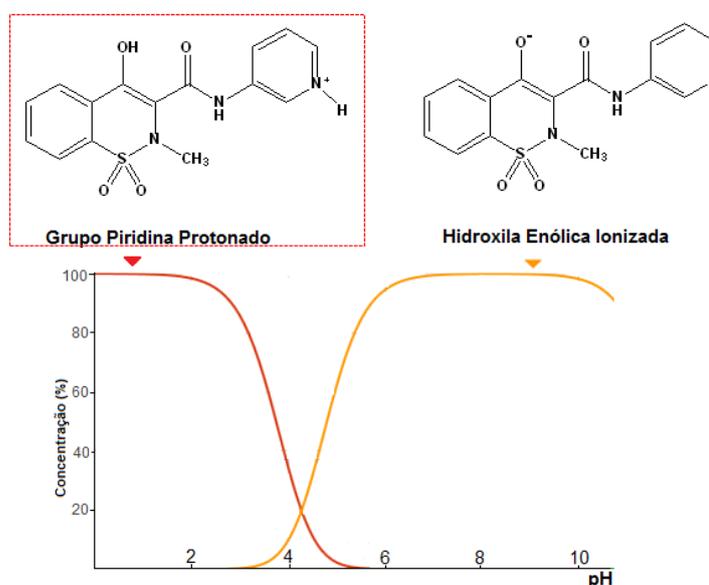
nesse intervalo de pH, na forma ionizada, mais especificamente com a amina cíclica protonada (grupo piridina). Isso faz com que esse fármaco apresente uma menor interação com fases estacionárias reversas, resultando em um menor tempo de retenção quando comparado ao DICLO.

Figura 4.2. Representação gráfica da relação entre pH x concentração de diclofenaco de sódio no intervalo de pH de 1 – 10, com destaque na estrutura química da forma prevalente no intervalo de pH 1 – 2,5.



Fonte: adaptado de CHEMICALIZE.ORG, 2017.

Figura 4.3. Representação gráfica da relação entre pH x concentração de piroxicam no intervalo de pH de 1 – 10, com destaque na estrutura química da forma prevalente no intervalo de pH 1 – 2,5.



Fonte: adaptado de CHEMICALIZE.ORG, 2017.

Frequentemente um modificador orgânico (metanol, acetonitrila ou propanol) é adicionado à fase móvel aquosa durante a análise de tetraciclinas em produtos farmacêuticos por CLAE (KNOX; JURAND, 1979; MONSER; DARGHOUTH, 2000; PAPADOYANNIS; SAMANIDOU; KOVATSI, 2000; DIANA et al., 2002; SMYRNIOTAKIS; ARCHONTAKI, 2007; WANG; PENG, LIU; 2008; VUČIĆEVIĆ-PRČETIĆ; CSERVENÁK; RADULOVIĆ, 2011; GIUGIU, 2013; KAHSAY et al., 2013; TAUBER; CHIURCIU, 2014). Desse modo, a escolha do modificador orgânico foi baseada nos trabalhos de Tsuji, Robertson e Beyer (1974) e Knox e Jurand (1979), os quais evidenciaram que a acetonitrila foi o melhor modificador orgânico para separação de diferentes tetraciclinas, proporcionando picos simétricos, com elevado número de pratos e alta resolução. Todavia, conforme descrito por Kahsay e colaboradores (2013), o metanol também pode ser adicionado na fase móvel para aperfeiçoar a separação cromatográfica. Além disso, a utilização de metanol reduz o custo da análise por se tratar de um solvente de custo mais acessível quando comparado à acetonitrila.

Assim sendo, diferentes proporções de acetonitrila, metanol e água foram testadas a fim de obter uma separação cromatográfica eficiente. No entanto, a mistura ternária composta por metanol:acetonitrila:água (40:35:25, v/v/v) com pH ajustado para 2,5 com ácido *orto*-fosfórico foi eleita como fase móvel ideal para análise cromatográfica da associação de OTC com DICLO ou com PIRO em produtos farmacêuticos veterinários, uma vez que propiciou uma separação cromatográfica eficiente.

A vazão escolhida para a fase móvel foi 1 mL min⁻¹, pois foi observado que reduções graduais na vazão de 1,2 para 0,5 mL min⁻¹ provocaram decréscimo na altura do pico de OTC, além de aumentarem o tempo de análise devido à maior retenção dos AINEs na fase estacionária. Não foram testadas vazões superiores a 1,2 mL min⁻¹ a fim de minimizar o descarte de resíduos de solventes orgânicos. Finalmente, o modo eluição preconizado foi o isocrático por ser mais vantajoso do que o gradiente devido ao menor tempo de análise, além de proporcionar a redução do consumo de solvente por não necessitar de etapas adicionais de condicionamento da fase móvel (ASSASSI et al., 2015).

4.2.1.3. Seleção do Comprimento de Onda

Após a escolha da coluna, fase móvel e vazão apropriadas para análise dos fármacos em estudo foram selecionados os comprimentos de onda para a quantificação dos fármacos. Assim sendo, com auxílio do detector de DAD, foram realizadas varreduras espectrais no intervalo de 200 – 400 nm. O comprimento de onda selecionado para quantificação de OTC e DICLO foi 275 nm e de PIRO 350 nm, uma vez que correspondem às regiões de máxima absorção no UV de cada fármaco. Além disso, os solventes utilizados (acetonitrila e metanol) no preparo das soluções empregadas nas análises cromatográficas apresentam absorção em torno de 210-220 nm, sendo abaixo dos comprimentos de onda selecionados para a quantificação dos fármacos.

4.2.2. Conformidade do Sistema Cromatográfico

A conformidade do sistema (*system suitability*) pode ser definida como um conjunto de testes que garantem que o equipamento e as condições experimentais selecionadas durante o desenvolvimento do método analítico são capazes de fornecer resultados precisos e exatos para a finalidade pretendida (RIBANI et al., 2004; PASCHOAL et al., 2008). A Farmacopeia Americana (USP, 2015) menciona essa etapa como preliminar ao procedimento de validação, enquanto que a *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005) a classifica como parte integrante do processo de validação (PASCHOAL et al., 2008).

Os parâmetros avaliados durante a determinação da conformidade do sistema cromatográfico, bem como os limites recomendados por literaturas internacionais (FDA, 2004; MEYER, 2004; ZAKERI-MILANI et al., 2005; MAIO et al., 2006; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; USP, 2015; ESMAEILZADEH; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2016) encontram-se demonstrados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Parâmetros avaliados para determinação da conformidade do sistema cromatográfico e recomendações descritas na literatura.

Parâmetro	Recomendação	Referência
Número de pratos (N)	$N \geq 2000$	FDA, 2004; USP, 2015
Assimetria do pico (As)	$As \leq 2^a$; $0,9 < As < 1,2^b$	^a FDA, 2004; ^b USP, 2015
Resolução (Rs)	$R_s > 2$, entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação ou outro fármaco)	FDA, 2004; USP, 2015
Repetibilidade*	DPR < 1%, onde n > 5 é desejável	FDA, 2004
Pureza do pico (PP)	PP > 950, em uma escala de 0 a 1000.	MAIO et al., 2006
Fator de retenção (k')	$k' \geq 2^a, b$; $1 < k' < 10^c, d$; $0,5 < k' < 10^e, f$	^a FDA, 2004; ^b USP, 2015; ^c SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; ^d MEYER, 2004; ^e ZAKERI-MILANI et al., 2005; ^f ESMAEILZADEH; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2016

*Referente, principalmente, à resposta (área do pico) e ao tempo de retenção. DPR: desvio padrão relativo; n: número de injeções (n = 6).

Tipicamente, no mínimo, dois desses critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema (RIBANI et al., 2004). De acordo com Mukherjee e Bera (2012), os parâmetros mais importantes durante a avaliação da conformidade são: resolução (Rs), repetibilidade (em termos de desvio padrão relativo referente à área do pico e ao tempo de retenção), eficiência da coluna ou número de pratos (N) e assimetria (As) ou fator de alargamento do pico (*tailing factor*). Esses parâmetros indicam a especificidade do sistema, precisão e estabilidade da coluna (MUKHERJEE; BERA 2012).

Na Tabela 4.11 encontram-se os resultados da análise da conformidade do sistema para determinação simultânea de OTC associada com DICLO ou com PIRO em soluções injetáveis para uso animal por CLAE.

Tabela 4.11. Análise da conformidade do sistema cromatográfico para determinação simultânea de OTC associada com DICLO ou com PIRO em soluções injetáveis para uso animal por CLAE.

Parâmetro ± DPR^a	OTC	PIRO	DICLO
Números de pratos	5418 ± 0,62	9273 ± 0,99	14932 ± 0,49
Assimetria	1,12 ± 0,98	0,90 ± 0,00	0,99 ± 0,88
Resolução	7,62 ± 0,94	12,39 ± 0,55	-----
Tempo de retenção (min)	1,64 ± 0,00	2,66 ± 0,00	4,82 ± 0,17
Área	11,3985 ± 0,24	2,3422 ± 0,08	2,0039 ± 0,13
Pureza do pico	997,94 ± 0,01	999,77 ± 0,00	999,92 ± 0,01
Fator de retenção	0,32 ± 0,00	1,18 ± 0,00	2,95 ± 0,00

^amédia de 6 determinações ± desvio padrão relativo (DPR); OTC: oxitetraciclina na concentração de 8 µg mL⁻¹; PIRO: piroxicam na concentração de 1,8 µg mL⁻¹; DICLO: diclofenaco de sódio na concentração de 1,2 µg mL⁻¹; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

De acordo com a Tabela 4.11, todos os parâmetros cromatográficos, exceto o fator de retenção (k') para OTC, estão dentro dos limites estabelecidos pelas literaturas consultadas (Tabela 3.10). Além disso, embora esteja acima do limite recomendado, a eficiência da separação de OTC (número de pratos = 5418) foi menor do que dos outros fármacos devido à sua menor retenção. Desse modo, pode-se inferir que o k' está intimamente relacionado com o tempo de retenção do analito e indica sua interação com a fase estacionária, sendo determinado pela Equação 4.6 (MEYER, 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

$$\text{Equação 3.6: } k' = \frac{t_R - t_0}{t_R}$$

Em que:

t_R : tempo de retenção do analito e t_0^* : tempo de volume vazio (tempo que a fase móvel leva para percorrer a coluna ou tempo de retenção do composto não retido). * O t_0 calculado neste estudo foi de 1,24 minutos, sendo obtido através da Equação 4.7 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

$$\text{Equação 4.7: } t_0 = \frac{0,50 \times \pi \times r^2 \times C}{V}$$

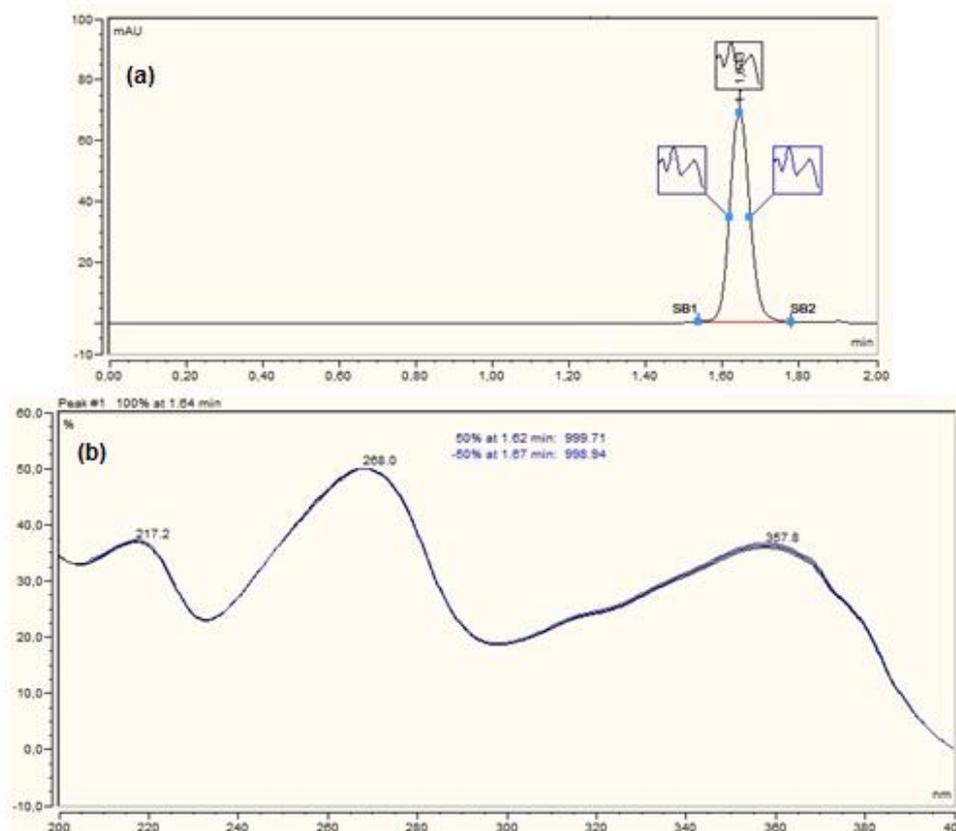
Em que:

valor de Pi (π) = 3,14; r: raio interno da coluna cromatográfica (mm);
C = comprimento da coluna (mm); V= Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$).

Conforme observado na Tabela 4.10, não existe concordância entre as literaturas consultadas em relação à recomendação do limite aceitável para o k' . Todavia, todas são unânimes em dizer que caso o valor de k' seja muito baixo, a separação cromatográfica pode ser inadequada, uma vez que pode haver coeluição entre o analito de interesse e um componente não retido. Por outro lado, valores de k' elevados são acompanhados de longos tempos de análise, o que, conseqüentemente, aumenta o descarte de resíduos (MEYER, 2004; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

No entanto, apesar do valor de k' de OTC ter sido $< 0,50$ pode-se inferir que houve eficiente separação cromatográfica desse fármaco, pois todos os demais parâmetros encontram-se dentro dos limites adequados, inclusive a pureza do pico (Tabela 4.11). A Figura 4.4 ilustra a análise da pureza do pico de OTC através da avaliação da similaridade dos espectros UV extraídos de três pontos do pico cromatográfico (ápice, parte inicial ou frontal, parte posterior ou cauda), obtida pelo detector DAD. Conforme é possível observar nessa Figura, os espectros de UV nos três pontos estão sobrepostos, sendo um importante indicativo que o pico cromatográfico de OTC está puro (pureza de $997 \pm 0,67$) e que, conseqüentemente, não existe coeluição de nenhum interferente (impureza relacionada ou produto de degradação) (STAHL, 2003; MAIO et al., 2006).

Figura 4.4. Análise da pureza do pico de oxitetraciclina, obtida pelo detector DAD, através da avaliação da similaridade dos espectros UV extraídos de três pontos do pico cromatográfico (ápice, parte frontal e parte posterior). **(a)** Cromatograma da SQC de oxitetraciclina, evidenciando as regiões onde os espectros UV foram extraídos; **(b)** Sobreposição dos espectros UV extraídos do pico cromatográfico.



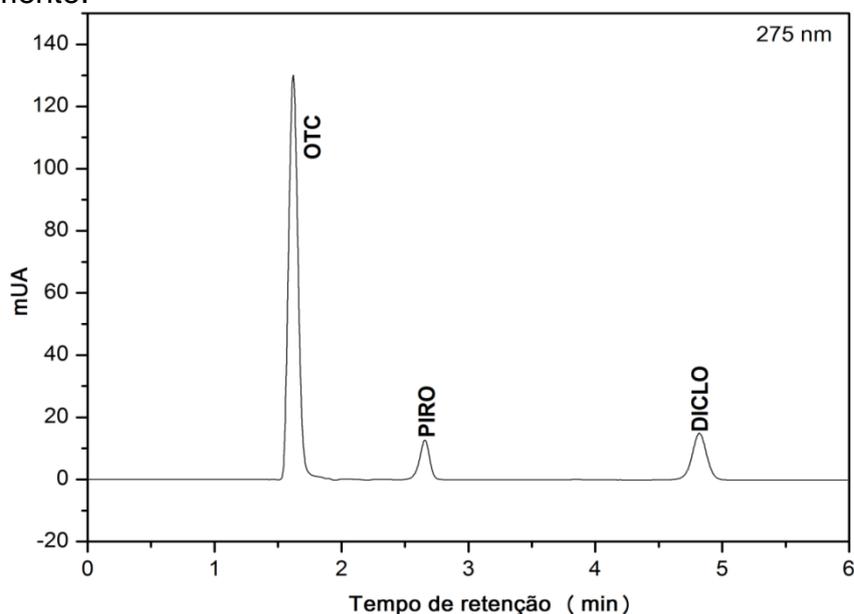
Além disso, durante a avaliação da conformidade do sistema é necessário analisar o método como um todo. Em algumas situações, a realização de alterações em certas condições cromatográficas (por exemplo: na composição e vazão da fase móvel) na tentativa de aprimorar o valor de k' pode não ser vantajosa para a rotina do controle de qualidade de medicamentos, pois pode resultar no aumento do tempo de análise, do custo operacional ou da contaminação ambiental devido à maior geração de resíduos de solventes orgânicos.

Em concordância com o exposto, Assassi e colaboradores (2015) optaram por desenvolver e validar um método cromatográfico sustentável para determinação simultânea de estatinas. Esses autores testaram diversas condições cromatográficas, mas selecionaram aquela que ponderou entre o curto tempo de análise e a manutenção de adequados valores para a maioria

dos parâmetros cromatográficos. Portanto, nas condições desenvolvidas pelos autores, o tempo de análise foi de 5 minutos, a $R_s > 2$ e a $A_s < 2$, apesar do valor de k' obtido para um dos fármacos (provastatina) ter sido inferior a 1,0 ($k' = 0,86$). Zakeri-Milani e colaboradores (2005) também validaram um método por CLAE com valor de $k' < 1$ para um dos analitos durante a avaliação da permeabilidade de naproxeno, cetoprofeno e vermelho de fenol em intestinos de camundongos.

Por último, após a discussão dos parâmetros cromatográficos, a Figura 4.5 demonstra o cromatograma da separação cromatográfica da solução das SQC de OTC, PIRO e DICLO preparada para análise da conformidade do sistema e analisada sob as condições cromatográficas desenvolvidas. Nessa Figura, evidencia-se a eficiente separação cromatográfica entre os três analitos, em um curto tempo de análise (cinco minutos) e sem a existência de interferentes, indicando que o método por CLAE proposto está apto para ser validado para finalidade pretendida, isto é, a análise simultânea desses fármacos em produtos farmacêuticos para uso animal. Além disso, o método proposto pode ser aplicável para quantificação de OTC, DICLO e PIRO, na forma isolada, em medicamentos para uso humano.

Figura 4.5. Cromatograma da solução das SQC de oxitetraciclina (OTC), piroxicam (PIRO) e diclofenaco de sódio (DICLO) preparada para análise da conformidade do sistema e analisada sob as condições cromatográficas desenvolvidas (coluna InertSustain[®] HP C₈; fase móvel, em modo isocrático, composta por metanol:acetonitrila:água, 40:35:25, v/v/v, pH 2,5 ajustado com ácido *orto*-fosfórico; vazão de 1 mL min⁻¹; volume de injeção de 20 µL e temperatura de 24 ± 2 °C). OTC, PIRO e DICLO a 8, 1,8 e 1,2 µg mL, respectivamente.



4.2.3. Validação do Método

4.2.3.1. Linearidade, Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD)

Conforme demonstrado na Tabela 4.12, os resultados obtidos com as curvas analíticas demonstraram, nos intervalos de concentração utilizados, correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações analisadas, pois os valores dos coeficientes de correlação (r) foram maiores de 0,990 (BRASIL, 2017a,b). Além disso, os valores de LD e LQ, obtidos através das Equações 4.1 e 4.2, mostraram que o método cromatográfico proposto é adequado para determinação de OTC, DICLO e PIRO na forma isolada ou em associação em medicamentos veterinários ou para uso humano.

O método cromatográfico proposto apresentou menor LD para OTC ($0,694 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que o desenvolvido e validado por Wang, Peng e Liu (2008) para determinação de OTC e outras tetraciclinas. Esses autores determinaram que o LD calculado para OTC foi de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Do mesmo modo, os valores de LD e LQ obtidos para DICLO e PIRO foram inferiores aos encontrados da literatura. Shaalan e Belal (2013) demonstraram valores de LD e LQ de, respectivamente, 0,65 e $2,16 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DICLO. Dragomiroiu e colaboradores (2015) encontraram valor de $0,087 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o LQ de PIRO.

Tabela 4.12. Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas dos fármacos em estudo.

Parâmetros	OTC	DICLO	PIRO
λ (nm)	275	275	350
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5,0 – 35,0	0,40 – 1,60	0,60 – 1,80
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,8802x + 0,5687$	$y = 0,8355x + 0,0175$	$y = 0,9959x + 0,0102$
Inclinação (a) \pm DP ^a	$0,8802 \pm 0,0215$	$0,8350 \pm 0,0164$	$0,9960 \pm 0,0051$
Intercepto (b) \pm DP ^a	$0,5686 \pm 0,1851$	$0,0185 \pm 0,0108$	$0,00312 \pm 0,0029$
Coefficiente de correlação (r) \pm DP ^a	$0,9998 \pm 0,00006$	$0,9998 \pm 0,0001$	$0,9998 \pm 0,0001$
Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,694	0,043	0,042
Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,103	0,129	0,126

^aos valores são discriminados como Média \pm Desvio Padrão (DP) de três curvas analíticas geradas em três dias consecutivos ($n = 3$). OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam; λ : comprimento de onda.

A Tabela 4.13 traz os resultados da análise estatística utilizada para a comprovação da linearidade do método cromatográfico proposto.

Tabela 4.13. Resultados da análise estatística para linearidade do método cromatográfico proposto.

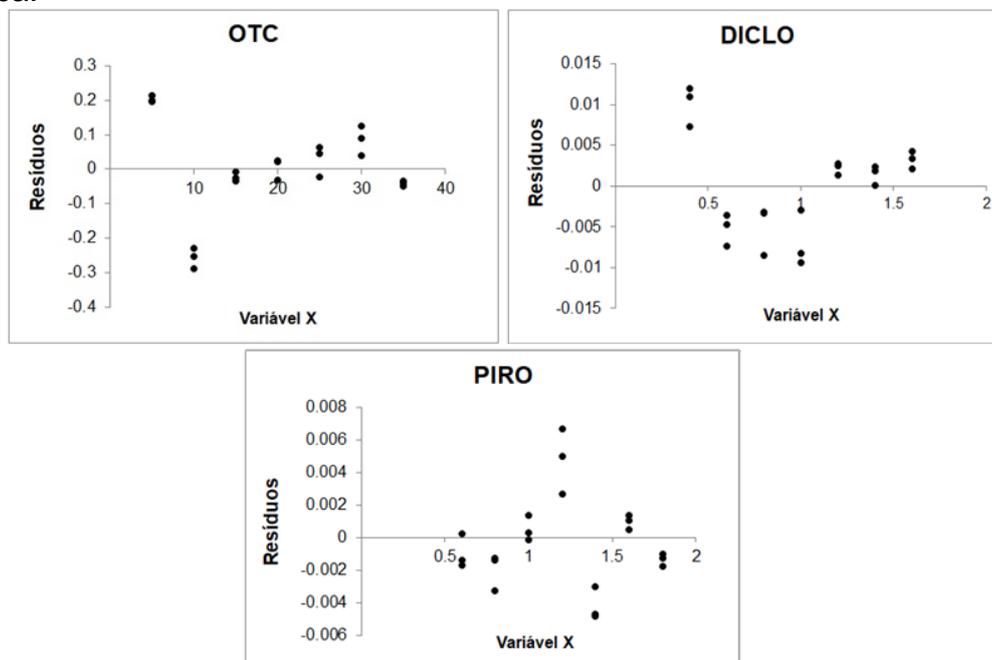
Testes estatísticos ($\alpha=5\%$)	OTC	DICLO	PIRO
^a Teste de Cochran ($C_{\text{calculado}}$)	0,336	0,347	0,269
p-valor da Regressão	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
^b p-valor Shapiro-Wilk	0,081	0,457	0,357

^aAnálise da homocedasticidade dos dados obtidos para o eixo y da curva ($C_{\text{crítico}} = 0,561$); ^bAnálise da normalidade dos resíduos obtidos a partir da regressão; OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

Os resultados obtidos com o teste de Cochran indicam que dados em y (variável dependente) são homocedásticos, uma vez que para os três fármacos os valores de $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$ (BRASIL, 2017b). O valor de p da regressão linear, obtido pelo teste ANOVA das curvas analíticas, foi altamente significativo ($p < 0,0001$), o que confirma a hipótese de proporcionalidade entre as variáveis x (concentração) e y (área). Além disso, os resíduos se distribuem normalmente, pois os valores de p, obtido através do teste de Shapiro-Wilk, são maiores que 0,05.

Na Figura 4.6 encontram-se os gráficos de distribuição dos resíduos para cada um dos fármacos em função da resposta analítica.

Figura 4.6. Gráficos de distribuição dos resíduos para oxitetraciclina (OTC), diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO) em função da resposta analítica.



Conforme observado na Figura 4.6, os valores dos resíduos estão próximos de zero, não havendo valores fora da faixa esperada (*outliers*). Além disso, a variância dos resíduos parece ser constante (homocedasticidade) (BRASIL, 2017b).

3.2.3.2. Precisão

A Tabela 4.14 traz os resultados obtidos com o ensaio de precisão dos fármacos analisados através do método cromatográfico proposto. Os valores obtidos para repetibilidade (precisão intradia) foram expressos em termos de Desvio Padrão Relativo (DPR), sendo esses inferiores ao limite máximo preconizado de 1,0% para $n \geq 5$ (FDA, 2004). A diferença entre as variâncias obtidas das dez determinações em três dias consecutivos demonstrou ser não significativa ($p > 0,05$) pelo teste ANOVA de fator único. Portanto, as médias das concentrações obtidas nos dias 1, 2 e 3 não diferem significativamente, podendo ser consideradas semelhantes, o que confirma a precisão intermediária do método proposto.

Tabela 4.14. Teores dos fármacos obtidos para determinação da precisão método cromatográfico proposto.

Fármacos	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor encontrado \pm DPR (%) ^c			Precisão Intermediária ANOVA ^d
		Repetibilidade			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Associação OTC + DICLO^a					
OTC	20,0	100,41 \pm 0,67	100,76 \pm 0,10	100,55 \pm 0,62	$p = 0,348$
DICLO	1,0	99,29 \pm 0,88	99,61 \pm 0,82	98,86 \pm 0,84	$p = 0,134$
Associação OTC + PIRO^b					
OTC	22,0	100,44 \pm 0,10	100,43 \pm 0,10	100,42 \pm 0,10	$p = 0,761$
PIRO	1,20	100,08 \pm 0,33	99,97 \pm 0,18	99,80 \pm 0,21	$p = 0,135$

^aOxitrat La Plus[®]: oxitetraciclina (OTC) + diclofenaco de sódio (DICLO); ^bTerracam Plus[®]: OTC + piroxicam (PIRO); ^cMédia \pm Desvio Padrão Relativo ($n = 10$); ^dAnálise de Variância de Fator Único (I.C.=95%).

4.2.3.3. Exatidão

Os valores obtidos para a recuperação da quantidade de solução padrão de cada fármaco adicionado às respectivas soluções amostras estão apresentados na Tabela 4.15. As quantidades de OTC, DICLO e PIRO recuperadas encontraram-se dentro dos limites aceitáveis de 98-102% para todos três níveis de concentração analisados. Sendo que, o DPR da média desses níveis esteve abaixo de 2,0% (AOAC, 2005). Portanto, o método possui exatidão adequada para determinação simultânea de OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO em medicamentos injetáveis para uso animal.

Tabela 4.15. Ensaio de exatidão dos fármacos analisados através do método cromatográfico proposto.

Fármacos	Concentração teórica adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^c	Recuperação (%)	
			Resultado	Média \pm DPR (%)
Associação OTC + DICLO^a				
	8,00	7,97	99,64	
OTC	16,00	16,13	100,80	100,04 \pm 0,66
	24,00	23,92	99,67	
	0,50	0,49	98,21	
DICLO	0,75	0,74	99,10	99,41 \pm 1,40
	1,00	1,01	100,93	
Associação OTC + PIRO^b				
	8,80	8,81	100,09	
OTC	17,60	17,82	101,27	100,97 \pm 0,76
	26,40	26,81	101,54	
	0,60	0,60	99,40	
PIRO	0,90	0,90	99,67	99,89 \pm 0,63
	1,30	1,31	100,59	

^aOxirat La Plus[®]: oxitetraciclina (OTC) + diclofenaco de sódio (DICLO); ^bTerracam Plus[®]: OTC + piroxicam (PIRO); ^cMédia de 3 determinações. DPR: Desvio Padrão Relativo.

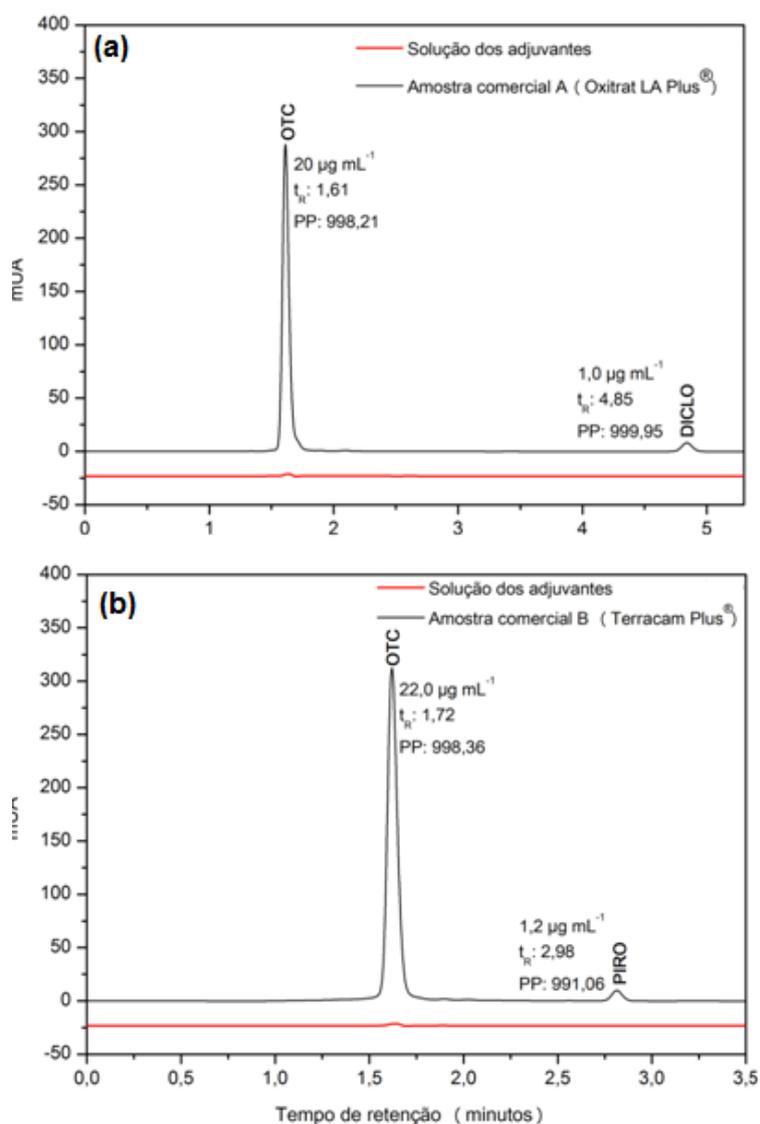
4.2.3.4. Seletividade

A Figura 4.7 mostra os cromatogramas da solução dos adjuvantes (placebo) sobrepostos aos cromatogramas das soluções das amostras comerciais A (Oxirat La Plus[®]) e B (Terracam Plus[®]). Os principais adjuvantes presentes em soluções injetáveis para uso animal à base de oxitetraciclina não

interferiram na determinação simultânea de OTC e DICLO, bem como de OTC e PIRO, uma vez que não apresentaram nenhum pico com eluição no mesmo tempo de retenção dos fármacos analisados. Portanto, esse resultado demonstra a seletividade do método proposto para análise desses fármacos.

Além disso, os valores das purezas dos picos cromatográficos dos fármacos contidos nas amostras comerciais A e B, obtidos a partir do detector de DAD, foram superiores a 990, sendo um forte indicativo da seletividade do método (STAHL, 2003; MAIO et al., 2006).

Figura 4.7. Cromatogramas da solução dos adjuvantes sobrepostos aos cromatogramas das soluções das amostras comerciais A (Oxirat La Plus® - a) e B (Terracam Plus® - b) preparadas em fase móvel e analisadas através do método cromatográfico proposto. OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam; t_R : tempo de retenção (minutos); PP: pureza do pico cromatográfico determinada pelo detector de arranjo de diodos numa escala de 0 a 1000.



3.2.3.5. Robustez

As Figuras 4.8 e 4.9 trazem, respectivamente, os resultados obtidos para os ensaios de robustez da associação de OTC e DICLO, bem como de OTC e PIRO, baseados no modelo fatorial de Plackett-Burman (1944). Nessas Figuras, encontram-se os valores absolutos do efeito (E) das variações testadas (nível superior: 1 e nível inferior: -1) para cada parâmetro sobre os teores dos fármacos em comparação à condição normal que o método foi desenvolvido (nível 0).

Os valores dos efeitos foram comparados com os valores críticos ($\sqrt{2S}$) obtidos para cada fármaco nos níveis de variação 1 e -1 através da Equação 4.5. Para um método ser considerado robusto, os valores de E devem ser menores do que $\sqrt{2S}$ (NEVADO et al.,2006).

Figura 4.8. Ensaio de robustez da associação de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio obtidos através do modelo fatorial de Plackett-Burman. Letras de A a G representam os fatores selecionados, sendo as letras maiúsculas as variações para o nível superior (1) e as minúsculas para o nível inferior (-1): A: proporção de metanol na fase móvel; B: fornecedor de metanol; C: pH da fase móvel; D: vazão da fase móvel; E: comprimento de onda; F: fornecedor da coluna; G: temperatura da sala.

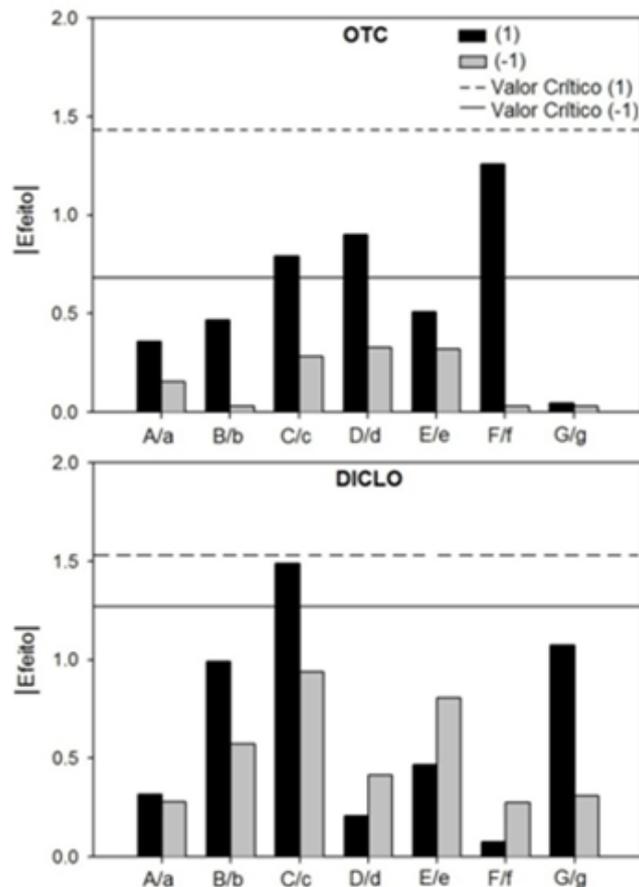
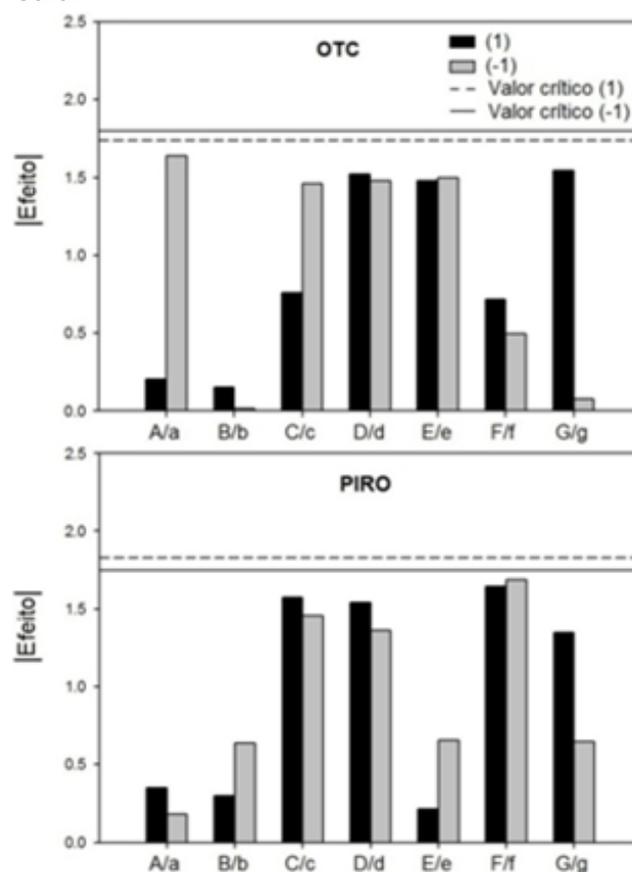


Figura 4.9. Ensaio de robustez da associação de oxitetraciclina e piroxicam obtidos através do modelo fatorial de Plackett-Burman. Letras de A a G representam os fatores selecionados, sendo as letras maiúsculas as variações para o nível superior (1) e as minúsculas para o nível inferior (-1): A: proporção de metanol na fase móvel; B: fornecedor de metanol; C: pH da fase móvel; D: vazão da fase móvel; E: comprimento de onda; F: fornecedor da coluna; G: temperatura da sala.



Conforme observado na Figura 4.8, os valores críticos para os níveis de variação 1 e -1 para OTC foram, respectivamente, 1,43 (linha pontilhada) e 0,78 (linha contínua). Já para DICLO, o valor crítico do nível 1 foi de 1,52 (linha pontilhada) e do nível -1 foi 1,27 (linha contínua). Nenhuma alteração nas condições experimentais apresentou resultado significativo, pois todos os valores absolutos de E estiveram abaixo do seu respectivo valor crítico.

É válido ressaltar que, para essa associação, o efeito mais próximo, porém inferior, ao valor crítico foi o efeito da variação de pH da fase móvel no nível 1 para DICLO. Essa influência pode ser atribuída ao caráter químico do fármaco, uma vez que DICLO é considerado um ácido fraco ($pK_a = 4,5$). Em valores de pH extremamente ácidos, isto é, menores que 2,50, o fármaco predomina na forma não ionizada, responsável pela maior interação com a fase

estacionária utilizada (C₈). Por outro lado, o aumento deliberado do pH, ocasionou uma sutil alteração na quantidade da forma não ionizada, que passou de 98,0% para 96,0% em relação à forma ionizada (CHEMICALIZE, 2017). Isso pode ter reduzido a interação entre o analito e a fase estacionária, resultando no maior efeito observado. Portanto, o pH da fase móvel trata-se de uma condição experimental que deve ser rigorosamente monitorada durante a análise cromatográfica de DICLO, devendo estar, preferencialmente, entre valores próximos e não maiores que 2,50.

Na Figura 4.9 observa-se que os valores críticos para os níveis de variação 1 e -1 para OTC foram, respectivamente, 1,74 (linha pontilhada) e 1,82 (linha contínua). Já para PIRO, o valor crítico do nível 1 foi de 1,82 (linha pontilhada) e do nível -1 foi de 1,75 (linha contínua). Nenhuma alteração apresentou efeito maior que o valor crítico observado para ambos os níveis de variação, o que demonstra a robustez do método analítico.

Para a associação OTC e PIRO, o efeito mais próximo, porém inferior, ao valor crítico foi o efeito do fornecedor da coluna para PIRO. Isso pode ser explicado pelo fato da coluna InertSustain[®] C₈, selecionada para o desenvolvimento e validação do método, possuir uma tecnologia de revestimento superior em relação à coluna cromatográfica utilizada nos dois níveis de variação (Thermo Hypersil[®] C₈), o que proporciona uma análise cromatográfica mais eficiente, principalmente em valores de pH extremos.

As Tabelas 4.16 e 4.17 mostram os teores obtidos para os fármacos em estudo no ensaio de robustez, respectivamente, nas condições 1 e -1 em relação aos parâmetros nas condições normais. Como é possível observar todos os teores dos fármacos apresentaram-se próximos de 100%, tanto nas condições normais quanto nas alteradas, não ultrapassando os limites estabelecidos nas monografias individuais dos respectivos produtos acabados, isto é, 90 a 115% para soluções injetáveis de OTC (USP, 2015), 92,5 a 107,5% para cápsulas de PIRO (USP, 2015) e 90 a 110% para comprimidos de liberação controlada de DICLO (USP, 2015).

Tabela 4.16. Teores obtidos no teste de robustez para as condições normal (0) e alterada (1).

Condição	Teor (%) ^a							
	OTC		DICLO		OTC		PIRO	
	0	1	0	1	0	1	0	1
Proporção de metanol na fase móvel	99,87	99,51	100,90	100,58	99,17	98,96	98,49	98,84
Fornecedor de metanol	100,18	99,71	100,24	101,23	98,99	99,14	98,82	98,52
pH da fase móvel	100,09	99,30	101,48	99,99	99,44	98,69	99,95	98,38
Vazão da fase móvel	100,14	99,24	100,63	100,84	100,45	98,93	99,94	98,40
Comprimento de onda	99,95	99,44	100,50	100,97	100,07	98,59	99,56	98,77
Fornecedor da coluna	99,06	100,32	100,78	100,70	98,72	98,43	98,37	100,01
Temperatura da sala	99,72	99,67	101,27	100,20	98,05	99,60	98,85	100,20

^aMédia de 3 determinações.

Tabela 4.17. Teores obtidos no teste de robustez para as condições normal (0) e alterada (-1).

Condição	Teor (%) ^a							
	OTC		DICLO		OTC		PIRO	
	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1
Proporção de metanol na fase móvel	100,27	100,42	101,66	101,94	105,47	103,83	102,81	103,00
Fornecedor de metanol	100,33	100,36	102,09	101,51	104,40	104,41	103,22	102,59
pH da fase móvel	100,49	100,20	101,33	102,27	103,05	104,51	100,43	101,88
Vazão da fase móvel	100,18	100,51	101,59	102,01	101,66	103,14	100,47	101,84
Comprimento de onda	100,50	100,18	102,20	101,40	103,15	104,65	102,58	103,23
Fornecedor da coluna	100,33	100,36	101,66	101,94	104,68	104,18	102,21	100,52
Temperatura da sala	100,33	100,37	101,65	101,96	104,44	104,37	102,58	103,23

^aMédia de 3 determinações.

4.2.4. Aplicabilidade do Método

A Tabela 4.18 traz a análise dos medicamentos para uso animal e humano pelo método cromatográfico proposto. É válido ressaltar que, assim como para os métodos espectrofotométricos, os teores dos fármacos foram comparados com os estabelecidos nas monografias oficiais individuais dos produtos acabados contendo os fármacos isolados. Assim sendo, foram adotados os seguintes limites descritos na Farmacopeia Americana (USP,

2015): 90 a 115% para OTC (solução injetável), 92,5 a 107,5% para PIRO (cápsulas) e 90 a 110% para DICLO (comprimidos de liberação controlada).

Tabela 4.18. Análise dos medicamentos através do método cromatográfico proposto.

Medicamento	Teor encontrado \pm DPR (%) ^a		
	OTC	DICLO	PIRO
Amostra A	99,95 \pm 0,27	98,90 \pm 1,01	-----
Amostra B	100,36 \pm 0,13	-----	99,49 \pm 0,07
Amostra C	101,79 \pm 0,52	100,15 \pm 0,71	-----
Amostra D	106,27 \pm 0,32	101,24 \pm 1,02	-----
Amostra E	101,91 \pm 1,20	-----	-----
Amostra F	-----	102,83 \pm 0,52	-----
Amostra G	-----	100,57 \pm 0,59	-----
Amostra H	-----	-----	95,67 \pm 1,77
Amostra I	-----	-----	97,24 \pm 0,18

^a Média de 3 determinações \pm Desvio Padrão Relativo (DPR). Amostras A-D: soluções injetáveis para uso animal, sendo as amostras A, C e D, respectivamente, Oxitrat La Pus[®], Terramacina Mais[®] e Ourotetra Plus La[®] compostas pela associação de OTC 20,0% + DICLO 1,0% e a amostra B Terracam Plus[®] (OTC 22,0% + PIRO 1,2%). Amostras E-I: medicamentos para uso humano, sendo a amostra E Terramicina[®] cápsulas 500mg, a F comprimidos revestidos de diclofenaco de sódio Genérico 50 mg, a G Diclofarma[®] solução injetável 25 mg mL⁻¹, a H cápsulas de piroxicam Genérico 20 mg e a I Feldene[®] solução injetável 20 mg mL⁻¹. As linhas pontilhadas (----) indicam que o fármaco não faz parte da composição do medicamento.

Portanto, conforme mostrado na Tabela 3.18, todos os medicamentos analisados, tanto veterinários quanto para uso humano, apresentaram teores de fármacos dentro dos limites preconizados pelas monografias oficiais individuais (USP, 2015). Esses resultados evidenciam a aplicabilidade do método por CLAE desenvolvido e validado não só para determinação simultânea de OTC combinada com DICLO ou com PIRO em medicamentos veterinários, mas também para quantificação individual desses fármacos em produtos farmacêuticos para uso humano.

4.2.5 Análise Comparativa entre o Método Cromatográfico e os Espectrofotométricos

A comparação entre métodos analíticos é uma ferramenta necessária para determinar se os procedimentos são analiticamente equivalentes. Avaliou-se a equivalência analítica entre o método por CLAE e métodos espectrofotométricos (Capítulo III) para a determinação simultânea de OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO nos medicamentos veterinários.

Portanto, foi realizada a análise estatística dos teores médios desses fármacos nos medicamentos veterinários, usando o teste-*t* de Student bicaudal com 95% de intervalo de confiança (I.C).

Os teores dos fármacos, presentes nas soluções injetáveis para uso animal, foram analisados através dos métodos analíticos e encontram-se na Tabela 4.19.

Tabela 4.19. Teores dos fármacos, presentes nas soluções injetáveis para uso animal, analisados pelos métodos analíticos propostos.

Amostras comerciais	Teor (%)	
	CLAE	Espectrotometria no UV
Associação OTC + DICLO^a		
	101,71	100,75
OTC	101,30	101,07
	102,35	102,83
Teor Médio (%) ± DPR	101,79 ± 0,52	101,55 ± 1,10
	99,93	100,34
DICLO	99,57	98,31
	100,94	100,25
Teor Médio (%) ± DPR	100,15 ± 0,71	99,63 ± 1,15
Associação OTC + PIRO^b		
	100,29	101,80
OTC	100,29	100,28
	100,51	101,42
Teor Médio (%) ± DPR	100,36 ± 0,13	101,80 ± 0,79
	99,47	100,45
PIRO	99,44	100,65
	99,57	98,53
Teor Médio (%) ± DPR	99,49 ± 0,07	99,48 ± 1,17

^aTerramicina Mais[®]; ^bTerracam Plus[®]; OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam. DPR: desvio padrão relativo.

A Tabela 4.20 traz a análise estatística dos resultados obtidos para o doseamento dos fármacos presentes nas soluções injetáveis para uso animal através dos métodos propostos, empregando o teste-*t* de Student bicaudal com 95% de intervalo de confiança (I.C.).

Tabela 4.20. Análise estatística, empregando o teste-*t* bicaudal^a, dos resultados obtidos para o doseamento dos fármacos presentes nas soluções injetáveis para uso animal através dos métodos propostos.

Parâmetro	Associação OTC + DICLO ^b		Associação OTC + PIRO ^c	
	OTC	DICLO	OTC	PIRO
Graus de liberdade	3	3	4	4
$t_{\text{calculado}}$	0,33	0,66	-1,74	-0,57
$t_{\text{crítico}}$	3,18	3,18	2,78	2,78

^aI.C: 95%; ^bTerramicina Mais[®]; ^cTerracam Plus[®]; OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

Analisando-se os dados obtidos através o teste-*t* de Student bicaudal, apresentados na Tabela 4.20, observa-se que a determinação dos teores de OTC, DICLO e PIRO pelos métodos propostos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, já que nenhum dos valores obtidos para *t* ($t_{\text{calculado}}$, I.C. = 95%) ultrapassou seus respectivos valores críticos ($t_{\text{crítico}}$). Esses resultados indicam que os métodos por CLAE e espectrofotometria no UV propostos são analiticamente equivalentes.

4.3. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um método analítico preciso, exato, sensível, seletivo, robusto e rápido para determinação simultânea de OTC associada ao DICLO ou ao PIRO em soluções injetáveis para uso animal, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, existe a possibilidade desse método ser empregado na rotina do controle de qualidade desses fármacos em medicamentos para uso humano.

Por último, a análise estatística dos resultados obtidos para o doseamento dos fármacos presentes nos medicamentos veterinários revelou a existência de equivalência analítica entre os métodos desenvolvidos e validados neste estudo (CLAE e espectrofotometria no UV).

CAPÍTULO V

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Os tópicos abordados neste capítulo visam constatar se o método por CLAE-DAD, previamente desenvolvido e validado para determinação simultânea de oxitetraciclina associada ao diclofenaco de sódio ou ao piroxicam, pode ser considerado indicativo de estabilidade. Além disso, através da identificação dos produtos de degradação formados, da determinação da cinética da reação e da citotoxicidade *in vitro* pretende-se entender a rota de degradação dos fármacos e as condições ideais de armazenamento dos produtos acabados, bem como prever alguns produtos de degradação que podem estar presentes no ambiente.

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos Isolados

Primeiramente, o estudo de degradação forçada foi realizado com os fármacos isolados com finalidade de verificar a cinética de degradação e obter uma condição experimental ideal, em termos de concentração do degradante e tempo de exposição, que propiciasse um decaimento de teor de princípio ativo na faixa de 10 a 30% (WHO, 2009). Portanto, foram preparadas soluções padrões-estoques das SQC de OTC ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), DICLO ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e PIRO ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando acetonitrila como solvente. Em seguida, alíquotas de 10 mL dessas soluções foram submetidas, separadamente, às condições de degradação descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Condições de degradação testadas durante estudo de degradação forçada dos fármacos isolados.

Condição de degradação	Degradante	Tempo de exposição (h)
Hidrólise alcalina	NaOH 0,1 M e 0,01 M ^b , 60°C ^c	0 a 8
Hidrólise ácida	HCl 0,1 M e 0,01 M ^b , 60°C ^c	0 a 48
Hidrólise neutra	H ₂ O ^b , 60°C ^c	0 a 3
Hidrólise oxidativa	H ₂ O ₂ 3%, 0,3% e 0,03% ^b ,	0 a 24
Fotólise ^a	Luz UV/VIS, H ₂ O ^b , TA ^d	0 a 120

^a Câmara UV/VIS de madeira com dimensões de 35 x 35 x 110 cm (altura x largura x comprimento), equipada com duas lâmpadas: Philips® TLT 40W/75 RS UVB (290-350 nm) e Philips® TL 40W/12 RS (400-700 nm).^b Volume = 10 mL; ^c Banho-maria Delta®, modelo 105DC; ^d TA: temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$);

A partir das soluções degradadas, obtidas nos diferentes intervalos de tempo, foram transferidas, separadamente, alíquotas de 1 mL (OTC), 0,7 mL (DICLO) e 0,8 mL (PIRO) para balões volumétricos de 10 mL (OTC) ou 25 mL (DICLO e PIRO). Os volumes foram completados com fase móvel, composta por metanol:acetonitrila:água pH 2,5 (40:35:25, v/v/v), obtendo as seguintes concentrações finais: OTC a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; DICLO a $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e PIRO a $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essas soluções foram injetadas em triplicata, sendo analisadas pelo método por CLAE-DAD previamente desenvolvido e validado (Capítulo IV). As porcentagens de decaimento de teor dos fármacos foram calculadas por intermédio das equações das retas obtidas a partir das respectivas curvas analíticas.

5.1.1.1. Determinação da Cinética Reacional de Degradação dos Fármacos

Os modelos cinéticos de zero, primeira e segunda ordem foram testados através do método de regressão, a fim de explicar o comportamento do decaimento de teor dos fármacos frente às diferentes condições de degradação testadas.

Conforme descrito na Tabela 5.2, as constantes de velocidade das reações (k), o tempo de reação médio ou a meia-vida ($t_{50\%}$ ou $t_{1/2}$) e o tempo necessário para que ocorra redução de 10% da concentração inicial do fármaco ($t_{90\%}$) foram calculados de acordo com a ordem da reação analisada (NETZ; ORTEGA, 2002).

Tabela 5.2. Modelos matemáticos empregados na determinação de k , $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ de acordo com a ordem de reação analisada.

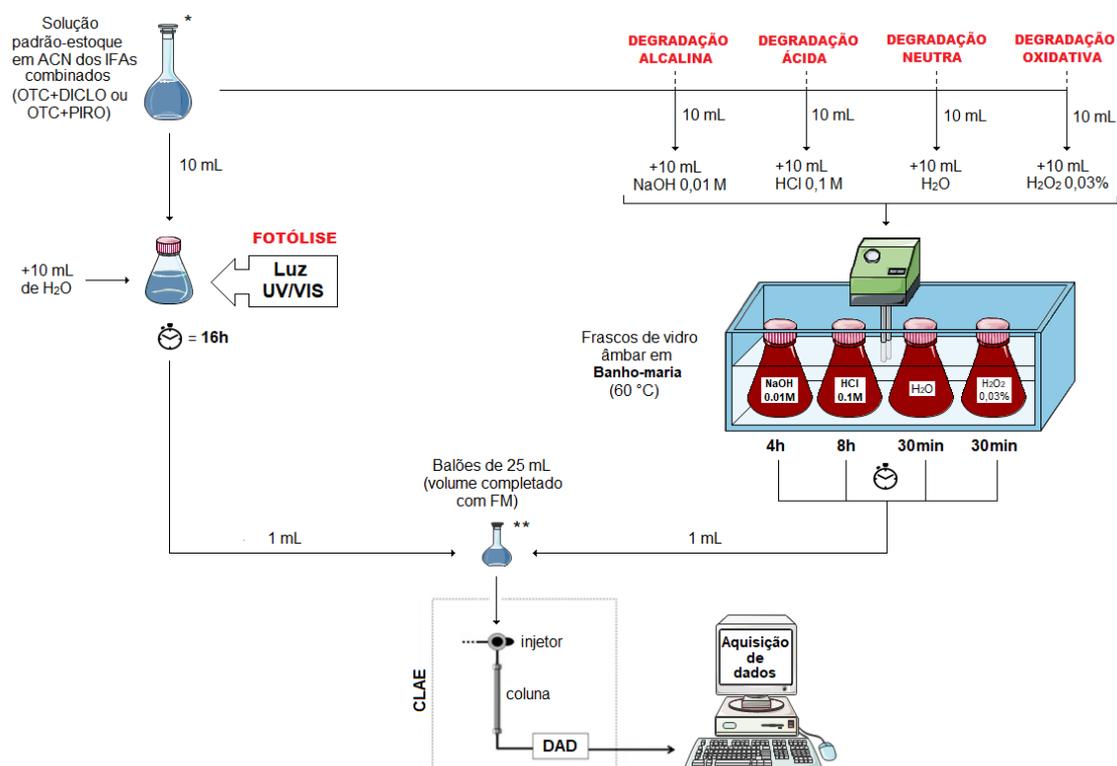
Parâmetro determinado	Ordem da reação		
	Zero	Primeira	Segunda
k	$[C] = [C]_0 - kt$	$\ln[C] = -kt + \ln[C]_0$	$\frac{1}{[C]} = \frac{1}{[C]_0} + kt$
$t_{50\%}^a$	$\frac{1}{k} \times \frac{[C]_0}{2}$	$\frac{0,693}{k}$	$\frac{1}{k \times [C]_0}$
$t_{90\%}^a$	$\frac{0,1 \times [C]_0}{k}$	$\frac{0,105}{k}$	$\frac{1}{9k \times [C]_0}$

k : constante de velocidade de reação; $[C]_0$: concentração inicial do fármaco no tempo zero; $[C]$: concentração do fármaco após degradação no tempo t ; $\ln[C]_0$: logaritmo natural da concentração inicial do fármaco no tempo zero; $\ln[C]$: logaritmo natural da concentração do fármaco após degradação no tempo t .^a Expressos em horas.

5.1.2. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos em Associação

Com a finalidade de verificar a seletividade do método cromatográfico para a determinação simultânea dos fármacos na presença de seus produtos de degradação, foi realizado o estudo de degradação forçada com os fármacos em associação (OTC + DICLO ou OTC + PIRO), utilizando os mesmos degradantes descritos na Tabela 5.1. No entanto, foram empregadas apenas as concentrações de degradante e os tempos de exposição que propiciaram uma degradação na faixa ideal (10 a 30%) para pelo menos um dos fármacos. O protocolo experimental adotado encontra-se detalhadamente descrito na Figura 5.1.

Figura 5.1. Protocolo experimental utilizado para a realização do estudo de degradação forçada dos fármacos em associação.



*Concentração dos ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) nas soluções padrão-estoques (balões volumétricos de 100 mL): oxitetraciclina (OTC) a $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO) a $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando acetonitrila (ACN); **Concentração dos IFAs nas soluções finais (balões volumétricos de 25 mL): OTC a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; DICLO e PIRO a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, diluídas em fase móvel (FM); ***Método CLAE-DAD desenvolvido e validado: coluna InertSustain® HP C₈; fase móvel, em modo isocrático, composta por metanol:acetonitrila:água, 40:35:25, v/v/v, pH 2,5; vazão de 1 mL min^{-1} ; volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; Luz ultravioleta (UV): 290-350 nm (UVB) e visível (VIS): 400-700 nm.

Fonte: Próprio autor

Paralelamente, as soluções dos brancos, compostas por acetonitrila e os respectivos degradantes, foram submetidas às condições de degradação descritas na Figura 5.1.

5.1.3. Isolamento dos Produtos de Degradação

Os produtos de degradação majoritários foram isolados através do preparo de novas soluções dos fármacos combinados (OTC + DICLO e OTC + PIRO). Essas soluções foram analisadas de acordo com o protocolo experimental descrito na Figura 5.1, com exceção do fato das concentrações dos fármacos nas soluções padrão-estoques e soluções finais serem de, respectivamente, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar das concentrações dessas soluções estarem fora da faixa linear do método, seu preparo foi propositalmente pensado com a finalidade de obter uma quantidade adequada dos produtos de degradação para análise qualitativa (identificação).

Portanto, a partir das soluções degradadas de OTC + DICLO e OTC + PIRO a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram coletadas de 20 a 30 frações correspondentes aos picos dos produtos de degradação detectados pelo método CLAE-DAD. Em seguida, as frações coletadas foram rotoevaporadas na temperatura de 45°C , com auxílio do rotaevaporador Buchi® (Zurique, Suíça), modelo R-3 *vacuum pump* V-700. Posteriormente, as frações resultantes foram congeladas com nitrogênio líquido e, finalmente, liofilizadas durante aproximadamente 3 horas em liofilizador Christ® (Osterode am Harz, Alemanha), modelo Alpha 2-4 LD plus.

5.1.4. Identificação dos Principais Produtos de Degradação

Os produtos de degradação isolados foram solubilizados em $150 \mu\text{L}$ de água:acetonitrila (80:20, v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM). O método CLAE-EM foi previamente descrito no Capítulo II, durante a caracterização das matérias-primas dos fármacos, e encontra-se sumarizado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Condições empregadas para a identificação dos produtos de degradação por CLAE-EM.

Condição	Especificação
Equipamento	Cromatógrafo a líquido Shimadzu [®] , modelo LC-20 AD acoplado ao espectrômetro de massas Bruker Daltonics [®] , modelo MicroTOF-III
Fonte e modo de ionização	Eletrospray, modo positivo
Analísadores	Quadrupolo e TOF
Gás de nebulização, secante e de colisão	Nitrogênio
Voltagem do capilar	10 eV
Coluna e Temperatura	Kinetex [®] C18 (150 x 2,1 mm, tamanho de partícula de 2,6 µm), acondicionada a 50°C
Fase móvel	Água (Fase A) e acetronitrila (Fase B), ambas com 0,1% de ácido fórmico. Gradiente de eluição: 0 a 2 minutos: 3% de fase B; 2 a 25 minutos: 25% de fase B; 25 a 43 minutos: 80% de fase B; 43 a 48 minutos: 3% de fase B
Vazão	0,3 mL min ⁻¹
Volume de injeção	5 µL
Análise e Processamento dos dados	Data Analysis [®]

TOF: *time-of-flight* (tempo de voo)

5.1.5. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* dos Produtos de Degradação Selecionados

Para os ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos produtos de degradação selecionados foi utilizada a linhagem celular NIH/3T3 (ATCC–CRL 1658, fibroblasto murino), adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As células foram cultivadas em meio contendo RPMI 1640 (Sigma Aldrich[®]), suplementado com penicilina-estreptomicina 1% e soro fetal bovino (SFB) 10%, e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂ até a formação da monocamada com pelo menos 80% de confluência (FRESHNEY, 2005). Em seguida, foram semeadas em placas de 96 cavidades e incubadas por 24 horas.

As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo a concentração de 100 mg mL^{-1} e diluídas em meio contendo RPMI até as concentrações de 0,25, 2,5, 25 e $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, as amostras nessas concentrações foram aplicadas, em triplicata, nas placas-teste que foram novamente incubadas por 48 horas.

Decorrido o tempo de 48 horas de incubação, o volume de meio das cavidades da placas de 96 poços foi aspirado e as células foram fixadas com adição de $100 \text{ } \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) 20 % durante 30 minutos a 4°C . Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram coradas com sulforrodamina B (SRB) a 1% por 30 minutos, seguindo o método descrito por Skehan e colaboradores (1990). Após o tempo de coloração, foi realizada a lavagem das placas com ácido acético 1% e a adição do tampão Trizma Base[®] (10 mM, pH 10,5) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas.

Finalmente, as absorvâncias das células tratadas com as amostras (placas-teste, T), do controle negativo (CN), do branco das amostras-teste e da placa T_0 foram medidas em triplicata no comprimento de onda de 540 nm. Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo que correspondeu às soluções de doxorrubicina (Eurofarma) nas concentrações de 0,025, 0,25, 2,5 e $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

O crescimento celular, expresso em porcentagem, foi calculado através das equações 5.1 e 5.2 (MONKS et al., 1991), com o auxílio do programa SoftMax Pro[®] versão 6.3:

Equação 5.1:

$$\text{Se } T \geq T_0 \text{ e } < \text{CN: \% de Crescimento celular} = 100 \times [(T - T_0) / (\text{CN} - T_0)]$$

Equação 5.2:

$$\text{Se } T < T_0: \% \text{ de Crescimento celular} = 100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$$

Em que: T corresponde às absorvâncias das amostras nas placas-teste; T_0 às absorvâncias da placa que não recebeu aplicação das amostras; CN à absorvância do controle negativo (células não tratadas).

A concentração que inibiu 50% do crescimento celular (*growth inhibition*, GI_{50}) de cada amostra-teste foi determinada, em triplicata, pela análise de regressão não linear, utilizando o programa Origin[®], versão 8.0.

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Otimização do Protocolo Experimental adotado para o Estudo de Degradação Forçada

Estudos de degradação forçada de ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) podem fornecer informações valiosas sobre a estabilidade intrínseca do fármaco que incluem a identificação de produtos de degradação, bem como a compreensão de seu mecanismo de formação e da cinética da reação. A interpretação dessas informações permite antecipar futuros problemas de estabilidade do produto acabado, possibilitando a seleção da forma farmacêutica, da embalagem e das condições de transporte e estocagem ideais (SINGH et al., 2013; KOGAWA; SALGADO, 2016).

Neste contexto, trabalhos recentes descritos na literatura abordam a degradação forçada e a identificação de produtos de degradação de IFAs isolados (RAMESH; RAO; RAO, 2014; SASTRY et al., 2016; SKIBINSKI et al., 2016; CHADHA; BALI; BASAL, 2016; LEI et al., 2017; SWAIN; SAMANTHULA, 2017; JOHNIIRANI et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017). No entanto, apesar das condições experimentais dos estudos de degradação forçada variarem de acordo com o IFA em decorrência da sua estabilidade intrínseca, muitas vezes os trabalhos científicos deixam dúvidas a respeito do protocolo ou delineamento experimental seguido e, conseqüentemente, da condução do experimento. Por isso, salienta-se a importância da elaboração de um protocolo experimental detalhado, assim como o proposto neste trabalho (Figura 5.1), sobretudo para a realização da degradação de IFAs combinados, uma vez que a maioria dos trabalhos aborda apenas degradação de IFAs isolados.

Para a elaboração do protocolo experimental descrito na Figura 5.1, diferentes concentrações dos degradantes e tempos de exposição foram testados (Tabela 5.1). No entanto, as condições experimentais adotadas nesse protocolo foram racionalmente escolhidas, pois propiciaram de 10 a 30% de degradação para pelo menos um dos fármacos. Porcentagens de degradação superiores a esse limite não são indicadas em razão do aparecimento de produtos de degradação secundários que, quando comparados aos produtos de degradação primários ou majoritários, não trazem informações úteis à respeito do mecanismo de degradação do fármaco (WHO, 2009).

A acetonitrila (ACN) foi utilizada como solvente, pois permitiu a completa solubilização dos IFAs, sob as condições de degradação testadas. Além disso, quando comparada ao metanol, a ACN é geralmente considerada um solvente menos reativo. O uso de metanol deve ser especialmente evitado durante os estudos de degradação forçada caso o fármaco possua grupamentos eletrofílicos (ácido carboxílico, éster ou amidas), pois esse solvente pode agir como nucleófilo, interferindo nos produtos de degradação formados (BAERTSCHI; ALSANTE; REED; 2011).

Entretanto, deve ser salientado que a ACN não pode ser classificada como um solvente totalmente inerte, pois é reconhecido sua degradação na presença de bases (pH 13) ou ácidos (pH 1), sob altas temperaturas, resultando na formação de acetamida e/ou ácido acético que aparecem como picos de eluição antecipada facilmente detectáveis por CLAE-UV ou CLAE-DAD. Por isso, a análise do branco, composto pelo solvente e o degradante, é altamente indicada (BAERTSCHI; ALSANTE; REED; 2011). Assim sendo, os brancos analisados a partir do protocolo experimental proposto (Figura 5.1) não apresentaram picos relacionados aos prováveis produtos de degradação de ACN, evidenciando que o solvente escolhido não interferiu no estudo de degradação forçada dos fármacos analisados.

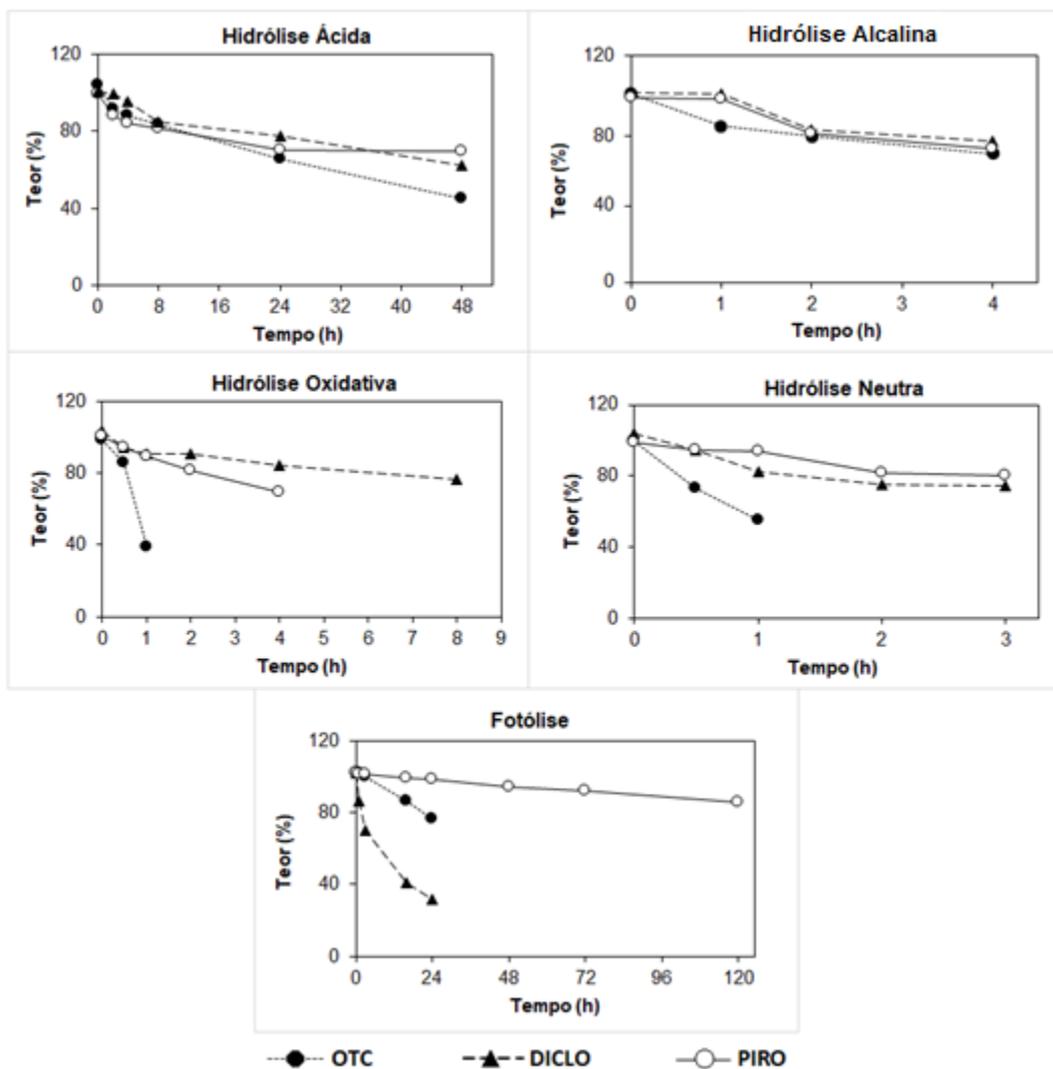
Por último, outros fatores que foram considerados durante a execução dos experimentos de degradação forçada foram: a utilização de frascos de borossilicato de cor âmbar nas degradações hidrolíticas para evitar a fotodegradação dos fármacos (SUN et al., 2013), e a não neutralização das soluções resultantes das hidrólises ácidas e alcalinas, antes da análise por CLAE. Segundo Baertschi, Alsante e Reed (2011), essa etapa não é recomendada devido à possível formação de precipitados ou artefatos de reação que, além de influenciarem nos resultados, podem danificar o sistema cromatográfico.

5.2.2. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos Isolados

A Figura 5.2 mostra os perfis de decaimento de teor de OTC, PIRO e DICLO, sob as diferentes condições de degradação forçada analisadas. Nessa Figura encontram-se representadas apenas as condições de degradação, em termos de concentração dos degradantes (HCl, NaOH e H₂O₂), que

proporcionaram degradação mais branda para cada um dos fármacos analisados.

Figura 5.2. Perfis de decaimento de teor de OTC (oxitetraciclina), DICLO (diclofenaco de sódio) e PIRO (piroxicam), submetidos à hidrólise ácida (HCl 0,1 M), alcalina (NaOH 0,01 M), oxidativa (H₂O₂ 0,03%), neutra e fotólise.



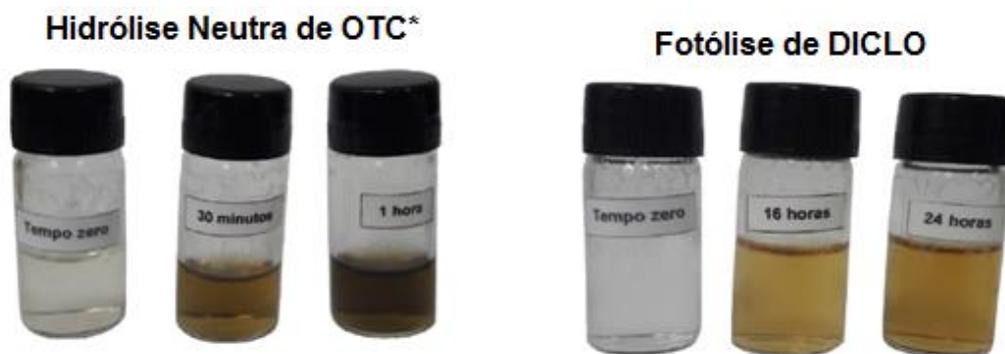
Nas condições de degradação forçada estudadas, os fármacos foram analisados em diferentes intervalos de tempo, exceto para as hidrólises ácidas e básicas que foram investigadas nos mesmos intervalos de tempo para os três fármacos sendo, respectivamente, 48 e 4 horas. Nas demais condições de degradação, a escolha de diferentes tempos de exposição para OTC, DICLO e PIRO foi devido à estabilidade intrínseca de cada analito.

Através da análise visual dos gráficos presentes na Figura 5.2, presume-se que PIRO foi o fármaco mais estável e OTC o mais lábil para a maioria das condições de degradação analisadas. Por exemplo, OTC

apresentou considerável decaimento de teor logo na primeira hora do experimento de hidrólise neutra e oxidativa. A exceção ocorreu em relação ao experimento de fotólise em que DICLO revelou ser o fármaco mais fotossensível. Nessa condição de degradação, DICLO apresentou uma porcentagem de degradação de, aproximadamente, 70% em 24 horas de exposição à luz UV/VIS, enquanto que OTC 25% e PIRO 7%.

Particularmente, na hidrólise neutra e oxidativa de OTC e na fotólise de DICLO houve notável escurecimento das soluções degradadas em comparação com as soluções não degradadas (Figura 5.3). Essa mudança na coloração pode ser atribuída às alterações nos grupamentos cromóforos, presentes nas moléculas dos produtos de degradação formados, em relação à molécula do fármaco original (SWAIN; SAMANTHULA, 2017).

Figura 5.3. Mudança na coloração das soluções de OTC (oxitetraciclina) submetida à hidrólise neutra* e de diclofenaco de sódio (DICLO) à fotólise, em comparação com as soluções não degradadas (tempo zero).
* mesmo comportamento para hidrólise oxidativa.



5.2.2.1. Determinação da Cinética Reacional de Degradação dos Fármacos

A determinação da ordem da reação está inserida no contexto da cinética química, um campo extremamente vasto que tem por objetivo a correlação matemática de dados experimentais, e visa estabelecer hipóteses sobre os fatores determinantes da velocidade de uma reação (NETZ; ORTEGA, 2002).

No âmbito farmacêutico, a cinética química tem aplicação relevante nos estudos de estabilidade de fármacos e medicamentos. O conhecimento do modelo matemático apropriado permite estabelecer prazos de validade, determinar as condições ideais para o armazenamento, detectar

incompatibilidades decorrentes da mistura de componentes da formulação e evitar a toxicidade associada aos produtos de degradação (NETZ; ORTEGA, 2002; WATERMAN; ADAMI, 2005).

Assim sendo, na Tabela 5.4 encontram-se os coeficientes de determinação (R^2) dos modelos cinéticos testados para avaliação da degradação dos fármacos, submetidos às diferentes condições degradativas. Os modelos matemáticos de ordem zero, primeira e segunda ordem foram selecionados para a avaliação do comportamento de degradação dos fármacos, pois a maioria dos produtos farmacêuticos segue essas leis cinéticas (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JÚNIOR, 2016).

Tabela 5.4. Coeficientes de determinação (r^2) dos modelos cinéticos de degradação dos fármacos.

Condição de degradação	Ordem Zero			Primeira Ordem			Segunda Ordem		
	OTC	DICLO	PIRO	OTC	DICLO	PIRO	OTC	DICLO	PIRO
Hidrólise ácida	0,952	0,936	0,703	0,986	0,961	0,740	0,990	0,977	0,772
Hidrólise alcalina	0,882	0,859	0,883	0,915	0,870	0,896	0,944	0,881	0,908
Hidrólise neutra	0,989	0,833	0,935	0,997	0,852	0,936	0,995	0,869	0,935
Hidrólise oxidativa	0,903	0,846	0,979	0,860	0,881	0,987	0,823	0,911	0,988
Fotólise	0,997	0,899	0,990	0,993	0,996	0,994	0,986	0,995	0,996

Independentemente do modelo cinético, os coeficientes de determinação (r^2) mais próximos do valor 1,0 indicam a ordem da reação (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001). Portanto, conforme observado na Tabela 5.4, sugere-se que todos os fármacos obedeceram ao modelo cinético de segunda ordem para hidrólise ácida e básica, o que indica que a velocidade da reação depende do quadrado das concentrações dos fármacos. Na hidrólise neutra, apenas DICLO decaiu conforme modelo de segunda ordem, enquanto OTC e PIRO obedeceram ao modelo de primeira ordem que presume que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração remanescente do fármaco em relação ao tempo (NETZ; ORTEGA, 2002). Para degradação oxidativa, a OTC degradou conforme cinética de ordem zero, isto é, sua degradação possui velocidade constante e independe da concentração de qualquer reagente, já DICLO e PIRO obedeceram ao modelo cinético de segunda ordem. Por fim, na fotólise, os modelos matemáticos que mais se

encaixaram no decaimento do teor de OTC, DICLO e PIRO foram, respectivamente, os de ordem zero, primeira e segunda ordem.

As constantes de velocidade das reações (k), a meia vida ($t_{50\%}$) e o tempo necessário para que ocorra redução de 10% da concentração inicial do fármaco ($t_{90\%}$) foram calculados, para cada condição de degradação, através do modelo cinético mais adequado e encontram-se descritos na Tabela 5.5. Em todos os casos, a inclinação da reta ou coeficiente angular corresponde à constante de velocidade da reação (k) de degradação dos fármacos.

Tabela 5.5. Constante de degradação (k), meia-vida ($t_{50\%}$) e $t_{90\%}$ dos fármacos de acordo com o modelo cinético mais adequado.

Condição de Degradação	OTC			DICLO			PIRO		
	k	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$	k	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$	k	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$
Hidrólise ácida	0,00020	50,0	5,6	0,00010	90,0	10,1	0,00008	110,0	1,1
Hidrólise alcalina	0,00100	9,7	0,8	0,00080	12,9	1,8	0,00100	10,2	1,3
Hidrólise neutra	-0,59700	1,2	0,2	0,00130	7,6	0,8	-0,07500	9,0	1,2
Hidrólise oxidativa	-59,9400	0,9	0,2	0,00040	24,3	2,0	0,00230	4,4	0,6
Fotólise	-1,06100	49,8	12,1	-0,04600	12,9	0,06	0,00002	510,0	65,6

$t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ expressos em horas. OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam

Como é possível observar na Tabela 5.5, os valores de $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ variaram de acordo com estabilidade intrínseca de cada fármaco, estando de acordo com o verificado através dos gráficos de decaimento de teor (Figura 5.2). De modo geral, PIRO foi o fármaco mais estável, pois apresentou os maiores valores de $t_{50\%}$ e os menores valores de k para as condições de degradação analisadas. Entretanto, OTC foi o fármaco mais lábil, ou seja, demonstrou os menores valores de $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$. Particularmente, a hidrólise neutra e oxidativa foram as condições em que OTC apresentou maior instabilidade com valores de $t_{50\%}$ de 1,2 e 0,9 horas, respectivamente. Esse resultado corrobora com o encontrado por Xuan e colaboradores (2009) que observaram que a hidrólise de OTC foi muito mais rápida em pH neutro do que em pH ácido ou básico. Além disso, a maior estabilidade de OTC em condições hidrolíticas ácidas ($t_{50\%} = 50$ h e $t_{90\%} = 5,6$ horas) do que em alcalinas

($t_{50\%} = 9,7$ h e $t_{90\%} = 0,8$ h) também está de acordo com o descrito na literatura (DOI; STOSKOPF, 2000; XUAN et al., 2009).

Comparado com OTC, os fármacos DICLO e PIRO foram menos propensos às reações de hidrólise ácida, alcalina, neutra e oxidativa, estando de acordo com os estudos de estabilidade descritos na literatura para esses anti-inflamatórios não esteroidais (STAREK et al., 2009; ELZAYAT et al., 2014). Entretanto, DICLO apresentou expressiva fotodegradação ($t_{50\%} = 12,9$ h e $t_{90\%} = 0,06$ h), o que corrobora com o previsto na literatura (AGÜERA et al., 2005; KEEN et al., 2013).

5.2.3. Estudo de Degradação Forçada dos Fármacos em Associação

A Tabela 5.6 traz as porcentagens de degradação dos fármacos, sob as condições experimentais selecionadas para realização da degradação das associações em estudo (OTC + DICLO e OTC + PIRO). Conforme é possível observar nessa Tabela, os fármacos apresentaram diferentes porcentagens de degradação, sob as condições adotadas, em razão de sua estabilidade intrínseca. No entanto, todas as condições propiciaram porcentagem de degradação dentro do limite recomendado (10 a 30%) (WHO, 2009) para pelo menos um dos fármacos. Apenas DICLO, na condição otimizada para fotólise, apresentou porcentagem de degradação superior a esse valor e, conforme explicado anteriormente, isso pode ser atribuído à expressiva fotodegradação desse fármaco.

Tabela 5.6. Porcentagem de degradação dos fármacos, sob as condições selecionadas para realização do estudo de degradação forçada de OTC (oxitetraciclina) combinada com DICLO (diclofenaco de sódio) ou com PIRO (piroxicam).

Condição de degradação	Degradante	Duração	Degradação (%)		
			OTC	DICLO	PIRO
Hidrólise alcalina ^a	NaOH 0,01 M	4 h	29,96	24,40	25,44
Hidrólise ácida ^a	HCl 0,1 M	8 h	20,13	15,86	17,80
Hidrólise neutra ^a	H ₂ O	30 min	26,38	8,71	4,00
Hidrólise oxidativa ^a	H ₂ O ₂ 0,03%	30 min	12,99	9,44	6,78
Fotólise ^b	Luz UV/VIS ^c ,	16 h	15,32	60,85	3,77

Temperatura de exposição: ^a 60°C e ^b temperatura ambiente (25 ± 2°C);
^c lâmpadas: Philips® TLT 40W/75 RS UVB (290-350 nm) e Philips® TL 40W/12 RS (400-700 nm).

Na Figuras 5.4 e 5.5 encontram-se ilustrados, respectivamente, os cromatogramas das associações de OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO e de seus respectivos produtos de degradação, obtidos a partir do método CLAE-DAD desenvolvido e validado.

Figura 5.4. Cromatogramas da associação de oxitetraciclina (OTC, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e diclofenaco de sódio (DICLO, $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de seus produtos de degradação (PD): (a) sem degradar; (b) hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M, 4 h); (c) hidrólise ácida (HCl 0,1 M, 8 h); (d) hidrólise neutra (H_2O , 30 min); (e) hidrólise oxidativa (H_2O_2 0,03%, 30 minutos) e (f) Fotólise (luz UV/VIS, 16 h). Condições cromatográficas: coluna InertSustain[®] HP C₈; fase móvel, em modo isocrático, composta por metanol:acetonitrila:água, 40:35:25, v/v/v, pH 2,5; vazão de 1 mL min^{-1} ; volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

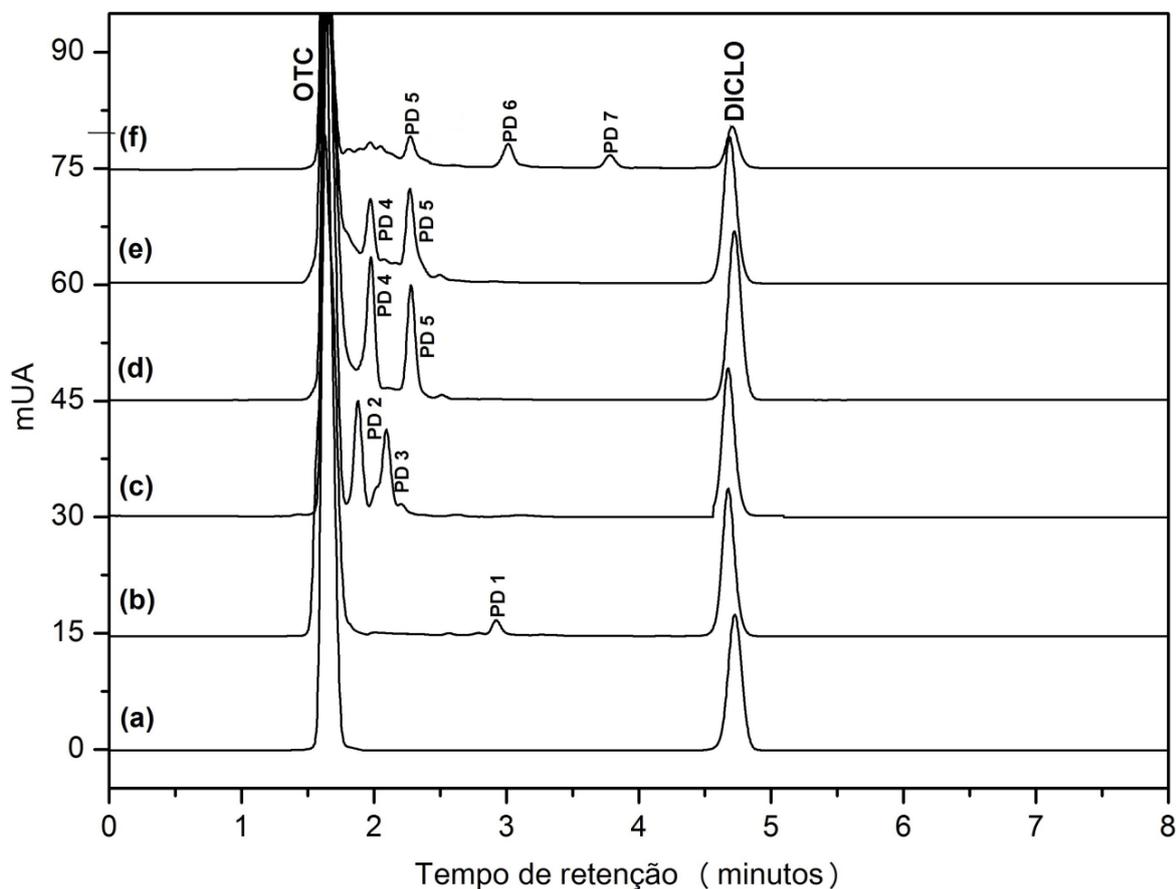
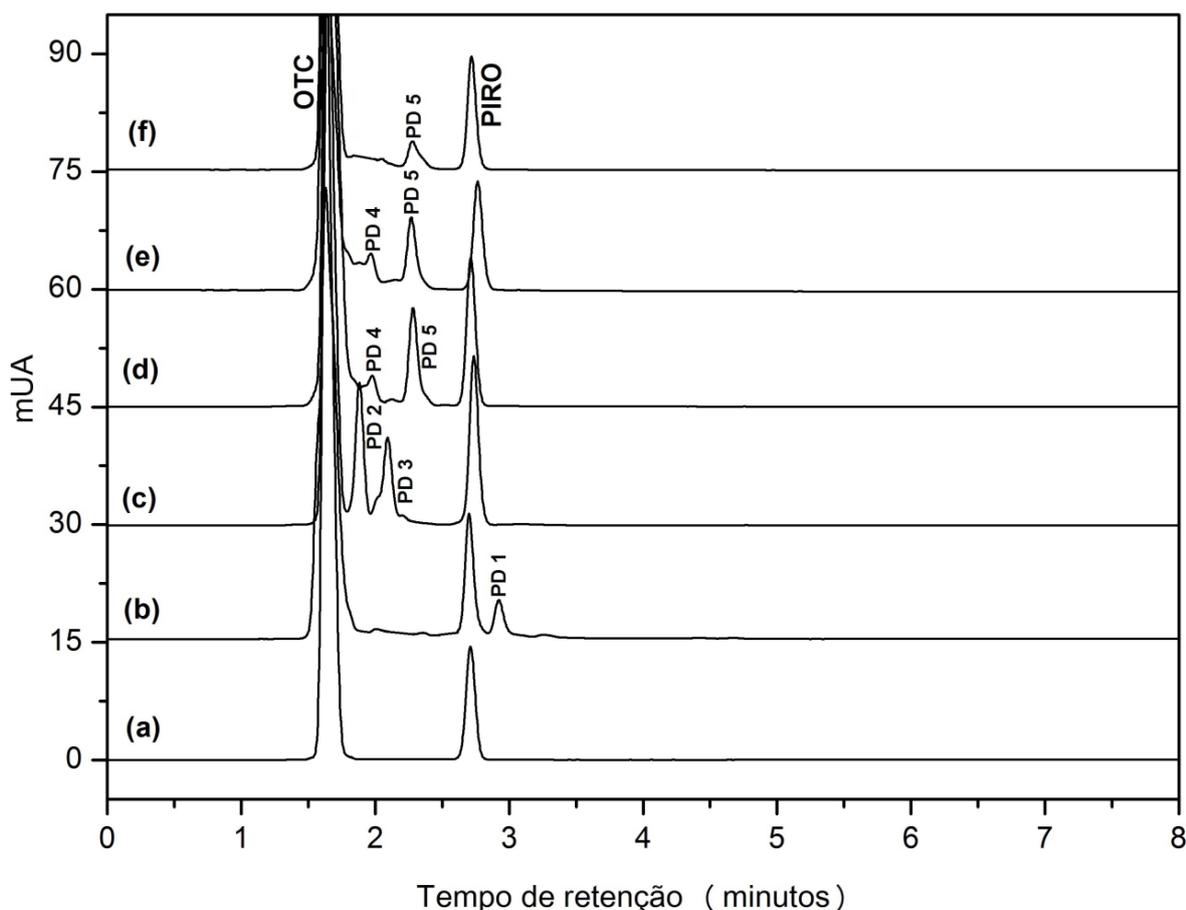


Figura 5.5. Cromatogramas da associação de oxitetraciclina (OTC, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e piroxicam (PIRO, $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem degradar e de seus produtos de degradação (PD): (a) sem degradar; (b) hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M, 4 h); (c) hidrólise ácida (HCl 0,1 M, 8 h); (d) hidrólise neutra (H_2O , 30 min); (e) hidrólise oxidativa (H_2O_2 0,03%, 30 min) e (f) Fotólise (luz UV/VIS, 16 h). Condições cromatográficas: coluna InertSustain[®] HP C₈; fase móvel, em modo isocrático, composta por metanol:acetonitrila:água, 40:35:25, v/v/v, pH 2,5; vazão de 1 mL min^{-1} ; volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.



Na Figura 5.4 nota-se a presença de sete produtos de degradação (PD), enquanto cinco PD são observados na Figura 5.5. Independentemente da associação, os valores de pureza dos picos cromatográficos dos fármacos foram superiores a 990 para todas as condições de degradação. Esses valores indicam que os picos cromatográficos dos fármacos estão puros, ou seja, não há coeluição de PDs, sendo um importante indício da seletividade do método (STAHL, 2003; MAIO et al., 2006). Além disso, observou-se que não houve mudanças significativas nos tempos de retenção dos fármacos nas soluções degradadas em comparação com as não degradadas. Portanto, o método por CLAE-DAD desenvolvido e validado (Capítulo IV) pode ser considerado

indicativo de estabilidade para determinação simultânea de OTC associada ao DICLO ou ao PIRO, pois possibilitou uma eficiente separação dos fármacos e de seus produtos de degradação nas duas associações estudadas.

A Tabela 5.7 dispõe a relação dos PD obtidos a partir de diferentes condições de degradação e detectados pelo método CLAE-DAD, bem como seus respectivos tempos de retenção.

Tabela 5.7. Produtos de degradação (PD) obtidos e detectados pelo método CLAE-DAD.

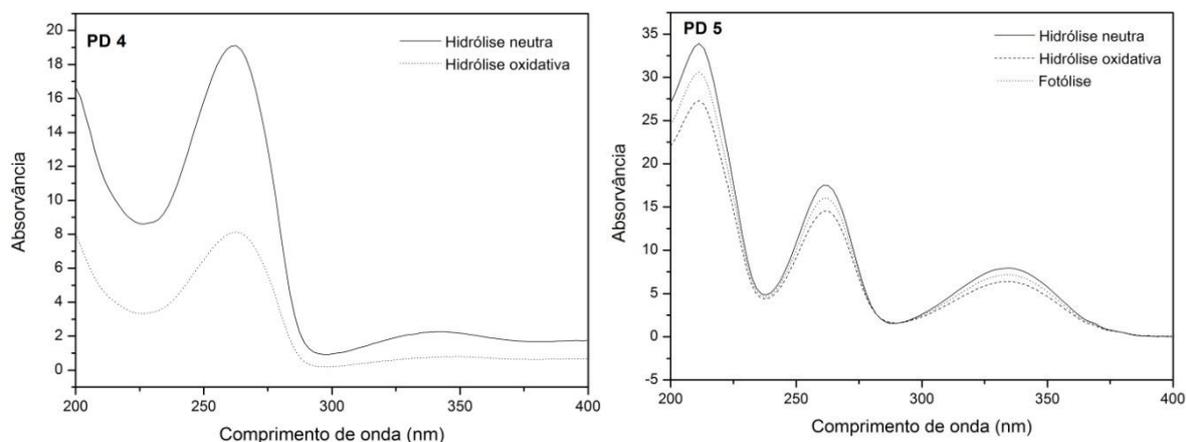
Produtos de degradação	Tempo de retenção (minutos)	Condição de degradação
PD 1	2,92	Hidrólise alcalina
PD 2	1,88	Hidrólise ácida
PD 3	2,09	Hidrólise ácida
PD 4	1,98	Hidrólise neutra e oxidativa
PD 5	2,28	Hidrólise neutra, oxidativa e fotólise
PD 6 ^a	3,04	Fotólise
PD 7 ^a	3,78	Fotólise

^a Presentes apenas na degradação forçada da associação de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio.

Conforme observado na Tabela 5.7 e nas Figuras 5.4 e 5.5, o PD 4 ($t_R = 1,98$ minutos) e o PD 5 ($t_R = 2,28$ minutos) se repetiram nas duas associações estudadas, sob as condições hidrólises neutra e oxidativa, sendo que, particularmente, o PD 5 também esteve presente na degradação fotolítica. Sugere-se que esses PD sejam oriundos de OTC, uma vez que esse é o fármaco em comum das duas associações. Adicionalmente, acredita-se que os PD 6 e 7 sejam decorrentes da fotodegradação de DICLO, uma vez que somente apareceram no cromatograma de sua respectiva associação.

Além do tempo de retenção idêntico, os produtos de degradação denominados como PD 4 (hidrólise neutra e oxidativa) apresentaram entre si similaridade espectral na região do UV, bem como os denominados como PD 5 (hidrólise neutra, oxidativa e fotólise) (Figura 5.6).

Figura 5.6. Perfis espectrais na região do ultravioleta dos produtos de degradação (PD) 4 e PD 5, sob diferentes condições de degradação.



5.2.4. Identificação dos Principais Produtos de Degradação

Os espectros de massas de alta resolução dos produtos de degradação (PD) isolados, obtidos sob as condições de degradação estudadas, estão dispostos na Figura 5.7. Os dados obtidos a partir desses espectros encontram-se sumarizados na Tabela 5.8.

Figura 5.7. Espectros de massas de alta resolução dos produtos de degradação isolados, obtidos em modo de ionização positivo. PD 1: hidrólise alcalina, PD 2 e 3: hidrólise ácida, PD 4 e 5: hidrólise neutra e oxidativa, PD 5 e 6: fotólise. * íons de *background*, confirmados a partir da análise do espectro de massas do branco (água: acetonitrila, 80:20 v/v, com 0,1% de ácido fórmico).

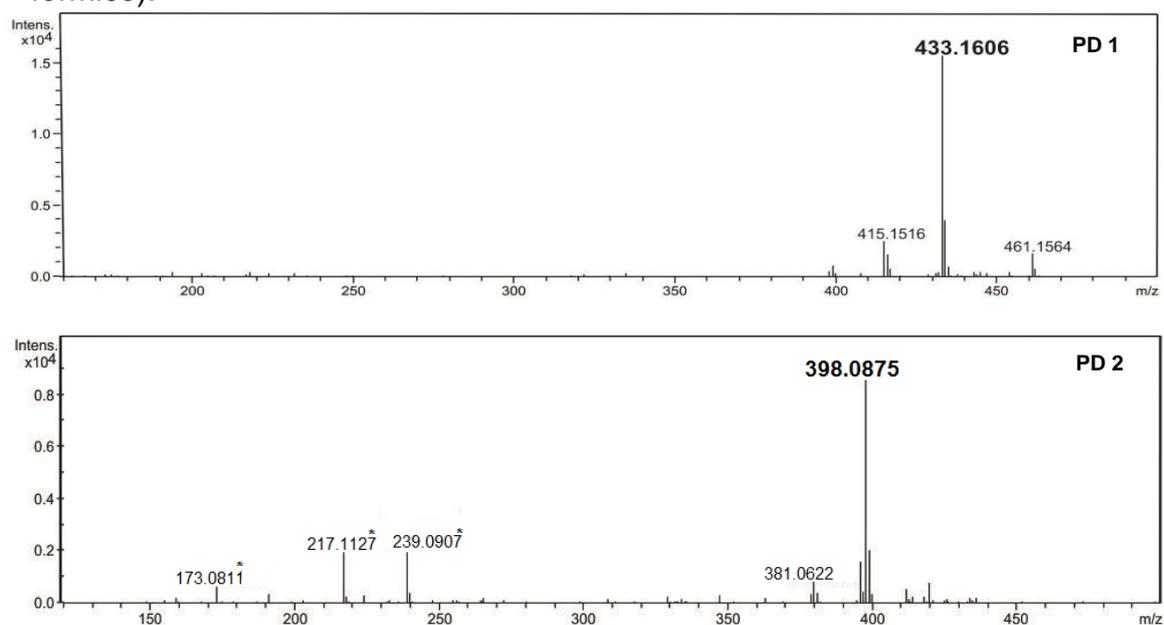


Figura 5.7 (continuação). Espectros de massas de alta resolução dos produtos de degradação isolados, obtidos em modo de ionização positivo. PD 1: hidrólise alcalina, PD 2 e 3: hidrólise ácida, PD 4 e 5: hidrólise neutra e oxidativa, PD 5 e 6: fotólise. * íons de *background*, confirmados a partir da análise do espectro de massas do branco (água: acetonitrila, 80:20 v/v, com 0,1% de ácido fórmico).

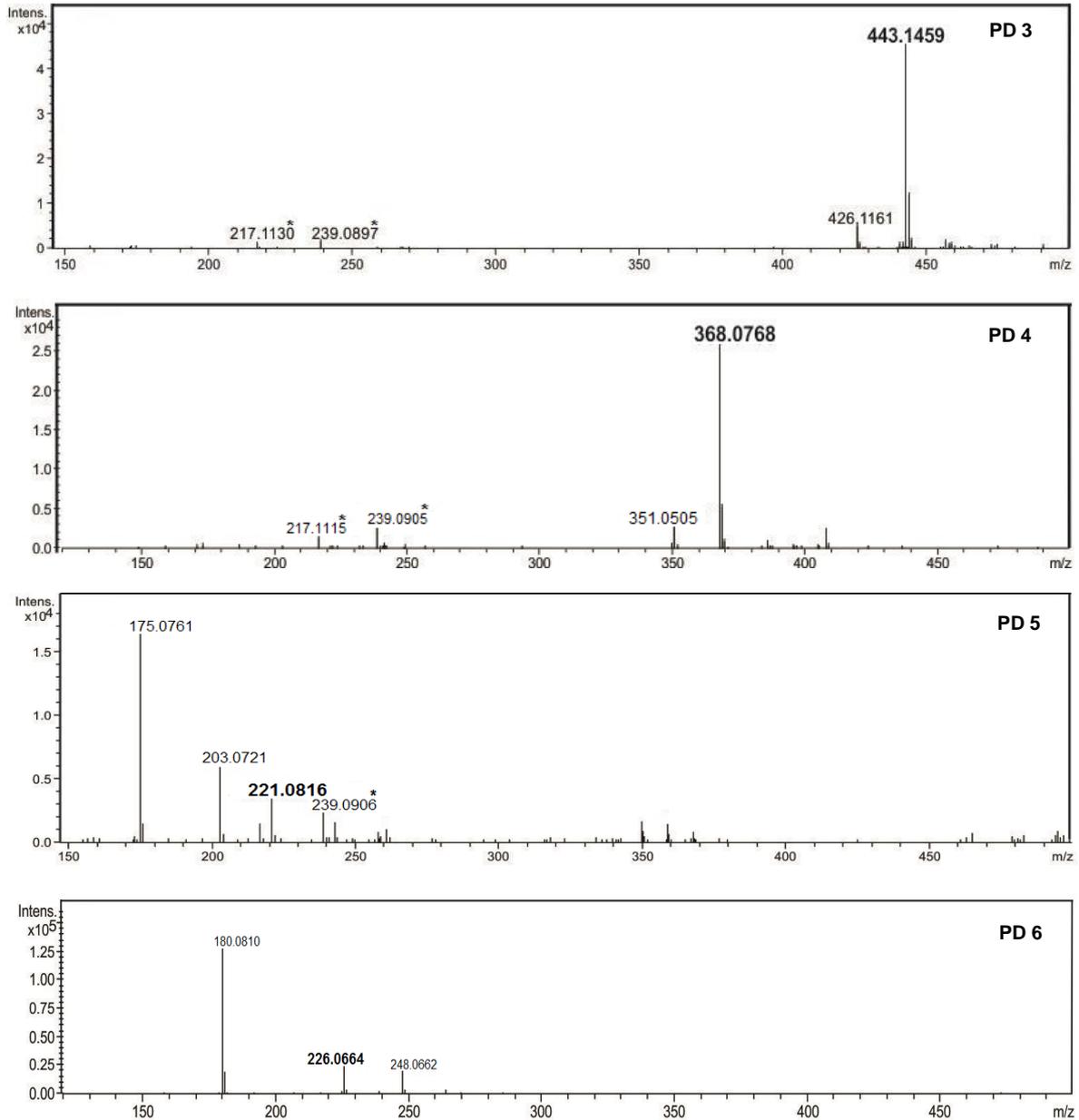


Tabela 5.8 Dados dos produtos de degradação (PD) isolados, obtidos a partir dos espectros de massas de alta resolução.

Produto de degradação	Fórmula molecular	Massa teórica [M+H] ⁺	Massa experimental [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Condição de degradação	Fármaco precursor
PD 1	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₈	433,1605	433,1606	-0,1	Hidrólise alcalina	OTC
PD 2	C ₂₀ H ₁₅ NO ₈	398,0870	398,0875	-1,3	Hidrólise ácida	OTC
PD 3	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈	443,1469	443,1459	2,2	Hidrólise ácida	OTC
PD 4	C ₁₉ H ₁₅ NO ₇	368,0765	368,0768	-1,0	Hidrólise neutra e oxidativa	OTC
PD 5	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	221,0808	221,0816	-3,4	Hidrólise neutra, oxidativa e fotólise	OTC
PD 6	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂	226,0863	226,0864	0,4	Fotólise	DICLO

OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio

Conforme observado na Figura 5.7 e Tabela 5.8, foram identificados seis produtos de degradação (PD 1 a 6), sendo que cinco (PD 1 a 5) possuem como precursor o fármaco OTC e um (PD 6) o DICLO. Através da análise dos dados dos espectros de massas de alta resolução, foi confirmado que o produto de degradação denominado PD 4, visualizado nos cromatogramas das análises de hidrólises neutra e oxidativa (Figuras 5.5 e 5.6), trata-se do mesmo composto, cuja molécula protonada [M+H]⁺ possui fórmula molecular C₁₉H₁₄NO₇⁺ e *m/z* 368,0768. Do mesmo modo, o PD 5, presente nos cromatogramas das hidrólises neutra, oxidativa e fotólise (Figuras 5.5 e 5.6), compreende ao mesmo produto de degradação, no qual a molécula protonada [M+H]⁺ apresenta *m/z* de 221,0816, compatível com a fórmula molecular C₁₂H₁₃O₄⁺.

É válido ressaltar que apesar do decaimento de teor de DICLO e de PIRO frente às diferentes condições degradativas testadas (discutidas anteriormente nas seções 5.1.1 e 5.1.2), seus PD não foram detectados pelo método CLAE-DAD desenvolvido e validado, com exceção da fotólise de DICLO em que os PD 6 e 7 foram detectados, sendo o PD 6 identificado por CLAE-EM como o íon protonado de *m/z* 226,0864. Esse problema no balanço de massa pode ser justificado pela potencial perda de produtos de degradação

voláteis, retenção de compostos na coluna ou formação de eluentes iniciais ou extremamente tardios que não foram capazes de serem detectados pelo método CLAE-DAD proposto (MAHESWARAN, 2012; SINGH et al., 2013). O PD 7 não foi identificado, possivelmente, devido à formação de pequena quantidade, dificultando seu isolamento e a obtenção de seu espectro de massas.

Na Figura 5.8 estão as estruturas químicas propostas para os PD 1 a 5, oriundos de OTC, sob diferentes condições de degradação. Já na Figura 5.9 está a estrutura química do PD 6 formado a partir da fotólise de DICLO. As fórmulas moleculares desses PD foram confirmadas através do espectro de massas de alta resolução.

Figura 5.8. Estruturas químicas propostas para os produtos de degradação (PD) 1 a 5, oriundos de OTC, sob diferentes condições de degradação. α ou β -APOTC: α ou β -apo-oxitetraciclina.

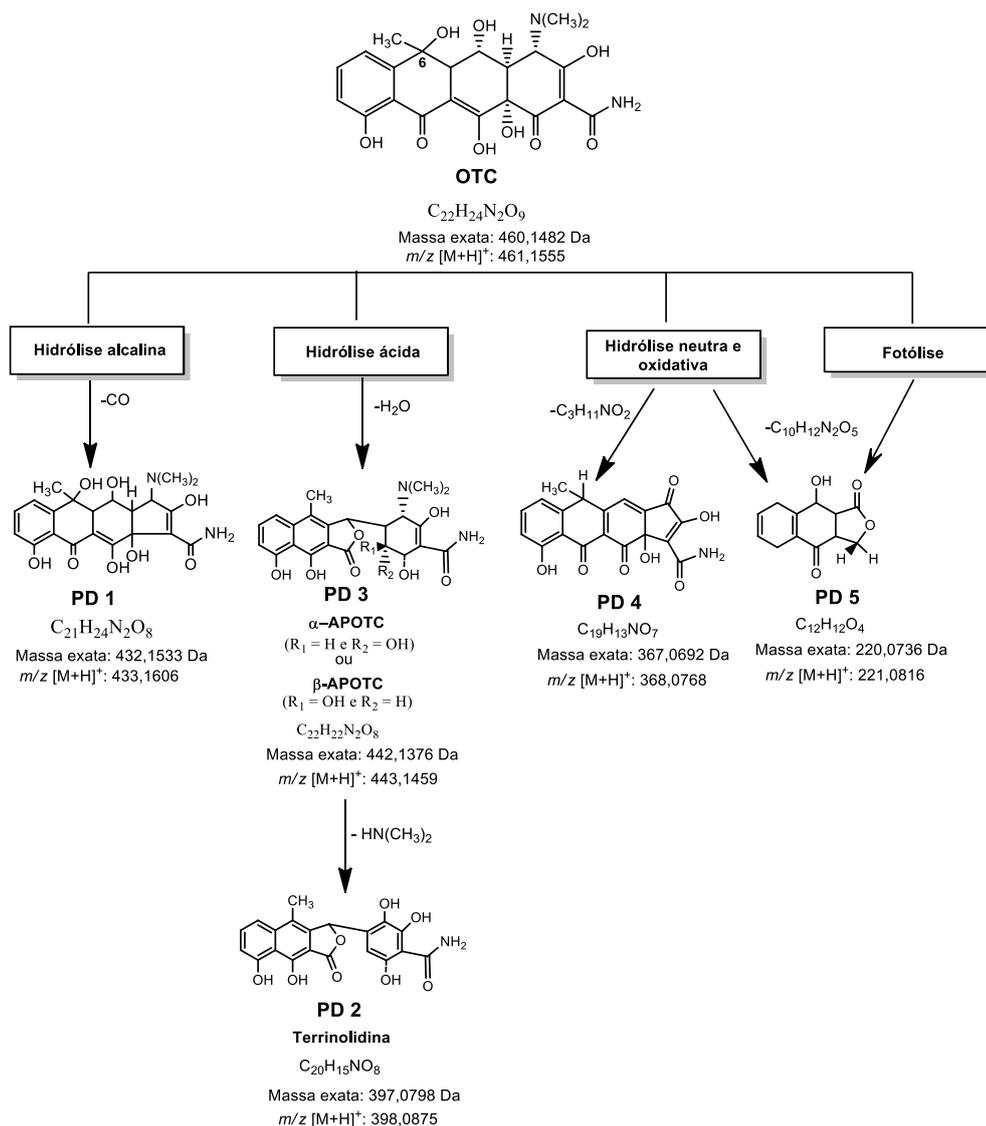
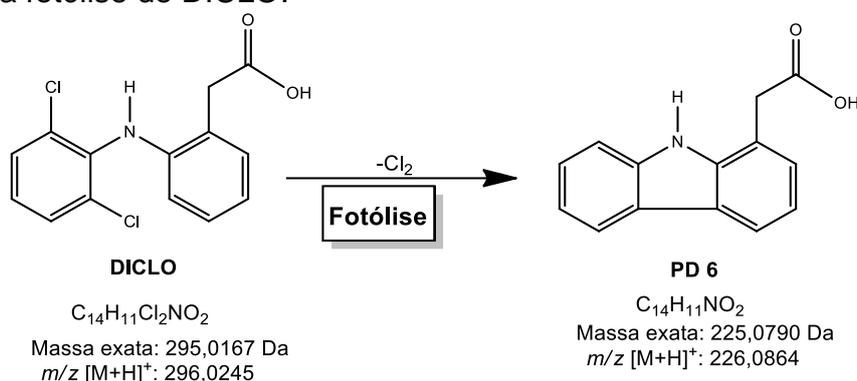


Figura 5.9. Estrutura química proposta para o produto de degradação 6 (PD 6), oriundo da fotólise de DICLO.



Os PD 2 e 3, oriundos da hidrólise ácida de OTC, são previsíveis e encontram-se descritos na literatura, sendo identificados como terrinolidina (PD 2, m/z 398,0875) e α ou β -apo-oxitetraciclina (α -APOTC ou β -APOTC, PD 3, m/z 443,1459) (HOCHSTEIN et al., 1953; HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002; HALLING-SØRENSEN et al., 2003; KAHSAY et al., 2013; SVERSUT et al., 2017). Do mesmo modo, o PD 6 (m/z 226,0864), oriundo da fotodegradação de DICLO, foi descrito por Keen e colaboradores (2013). No entanto, esses autores não discutiram seu mecanismo de fragmentação e de formação.

Não foram encontrados registros na literatura acerca da identificação dos PD 1 (m/z 433,1606), PD 4 (m/z 368,0768) e PD 5 (m/z 221,0816), sendo suas estruturas químicas propostas pela primeira vez neste trabalho.

5.2.4.1. Proposta para o Mecanismo de Fragmentação dos Produtos de Degradação

Na Tabela 5.9 encontram-se os dados dos íons fragmentos dos produtos de degradação, obtidos a partir dos espectros de massas de alta resolução (Figura 5.7).

Tabela 5.9. Dados dos íons fragmentos dos produtos de degradação (PD), obtidos a partir dos espectros de massas de alta resolução.

Produto de degradação	<i>m/z</i> íon precursor [M+H] ⁺	Íon Fragmento			
		Fórmula proposta	Massa teórica	Massa experimental	Erro (ppm)
PD 1	433,1006	C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₇ ⁺	415,1500	415,1495	1,0
PD 2	398,0875	C ₂₀ H ₁₃ O ₈ ⁺	381,0605	381,0622	-4,6
PD 3	443,1459	C ₂₂ H ₂₀ NO ₈ ⁺	426,1183	426,1161	5,2
PD 4	368,0768	C ₁₉ H ₁₁ O ₇ ⁺	351,0499	351,0505	-1,8
PD 5	221,0816	C ₁₂ H ₁₁ O ₃ ⁺	203,0703	203,0721	-8,3
		C ₁₁ H ₁₁ O ₂ ⁺	175,0754	175,0761	-4,0
PD 6	226,0864	C ₁₄ H ₁₁ NNaO ₂ ⁺	248,0681	248,0682	0,6
		C ₁₃ H ₁₀ N ⁺	180,0808	180,0810	-1,0

Os produtos de degradação identificados (PD 1 a PD 6) formam seus respectivos íons fragmentos, seguindo os mecanismos propostos na Figura 5.10.

Do mesmo modo de que o descrito na proposta de fragmentação de OTC (Capítulo II), sugere-se que o sítio de protonação do PD 1 seja a hidroxila alcóolica em C-6, corroborando com o descrito por Kamel e colaboradores (2002). Portanto, a partir de sua molécula protonada [M+H]⁺ (*m/z* 433,1606), o PD 1 sofre desidratação, originando o íon fragmento *m/z* 415,1495.

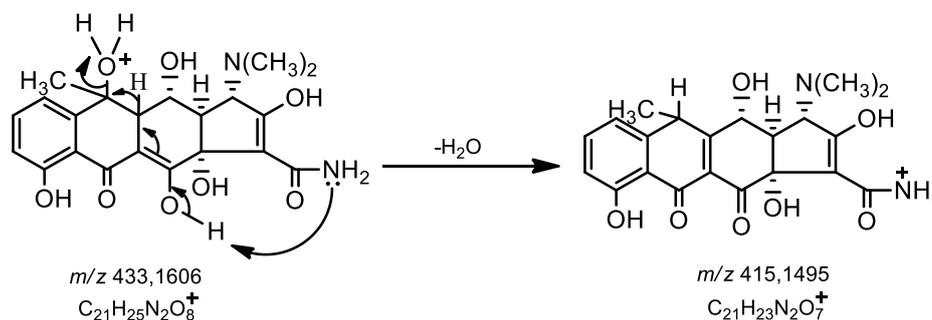
Através de seus respectivos íons [M+H]⁺, os PD 2 (*m/z* 398,0875), PD 3 (*m/z* 443,1459) e PD 4 (*m/z* 368,0768) sofrem perda neutra de amônia (NH₃, 17 *u*), formando os íons acílios correspondentes (PD 2= *m/z* 381,0622; PD 3= *m/z* 426,1161 e PD 4= *m/z* 351,0505). No PD 5, além da perda neutra de água (18 *u*) que resulta no íon fragmento *m/z* 203,0721, sugere-se a perda de monóxido de carbono (CO, 28 *u*), formando o íon *m/z* 175,0761 que corresponde ao pico base visualizado no espectro de massas de alta resolução (Figura 5.7).

Já em relação ao PD 6, único composto que tem como precursor o fármaco DICLO, observa-se a formação do aduto sodiado (*m/z* 248,0682) e do íon fragmento *m/z* 180,0810 a partir do íon [M+H]⁺ (*m/z* 226,0864). O íon

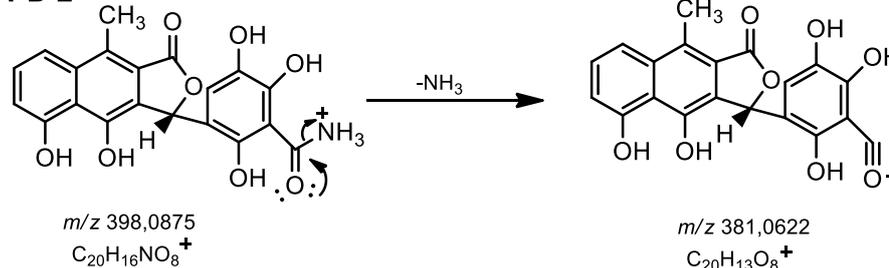
m/z 180,0810 possui sinal intenso no espectro de massas de alta resolução (Figura 5.7) e sugere-se que seja formado através da perda neutra de ácido fórmico (HCOOH , $46u$), gerando um novo anel de quatro membros a partir do ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio ao carbono.

Figura 5.10. Proposta do mecanismo de fragmentação dos produtos de degradação (PD) identificados. * mesmo mecanismo de fragmentação proposto para geração dos íons fragmentos m/z 426,1161 e 351,0505 a partir das moléculas protonadas dos PD 3 e PD 4, respectivamente.

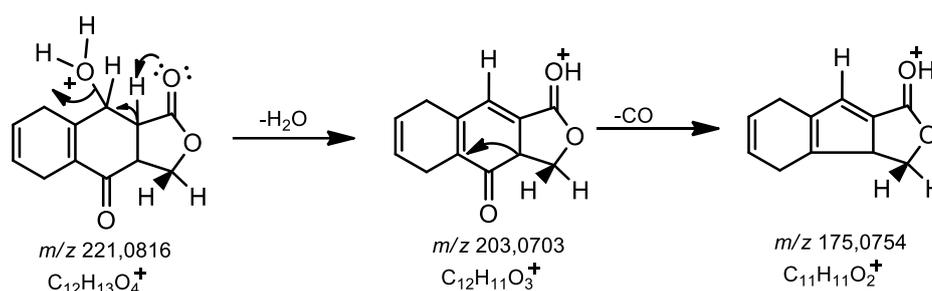
PD 1



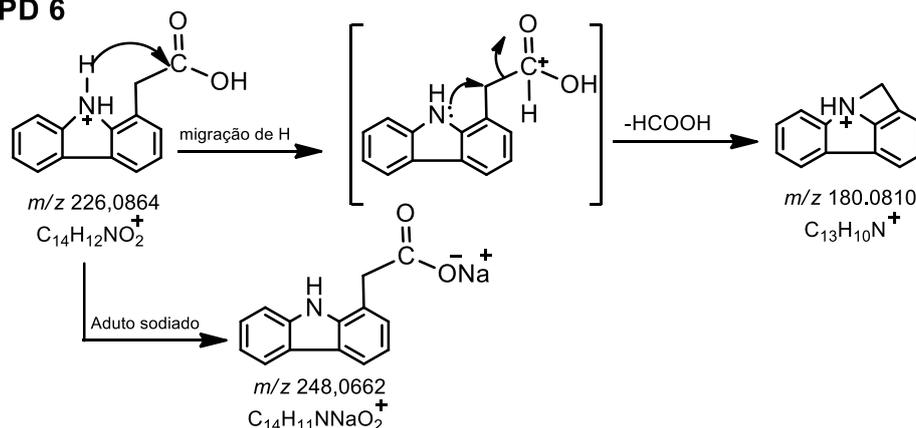
PD 2*



PD 5



PD 6



5.2.4.2. Proposta para Formação dos Produtos Degradação

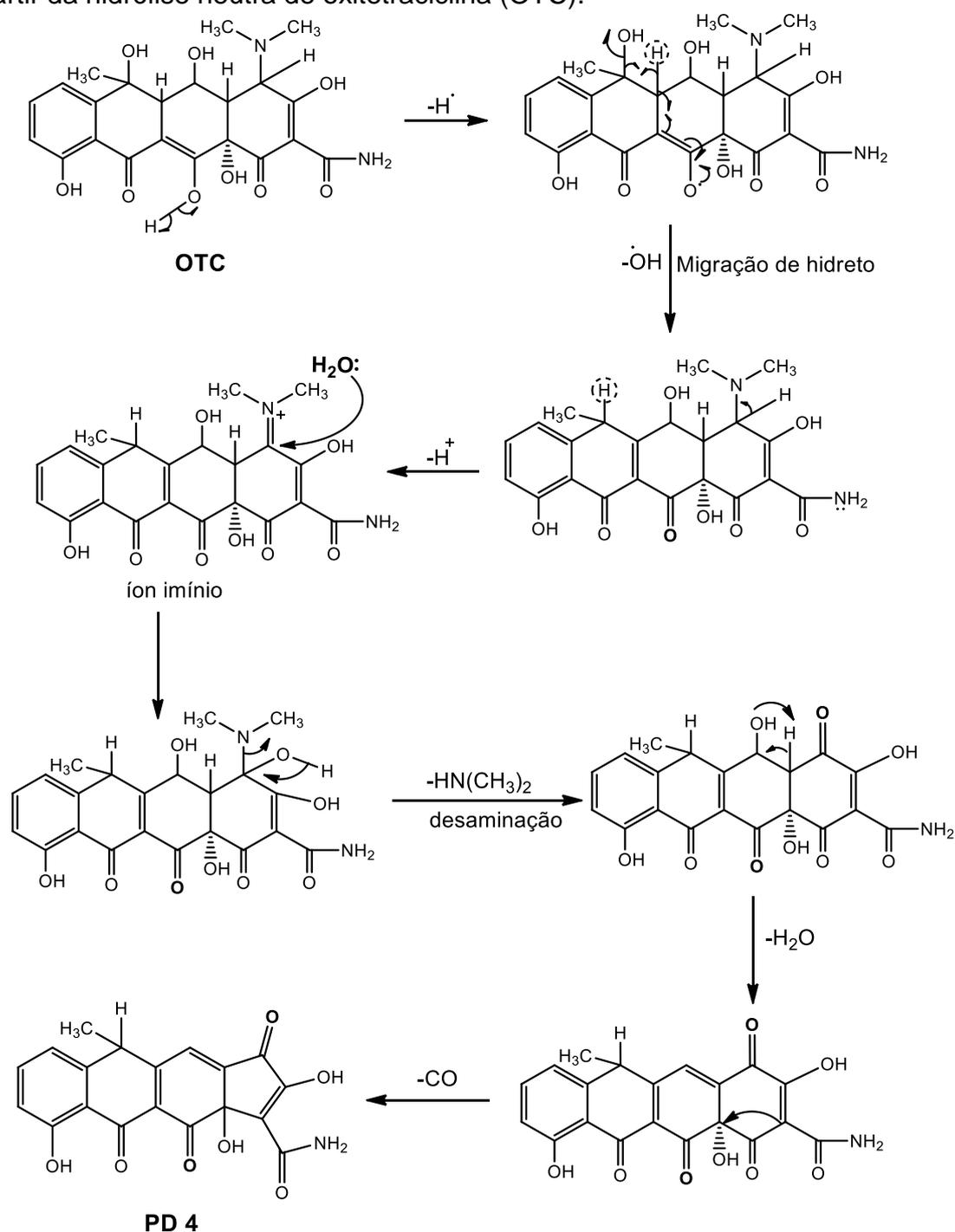
A OTC é altamente suscetível à hidrólise ácida e alcalina em razão da presença da hidroxila (-OH) em C-6 (HOCHSTEIN et al., 1953; HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; Tjørnelund, 2002; HALLING-SØRENSEN et al., 2003; KAHSAY et al., 2013; SVERSUT et al., 2017). Apesar de alguns produtos de degradação oriundos da hidrólise básica de OTC serem descritos na literatura (iso-oxitetraciclina, ácido terranoico, N-desmetil e N-didesmetil-oxitetraciclina), as informações fornecidas pelo espectro de massas de alta resolução do PD 1 não coincidiram com as desses produtos. Portanto, sugere-se que o PD 1 tenha sido formado pela descarbonilação de OTC, em meio alcalino, por um mecanismo ainda não esclarecido.

Em relação à formação dos produtos de degradação originados da hidrólise ácida de OTC, isto é, o PD 2 (terrinolidina) e PD 3 (α ou β -apoxitetraciclina), acredita-se que o grupo -OH em C-6 tenha favorecido a reação de ciclização intramolecular, resultando na formação do grupo lactona presente em ambos os PD (BAERTSCHI; ALSANTE; REED; 2011). Sob condições extremamente ácidas, como a empregada neste estudo ($\text{pH} < 2$), o PD 3 (α ou β -APOTC) pode se degradar através de um processo irreversível, formando a terrinolidina (PD 2) (HOCHSTEIN et al., 1953; SVERSUT et al., 2017).

Conforme descrito anteriormente, os PD 4 e PD 5 foram formados a partir de OTC, sob diferentes condições de degradação. Além de serem produzidos na hidrólise neutra, em que a água era o degradante principal, esses produtos de degradação também foram originados na hidrólise oxidativa e fotólise que também continham água no meio reacional, além do peróxido de hidrogênio a 0,03% (hidrólise oxidativa) e da luz UV/VIS (fotólise). Na hidrólise neutra e oxidativa, ambas conduzidas à 60°C, esses produtos foram formados praticamente na mesma proporção após 30 minutos de reação, obedecendo a diferentes modelos cinéticos (vide seções 5.2.2.1 e 5.2.3). Porém, na fotólise, realizada à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), apenas uma menor proporção do PD 5 foi detectada após 16 horas de experimento. Portanto, sugere-se que nessas três condições de degradação a água foi o degradante crucial para a formação dos PD 4 e PD 5, e temperatura elevada desempenhou o papel de catalisador da reação.

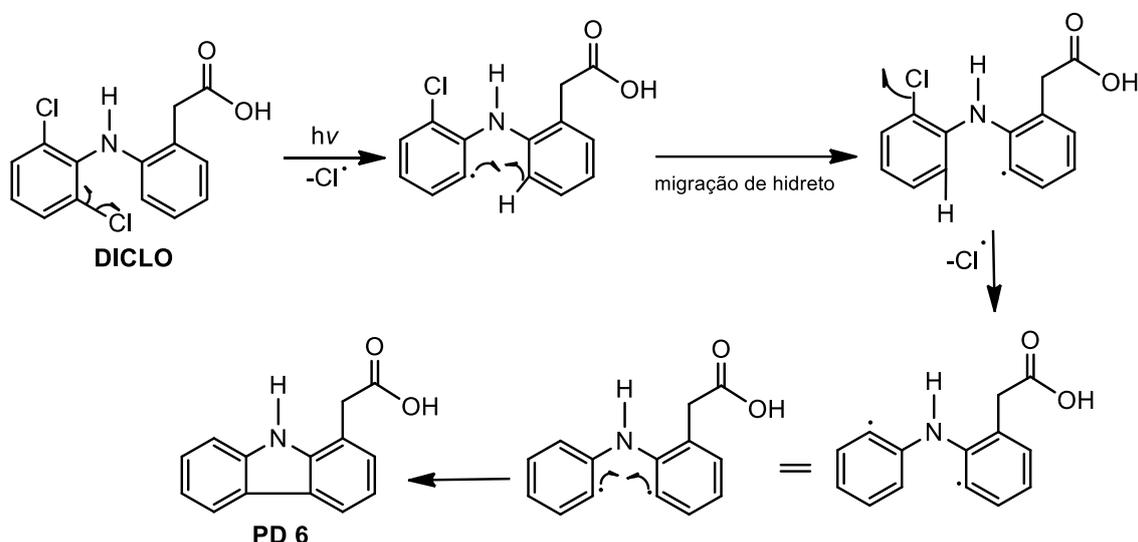
Sugere-se que os PD 4 e PD 5 sejam formados através de reações de oxidação da amina terciária alifática e das hidroxilas alcoólicas presentes na estrutura química de OTC, sendo essas reações previstas e descritas na literatura (BAERTSCHI; ALSANTE; REED; 2011; LIU et al., 2016). Na Figura 5.11 encontra-se, especificamente, o mecanismo proposto para a formação do PD 4 a partir da hidrólise neutra de OTC. O mesmo mecanismo também pode ser sugerido para obtenção desse produto de degradação a partir da hidrólise oxidativa.

Figura 5.11. Proposta para formação do produto de degradação 4 (PD 4) a partir da hidrólise neutra de oxitetraciclina (OTC).



A formação do PD 6, oriundo da fotodegradação de DICLO, é decorrente da ruptura da ligação entre C-Cl na presença de luz UV, processo bastante comum em haletos de arila (BAERTSCHI; ALSANTE; REED; 2011). Como consequência da desalogenação, ocorre a ciclização da molécula, formando o PD 6 que é quimicamente conhecido como 9,9a-di-hidro-4 aH-carbazol-1-il acético (KEEN et al., 2013). O mecanismo proposto para a formação do PD 6 está na Figura 5.12.

Figura 5.12. Proposta para formação do produto de degradação 6 (PD 6) a partir da fotodegradação de diclofenaco de sódio (DICLO).



5.2.5. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* dos Produtos de Degradação Selecionados

Os produtos de degradação 4 e 5 foram os selecionados para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, pois esses produtos que se repetiram em diferentes condições degradativas do fármaco OTC (fotólise, hidrólise ácida e neutra).

O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando o método de coloração por Sulforrodamina B (SRB) que se baseia na afinidade deste corante pelas proteínas básicas presentes nas células íntegras, fixadas pelo ácido trifluoracético (SKENAN et al., 1990). Assim sendo, os valores de GI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) dos PD 4 e PD 5 na linhagem celular NIH/3T3 estão na Tabela 5.10. Também se encontram nessa

Tabela os valores de GI_{50} do fármaco OTC, sem degradar, e do controle negativo (doxorubicina) para fins comparativos.

Tabela 5.10. Valores de GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos produtos de degradação 4 e 5, bem como de oxitetraciclina e do controle positivo (doxorubicina) na linhagem celular NIH/3T3.

Composto	GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) \pm DP ^a
PD 4	> 250
PD 5	88,83 \pm 3,78
OTC	151,59 \pm 3,69
Doxorubicina ^b	0,25 \pm 0,20

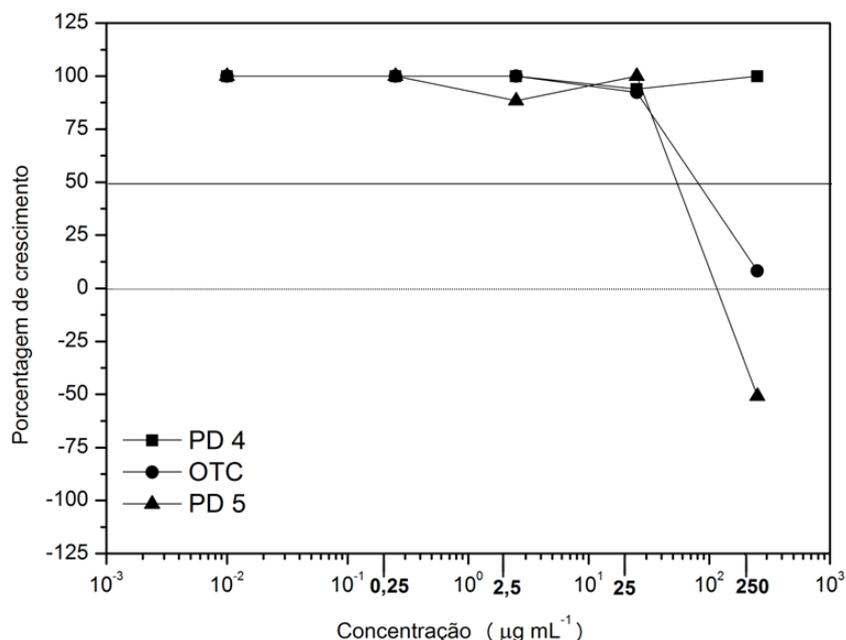
^a Concentração que inibe 50% do crescimento celular expressa em média de 3 determinações \pm desvio padrão (DP); PD: produto de degradação; OTC: oxitetraciclina; ^b Controle positivo.

Não existe na literatura valores de referência de GI_{50} para se considerar um produto de degradação de fármaco citotóxico ou não. Desse modo, utilizou como referência o trabalho recente de Johnsirani e colaboradores (2017) que realizaram a avaliação na citotoxicidade *in vitro* de produtos de degradação de niclosamida em células de neuroblastoma humano (linhagem neuro 2a). Esses autores classificaram como citotóxicos os produtos de degradação com GI_{50} entre 8 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (63 a 92 μM).

Assim sendo, o PD 4, oriundo da hidrólise neutra e oxidativa de OTC, foi considerado inativo para células NIH/3T3, pois apresentou GI_{50} superior a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo inclusive esse valor maior que o GI_{50} de seu próprio precursor (OTC, $GI_{50} = 151,59 \mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, o PD 5 foi considerado moderadamente citotóxico para a linhagem testada, com $GI_{50} = 88,83 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando atividade citotóxica, aproximadamente, 2 vezes maior que de OTC.

Na Figura 5.13 está o gráfico de porcentagem de crescimento da linhagem celular NIH/3T3 exposta às concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos PD 4, PD 5 e OTC, considerando uma das replicatas obtidas.

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



A interpretação do gráfico de porcentagem de crescimento celular (Figura 5.13) segue o preconizado por Monks e colaboradores (1991), em que para porcentagem de crescimento até o ponto zero considera-se efeito citostático, pois há apenas inibição do crescimento celular, seja parcial ou total, estando representado pela linha pontilhada que cruza o eixo y. Já a linha sólida que cruza esse mesmo eixo y em 50% corresponde à representação da estimativa da GI_{50} calculada por análise de regressão não linear pelo programa Origin® (versão 8.0). Os valores negativos, abaixo de 0%, são avaliados como efeito citocida, correspondendo à porcentagem de células mortas nas referentes concentrações testadas. Os símbolos na curva, desconsiderando o primeiro, representam as quatro concentrações testadas para cada composto, compreendendo aos números destacados em negrito no eixo x.

Desse modo, nota-se que realmente o PD 4 não apresentou atividade citotóxica sobre as células NIH/3T3, pois nenhuma das concentrações testadas apresentou redução expressiva da porcentagem de crescimento celular. Por outro lado, o PD 5 e a OTC cruzam a linha sólida, sendo estimado que a inibição de 50% do crescimento celular está próximo das concentrações de 100 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apenas o PD 5, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou efeito citocida, uma vez que para essa concentração o valor de crescimento celular foi negativo.

Assim sendo, os resultados evidenciados neste Capítulo permitem pressupor alguns produtos de degradação dos fármacos que podem ser formados no ambiente após o descarte, o escoamento, o metabolismo e/ou a excreção. Isso é particularmente preocupante em relação à OTC e DICLO, pois esses fármacos foram propensos à degradação hidrolítica e fotolítica nas condições de pH e temperatura comumente presentes no ambiente (rios, lagos e solo), isto é, valores de pH neutro e de temperaturas em torno de 45 e 60°C. Essas condições podem ser naturalmente alcançadas em determinadas épocas do ano devido às alterações climáticas ocasionadas pelo aumento da incidência dos raios solares (RAHAM et al., 2005; XUAN et al., 2010; SINGH et al., 2013; MITCHELL et al., 2014; MITCHELL et al., 2015).

A atividade citotóxica moderada e o efeito citocida na concentração de 250 µg mL⁻¹ do PD 5, formado a partir da hidrólise neutra, oxidativa e fotólise de OTC, é alarmante, uma vez que essa substância pode ser formada no ambiente, causando danos ao ecossistema terrestre e aquático relacionados à contaminação e toxicidade de animais e plantas (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; MARGALIDA et al., 2014; AGA et al., 2016).

Além disso, a interpretação dos resultados alcançados permite nortear estudos que visam o manejo adequado de resíduos de fármacos e a descontaminação ambiental. Soma-se a isso, o fato de que mimetizar a degradação de fármacos em laboratório é menos trabalhoso e oneroso do que a análise direta de amostras ambientais, pois essas amostras necessitam de amostragem significativa e de etapas preliminares de extração ou processamento (RAHAM et al., 2005).

5.3. CONCLUSÃO

O método de CLAE-DAD desenvolvido e validado para determinação simultânea de OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO foi capaz de separar diferentes produtos de degradação, sendo portanto considerado indicativo de estabilidade. Através do estudo da cinética de degradação foi possível constatar que OTC foi o fármaco mais lábil, principalmente, frente às condições hidrolíticas. Por outro lado, PIRO foi o fármaco mais estável e DICLO o que apresentou maior fotossensibilidade.

Foram obtidos sete produtos de degradação obtidos sob diferentes condições degradativas. No entanto, foram identificados por CLAE-EM seis produtos de degradação, sendo cinco oriundos da hidrólise alcalina, ácida, neutra, oxidativa e fotólise de OTC e um proveniente da fotodegradação de DICLO. Em relação à citotoxicidade *in vitro* dos produtos de degradação selecionados verificou-se que produto de degradação 4 demonstrou ser não citotóxico para a linhagem celular NIH/3T3, enquanto que o produto de degradação 5 apresentou atividade citotóxica moderada para essas células.

CAPÍTULO VI

ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA E DE LONGA DURAÇÃO

Este capítulo aborda os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração das soluções injetáveis para uso animal contendo oxitetraciclina associada ao diclofenaco de sódio ou ao piroxicam. Esses estudos objetivaram avaliar o impacto de curtas exposições às condições além daquelas estabelecidas nos rótulos e os efeitos físico-químicos relacionados à exposição prolongada, a fim de confirmar o prazo de validade e recomendar as condições ideais de transporte e armazenamento dos produtos farmacêuticos estudados.

6.1. MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1. Amostras Comerciais

Foram utilizadas as soluções injetáveis de Oxitrat La Plus[®] (validade: junho/2017 e lote: 015/15), composta pela associação de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio; e Terracam Plus[®] (validade: dezembro/2016 e lote: 1435663), constituída da associação de oxitetraciclina e piroxicam. Esses produtos farmacêuticos foram adquiridos no comércio agropecuário de Campo Grande – MS.

6.1.2. Condições dos Estudos de Estabilidade

Os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração foram conduzidos de acordo com a Resolução (RE) nº 1 de 29 de julho de 2005 que serve como guia para a realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005). Por se tratarem de medicamentos líquidos acondicionados em embalagens impermeáveis, as amostras foram mantidas na embalagem primária e, para o estudo de estabilidade acelerada, foram armazenadas a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante seis meses, utilizando a estufa BD216 (Novus[®]), equipada com controlador de temperatura. Já para o estudo de estabilidade de longa duração, as amostras foram mantidas em câmara climática MA 835/UR (Marconi[®]) com temperatura controlada de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 meses.

6.1.3. Análise das Amostras

No estudo de estabilidade acelerada, as amostras foram analisadas nos tempos de 3 e 6 meses, enquanto que no estudo de longa duração os tempos analisados foram: 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. Para ambos os testes de estabilidade os parâmetros avaliados compreenderam a avaliação organoléptica, a determinação do pH e o doseamento. Esses mesmos parâmetros foram verificados antes das amostras serem submetidas aos ensaios de estabilidade (tempo 0) para fins comparativos.

6.1.3.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em triplicata e à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) através da leitura direta das soluções injetáveis, utilizando medidor de pH de bancada da marca MS Tecno[®] modelo mPA210. O peagâmetro foi previamente calibrado com soluções de pH 7 e 4, conforme requerido pelo equipamento.

6.1.3.2. Doseamento

O doseamento das amostras submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada e de longa duração foi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo o método previamente validado e descrito no Capítulo IV. Desse modo, as condições cromatográficas foram: coluna InertSustain[®] HP C₈, com fase móvel, em modo isocrático, composta por metanol:acetonitrila:água pH 2,5 (40:35:25, v/v/v) sob vazão de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e detector de arranjo de diodos fixado em 275 e 350 nm. As soluções amostras foram preparadas em fase móvel, obtendo as concentrações teóricas de: OTC a $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e DICLO a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ na amostra comercial Oxitrat La Plus[®] e OTC a $22,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e PIRO a $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ na amostra comercial Terracam Plus[®]. As áreas foram registradas em triplicata e os teores dos fármacos foram calculados através de equações das retas obtidas a partir de curvas analíticas construídas no intervalo linear do método.

6.1.4. Determinação da Cinética Reacional de Degradação dos Fármacos

Os modelos cinéticos de ordem zero, primeira e segunda ordem foram testados para avaliação da cinética de degradação das amostras submetidas aos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração. Foi adotada a mesma metodologia utilizada para a avaliação da cinética do estudo de degradação forçada (Capítulo V, seção 5.1.1.1).

6.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1. Avaliação Organoléptica

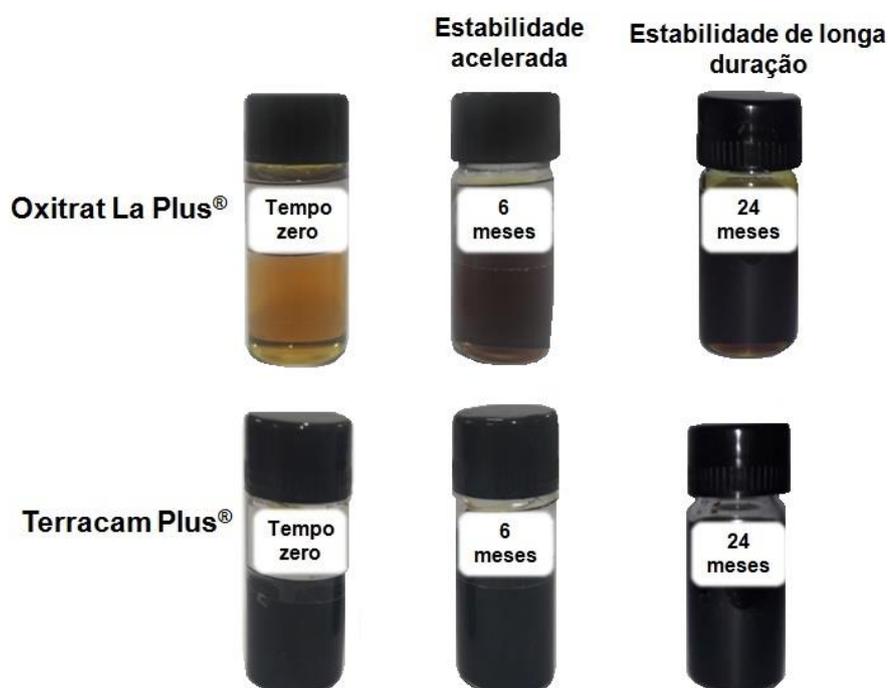
A avaliação organoléptica de um produto farmacêutico é extremamente importante, uma vez que alterações na cor ou odor podem indicar desvios de qualidade, instabilidade da formulação ou degradação do fármaco. As soluções injetáveis contendo OTC associada ao DICLO ou ao PIRO possuem como embalagem primária frascos-ampolas de vidro âmbar com capacidade de 20, 50 ou 100 mL, apresentando-se como um líquido límpido de coloração acastanhada, de tonalidade média ou escura, e com odor característico.

Conforme observado na Figura 6.1, na amostra comercial Oxitrat La Plus[®], composta pela associação de OTC e DICLO, houve o escurecimento da solução após o término dos estudos de estabilidade acelerada (6 meses) e de longa duração (24 meses), passando de castanho amarelado para castanho escuro, o que pode ser indicativo da degradação da formulação. Já na amostra Terracam Plus[®], constituída da associação de OTC e PIRO, não foi observado alteração na coloração, isto é, essa amostra manteve a cor castanho-escura do início até o final dos estudos de estabilidade. No entanto, a preservação da cor castanho-escura nesse medicamento não é indicativa da manutenção da eficácia terapêutica.

É válido mencionar que a alteração da coloração do medicamento Oxitrat La Plus[®] é prevista pelo fabricante, sendo descrita na bula do produto e acompanhada da informação de que o escurecimento da solução pode não implicar na perda de sua qualidade terapêutica. Todavia, o fornecedor adverte que o armazenamento do produto deve ser em local fresco, ao abrigo de luz, e que após a abertura do frasco, o medicamento deve ser consumido em até 10 dias e eventuais sobras devem ser descartadas (OXITRAT LA PLUS, 2001).

Ressalta-se que não houve alteração no odor de nenhuma das amostras durante e após a finalização dos ensaios.

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



6.2.2. Determinação do pH

A Tabela 6.1 corresponde à análise do pH das amostras antes (tempo zero) e depois do término do estudo de estabilidade acelerada (6 meses) e de longa duração (24 meses). Conforme evidenciado nesta Tabela, as exposições às temperaturas de $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses (estabilidade acelerada) e de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 meses (estabilidade de longa duração) não provocaram mudanças expressivas nos valores de pH das amostras. Dessa forma, esse parâmetro físico-químico não pode ser considerado como indicativo da degradação térmica dos fármacos.

Valores de pH superiores a 6 são necessários em soluções injetáveis de OTC, pois evitam a epimerização irreversível do fármaco, impedindo a formação do produto de degradação 4-epioxitetraclina (KAPLAN; GRANATEK; BUCKWALTER, 1957).

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

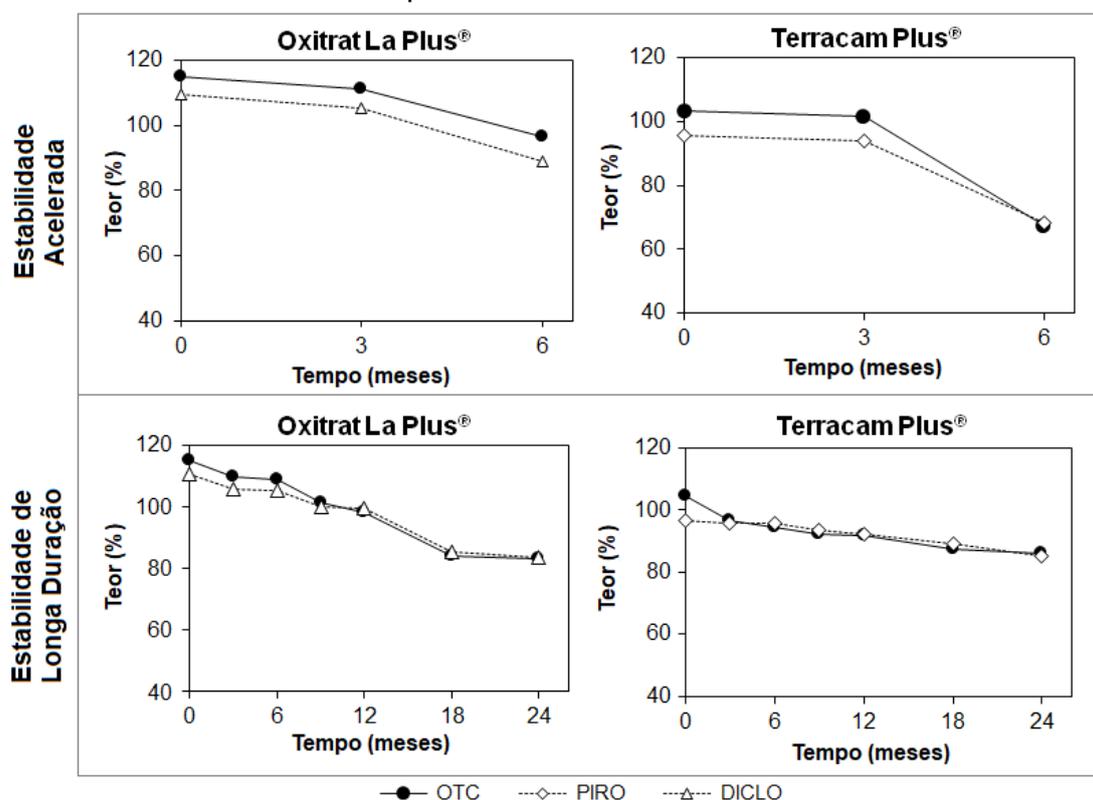
Estabilidade	Tempo de climatização (meses)	pH ± DP	
		Oxitrat La Plus®	Terracam Plus®
	0	8,35 ± 0,11	8,38 ± 0,08
Acelerada	6	8,32 ± 0,07	8,31 ± 0,05
Longa duração	24	8,28 ± 0,02	8,48 ± 0,05

^a média de 3 determinações ± desvio padrão (DP).

6.2.3. Doseamento

A determinação dos teores dos fármacos foi realizada através do método analítico por CLAE previamente desenvolvido e validado (Capítulo IV). Na Figura 6.2 encontram-se os perfis de decaimento do teor dos fármacos presentes nas amostras comerciais Oxitrat La Plus® e Terracam Plus®, submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração.

Figura 6.2. Perfis de decaimento do teor dos fármacos presentes nas amostras comerciais Oxitrat La Plus® e Terracam Plus®, submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração. OTC: oxitetraciclina, DICLO: diclofenaco de sódio e PIRO: piroxicam.



Os teores obtidos nos diferentes tempos analisados durante os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração das amostras Oxitrat La Plus® e Terracam Plus® constam na Tabela 6.2.

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

Estabilidade	Tempo de climatização (meses)	Teor ± DPR (%) ^a			
		Oxitrat La Plus®		Terracam Plus®	
		OTC	DICLO	OTC	PIRO
Acelerada^b	0	114,95 ± 0,68	109,64 ± 0,49	103,38 ± 0,06	95,74 ± 0,07
	3	111,42 ± 1,74	105,23 ± 1,53	101,55 ± 0,43	93,99 ± 0,43
	6	96,73 ± 0,37	89,10 ± 0,26	67,32 ± 0,13	68,20 ± 0,01
Longa duração^c	0	114,83 ± 0,53	110,82 ± 0,70	104,48 ± 0,13	96,49 ± 0,05
	3	109,66 ± 0,08	105,75 ± 0,59	96,79 ± 0,16	95,94 ± 0,12
	6	109,01 ± 0,20	105,38 ± 0,14	94,41 ± 0,07	95,78 ± 0,03
	9	101,34 ± 0,07	99,75 ± 2,46	92,39 ± 0,12	93,62 ± 1,62
	12	98,00 ± 0,10	94,71 ± 0,36	91,91 ± 0,49	92,27 ± 1,57
	18	83,96 ± 0,71	85,15 ± 1,41	87,57 ± 1,12	89,07 ± 2,36
	24	83,07 ± 0,69	83,51 ± 2,38	86,32 ± 0,98	85,34 ± 1,16

^a Média de 3 determinações ± Desvio Padrão Relativo (DPR); ^b 40 ± 2 °C durante 6 meses; ^c 30 ± 2°C durante 24 meses; OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam.

No estudo de estabilidade acelerada OTC, na amostra Terracam Plus®, apresentou a maior porcentagem de decaimento de teor, isto é, de aproximadamente 36%, seguida por PIRO (27,5%). Já na amostra Oxitrat La Plus®, OTC apresentou decaimento de 18,2% e DICLO 20,5%.

A divergência entre as porcentagens de decaimento de teor de OTC nas amostras Terracam Plus® e Oxitrat La Plus®, submetidas aos estudos de estabilidade acelerada, pode ser atribuída às diferenças na procedência e

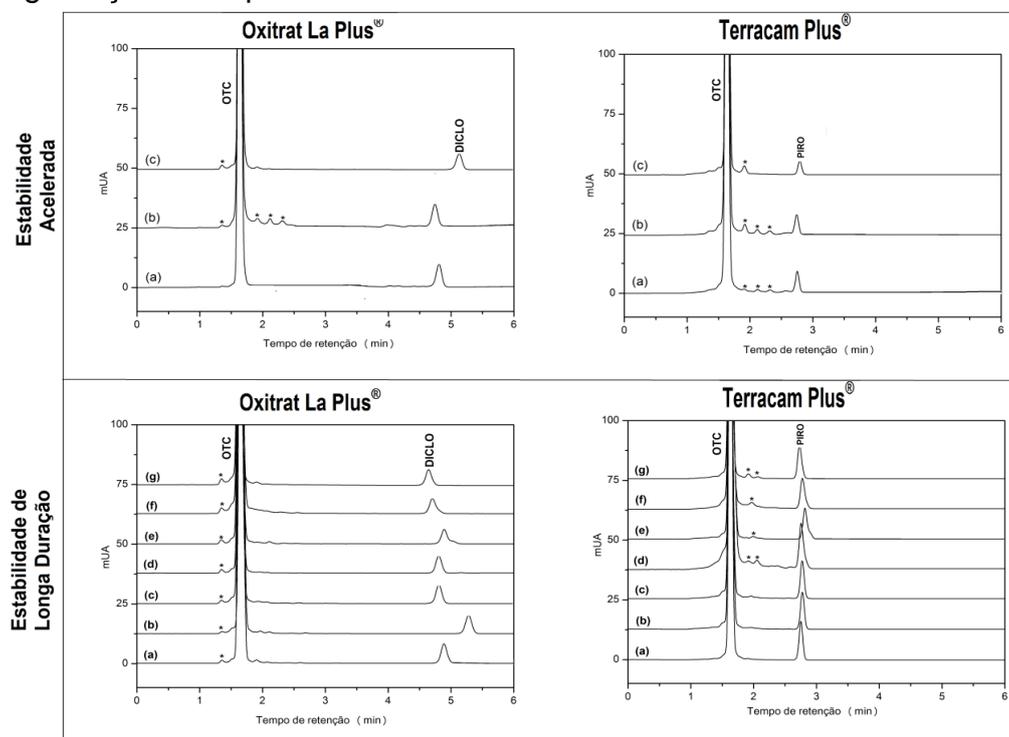
qualidade da matéria-prima, dos adjuvantes, no processo de produção e nas condições de armazenamento e transporte do produto acabado.

Em relação à estabilidade de longa duração, a OTC também foi o fármaco que mais degradou, porém na amostra Oxitrat La Plus®. A porcentagem de degradação de OTC nessa amostra foi de, aproximadamente, 30% no final dos 24 meses de estudo, enquanto que de DICLO foi de 27% nesse mesmo intervalo de tempo. PIRO, presente na amostra Terracam Plus®, foi o fármaco mais estável frente às condições de estabilidade de longa duração, degradando cerca de 10% em 24 meses. Nessa mesma amostra (Terracam Plus®), OTC degradou, aproximadamente, 18% em 24 meses.

Corroborando com os resultados encontrados, estudos descritos na literatura demonstram a instabilidade térmica de OTC em temperaturas entre 40 a 60°C (KHAN et al., 1987; DOI; STOSKOPF, 2000; HASSANI et al., 2008; NGUYEN et al., 2015).

Na Figura 6.3 estão os cromatogramas dos fármacos presentes nas amostras comerciais Oxitrat La Plus® e Terracam Plus®, submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração, nos diferentes tempos analisados.

Figura 6.3. Cromatogramas dos fármacos presentes nas amostras comerciais Oxitrat La Plus® e Terracam Plus®, submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração, nos tempos (a) zero, (b) 3 meses, (c) 6 meses; (d) 9 meses, (e) 12 meses, (f) 18 meses, (g) 24 meses. OTC: oxitetraciclina, DICLO: diclofenaco de sódio, PIRO: piroxicam, * picos dos prováveis produtos de degradação ou impurezas relacionadas.



Conforme observado na Figura 6.3, não houve profunda alteração entre os tempos de retenção dos fármacos durante os estudos de estabilidade. Porém, é possível notar uma pequena mudança nos tempos de retenção de DICLO que pode ser atribuída às deliberadas variações experimentais como, por exemplo, pH da fase móvel.

Além dos picos dos fármacos, observam-se outros picos de menor intensidade que se acredita serem impurezas relacionadas ou produtos de degradação. Todavia, para confirmar tal hipótese seria necessário realizar a identificação desses picos através de espectrometria de massas. Durante os estudos de estabilidade, as purezas cromatográficas dos picos dos fármacos foram verificadas através do detector DAD, sendo que para todos os valores encontrados foram superiores a 990, sugerindo não haver coeluição de interferentes (STAHL, 2003; MAIO et al., 2006).

6.2.4. Determinação da Cinética Reacional de Degradação dos Fármacos

Na Tabela 6.3 estão dispostos os resultados das cinéticas das reações de degradação dos fármacos presentes nas amostras Oxitrat La Plus® e Terracam Plus®, submetidas aos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração.

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

Estabilidade		Oxitrat La Plus®		Terracam Plus®	
		OTC	DICLO	OTC	PIRO
Acelerada	r^2	0,889 ^a	0,902 ^a	0,788 ^a	0,798 ^a
	k	-3,04	-3,42	-6,01	-4,59
	$t_{90\%}$	8,8	6,3	3,1	2,1
	$t_{50\%}$	22,0	18,0	9,8	10,8
Longa Duração	r^2	0,956 ^a	0,947 ^a	0,897 ^b	0,968 ^a
	k	-1,45	-1,20	$8,0 \times 10^{-5}$	-0,481
	$t_{90\%}$	17,2	17,4	13,9	15,8
	$t_{50\%}$	44,8	50,6	125,0	98,9

OTC: oxitetraciclina; DICLO: diclofenaco de sódio; PIRO: piroxicam; r^2 : coeficiente de determinação da reta obtida por regressão linear que melhor explica o comportamento cinético; k : constante da cinética de degradação; Modelo cinético de ^azero e ^bsegunda ordem; $t_{90\%}$ e $t_{50\%}$: tempo em meses para se atingir 90% e 50% de teor do fármaco, respectivamente.

Os valores de $t_{90\%}$ e $t_{50\%}$ foram obtidos através da equação da reta, oriunda da regressão linear, do modelo cinético que melhor descreveu o comportamento da degradação dos fármacos. Portanto, foram selecionadas as retas que obtiveram os coeficientes de determinação (r^2) mais próximos do valor 1, levando em consideração as seguintes ordens de reação: zero, primeira e segunda.

Assim sendo, apenas OTC, na amostra Terracam Plus[®] submetida ao estudo de estabilidade de longa duração, degradou de acordo com o modelo cinético de segunda ordem, obtendo o menor $t_{90\%}$ para esse ensaio (13,9 meses). Nas demais situações, todos os fármacos, inclusive OTC presente em Oxitrat La Plus[®], degradaram-se conforme o modelo cinético de ordem zero.

Analisando a cinética da estabilidade acelerada, observa-se que OTC, na amostra Terracam Plus[®], apresentou o menor valor de $t_{50\%}$ (9,8 meses). Porém, esse mesmo fármaco, na amostra Oxitrat La Plus[®], teve o maior $t_{90\%}$ (8,8 meses).

A determinação do $t_{90\%}$, principalmente na estabilidade de longa duração, é importante, visto que informa o prazo de validade da formulação (CARSTENSEN; RHODES, 2000; NETZ; ORTEGA, 2002; BRASIL, 2005). Isso é particularmente relevante para OTC, pois, de acordo com estudos descritos na literatura, a utilização de tetraciclinas vencidas pode causar síndrome de Fanconi, uma tubulopatia renal, que tem como uma das causas o acúmulo de seus produtos de degradação nos rins (FRIMPTER et al., 1963; MONTOLIU et al., 1981; HALL; BASS; UNWIN, 2014).

Entretanto, apesar de OTC na amostra Terracam Plus[®] ter apresentado o menor prazo de validade (13,9 meses), de acordo com o estudo de estabilidade de longa duração, esse valor é superior ao prazo estipulado pelo fabricante (dezembro de 2016), tendo em vista que o estudo de estabilidade de longa duração foi iniciado em dezembro de 2015. Do mesmo modo, PIRO, também na amostra Terracam Plus[®], OTC e DICLO na amostra Oxitrat La Plus[®] também apresentaram prazos de validade superiores ao estipulado, isto é, dezembro de 2016 (Terracam Plus[®]) e julho de 2017 (Oxitrat La Plus[®]).

Khan e colaboradores (1987) desenvolveram um estudo de estabilidade de longa duração para o cloridrato de OTC. Porém, esses autores utilizaram a matéria-prima no estado sólido armazenada em frascos com tampa de rosca

ou de borracha, no intervalo de temperatura de 37 a 70 °C durante seis. Nas temperaturas de 37 e 50 °C nenhuma decomposição significativa foi observada. Porém, a 70 °C observou-se diminuição do teor do fármaco e a formação de produtos de degradação (anidroxitetraciclina, α e β -apooxitetraciclina). Além disso, foi constatado que a decomposição das amostras armazenadas nos frascos com tampa de borracha foi mais rápida do que naqueles com tampa de rosca. Diante desses dados, os autores concluíram que é necessário condições de armazenamento adequadas, como temperatura de 20°C e baixa umidade, para manter a estabilidade físico-química dos medicamentos contendo OTC.

Portanto, as informações fornecidas através dos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração realizados neste estudo permitiram atestar que os prazos de validade e as condições de estocagem dos medicamentos (locais frescos e ao abrigo de luz), estabelecidas pelos fabricantes, estão adequados, confirmando que os produtos não devem ser armazenados sob temperaturas superiores a 30°C, conforme a utilizada no estudo de estabilidade acelerada. Salienta-se que os estabelecimentos que comercializam esses medicamentos devem seguir as condições de armazenamento preconizadas, além de orientar os consumidores a adotá-las rigorosamente.

Finalmente, os estudos de estabilidade são necessários para assegurar a qualidade e eficácia dos medicamentos, pois, caso não sejam mantidas as condições ideais de transporte e estocagem, podem ser gerados produtos de degradação tóxicos aos pacientes e/ou animais, além da ineficácia dos medicamentos comercializados (WATERMAN; ADAMI, 2005; MORENO; SALGADO, 2012).

6.3. CONCLUSÃO

As amostras Oxitrat La Plus[®] (OTC + DICLO) e Terracam Plus[®] (OTC + PIRO), submetidas aos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, não apresentaram mudanças expressivas nos valores de pH. No entanto, em relação à análise organoléptica, na amostra Oxitrat La Plus[®] houve o escurecimento da solução após o término dos ensaios de estabilidade acelerada (6 meses) e de longa duração (24 meses).

As duas amostras comerciais analisadas apresentaram instabilidade térmica, sendo que para a maioria dos fármacos a cinética de degradação foi de ordem zero. No entanto, na estabilidade de longa duração de OTC, na amostra Terracam Plus[®], o modelo cinético mais adequado foi o de segunda ordem.

O prazo de validade foi verificado através da determinação do $t_{90\%}$, sendo observado que os prazos de validade estabelecidos pelos fabricantes, bem como as recomendações sobre as condições de armazenamento para os dois medicamentos estavam adequados.

CAPÍTULO VII

AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE FÁRMACO-FÁRMACO

Este capítulo descreve a avaliação da compatibilidade fármaco-fármaco das misturas de oxitetraciclina e diclofenaco de sódio, bem como de oxitetraciclina e piroxicam. Esse estudo foi realizado com o intuito de prever a existência de uma provável interação físico-química dessas associações de fármacos que compõem as soluções injetáveis para uso animal em estudo.

7.1. MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1. Preparo das Misturas Binárias

Foram utilizadas as Substâncias Químicas de Referência Caracterizadas (SQC) de cada fármaco, previamente caracterizadas, conforme descrito no Capítulo II. A partir dessas, foram preparadas misturas binárias na proporção de 1:1 (m/m), isto é, oxitetraciclina e diclofenaco de sódio (OTC-DICLO, 1:1 m/m), bem como oxitetraciclina e piroxicam (OTC-PIRO, 1:1 m/m). As misturas dos pós das SQC foram homogeneizadas, usando o método de diluição geométrica, em gral e pistilo de vidro. Posteriormente, foram analisadas através das técnicas analíticas de Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV).

7.1.2. Métodos Analíticos

7.1.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

As curvas de Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG) foram obtidas no sistema termoanalisador TGA-Q50 da TA Instruments® em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 mL min⁻¹ para a balança e 60 mL min⁻¹ para o forno, razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ de 25 a 900°C. As amostras foram colocadas em cadinhos de platina com massas iniciais variando entre 3 e 6 mg. Antes dos ensaios verificou-se a calibração da temperatura do instrumento através da determinação da temperatura do ponto de *Curie* do padrão níquel (temperatura experimental = 373,29 °C).

7.1.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas no equipamento DSC-Q20, com sistema de refrigeração RCS-90 da TA Instruments® em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 60 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ na faixa de temperatura -80 a 500 °C. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio com tampa prensada e suas massas iniciais variaram entre

1,5 e 5 mg. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios utilizando o padrão de índio metálico ($T_{onset_{fusão}} = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H_{fusão} = 28,7 \text{ J g}^{-1}$).

7.1.2.3. Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho (IV)

O equipamento de infravermelho empregado foi Thermo Scientific® modelo Nicolet IS-5. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 100 *scans*. O brometo de potássio (KBr), utilizado para a confecção das pastilhas, foi de grau analítico (Sigma-Aldrich®) e previamente dessecado em estufa a 105 $^\circ\text{C}$.

Para o preparo das pastilhas, foram pesados, aproximadamente, 2,0 mg de cada matéria-prima que foram homogeneizados em quantidades ideais de de KBr. A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do programa Omnic®.

7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das possíveis interações físico-químicas entre os componentes da formulação é de extrema importância durante os estudos de pré-formulação e desenvolvimento do produto farmacêutico, uma vez que essas interações podem influenciar negativamente na biodisponibilidade e, conseqüentemente, na eficácia terapêutica e segurança do medicamento (LAVOR et al., 2012).

Apesar da relevância do assunto, não existe nenhum protocolo experimental oficialmente aceito para análise da compatibilidade fármaco-excipiente e fármaco-fármaco (GOMES et al., 2013). No entanto, nos últimos anos, as técnicas termoanalíticas, principalmente DSC e TG, têm sido amplamente utilizadas para essa finalidade, por serem metodologias rápidas e confiáveis (LAVOR et al., 2012).

No intuito de não fornecer resultados duvidosos relacionados à compatibilidade dos componentes da formulação, utilizam-se técnicas que complementam os resultados fornecidos pela DSC e TG. Nesse sentido, a espectrofotometria no IV, técnica rápida e de baixo custo operacional, tem sido empregada como análise complementar às técnicas termoanalíticas (PANI et al., 2012).

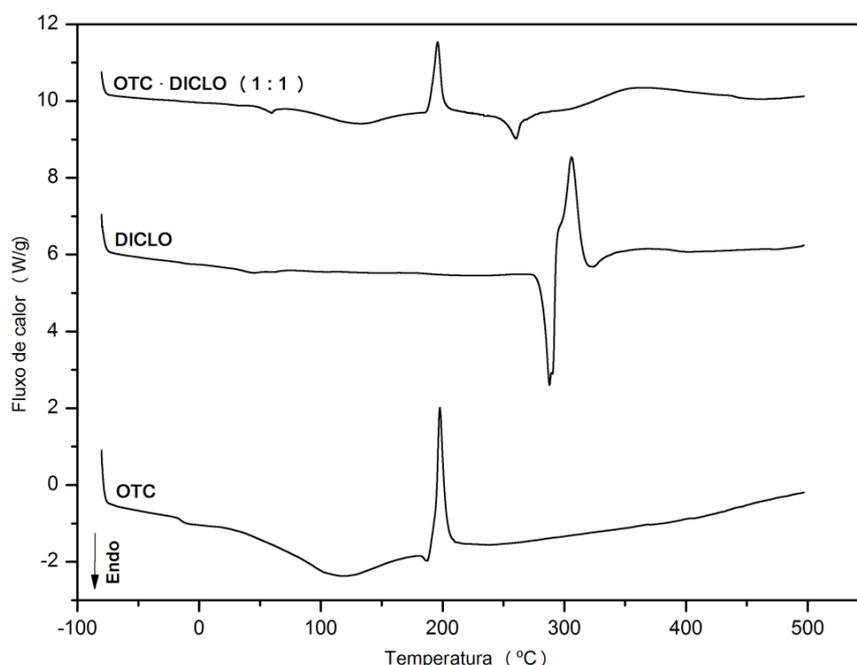
Portanto, trabalhos recentes descritos na literatura utilizam as técnicas termoanalíticas isoladas ou em associação com a espectrofotometria no IV para avaliação da compatibilidade entre os fármacos. Para essa finalidade, usualmente são preparadas misturas binárias na proporção de 1:1 (m/m), assim como o realizado neste estudo (LAVOR et al., 2012; GÓRNIAK et al., 2013; GOMES et al., 2013; GUPTA; CHADHA, 2015).

Os resultados da interpretação das curvas termoanalíticas e dos espectros no IV das misturas binárias encontram-se descritos a seguir e foram comparados com os obtidos com os fármacos isolados, previamente discutidos no Capítulo II (caracterização das matérias-primas).

7.2.1. Avaliação da Compatibilidade da Mistura OTC-DICLO

A Figura 6.1 traz a sobreposição das curvas DSC dos fármacos OTC e DICLO isolados e da mistura binária OTC-DICLO (1:1, m/m).

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



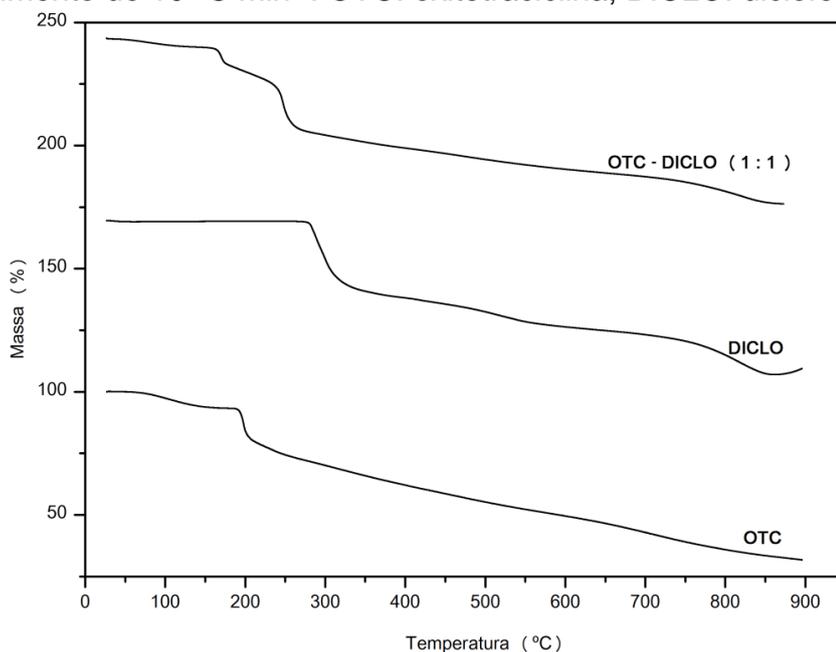
Ao analisar das três curvas DSC, é possível notar que houve mudança no comportamento térmico da mistura OTC-DICLO em relação aos fármacos isolados. As mudanças mais evidentes foram: alteração na faixa do primeiro evento endotérmico visualizado em OTC que passou de $67,6 - 151,8\text{ }^{\circ}\text{C}$

($\Delta H=163,7 \text{ Jg}^{-1}$) para $92,57\text{--}166,10 \text{ }^\circ\text{C}$ na mistura binária, bem como a diminuição da intensidade do pico exotérmico relacionado com eliminação de água de cristalização acompanhada da decomposição térmica de OTC, havendo também uma relativa mudança na faixa de temperatura e ΔH envolvido (de $173,30\text{--}199,0^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 159,3 \text{ Jg}^{-1}$ para $184,85\text{--}206,59 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 75,54 \text{ Jg}^{-1}$).

Evidencia-se também na curva DSC da mistura OTC-DICLO (Figura 7.1) a antecipação e a diminuição da intensidade do pico relacionado à fusão de DICLO, passando de $265,93\text{--}276,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{\text{onset fusão}} = 271,48 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 58,17 \text{ Jg}^{-1}$) para $242,72\text{--}274,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{\text{onset fusão}} = 260,13 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 36,8 \text{ Jg}^{-1}$), o que pode ser sugestivo de interação entre os fármacos devido ao aquecimento, resultando na provável formação de mistura eutética.

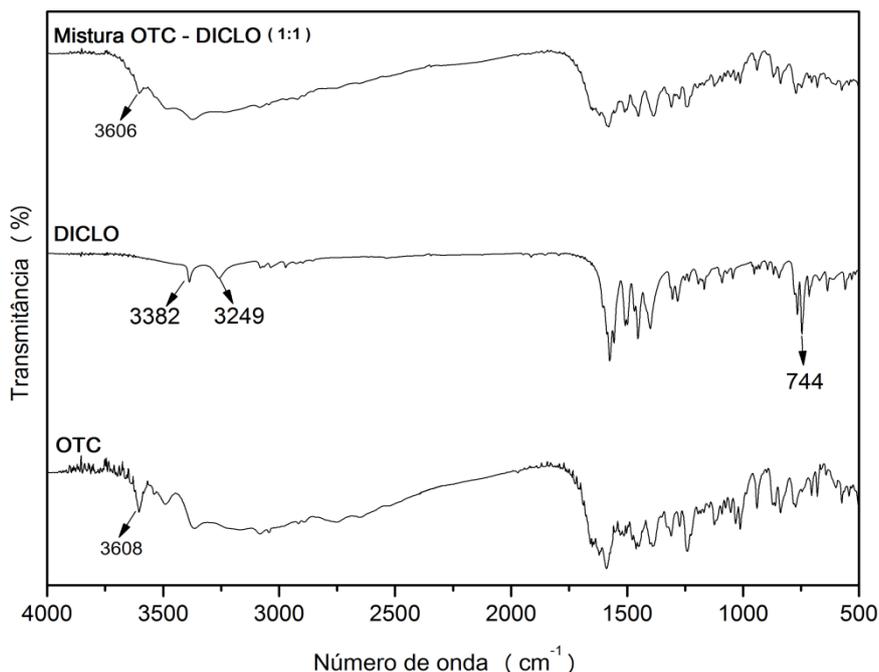
Adicionalmente, observa-se nas curvas TG desses fármacos (Figura 7.2) a diminuição da estabilidade térmica da mistura binária, quando comparada aos fármacos isolados. Essa redução da estabilidade térmica é, principalmente, notada para DICLO, pois na forma isolada esse fármaco se mantinha termicamente estável entre $60\text{--}276 \text{ }^\circ\text{C}$. Porém, na mistura binária evidencia-se perda de massa entre $185\text{--}230 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 10,0\%$), seguida de outra perda até $330 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 24,35\%$).

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



Com a finalidade de complementar os resultados obtidos pelas curvas DSC e TG da mistura binária OTC-DICLO que apontaram provável interação físico-química entre esses fármacos, foram analisados os perfis espectrais no IV da mistura em comparação com os dos fármacos isolados (Figura 7.3).

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

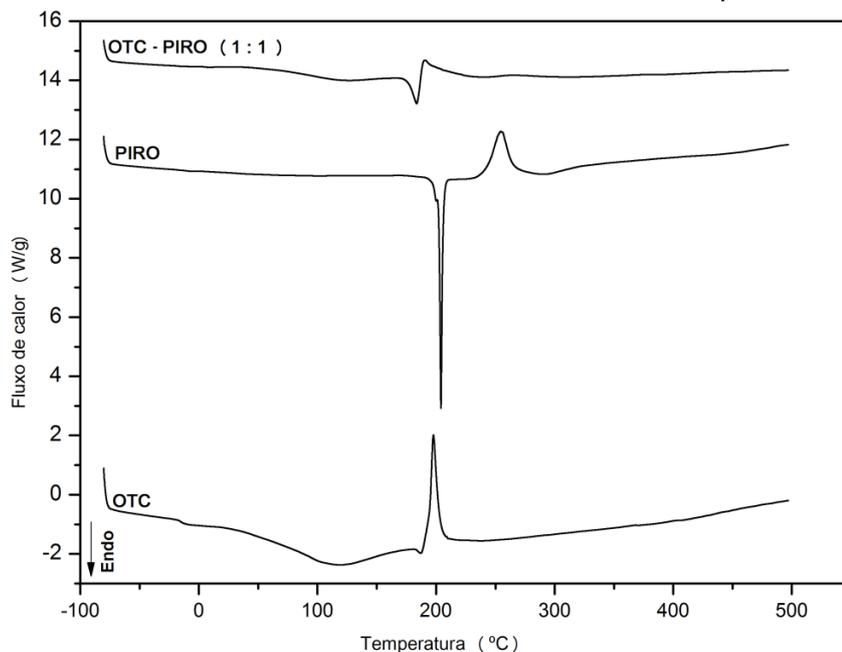


Ao observar a Figura 7.3, nota-se que no espectro da mistura OTC-DICLO houve a diminuição da intensidade da banda em torno de 3600 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da hidroxila “livre” do grupamento fenol ligado ao anel D (ν O-H fenol) de OTC. Além disso, percebe-se o desaparecimento das bandas de média intensidade em 3382 e 3249 cm⁻¹ características, respectivamente, das vibrações da ligação entre nitrogênio e hidrogênio (ν N-H) e da ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do grupo amina e o oxigênio da carbonila (ν NH \cdots O) que estão presentes na forma anidra de DICLO (BARTOLOMEI et al., 2006). Por último, verifica-se que também houve, no espectro IV da mistura OTC-DICLO, o desaparecimento da banda na região de 750 cm⁻¹ que corresponde à vibração da ligação entre carbono e cloro (ν C-Cl) presente na molécula de DICLO (PAVIA et al., 2010).

7.2.2. Avaliação da Compatibilidade da Mistura OTC- PIRO

As curvas DSC dos fármacos OTC e PIRO isolados e da mistura binária OTC:PIRO (1:1, m/m) estão demonstradas na Figura 7.4.

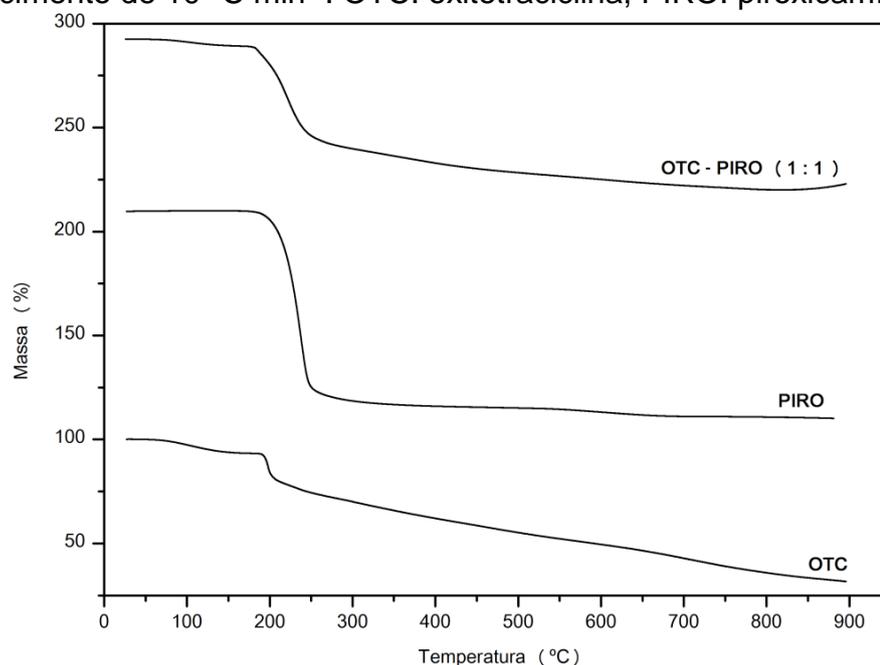
Figura 7.4. Curvas DSC dos fármacos OTC e PIRO isolados e da mistura binária OTC-PIRO (1:1, m/m), obtidas em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. OTC: oxitetraciclina; PIRO: piroxicam.



Através da análise das três curvas DSC, observa-se que houve considerável mudança no comportamento térmico da mistura binária em relação aos fármacos isolados. É possível notar que houve a diminuição da intensidade e alargamento no pico exotérmico observado para OTC entre 173,30–199,0°C. No entanto, a principal mudança foi em relação à fusão de PIRO. Na curva DSC de PIRO isolado observa-se o pico de fusão do fármaco entre 192,02–203,87 °C, com $T_{onset\text{ fusão}}$ de 199,88°C e $\Delta H_{\text{fusão}}$ de 101,51 J g⁻¹. Contudo, na curva DSC da mistura OTC-PIRO, nota-se esse pico mais largo, em um intervalo de temperatura menor (168–186 °C, $T_{onset\text{ fusão}}$ de 176,47°C), sugerindo a formação de uma mistura eutética.

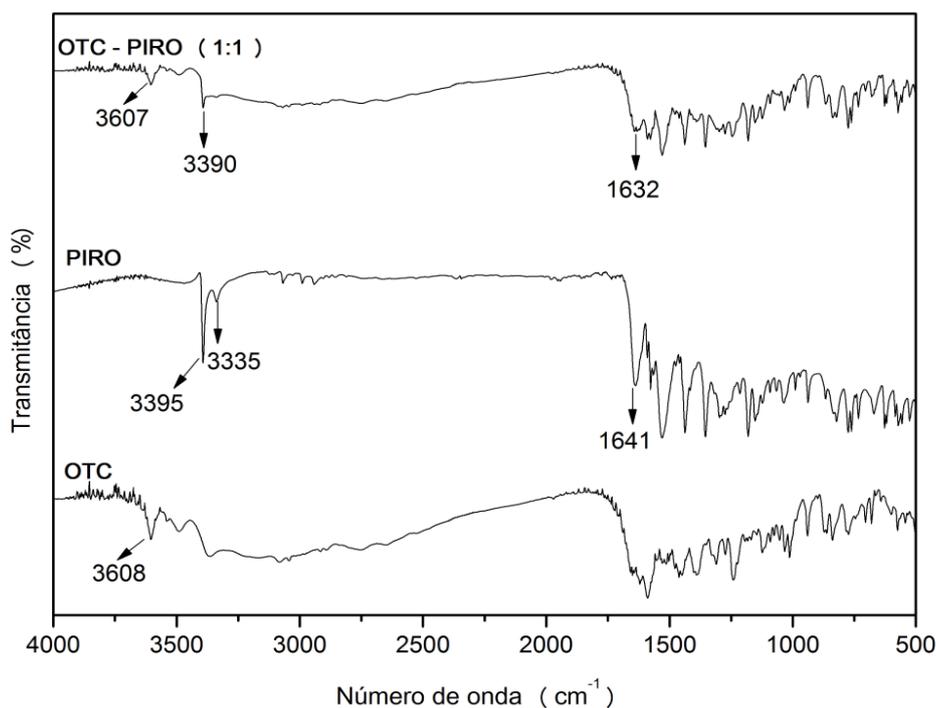
Além disso, verifica-se na Figura 7.5, que traz as curvas TG dos fármacos isolados e da mistura binária, a diminuição da estabilidade térmica de PIRO. Na forma isolada esse fármaco permanecia termicamente estável até 203°C. Todavia, na mistura binária, PIRO mantém-se estável até 180°C e, a partir dessa temperatura, observa-se perda de massa ($\Delta m = 44,22\%$).

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



Conforme observado na Figura 7.6, que traz os espectros no IV dos fármacos isolados e da mistura binária OTC-PIRO, é possível notar diferenças no padrão de vibração do espectro IV da mistura quando comparado com os dos fármacos isolados. A primeira diferença é em relação à diminuição da intensidade da banda em torno de 3600 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da hidroxila “livre” do grupamento fenol ligado ao anel D ($\nu\text{O-H}$ fenol) de OTC. Em seguida, nota-se que também ocorreu a diminuição da intensidade da banda em 3395 cm^{-1} no espectro de PIRO que é característica da presença da forma polimórfica II (agulha) desse fármaco. Ainda em relação ao PIRO, percebe-se que na mistura binária houve o desaparecimento da banda em 3335 cm^{-1} atribuída à forma polimórfica I desse fármaco, além da diminuição da intensidade e deslocamento da banda em 1641 cm^{-1} , característica da vibração da ligação entre carbono e oxigênio da carbonila ($\nu\text{C=O}$), que na mistura binária passou a estar em 1632 cm^{-1} (MIHALIC et al., 1986).

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



Deste modo, os resultados demonstrados neste Capítulo sugerem a possibilidade de ocorrer interação físico-química entre OTC e DICLO, bem como OTC e PIRO nos medicamentos veterinários estudados. Essa suspeita é preocupante, pois interações (físicas ou químicas) entre os fármacos presentes em um medicamento podem acarretar toxicidade ou ineficácia terapêutica, prejudicando o restabelecimento da saúde do animal e, conseqüentemente, a produtividade do rebanho (GUPTA; CHADHA, 2015). Além disso, deve-se considerar o fato de que OTC é um antimicrobiano e sua ineficácia pode causar o surgimento de resistência bacteriana, uma vez que as associações em estudo são amplamente utilizadas na medicina veterinária.

7.3. CONCLUSÃO

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO I

Artigo Científico Publicado

CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY
2017, VOL. 47, NO. 2, 154–171|
<http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2016.1236673>



A Critical Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Oxytetracycline in Biological and Pharmaceutical Matrices

Rúbia Adrieli Sversut ¹, Adriane Andrade da Silva ², Teófilo Fernando Mazon Cardoso ³, Nájla Mohamad Kassab ², Marcos Serrou do Amaral ³, and Hérida Regina Nunes Salgado ¹

¹Department of Pharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil; ²Center of Biological and Health Sciences, Pharmacy Course, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, Brazil; ³Institute of Physics, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, Brazil

ABSTRACT

Antibiotics have an unquestionable importance in the treatment of many infections. Oxytetracycline is an antibiotic belonging to the class of tetracyclines, available for use in human and veterinary medicine. Development of analytical methods that prove the quality and efficacy of these drugs is fundamentally important to the pharmaceutical industry. In this context, the research presents an overview of the analytical profile of oxytetracycline, describing its chemical and pharmacological properties, and analytical methods for quantification of this drug in biological samples and pharmaceutical products. Oxytetracycline can be analyzed in these matrices by many types of methodologies. However, high-performance liquid chromatography is the most widely used, being recommended by official compendia. This kind of study can be useful to support the development of new efficient and sustainable analytical methods that may be utilized in the quality control routine of oxytetracycline in pharmaceutical products and pharmacokinetic monitoring in biological samples.

KEYWORDS

Analytical methods; liquid chromatography; oxytetracycline; pharmacological properties; quality control

ANEXO II

Artigo Científico Submetido

Arabian Journal of Chemistry

 Contact us
 Help ?

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

 Username: rusversut@gmail.com
 Switch To: Author ▼ | Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2017.11

Submissions Being Processed for Author Rúbia Sversut

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 ▼ results per page.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
View Submission Send E-mail	ARABJC-D-17-01813	Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of oxytetracycline associated with diclofenac sodium or with piroxicam in veterinary pharmaceutical dosage form	Sep 28, 2017	Oct 06, 2017	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 ▼ results per page.

[<< Author Main Menu](#)