



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica**

**Igor Edmar Martim Gouvea**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-  
UV PARA DETERMINAÇÃO DA DOXICICLINA EM PLASMA: Farmacocinética  
pré-clínica da doxiciclina em coelhos**

**Araraquara-SP**

**2022**

**Igor Edmar Martim Gouvea**

**FARMACOCINÉTICA PRÉ CLÍNICA DA DOXICICLINA EM COELHOS:  
Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-UV para  
determinação da doxiciclina em plasma**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

**Araraquara-SP**

**2022**

---

**G237d** Gouvea, Igor Edmar Martim.  
Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por clae-uv para determinação da doxiciclina em plasma: Farmacocinética pré-clínica da doxiciclina em coelhos / Igor Edmar Martim Gouvea. – Araraquara: [S.n.], 2022.  
33 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. Antibiótico. 2. Doxiciclina. 3. HPLC. 4. Farmacocinética. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

## RESUMO

A doxiciclina (DOX) é um antibiótico bastante utilizado em medicina humana e veterinária que, em geral, aplica extrapolação empírica dos regimes posológicos em humano para animais. Esta prática pode levar ao uso inadequado do medicamento, uma vez que não são consideradas as características fisiológicas próprias da espécie, contribuindo para o desenvolvimento de resistência bacteriana. No presente estudo, foi realizado o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de DOX em plasma e realizado um estudo piloto de farmacocinética em coelhos de diferentes formulações de DOX, a saber: um grupo recebeu DOX em dose única (5 mg/kg) por IV bolus (n= 3), um grupo recebeu uma nova formulação contendo DOX em dose única pela via oral na forma de comprimido (25 mg; n=3) e um terceiro recebeu a formulação disponível no mercado, contendo DOX, em dose única, pela via oral na forma de comprimido (50 mg; n=3). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta-visível (UV-Vis), operando a 357 nm, uma coluna SunFire C18, fase móvel constituída de solução aquosa de ácido oxálico 5 mM (pH 2,2), acetonitrila e metanol (65:20:15) com vazão de 0,9 mL/min em modo isocrático. O volume de injeção foi 40 µL, tempo de corrida de 10 min e a oxitetraciclina (OXI) foi usada como padrão interno (PI). O processamento do plasma foi realizado por extração líquido-líquido com acetato de etila e a validação de acordo com a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Os tempos de retenção do PI e fármaco foram de 3 e 6 min, respectivamente. A curva de analítica foi linear na faixa de concentração de 0,003125 – 1,000000 µg/mL, o limite inferior de quantificação (LIQ) foi de 0,003125 µg/mL, com precisão e exatidão intra-dia e inter-dia adequados. Os estudos indicaram estabilidade do analito em todas as condições avaliadas. Embora não tenham sido aplicadas as comparações estatísticas em decorrência do pequeno número de animais estudados, os resultados observados sugerem que a nova formulação deve melhorar a biodisponibilidade da DOX, demonstrando aspectos promissores para a continuidade do desenvolvimento do produto com potencial aplicação terapêutica e eventual liberação de venda no mercado.

**Palavras-chave:** Antibiótico; Doxiciclina; HPLC; Farmacocinética.

## ABSTRACT

Doxycycline (DOX) is an antibiotic widely used in human and veterinary medicine that, in general, applies empirical extrapolation of human dosage regimens to animals. This practice can lead to inappropriate use of the drug, since the physiological characteristics of the species are not considered, contributing to the development of bacterial resistance. In the present study, the development and validation of a bioanalytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of DOX in plasma and a pilot pharmacokinetic study in rabbits of different DOX formulations were carried out, one group received DOX in dose (5 mg/kg) by IV bolus (n=3), one group received a new formulation containing DOX in a single dose orally in the form of a tablet (25 mg; n=3) and one group received the formulation available in the market containing DOX, in a single oral dose in the form of a tablet (50 mg; n=3). A high performance liquid chromatography (HPLC) system with an ultraviolet-visible detector (UV-Vis) was used, operating at 357 nm, a SunFire C18 column, mobile phase consisting of an aqueous solution of 5 mM oxalic acid (pH 2.2), acetonitrile and methanol (65:20:15) with a flow rate of 0.9 mL/min in isocratic mode. The injection volume was 40  $\mu$ L, run time was 10 minutes and oxytetracycline (OXI) was used as the internal standard (PI). Plasma processing was performed by liquid-liquid extraction with ethyl acetate and validation according to RDC No. 27, of May 17, 2012. PI and drug retention times were 3 and 6 minutes, respectively. The calibration curve was linear in the concentration range of 0.003125 - 1  $\mu$ g/mL, the lower limit of quantification (LIQ) was 0.003125  $\mu$ g/mL, with adequate intra-day and inter-day precision and accuracy. The studies indicated analyte stability under all conditions evaluated. Although statistical comparisons were not applied due to the small number of animals studied, the results observed suggest that a new formulation should improve the bioavailability of DOX, demonstrating promising aspects for the continuity of product development with potential therapeutic application and eventual release for sale. in the market.

**Keywords:** Antibiotic; Doxycycline; HPLC; Pharmacokinetics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sobreposição dos cromatogramas da amostra branco e da amostra contendo DOX (1 µg/mL) e padrão interno (OXI 5 µg/mL) em plasma.....	17
<b>Figura 2</b> – Curva calibração da DOX em plasma (n=3).....	19
<b>Figura 3</b> – Perfil farmacocinético da DOX após administração intravenosa da dose de 5mg/kg em coelhos (média ± DP, n=3).....	22
<b>Figura 4</b> – Perfil farmacocinético da DOX após administração oral de 25 mg em coelhos (média ± DP, n=3).....	23
<b>Figura 5</b> – Perfil farmacocinético da DOX após administração oral da dose de 50 mg (Ourofino) em coelhos (média ± DP, n=3).....	24
<b>Figura 6</b> – Perfis farmacocinéticos da DOX após administrações intravenosa na dose de 5 mg/kg (Grupo I) e orais nas doses de 25 mg (Grupo II) e 50 mg (Grupo III) em coelhos (média ± DP, n=3).....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição e equações para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.....	16
<b>Tabela 2</b> – Precisão e exatidão das concentrações experimentais médias da curva de calibração (n=3).....	19
<b>Tabela 3</b> – Precisão e exatidão do LIQ e controles de qualidade intracorrída e intercorrída do método bioanalítico de DOX em plasma.....	20
<b>Tabela 4</b> – Estabilidade da DOX em plasma em diferentes condições de armazenamento.....	21
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros farmacocinéticos da DOX (média ± DP) determinados no plasma após administração intravenosa da dose de 5 mg/kg em coelhos (n=.....)	22
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros farmacocinéticos da DOX (média ± DP) determinados no plasma após administração oral da dose de 25 mg em coelhos (n=.....)	23
<b>Tabela 7</b> – Parâmetros farmacocinéticos da DOX (média ± DP) determinados no plasma após administração oral da dose de 50 mg (Ourofino) em coelhos (n=.....)	24

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Soluções padrão, solventes, reagentes e matriz biológica.....	10
3.2 Equipamentos.....	10
3.3 Softwares.....	10
3.4 Desenvolvimento do Método Bioanalítico e Sistema Cromatográfico.....	11
3.5 Processamento da Amostra.....	11
3.6 Validação do método bioanalítico.....	11
3.7 Protocolo experimental.....	14
3.8 Modelo animal.....	14
3.9 Administração intravenosa, oral e coleta de sangue.....	15
3.10 Farmacocinética.....	15
3.11 Análise estatística.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico.....	17
4.2 Seletividade.....	18
4.3 Sensibilidade.....	18
4.4 Linearidade.....	18
4.5 Precisão e Exatidão.....	19
4.6 Efeito residual.....	20
4.7 Estabilidade de armazenamento.....	20
4.8 Análise Farmacocinética e Administração intravenosa de DOX.....	21
4.9 Administração oral do comprimido de 25 mg de DOX.....	22
4.10 Administração oral do comprimido de 50 mg de DOX.....	23
4.11 Comparação entre os grupos.....	25
4.12 Clearance plasmático (Cl).....	25
4.13 Volume de distribuição (Vd).....	26
4.14 Meia-vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ou $\beta$ ) e constante de eliminação ( $K_{el}$ ).....	26
4.15 Concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) e tempo para atingir $C_{m\acute{a}x}$ ( $T_{m\acute{a}x}$ ).....	26
4.16 Avaliação da biodisponibilidade absoluta (Foral).....	27



5. CONCLUSÃO.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	29
7. ANEXO(S).....	32

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o avanço da urbanização e da grande mudança social dos humanos, houve aumento de forma expressiva da população de animais domésticos, principalmente nos países em desenvolvimento (LIMA; LUNA, 2012). Esse aumento, associado à relação sentimental do homem com os seus pets, implica intimamente na saúde pública, pois o animal pode ser responsável pela transmissão de diversas zoonoses para os humanos (AZEVEDO *et al.*, 2004). O cloridrato de doxiciclina (DOX) é um antibiótico da classe das tetraciclinas, derivada de forma sintética da oxitetraciclina ou metaciclina, de amplo espectro utilizada de forma eficaz na eliminação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo bastante utilizada na medicina humana e veterinária.

Porém, um dos principais problemas do sucesso terapêutico na medicina veterinária é a utilização da extrapolação empírica dos regimes posológicos de medicamentos de uso humano para animais, o que pode levar ao uso inadequado do medicamento por não considerar particularidades fisiológicas de cada espécie e contribuir para um quadro de subdoses ou doses excessivas e podendo evoluir para um quadro de resistência bacteriana, como é o caso da DOX (FREITAS; CARREGARO, 2013; MARTINS, 2018).

O mecanismo de ação (MEA) da DOX envolve sua ligação a subunidade 30S do ribossomo que irá inibir a síntese proteica, recebendo, assim, o nome de bacteriostático. Além da atuação sobre amplo espectro de bactérias, inclui, também, ação em alguns protozoários, porém sua maior seletividade é para células eucarióticas (PAPICH *et al.*, 2009; HARDMAN *et al.*, 2003).

A principal diferença da DOX em relação às demais tetraciclinas é sua maior lipofilicidade, característica que aumenta sua capacidade de penetração tecidual, resultando em maiores volumes de distribuição e melhores propriedades antimicrobianas. Além disso, possui também maior capacidade de ligação a proteínas plasmáticas, o que aumenta sua meia-vida refletindo em um maior tempo de seus efeitos.

Geralmente a DOX é o fármaco de escolha no tratamento de algumas doenças transmitidas por carrapato em animais, com eficácia demonstrada em pesquisas. Além disso, é usada no controle de alguns protozoários e bactérias dos gêneros e *Ehrlichia* sendo considerada padrão para o tratamento da erlichiose canina por melhorar sinais clínicos e anormalidades clínico-patológicas em cães

infectados. A DOX é absorvida rapidamente quando administrada pela via oral e em estudos com cães e gatos, após administração intravenosa, se mostrou com perfil cinético bicompartmental, uma vez que houve distribuição rápida e eliminação lenta (DAMAS *et al.*; 2012; RIOND *et al.*, 1990). Sua distribuição ocorre amplamente pelos tecidos, principalmente coração, rins, pulmões, músculos, fluido pleural, etc. A eliminação da DOX ocorre, sobretudo, pelas fezes e sua meia-vida média no plasma em cães é de 10 - 12 h com clearance de 1,7 mL/kg/min (DAVOUST, 1993). Um fator limitante para a sua boa absorção é a administração concomitante com alimentos, frente a isso, ela deve ser administrada 2 a 3 h antes ou após a qualquer ingestão alimentar (WOODY *et al.*, 1991).

Diversas irregularidades terapêuticas como dose inadequada, administração em intervalos inconstantes e seleção de fármaco pouco ativo para o patógeno envolvido, contribuem de forma irrefutável para o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, juntamente com o não sucesso terapêutico. Diante deste cenário, a indústria veterinária vem se empenhando nos estudos e no desenvolvimento de formulações que são eficazes para o tratamento contra agentes bacterianos, visando a construção do regime posológico adequado para a espécie animal alvo, com expectativa de menor variabilidade nos resultados esperados. Contudo, para isso, é necessário desenvolver e validar um método bioanalítico adequado para determinação de DOX em plasma. Assim, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar DOX em plasma de coelhos. As informações obtidas neste estudo fundamentarão o planejamento de ensaios de farmacocinética pré-clínica da doxiciclina veiculada em comprimidos desenvolvidos pela indústria veterinária Vetnil para a continuidade do desenvolvimento deste produto com potencial aplicação terapêutica e eventual liberação de venda no mercado.

Os estudos pré-clínicos são necessários para avaliar a segurança e efetividade do uso de um novo medicamento, uma vez que esta formulação possui potencial de melhorar a terapia medicamentosa em cães e gatos.

## **2 OBJETIVOS**

Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar DOX em plasma de coelhos por CLAE-UV; avaliar o perfil farmacocinético de DOX pela via

intravenosa após uma dose única de 5 mg/kg e pela via oral após uma dose única de 25 mg e 50 mg em coelhos; calcular os principais parâmetros farmacocinéticos para DOX em coelhos.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Soluções padrão, solventes, reagentes e matriz biológica**

O padrão de DOX (para preparação da solução estoque) utilizado foi adquirido na Sigma-Aldrich sendo a solução estoque preparada em acetonitrila na concentração de 100 µg/mL. A oxitetraciclina (OXI) utilizada como padrão interno (PI) foi solubilizada em acetonitrila na concentração de 50 µg/mL. O solvente acetato de etila empregado para extração líquido-líquido no processamento da amostra foi obtido da J. T. Baker (México), os solventes metanol e acetonitrila usados como componente da fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da J. T. Baker (México), ambos grau HPLC. A água ultrapura utilizada como fase móvel foi obtida do sistema de purificação Milli-Q Direct 16®. A solução de ácido fórmico obtido da Scharlab S.L® foi utilizada como modificador de pH. As soluções padrão de DOX e OXI foram mantidas sob refrigeração a 8°C (±1°C) durante a validação do método bioanalítico. A heparina utilizada para impedir o processo de coagulação nos microtubos foi adquirida na concentração de 5.000 U.I./mL da Blau Farmacêutica®.

#### **3.2 Equipamentos**

HPLC Alliance, Waters; Detector UV-Vis, Waters; Coluna de guarda SunFire C18 (4,6 x 20 mm; 5 µm); Coluna SunFire C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm); Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, Odontobrás; Peagâmetro digital pG 1800 Gehaka; Balança AY220, Shimadzu; Vórtex AP56, Phoenix; centrífuga 5810 R, Eppendorf; Evaporador à vácuo, miVac Duo Concentrator, Genevac; Seringa 1mL, BD; Filtro de seringa de PTA, poro de 0,22 µm, Analítica; Sistema Milli-Q®.

#### **3.3 Softwares**

MassLynx, Waters; Excel 2019, Microsoft; Prism 8, GraphPad.

### **3.4 Desenvolvimento do Método Bioanalítico e Sistema Cromatográfico**

Foi utilizado sistema CLAE Alliance Waters equipado com detector UV-Vis, operando a 357 nm, coluna SunFire C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm) e pré-coluna C18 (4,6 x 20 mm; 5 µm) mantida a 35°C. A fase móvel foi constituída de solução aquosa de ácido oxálico 5 mM (pH 2), acetonitria e metanol (65:20:15), operando em modo isocrático. A vazão utilizada foi 0,9 mL/min. O volume de injeção foi 40 µL e o tempo de corrida foi de 10 min. As amostras foram mantidas a 10°C até a injeção.

### **3.5 Processamento da Amostra**

À 200 µL de plasma foram adicionados 50 µL de PI (OXI 5µg/mL), 50 µL de solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 10%, que foi homogeneizado através de um agitador. A seguir, foi adicionado 1000 µL de acetato de etila e a mistura foi homogeneizada em um agitador por 70 s e centrifugada por 20 minutos a 12.000 rpm (15130 x G) a 4°C. A fase orgânica (800 µL) foi filtrada em membrana de PTFE com poro de 0,22 µm e transferida para um novo microtubo. A fase orgânica foi evaporada até a secura no evaporador/concentrador à vácuo. Ao resíduo foi adicionado 100 µL de fase móvel, homogeneizado através do agitador e injetado no sistema cromatográfico.

### **3.6 Validação do método bioanalítico**

A validação de um método bioanalítico para a avaliação quantitativa de analitos em uma determinada matriz biológica é crucial para a condução bem-sucedida de estudos farmacocinéticos (FDA, 2018). O método bioanalítico validado garante que os dados do estudo sejam confiáveis. Neste trabalho, a validação do método foi fundamentada nas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a resolução RDC nº27, de maio de 2012, e da Food and Drug Administration (FDA) pelo Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation de maio de 2018, avaliando os parâmetros seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, recuperação e estabilidade de armazenamento.

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o composto de interesse de outros compostos presentes na matriz biológica, sejam eles produtos de degradação, impurezas, componentes da matriz ou ainda fármacos de uso concomitante. Deve ser realizada a análise da amostra branco e não deve

haver picos interferentes nos tempos de retenção do fármaco e do PI. Como critério de aceitação, as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção do fármaco devem ser inferiores a 20% da resposta do limite inferior de quantificação (LIQ) e as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

A sensibilidade do método é estabelecida pela determinação do LIQ, que corresponde a menor concentração da curva de calibração que tenha precisão ( $\pm 20\%$ ) e exatidão ( $\pm 20\%$ ) em, no mínimo, 5 replicatas. Como critério de aceitação, a resposta do analito no LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a resposta da amostra zero (FDA, 2018).

A linearidade é definida como a capacidade do método ter proporcionalidade entre as concentrações do analito e a resposta adquirida pelo sistema cromatográfico. Este parâmetro é avaliado através da curva de calibração. Para a construção da curva de calibração foi utilizado um pool de plasma de coelhos Albinos Neozelandês. A curva foi realizada em triplicata e com seis níveis de concentração. Uma alíquota de plasma foi enriquecida com solução concentrada (100  $\mu\text{g/mL}$ ) de DOX para 10  $\mu\text{g/mL}$  e a partir desta realizaram-se diluições seriadas para obter as concentrações finais de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1  $\mu\text{g/mL}$  em plasma, seguidos da extração. A curva de calibração foi construída a partir da razão da área do pico do analito (DOX) e do PI (OXI) (área do analito/área do PI) projetados no eixo "y" (áreas obtidas através da média das triplicatas injetadas) contra a concentração nominal do analito (DOX) projetado no eixo "x". Como critérios de aceitação da linearidade, a curva deve apresentar coeficiente de correlação acima de 0,98 e 75% dos padrões de calibração devem ter exatidão variando entre 85 e 115%, podendo apenas o LIQ variar entre 80 e 120% (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por análise de amostras em intracorridas e intercorridas. A precisão tem como principal objetivo verificar a proximidade e concordância entre as replicatas analisadas. Já a exatidão verifica a proximidade do valor encontrado com o valor de referência, ou seja, a concentração nominal. Ambos os ensaios foram realizados utilizando o LIQ e os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e diluído (CQD), todos em

quintuplicata. Para aprovação, os valores de precisão deveriam se encontrar entre 0 e 15% e os de exatidão entre 85 e 115% (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

A recuperação tem como objetivo verificar a eficiência da extração empregada verificando a perda do analito decorrente do processamento da amostra bioanalítica. A recuperação não precisa ser de 100%, mas deve ser constante, precisa e reprodutível (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

O efeito residual ocorre quando há o aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI devido à contaminação por amostra analisada anteriormente, sendo assim sua presença determinada a partir da análise de uma amostra branco, seguida da maior concentração da curva, e então a amostra de plasma branco mais duas vezes. A resposta de picos interferentes não deve ser superior a 20% para o fármaco e 5% para o PI (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta e o seu processamento (tempo em que as amostras permaneceram dentro do equipamento). O ensaio de estabilidade tem como objetivo verificar se o analito permanece quimicamente inalterado sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo, indicando assim as condições que o analito pode ou não ser submetido. Todos os estudos de estabilidade preconizados foram avaliados empregando o controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) em triplicata (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

Na estabilidade de curta duração (ECD), as amostras foram mantidas em temperatura ambiente em um período de 6h, tempo superior ao que as amostras foram mantidas durante o estudo, depois foram processadas e analisadas (BRASIL, 2012; FDA, 2018). Na estabilidade de longa duração (ELD), o tempo de armazenamento das amostras em congelador deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última. Após preparo das amostras de CQA e CQB, elas foram congeladas a -20°C, mesma temperatura utilizada no estudo, por 30 dias (BRASIL, 2012; FDA, 2018). Na estabilidade pós-processamento (EPP), as amostras processadas foram mantidas a 10 °C dentro do equipamento de cromatografia líquida por 6 h, tempo superior à duração das corridas analíticas do conjunto de amostras (BRASIL, 2012; FDA, 2018). Na estabilidade, após ciclo de congelamento/descongelamento (ECCD), as amostras foram congeladas a -20 °C por 24 horas e descongeladas em temperatura

ambiente. Esse procedimento foi repetido e, ao final do terceiro descongelamento, as amostras foram analisadas e comparadas com as amostras recém preparadas (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

### **3.7 Protocolo experimental**

O protocolo abaixo descrito foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara através do parecer nº 05/2019 (anexo I).

### **3.8 Modelo animal**

Nesse estudo foram utilizados 9 coelhos brancos da raça Nova Zelândia, com peso na faixa de 2,5 a 3 kg, fornecidos pela empresa Vetnil provenientes da empresa Anilab – Animais de Laboratório Criação e Comércio. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 + ou - 1º C), umidade (55% + ou - 5%) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h) e tiveram alimento e água à vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro e os animais foram privados de alimento por 12 horas anteriores à administração do medicamento. Após administração, os animais permaneceram privados de alimentos por um período de 4 horas. O modelo animal foi selecionado com base na facilidade de manipulação e administração de forma farmacêutica sólida e pelo uso desta espécie em estudos farmacocinéticos. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

-Grupo Farmacocinética I, tratados com solução intravenosa de DOX, dose única (5 mg/kg), IV bolus (n= 3);

-Grupo Farmacocinética II, tratados com nova formulação contendo DOX desenvolvida pela Vetnil, dose única (25 mg), V.O, na forma de comprimido (n=3);

-Grupo Farmacocinética III, tratados com formulação disponível no mercado contendo DOX desenvolvida pela Ourofino, dose única (50 mg), V.O na forma de comprimido (n=3).

Devido à situação atual de pandemia do novo coronavírus, as regras de distanciamento social dentro das dependências da universidade, limite de número de



peessoas nos laboratórios, falta de pessoas para compor equipe do protocolo experimental e necessidade de uma equipe maior devido ao modelo animal escolhido, não foi possível realizar os experimentos com o número total de animais. Sendo esse número reduzido para 3 animais por grupo.

### **3.9 Administração intravenosa, oral e coleta de sangue**

Os animais do grupo I receberam solução intravenosa contendo DOX por administração IV na veia auricular marginal, em dose única, após jejum de 6 horas, com livre acesso à água. O grupo I foi acrescido ao estudo para o cálculo de biodisponibilidade absoluta (Foral) das formulações de DOX. Os grupos II e III receberam os comprimidos de DOX em dose única pela via oral utilizando um pill dispenser (dispositivo utilizado na clínica veterinária para administração de comprimidos), com volume fixo de 10 mL de água filtrada, após jejum de 6 horas. Os animais tiveram com livre acesso à água e receberam ração 4 horas após a administração do fármaco. Após a administração, foram realizadas coletas seriadas de sangue através da artéria auricular central, utilizando seringas de 1 mL com agulha 29G  $\frac{1}{2}$  (13 mm x 0,33 mm). O sangue foi coletado nos seguintes tempos estabelecidos para todos os grupos: tempos de 5; 15; 30; 60; 90; 180; 360; 540; 720; 960; 1440 minutos após administração. Alíquotas de 500  $\mu$ L de sangue foram colocadas em tubos com heparina, centrifugadas a 6.000 x G por 3 minutos e 200  $\mu$ L de plasma foram retirados em duplicata e imediatamente estocados a -20°C por período previamente testado nos estudos de estabilidade da validação bioanalítica. O volume de sangue coletado de cada animal não ultrapassou o volume máximo recomendado (7,5% do volume total) (DIEHL *et al.*, 2001), permitindo assim, que os animais ficassem em condições hematológicas e fisiológicas normais durante todo o experimento.

### **3.10 Farmacocinética**

Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados a partir das curvas de concentração plasmática versus tempo com três replicatas (3 animais por curva). Os cálculos foram feitos em Excel.

**Tabela 1** – Descrição e equações para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos

Parâmetros	Descrição	Equação ou método de cálculo
$ASC_{0-T}$	Área sob a curva de zero ao último tempo quantificável	Métodos dos Trapezoides $ASC_{0-t} + C_n / K_{el}$
$ASC_{0-INF}$	Área sob a curva de zero extrapolado ao infinito	Onde $C_n$ é a última concentração quantificável
$K_{el}$ ou $\beta$	Constante de eliminação	Gráfico log da concentração plasmática v.s. tempo $Ln 2\beta / Ln 2\beta$
$T_{1/2\beta}$	Meia-vida de eliminação	
$\alpha$	Constante de distribuição	Gráfico log da concentração plasmática v.s. tempo $Ln 2\alpha / Ln 2\alpha$
$T_{1/2\alpha}$	Meia-vida de distribuição	
$T_{ss}$	Tempo para atingir o estado de equilíbrio	$Ln(\alpha\beta) / (\alpha - \beta)$
Cl	Clearance total	$Dose \times F \times ASC_{0-INF} / C_{MÁX}$
$V_{\text{área}}$	$V_d$ no estado de pseudoequilíbrio	$Cl / K_{el}$
$K_a$	Constante de absorção	Gráfico log da concentração plasmática v.s. tempo $Ln 2K_a / Ln 2K_a$
$T_{1/2a}$	Meia-vida de absorção	
$C_{MÁX}$	Concentração plasmática máxima	Método gráfico
$T_{MÁX}$	Tempo para obtenção de $C_{MÁX}$	Método gráfico
$F_{\text{oral}}$	Biodisponibilidade absoluta	$ASC_{0-INF} (ORAL) \times Dose (IV) / ASC_{0-INF} (IV) \times Dose (ORAL)$

Fonte: Autoral

### 3.11 Análise estatística

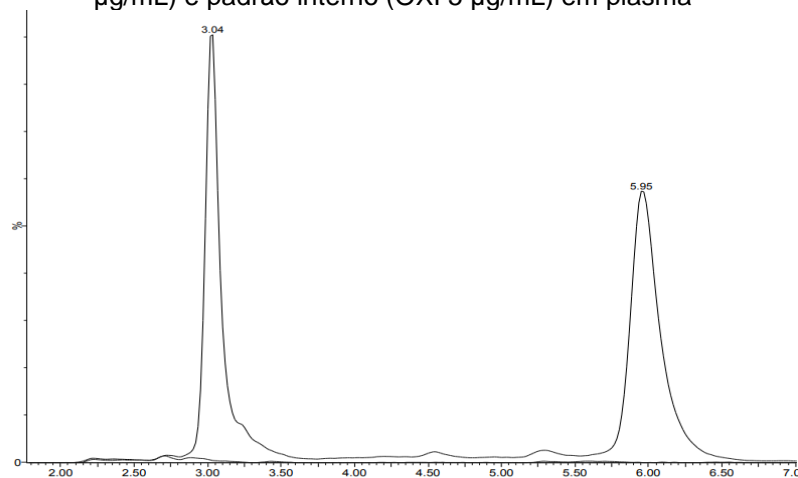
Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram estimados e expressos através da média aritmética.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico

O sistema cromatográfico proposto foi capaz de separar adequadamente o analito de interesse (DOX) e o padrão interno (OXI) sem interferentes do plasma. No desenvolvimento do método cromatográfico, desde o princípio, a coluna SunFire C18 foi empregada, pois pode ser usada em métodos de uso geral em pH baixo. As condições cromatográficas iniciais foram baseadas no estudo de Aguiar *et al.* (2007) mas sofreu alterações para melhorar a resposta do analito sob nossas condições laboratoriais. A separação do analito se deve por eluir junto com a fase móvel empregada na análise, que consistiu na mistura de proporções desiguais de solventes com força de eluição diferentes, sendo eles: solução aquosa de ácido oxálico 5mM com pH 2 ajustado com ácido fórmico, acetonitrila e metanol (65:20:15), operando em modo isocrático. Na figura 1, está apresentado o cromatograma obtido a partir do software MassLynx, demonstrando os tempos de retenção e intensidade do sinal gerado por cada analito.

**Figura 1** - Sobreposição dos cromatogramas da amostra branco e da amostra contendo DOX (1 µg/mL) e padrão interno (OXI 5 µg/mL) em plasma



Fonte: Autoral.

No sistema cromatográfico proposto o tempo de retenção da DOX foi de aproximadamente 6 min e da OXI de 3 min (Figura 1), apresentando adequada simetria e resolução entre os picos.

#### **4.2 Seletividade**

Com a sobreposição dos cromatogramas, demonstrado na figura 1, podemos observar que no tempo de retenção da DOX não houve interferências do PI utilizado e do plasma branco (isento de substâncias exógenas), características essas que favorecem a quantificação do analito de escolha, resultando em análises cromatográficas satisfatórias. As respostas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção da DOX e do PI foram inferiores ao limite estabelecido de 20% da área do LIQ (0,03125 µg/mL) e 5% da área do PI, demonstrando a seletividade do método.

#### **4.3 Sensibilidade**

O LIQ foi determinado como 0,03125 µg/mL e apresentou uma relação entre ruído e linha de base de 5:1 e com exatidão de até 86,9 % e precisão de até 5,94 %, atendendo os critérios exigidos e demonstrando a sensibilidade do método.

#### **4.4 Linearidade**

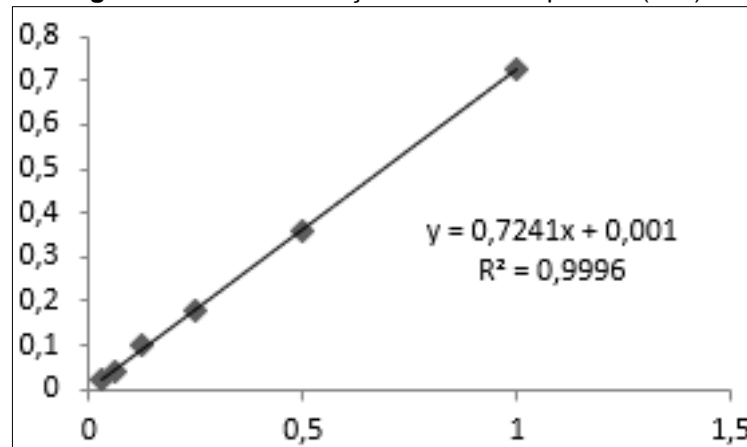
A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva de calibração plotando a relação entre as áreas dos picos de DOX e OXI contra a concentração nominal do DOX. A curva de calibração foi construída com 6 níveis de concentrações (0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1 µg/mL) a partir de uma diluição seriada e em triplicata. Os padrões de calibração, incluindo o LIQ, apresentaram exatidão entre 91,9% e 111,41%, valores aceitáveis, uma vez que o critério de aceitação é de 85 a 115%, exceto para o LIQ, que pode apresentar exatidão entre 80 e 120%. Na tabela 2, estão apresentados os padrões da curva de calibração e os resultados de precisão e exatidão. A curva foi construída sem ponderação e apresentou coeficiente de correlação de 0,9996 e a equação da reta:  $y=0,7241x+0,001$  (figura 2). A curva de calibração foi considerada linear dentro da faixa de concentração avaliada.

**Tabela 2** – Precisão e exatidão das concentrações experimentais médias da curva de calibração (n=3)

<b>Doxiciclina</b>						
Nominal (µg/mL)	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
Experimental (µg/mL)	0,2895	0,0575	0,1393	0,2457	0,495	1,002
Precisão (%)	9,33	6,27	1,38	6,94	2,21	0,22
Exatidão (%)	92,63	91,99	111,49	98,28	99	100,21

Fonte: Autoral.

**Figura 2** - Curva calibração da DOX em plasma (n=3)



Fonte: Autoral.

#### 4.5 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas a partir de cinco concentrações em quintuplicata: LIQ (0,03125 µg/mL) CQB (0,0625 µg/mL), CQM (0,25 µg/mL), CQD (0,5 µg/mL) e CQA (0,8 µg/mL), por meio de análises intracorrída, determinações realizadas no mesmo dia, e intercorrída, determinações realizadas em três dias consecutivos. Os resultados estão apresentados na tabela 3 e apresentam-se dentro dos critérios de aceitação exigidos, demonstrando que o método bioanalítico é preciso e exato.

**Tabela 3** - Precisão e exatidão do LIQ e controles de qualidade intracorrida e intercorrida do método bioanalítico de DOX em plasma

		Controles de qualidade em plasma				
		LIQ	CQB	CQM	CQD	CQA
Concentração nominal DOX ( $\mu\text{g/mL}$ )		0,0312	0,0625	0,25	0,5	0,8
Intracorrida	n	5	5	5	5	5
	Precisão (%)	5,94	3,69	2,71	2,94	1,22
	Exatidão (%)	89,31	90,96	97,11	99,06	93,73
Intercorrida	n	15	15	15	15	15
	Precisão (%)	4,05	3,83	3,05	3	1,32
	Exatidão (%)	86,96	89,36	96,32	98,82	94,06

LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQD: controle de qualidade diluído; CQA: controle de qualidade alto. Fonte: Autoral.

#### 4.6 Efeito residual

Foram analisadas três injeções da mesma amostra de plasma branco (ausente de DOX e OXI), sendo uma antes e duas logo após a injeção da amostra processada do limite superior de quantificação ( $\text{LSQ} = 1 \mu\text{g/mL}$ ). A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% da resposta do LIQ e as respostas de picos interferente no tempo de retenção do PI foram inferiores a 5% da resposta de OXI. Com esses resultados podemos concluir que não foi evidenciado aumento de sinal por contaminação de amostras anteriores, tanto para DOX quanto para o OXI, sendo assim descartada a chance do efeito residual.

#### 4.7 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade das amostras foi avaliada sob condições específicas para garantir que o analito não sofra alterações químicas em matriz biológica e, assim, definir condições adequadas e seguras para o armazenamento das amostras durante o estudo. Todos os estudos de estabilidade preconizados foram avaliados empregando o controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) em triplicata. Na tabela 4, estão apresentados os resultados dos estudos de estabilidade da DOX em plasma.

**Tabela 4** - Estabilidade da DOX em plasma em diferentes condições de armazenamento

		Estabilidade de armazenamento			
		ECD	ELD	EPP	ECCD
<b>CQB</b>	n = 3				
(0,0625 µg/mL)	Exatidão (%)	90,98	89,91	94,97	95,38
	Precisão (%)	6,019	0,15	6,5	4,81
<b>CQA</b>	n = 3				
(0,8 µg/mL)	Exatidão (%)	104,3	94,86	104,7	96,9
	Precisão (%)	3,92	3,13	4,07	1,14

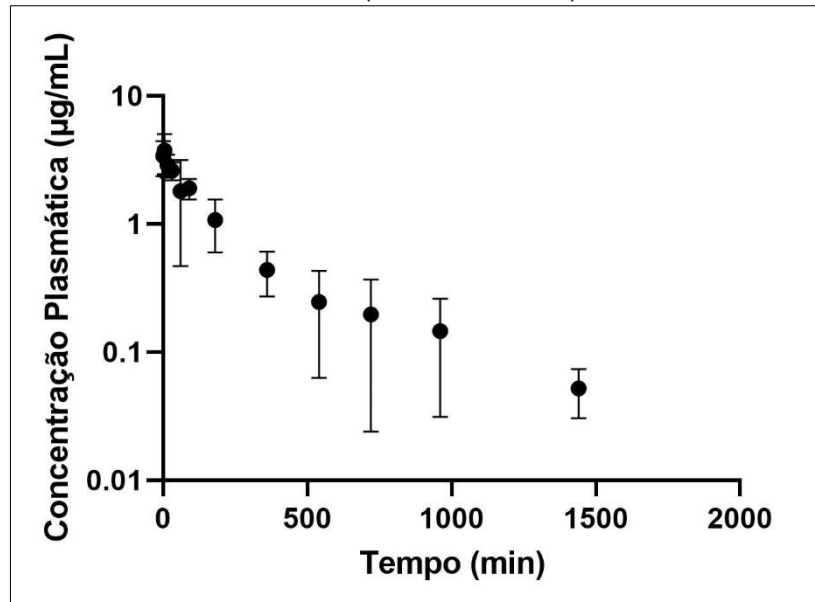
ECD: Estabilidade de curta duração; ELD: Estabilidade de longa duração; EPP: Estabilidade de pós processamento; ECCD: Estabilidade ciclos de congelamento e descongelamento. Fonte: Autoral.

Os resultados obtidos experimentalmente apresentam-se dentro dos limites aceitáveis determinados pelas leis vigentes, garantindo que as condições de armazenagem testadas foram consistentes para evitar a degradação do analito na matriz biológica plasma.

#### 4.8 Análise Farmacocinética e Administração intravenosa de DOX

A administração intravenosa (5 mg/kg de DOX) nos coelhos permitiu a construção de uma curva concentração plasmática *versus* tempo obtida através da análise das amostras coletadas, processadas e analisadas. Através da análise gráfica das concentrações plasmáticas médias apresentadas na figura 3, é possível observar que existem duas retas com inclinações diferentes, o que representa duas velocidades de decaimento das concentrações diferentes, indicando que o modelo bicompartimental é o mais adequado para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos do grupo I. Na tabela 5, estão apresentados os principais parâmetros farmacocinéticos estimados para este grupo de animais (grupo I).

**Figura 3** – Perfil farmacocinético da DOX após administração intravenosa da dose de 5mg/kg em coelhos (média ± DP, n=3)



Fonte: Autoral.

**Tabela 5** - Parâmetros farmacocinéticos da DOX (média ± DP) determinados no plasma após administração intravenosa da dose de 5 mg/kg em coelhos (n=3)

Parâmetros	Unidade	Média ± DP
$K_{el}$	Min <sup>-1</sup>	0,0014 ± 0,0004
$T_{1/2} (\beta)$	Min	503,19 ± 117,65
$\alpha$	Min <sup>-1</sup>	0,0068 ± 0,0020
$T_{1/2\alpha}$	Min	110,49 ± 27,24
$ASC_{0-inf}$	µg/mL.min	709,85 ± 120,64
Cl	mL/min/kg	7,2470 ± 1,20
$V_d$	mL/kg	5463,37 ± 2059,67

DP: desvio padrão;  $K_{el}$ : constante de eliminação,  $T_{1/2}$  ou  $\beta$ : meia-vida de eliminação,  $ASC_{0-inf}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito, Cl: clearance total,  $V_d$ : volume de distribuição calculado pela ASC;  $\alpha$ : constante de distribuição;  $T_{1/2\alpha}$ : meia-vida de distribuição.

Fonte: Autoral.

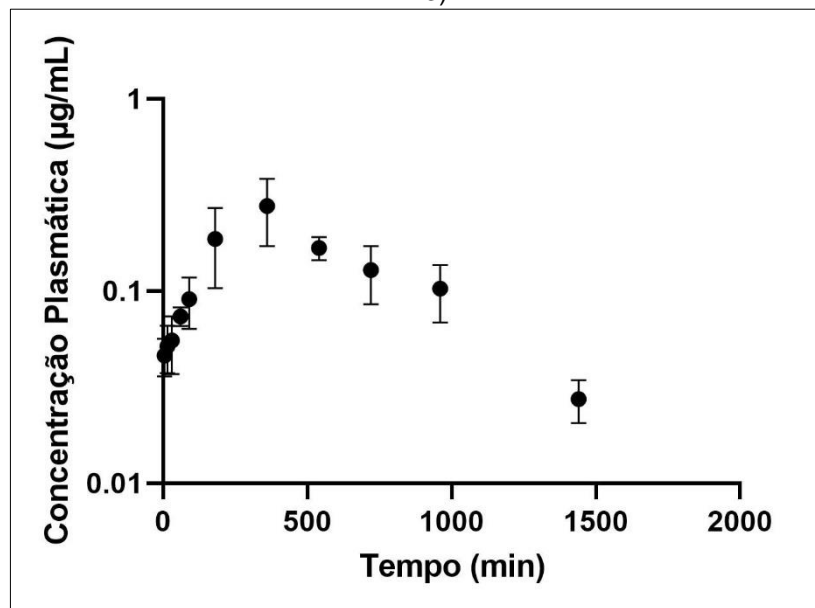
#### 4.9 Administração oral do comprimido de 25 mg de DOX

A administração oral de 25 mg de DOX na forma farmacêutica de comprimido (Vetnil) permitiu a construção de uma curva de concentração plasmática *versus* tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Através da análise gráfica das concentrações plasmáticas médias apresentadas na figura 4, é possível



observar que, na fase de eliminação, existe apenas uma reta, ou seja, uma única velocidade de decaimento das concentrações, indicando que o modelo monocompartimental é o mais adequado para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos deste grupo (grupo II). Na tabela 5, estão apresentados os principais parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo II.

**Figura 4** – Perfil farmacocinético da DOX após administração oral de 25 mg em coelhos (média  $\pm$  DP, n=3)



Fonte: Autoral.

**Tabela 6** - Parâmetros farmacocinéticos da DOX (média  $\pm$  DP) determinados no plasma após administração oral da dose de 25 mg em coelhos (n=3)

Parâmetros	Unidade	Média
$K_{el}$	Min <sup>-1</sup>	0,0020 $\pm$ 0,0002
$T_{1/2}$ ( $\beta$ )	Min	343,33 $\pm$ 30,09
$ASC_{0-inf}$	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	199,45 $\pm$ 33,89
Cl	mL/min/kg	7,0437 $\pm$ 0,00
$V_d$	mL/kg	3489,68 $\pm$ 305,86
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	0,29 $\pm$ 0,08
$T_{m\acute{a}x}$	Min	300 $\pm$ 84,85

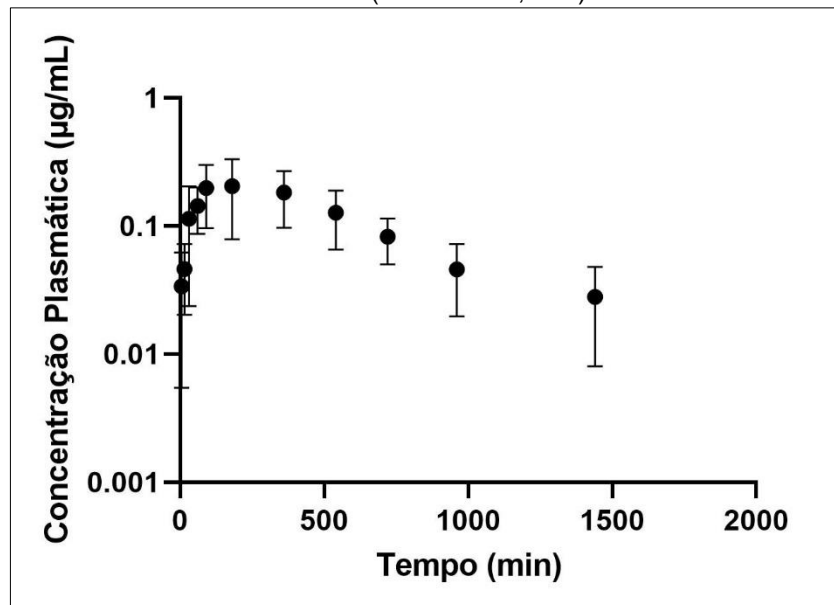
DP: desvio padrão;  $K_{el}$ : constante de eliminação,  $T_{1/2}$  ou  $\beta$ : meia-vida de eliminação,  $ASC_{0-inf}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito, Cl: clearance total,  $V_d$ : volume de distribuição calculado pela ASC;  $C_{m\acute{a}x}$ : concentração plasmática máxima;  $T_{m\acute{a}x}$ : tempo para atingir a  $C_{m\acute{a}x}$ .

Fonte: Autoral.

#### 4.10 Administração oral do comprimido de 50 mg de DOX

A administração oral de 50 mg de DOX na forma farmacêutica de comprimido (Ourofino) permitiu a construção da curva de concentração plasmática versus tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Através da análise gráfica das concentrações plasmáticas médias apresentadas na figura 5, é possível observar que, na fase de eliminação, existe apenas uma reta, ou seja, uma única velocidade de decaimento das concentrações, indicando que o modelo monocompartimental é o mais adequado para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos deste grupo (grupo III). Na tabela 6, estão apresentados os principais parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo III.

**Figura 5** - Perfil farmacocinético da DOX após administração oral da dose de 50 mg (Ourofino) em coelhos (média  $\pm$  DP, n=3)



Fonte: Autoral

**Tabela 7** - Parâmetros farmacocinéticos da DOX (média  $\pm$  DP) determinados no plasma após administração oral da dose de 50 mg (Ourofino) em coelhos (n=3)

Parâmetros	Unidade	Média $\pm$ DP
$K_{el}$	Min <sup>-1</sup>	0,0019 $\pm$ 0,0003
$T_{1/2}$ ( $\beta$ )	Min	373,14 $\pm$ 54,46
$ASC_{0-inf}$	µg/mL.min	159,67 $\pm$ 67,54
Cl	mL/min/kg	7,0437 $\pm$ 0,00
$V_d$	mL/kg	3792,67 $\pm$ 553,59
$C_{m\acute{a}x}$	µg/mL	0,23 $\pm$ 0,09
$T_{m\acute{a}x}$	Min	190 $\pm$ 134,91

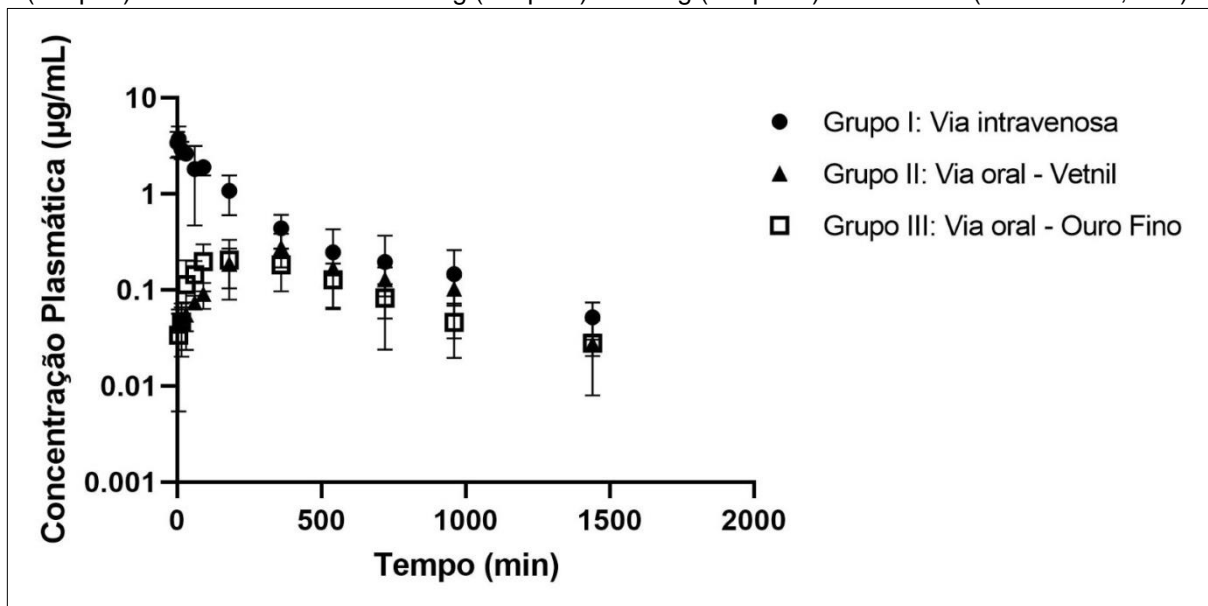
DP: desvio padrão;  $K_{el}$ : constante de eliminação,  $T_{1/2}$  ou  $\beta$ : meia-vida de eliminação,  $ASC_{0-inf}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito, Cl: clearance total,  $V_d$ : volume de distribuição calculado pela ASC;  $C_{m\acute{a}x}$ : concentração plasmática máxima;  $T_{m\acute{a}x}$ : tempo para atingir a  $C_{m\acute{a}x}$ .

Fonte: Autoral.

#### 4.11 Comparação entre os grupos

Na figura 5, está apresentado os perfis farmacocinéticos dos grupos analisados no estudo. Ao analisar graficamente os grupos, nota-se que os grupos II (25 mg DOX - Vetnil) e III (50 mg DOX-Ourofino) tiveram comportamentos semelhantes, apesar de terem recebidos doses diferentes.

**Figura 6** - Perfis farmacocinéticos da DOX após administrações intravenosa na dose de 5 mg/kg (Grupo I) e orais nas doses de 25 mg (Grupo II) e 50 mg (Grupo III) em coelhos (média  $\pm$  DP, n=3)



Fonte: Autoral.

#### 4.12 Clearance plasmático (Cl)

O Cl plasmático indica o volume de plasma do qual o fármaco é completamente eliminado por unidade de tempo pelos processos de metabolismo e excreção. Um dos fatores fisiológicos que influenciam o clearance plasmático é o débito cardíaco (DC) (TOUTAIN; BOUSQUETMÉLOU, 2004a). Considerando que a massa corporal média dos coelhos foi de 3,15 kg, o DC médio corresponde a 144,74 mL/min/kg. Considerando que o fluxo de sangue para fígado e rins é aproximadamente 50% do débito cardíaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a), o valor máximo de Cl do organismo deve ser próximo a 72,37 mL/min/kg. O Cl plasmático médio obtido neste estudo foi, aproximadamente, 10 vezes inferior ao Cl total do organismo, indicando uma eliminação lenta do fármaco.

#### **4.13 Volume de distribuição (Vd)**

O Vd é uma medida que relaciona a quantidade de fármaco existente no organismo à sua concentração no plasma. O valor mínimo de Vd para um fármaco corresponde ao próprio volume do plasma, caso não seja distribuído nos elementos figurados do sangue e no espaço extravascular. Desta forma, para interpretação deste parâmetro é preciso considerar o volume plasmático da espécie em estudo. Para um coelho de massa corpórea de aproximadamente 3 kg, o volume sanguíneo é em torno de 168 mL ou 56 mL/kg. Em todos os grupos o valor de Vd foi muito superior ao volume sanguíneo, o que indica extensa distribuição da DOX nos fluidos e tecidos.

#### **4.14 Meia-vida de eliminação (T<sub>1/2</sub> ou $\beta$ ) e constante de eliminação (K<sub>el</sub>)**

A meia-vida de eliminação (T<sub>1/2</sub>) é o parâmetro farmacocinético mais frequentemente relatado e indica o tempo necessário para que a concentração plasmática diminua pela metade após atingir o equilíbrio de distribuição (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004b). Sua principal utilidade clínica está na seleção do intervalo de dose apropriado em um regime posológico, já que a relação entre T<sub>1/2</sub> e intervalo de dose determina a amplitude das flutuações das concentrações do fármaco no plasma (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004b). Os valores de T<sub>1/2</sub> dos grupos I, II e III médio de 406,55 min (6,78 h) é considerado intermediário.

A constante de eliminação (K<sub>el</sub>) corresponde à inclinação da reta terminal e caracteriza a velocidade de eliminação do fármaco, expressando a eficiência de eliminação por unidade de tempo (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004b). Este parâmetro possui relação direta com a T<sub>1/2</sub>.

#### **4.15 Concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) e tempo para atingir C<sub>máx</sub> (T<sub>máx</sub>)**

A concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) é um parâmetro farmacocinético que indica a exposição máxima do organismo ao fármaco e se relaciona com a intensidade dos efeitos farmacológicos ou toxicológicos (JANG; HARRIS; LAU, 2001). A C<sub>máx</sub> é uma variável influenciada pela dose administrada e pelas constantes de absorção e eliminação. A C<sub>máx</sub> é atingida quando a velocidade de

absorção e de eliminação se igualam e  $T_{m\acute{a}x}$  é o tempo necessário para que este equilíbrio seja atingido (TOUTAIN; BOUSQUETMELÓU, 2004d). O valor médio de  $C_{m\acute{a}x}$  dos grupos orais (VETNIL; OUROFINO) foi de 0,2580  $\mu\text{g/mL}$ , semelhantes, embora um comprimido seja de 25 mg e outro de 50 mg. Este resultado de único ponto já sugere que a biodisponibilidade oral da DOX foi melhorada na formulação de 25 mg. Os valores de  $T_{m\acute{a}x}$  dos grupos orais II e III apresentaram valor médio foi de 245 min (4,08 h).

#### **4.16 Avaliação da biodisponibilidade absoluta (Foral)**

A biodisponibilidade é o parâmetro farmacocinético que descreve a proporção de fármaco absorvida e disponibilizada para a circulação sistêmica quando administrado por vias extravasculares (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004d). A biodisponibilidade pode ser descrita como biodisponibilidade absoluta (Foral) que é a porcentagem da dose administrada que realmente atinge a circulação sistêmica e varia de 0 a 100%. Os valores de Foral encontrados para os grupos orais (VETNIL; OUROFINO) foram 16,19% e 7,42%, respectivamente, apontando que a nova formulação desenvolvida melhora a biodisponibilidade oral da DOX. Observa-se que os perfis das concentrações plasmáticas *versus* tempo foram semelhantes, apesar das diferenças de doses (25 e 50 mg), conforme demonstrado anteriormente na figura 5.

## **5 CONCLUSÃO**

O método bioanalítico desenvolvido e validado apresentou limites de confiança adequados para sua aplicação em estudo piloto de farmacocinética pré-clínica da DOX veiculada em comprimidos de 25 mg desenvolvidos pela indústria veterinária. Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados a partir do estudo com 3 animais por grupo. Os resultados observados sugerem que o comprimido de 25 mg desenvolvido pela indústria veterinária Vetnil melhoram a biodisponibilidade oral da DOX quando comparada com o comprimido de 50 mg da empresa Ourofino. A maior biodisponibilidade proporcionada pela formulação da Vetnil pode implicar em maior segurança e eficácia para o tratamento dos animais.

## 6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, Geysa *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de doxiciclina em plasma humano. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 20, n. 3, p. 193-198, mês/mês. 2007 Disponível em: <https://ojs.unifor.br/RBPS/article/view/1025/2185>. Acesso em: 06 dez. 2022.

AZEVEDO, S. S; et al. Brucelose Canina por *Brucella canis*. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n. 31, p. 39-46, jan./fev. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RDC 27, de 17 de maio de 2012. **Guia para validação de métodos bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 abr 2013.

DAVOUST, B. Canine ehrlichiosis. **Point Vét.**, v. 151, n. 25, p. 43-51, mês/mês. 1993.

DIEHL, K. H. *et al.* A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, mês/mês. 2001.

DRAFT GUIDANCE FOR INDUSTRY. **Bioanalytical Method Validation**. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); September, 2018. <https://www.fda.gov/media/70858/download>.

FREITAS, Gabrielle Coelho.; CARREGARO, Adriano Bonfim. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 43, n. 2, p. 297-304, fev. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/R8CW3p8kCzNgrQ38v3Xxfpk/?lang=pt&format=pdf#:~:tex=Saliencia%2Dse%20assim%20que%20a,antibioticoterapia%20e%20analgesia%20p%C3%B3s%2D%20operat%C3%B3ria>. Acesso em: 06 dez. 2022.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, G. A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 5, p. 382-396,. 2001.

LIMA A. F. M.; LUNA S. P. L. Algumas causas e consequências da superpopulação canina e felina: acaso ou descaso? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 10, n. 1, p. 32–38. 2012.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 53-57. 2004.

MARTINS, Evelin Dos Santos. **Farmacocinética do efavirenz administrado na forma de micropartículas inorgânicas em coelhos**. 2018. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2018. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/152946/martins\\_es\\_me\\_arafcf\\_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/152946/martins_es_me_arafcf_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y). Acesso em: 06 dez. 2022.

PAPICH, M. G. *et al.* **Manual Sanders Terapêutico Veterinário**. 2. ed. São Paulo: MedVet., 2009.

RIOND, J.-L. *et al.* Comparative pharmacokinetics of doxycycline in cats and dogs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 415-424, 1990.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Plasma Clearance. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 27, n. 6, p. 415-25, 2004a.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Plasma terminal half-life. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 27, n. 6, p. 427-39, 2004b.

TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. Bioavailability and its assessment. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 27, n. 6, p. 455-466, 2004d.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 75-99, 1991.



## 7 ANEXO

## I - Certificado CEUA



# CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para determinação de doxiciclina em plasma e avaliação dos parâmetros farmacocinéticos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 05/2019, sob a responsabilidade do pesquisador Igor Edmar Martim Gouvea que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 21 de Maio de 2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho 2021
Espécie/linhagem/raça	Coelho Neozelandeses
Nº de animais	33
Peso/Idade	2,75 Kg - 6 meses
Sexo	Macho
Origem	Anilab – Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA (Paulínia/SP)

Araraquara, 21 de Maio de 2019.



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
Coordenador da CEUA

Fonte: Comissão de ética no uso de animais. Fcfar - Unesp.