UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Aspectos da qualidade da tetraciclina em
preparações farmacêuticas sólidas.
Correlação entre os métodos de dosagem por
cromatografia líquida de alta eficiência e
turbidimétrico**

CÉLIA HITOMI YAMAMOTO

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientadora:
Profa. Titular Terezinha J. Andreoli Pinto**

**São Paulo
1999**

CÉLIA HITOMI YAMAMOTO

**Aspectos da qualidade da tetraciclina em preparações
farmacêuticas sólidas. Correlação entre os métodos de
dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência e
turbidimétrico**

TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Profª Titular TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO
Orientadora e presidente

Profª Titular MARIA INÊS ROCHA M. SANTORO – 1ª Examinadora

Profª Titular ÉRIKA ROSA MARIA KEDOR – 2ª Examinadora

Profª Dra JULIANA M. M. HERNANDEZ – 3ª Examinadora

Prof. Dr. OSWALDO DE FREITAS – 5º Examinador

São Paulo, 26 de março de 1999

Aos meus pais *Kazuko* e *Massanobo*,
A quem devo a existência, o credo, a formação e orientação de vida.

À Profª Titular *Terezinha de Jesus Andreoli Pinto*
Pela amizade, dedicação, seriedade na orientação, constante apoio e pelo exemplo
de coragem e determinação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora representada pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

À Coordenação de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, representada pela Profª Drª *Maria Amélia Barata Ribeiro* e pelas funcionárias *Elizabeth Claro S. Paiva*, *Benedita E. Santo de Oliveira*, *Elaine M. Ychico* e *Jorge de Lima*.

À Profª Titular *Terezinha de Jesus Andreoli Pinto*, Coordenadora do Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CONFAR) pelo empenho e determinação em propiciar a disponibilidade do suporte técnico e material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Profª *Miriam Aparecida Pinto Vilela*, Diretora da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora no período de 1994 a 1998, pelo apoio, orientação, incentivo e grande empenho na transposição de inúmeras dificuldades, que foram fundamentais durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. *Lúcio Guedes Barra*, Diretor da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo incentivo e interesse demonstrado.

Ao Departamento Farmacêutico da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Aos laboratórios farmacêuticos BRISTOL-MYERS-SQUIBB do BRASIL SA e PFIZER LTDA pela doação das substâncias químicas de referência.

À Profª Drª *Lígia Maria Moreira Campos*, responsável pela disciplina de Controle de Qualidade Físico-Químico do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela orientação relacionada com a aplicação do método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Às Profªs Drªs. *Mitsuko Taba Ohara* e *Telma Mary Sakuda* pela amizade e contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Profs. Titular *João Fernandes Magalhães* e Dr. *Jorge Luiz S. Martins* pelo constante estímulo e interesse demonstrado.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CONFAR), representados pelas farmacêuticas *Rosa Noriko Yamamoto* e *Janice de Azevedo Campos*.

Aos colegas *Irene Satiko Kikuchi*, *Maria Silvana Alves*, *Aílson da Luz André de Araújo*, *Maria da Penha Henriques do Amaral*, *Vaneida Maria Meurer*, *Lourdes Kiyomi Oshiro* e *José de Jesus Ribeiro de Pinho* pela inestimável amizade e apoio.

Ao funcionário *José de Souza Sobrinho* do laboratório da disciplina de Controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À bibliotecária *Adriana Barreiros* pela orientação e revisão das referências bibliográficas.

A todos que de diferentes maneiras apoiaram e colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Considerações sobre a tetraciclina.....	6
2.1.1. Histórico.....	6
2.1.2 Síntese.....	6
2.1.3. Nomenclatura.....	7
2.1.4. Descrição.....	8
2.1.4.1. Cloridrato de tetraciclina.....	8
2.1.4.2. Fosfato de tetraciclina.....	8
2.1.4.3. Cloridrato de oxitetraciclina.....	9
2.1.4.4. Cloridrato de doxiciclina.....	9
2.1.5. Farmacologia e uso terapêutico das tetraciclina.....	10
2.2. Estabilidade.....	13
2.3. Dissolução de fármacos a partir de preparações farmacêuticas sólidas.....	17
2.3.1. Dissolução de cápsulas e comprimidos.....	18
2.3.2.. Dissolução de preparações farmacêuticas contendo tetraciclina.....	24
2.3.3. Metodologias desenvolvidas para o ensaio de dissolução in vitro.....	25
2.4. Considerações gerais sobre os fundamentos da validação.....	29
2.4.1. Validação do método analítico.....	30
2.4.1.1. Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	34
2.5. Determinação quantitativa de antibióticos.....	37
2.5.1. Métodos microbiológicos.....	37
2.5.1.1. Método de diluição seriada.....	38
2.5.1.2. Método turbidimétrico.....	42
2.5.1.3. Considerações gerais sobre os métodos de difusão em gel.....	48
2.6. Determinação quantitativa das tetraciclina.....	57
2.6.1. Métodos microbiológicos desenvolvidos.....	57
2.6.2. Métodos microbiológicos oficiais.....	60
2.6.2.1. Cloridrato e fosfato de tetraciclina.....	60
2.6.2.2. Cloridrato de doxiciclina.....	64
2.6.2.3. Cloridrato de oxitetraciclina.....	66
2.6.3. Determinação da tetraciclina através de métodos físico-químico cromatográficos.....	67
3. OBJETIVOS.....	86
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.1. MATERIAL.....	89
4.1.1. Substâncias químicas de referência.....	89
4.1.2. Amostras de especialidades farmacêuticas.....	90
4.1.3. Microrganismo-teste como revelador biológico.....	90
4.1.4. Equipamentos e material auxiliar.....	90
4.2. MÉTODOS.....	91
4.2.1. Amostragem.....	91
4.2.2. Determinação do peso médio das cápsulas de gelatina dura e drágeas.....	91
4.2.3. Descrição do material de embalagem primária.....	92
4.2.4. Aparência das amostras.....	92

4.2.5. Ensaio <i>in vitro</i> de dissolução dos antibióticos.....	92
4.2.5.1. Preparação das soluções-teste das substâncias químicas de referência.....	92
4.2.5.2. Preparação das soluções-teste das amostras.....	93
4.2.5.3. Condições experimentais do ensaio.....	93
4.2.6. Método de doseamento microbiológico turbidimétrico.....	94
4.2.6.1. Preparação dos meios de cultura.....	94
4.2.6.2. Padronização da suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737.....	94
4.2.6.3. Preparação do meio de cultura inoculado com <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737.....	95
4.2.6.4. Preparação das soluções-teste de antibióticos.....	95
4.2.6.5. Preparação das soluções-teste da amostra.....	96
4.2.6.6. Procedimento para o ensaio.....	96
4.2.7. Estudo do método de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de tetraciclina em amostras comerciais na forma de cápsulas.....	97
4.2.7.1. Preparação dos diluentes e soluções-teste.....	97
4.2.7.1.1. Preparação do solvente diluente (S ₁) de acordo com o procedimento da Farmacopéia Americana.....	98
4.2.7.1.2. Preparação da solução-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina de 1000 µg/mL de acordo com o procedimento da Farmacopéia Britânica.....	98
4.2.7.1.3. Preparação da solução-teste da substância química de referência de cloridrato 4-epianidrotetraciclina de acordo com o procedimento da Farmacopéia Americana.....	98
4.2.7.1.4. Preparação das soluções-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina de acordo com o procedimento da Farmacopéia Americana.....	99
4.2.7.1.5. Preparação das soluções-teste da amostra.....	99
4.2.7.1.6. Preparação da fase móvel segundo procedimento da Farmacopéia Britânica de 1993 (BPI).....	100
4.2.7.1.7. Preparação da fase móvel segundo procedimento da Farmacopéia Britânica de 1993 (BPII).....	100
4.2.7.1.8. Preparação da fase móvel segundo procedimento da Farmacopéia Americana 23ª edição.....	100
4.2.7.1.9. Preparação da fase móvel modificada.....	101
4.2.7.2. Estudo comparativo dos métodos da Farmacopéia Britânica e Americana.....	101
4.2.7.2.1. Estudo preliminar.....	101
4.2.7.2.1.1. Método da Farmacopéia Britânica.....	101
4.2.7.2.1.2. Método da Farmacopéia Americana.....	102
4.2.7.3. Estudo de adequação dos parâmetros do método cromatográfico de fase reversa para a determinação da tetraciclina empregando o método da Farmacopéia Americana.....	102
4.2.7.4. Procedimento do ensaio para o estudo do método para a determinação do cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina.....	106
4.2.7.5. Validação da metodologia.....	106
4.2.7.5.1. Construção da curva de calibração.....	106
4.2.7.5.2. Estudo da reprodutibilidade de resposta quando empregados diferentes números de lote da coluna SYMMETRY™.....	107
4.2.7.5.3. Padronização das soluções-teste do padrão e amostra empregados na determinação quantitativa do cloridrato de tetraciclina em amostras comerciais.....	107
4.2.7.5.3.1. Determinação quantitativa do princípio ativo, empregando a curva padrão com cinco concentrações e uma solução-teste da amostra.....	108

4.2.7.5.3.2. Determinação quantitativa do cloridrato de tetraciclina em amostra de concentração única frente a diferentes soluções-teste do padrão.....	108
4.2.7.5.4. Determinação do limite de detecção para o cloridrato de tetraciclina.....	109
4.2.7.5.5. Estudo da repetibilidade do ensaio de determinação quantitativa da tetraciclina, aplicado às amostras comerciais nas condições experimentais estabelecidas.....	110
4.2.7.5.6. Teste de recuperação.....	110
4.2.7.6. Determinação da adequação do método cromatográfico para o doseamento de tetraciclina para a metodologia aplicada.....	111
4.2.7.6.1. Determinação da resolução (R) entre os picos.....	111
4.2.7.6.2. Determinação da seletividade ou fator de separação (α) entre a tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina.....	112
4.2.7.6.3. Determinação da assimetria do pico (T).....	113
4.2.7.6.4. Estudo da alteração da eficiência da coluna após frequentes injeções das soluções-teste e fase móvel.....	114
4.2.7.7. Comparação das duas metodologias.....	115
4.2.8. Doseamento do teor de cloridrato e fosfato de tetraciclina em preparações farmacêuticas comerciais na forma de cápsulas de 500 mg empregando método da Farmacopéia Americana.....	115
4.2.9. Estudo para a determinação de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina.....	116
4.2.9.1. Construção da curva de calibração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina.....	116
4.2.9.2. Limite de detecção do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina.....	117
4.2.10. Quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina na substância química de referência de cloridrato de tetraciclina.....	117
4.2.11. Dosagem do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina em amostras comerciais.....	118
4.2.12. Análise estatística.....	118
4.2.12.1. Procedimento para o estudo comparativo dos métodos de CLAE e microbiológico aplicado à cápsula de de tetraciclina de 500 mg.....	118
4.2.12.2. Determinação da precisão do método.....	119
4.2.12.3. Averiguação da influência do erro analítico na aprovação ou reprovação do lote.....	119
4.2.12.4. Comparação dos resultados de teor obtidos através dos métodos cromatográfico e microbiológico empregando o teste-t.....	119
4.2.12.5. Comparação dos métodos cromatográfico e microbiológico pelo coeficiente de correlação de Pearson.....	119
4.2.12.6. Determinação da porcentagem de resultados fora do limite de especificação.....	120
5. RESULTADOS.....	121
5.1. Características da aparência e do material de embalagem.....	122
5.2. Determinação do peso médio das preparações farmacêuticas.....	124
5.3. Ensaio de dissolução <i>in vitro</i>	124
5.4. Estudo da determinação do método CLAE para a quantificação da tetraciclina em amostra comerciais na forma de cápsula.....	129
5.4.1. Comparação entre os métodos descritos na Farmacopéia Americana e Britânica.....	129
5.5. Validação do método CLAE descrito na Farmacopéia Americana.....	137
5.5.1. Construção da curva de calibração do cloridrato de tetraciclina.....	137

5.2.2. Estudo da reprodutibilidade de resposta quando empregados diferentes números de lote da coluna SYMMETRY™	144
5.5.3. Estudo da padronização do número de soluções do padrão e amostra para a aplicação do ensaio cromatográfico	145
5.5.4. Construção da curva de calibração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina	147
5.5.5. Determinação do limite de detecção do cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina	151
5.6. Determinação do teor de cloridrato e fosfato de tetraciclina em preparações farmacêuticas comerciais	154
5.7. Avaliação da precisão do método CLAE de determinação quantitativa da tetraciclina em amostras comerciais	156
5.8. Teste de recuperação empregando amostra comercial de cápsula de tetraciclina	157
5.9. Quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina	157
5.9.1. Quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina presente no padrão de cloridrato de tetraciclina com potência de 994 µg/mg	157
5.9.2. Dosagem do cloridrato do 4-epianidrotetraciclina em amostras comerciais	165
5.10. Estudo da adequação do método CLAE para as condições estabelecidas	165
5.11. Determinação da resolução dos picos de 4-epianidrotetraciclina e do desconhecido eluído imediatamente antes	165
5.12. Determinação da resolução dos picos (R) da tetraciclina e da 4-epianidrotetraciclina e seletividade ou fator de separação (α) a partir de uma solução-teste de mistura dos 2 padrões segundo procedimento da Farmacopéia Americana ²⁰⁸ , modificado	169
5.13. Determinação da assimetria do pico	172
5.14. Estudo da alteração da eficiência (N) da coluna após várias injeções das soluções-testes e fase móvel	173
5.15. Recursos do programa MILLENIUM™ para análise dos cromatogramas	174
5.16. Análise estatística	182
6. DISCUSSÃO	192
7. CONCLUSÕES	219
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	222
9. RESUMO	246
10. SUMMARY	248

ÍNDICE de FIGURAS, QUADRO E TABELAS

FIGURA 1.....	7
FIGURA 2.....	130
FIGURA 3.....	131
FIGURA 4.....	140
FIGURA 5.....	141
FIGURA 6.....	142
FIGURA 7.....	143
FIGURA 8.....	144
FIGURA 9.....	149
FIGURA 10.....	150
FIGURA 11.....	152
FIGURA 12.....	153
FIGURA 13.....	168
FIGURA 14.....	171
FIGURA 15.....	175
FIGURA 16.....	176
FIGURA 17.....	177
FIGURA 18.....	178
FIGURA 19.....	179
FIGURA 20.....	180
FIGURA 21.....	181
FIGURA 22.....	183
FIGURA 23.....	184
FIGURA 24.....	185
FIGURA 25.....	185
FIGURA 26.....	186
FIGURA 27.....	187
FIGURA 28.....	188
FIGURA 29.....	190
QUADRO 1.....	4
TABELA 1.....	103
TABELA 2.....	104
TABELA 3.....	105
TABELA 4.....	111
TABELA 5.....	122
TABELA 6.....	123
TABELA 7.....	125
TABELA 8.....	126
TABELA 9.....	126
TABELA 10.....	127
TABELA 11.....	128
TABELA 12.....	128
TABELA 13.....	132
TABELA 14.....	133
TABELA 15.....	134

TABELA 16.....	135
TABELA 17.....	136
TABELA 18.....	138
TABELA 19.....	139
TABELA 20.....	145
TABELA 21.....	146
TABELA 22.....	147
TABELA 23.....	148
TABELA 24.....	154
TABELA 25.....	155
TABELA 26.....	156
TABELA 27.....	158
TABELA 28.....	159
TABELA 29.....	160
TABELA 30.....	161
TABELA 31.....	162
TABELA 32.....	163
TABELA 33.....	164
TABELA 34.....	166
TABELA 35.....	167
TABELA 36.....	169
TABELA 37.....	170
TABELA 38.....	172
TABELA 39.....	173
TABELA 40.....	182
TABELA 41.....	189

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos constituem-se em classe de fármacos de importância fundamental para a saúde pública, sendo extensivamente comercializados no Brasil. Incluído nesta classificação está o grupo das tetraciclina, empregadas tanto na terapia humana como veterinária. São consideradas antibióticos de amplo espectro, produzidas por via fermentativa e semi-sintética. Constituem fármacos de escolha no tratamento de infecções por *Rickettsia*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*. Indicadas com frequência no tratamento auxiliar da cólera e diarreia e, topicamente no tratamento de acne e rosácea.

Tendo como referência o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF)⁴⁵, as preparações farmacêuticas comerciais contendo tetraciclina são produzidas por diversos laboratórios e se apresentam, em sua maioria, na forma de cápsula, sendo substância ativa única.

Para que os medicamentos produzam a atividade terapêutica desejada, procedimentos adequados relacionados com a produção, controle, armazenamento e distribuição devem ser implantados.

Assim, dentro deste contexto, fatos como falhas do sistema de qualidade na indústria farmacêutica ou fiscalização inadequada dos produtos colocados no mercado, podem tornar possível o consumo de medicamentos com ação terapêutica comprometida ou totalmente ausente ou que induzam a efeitos nocivos inesperados. Assim, no sentido preventivo, é imprescindível estabelecer políticas e procedimentos para a garantia da qualidade do produto, envolvendo todos os setores direta ou indiretamente relacionados com a produção. É ainda imperativa a prevalência de Sistema de Vigilância Sanitária atuante e consciente, com ações que balizem no sentido de uma Política Nacional de Saúde abrangendo os medicamentos.

As formas farmacêuticas obrigatoriamente devem contemplar entre outras características, uma formulação que permita a liberação da substância ativa na quantidade adequada para o meio onde será absorvido.

No que se refere a quantificação do princípio ativo, métodos físico-químicos ou microbiológicos podem ser empregados na determinação de antibióticos, sendo recomendados em compêndios oficiais. A escolha da metodologia depende principalmente das condições técnicas disponíveis e da aplicabilidade à determinada formulação.

De um modo geral, os métodos microbiológicos apresentam inconveniência em relação aos métodos físico-químicos de um modo geral, pois envolvem um período de incubação relativamente longo retardando a obtenção do resultado. Mas, por outro lado, apresentam como mérito permitir a determinação da atividade biológica do antibiótico.

Dentre os métodos físico-químicos conhecidos, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta, além da rapidez, características adicionais que justificam a sua crescente aplicação nos laboratórios analíticos. Contudo, mesmo quando oficialmente estabelecido, o método cromatográfico exige modificações que podem influir na confiabilidade dos resultados obtidos, tornando necessárias novas validações e, inclusive, estudos de equivalência com o método microbiológico.

QUADRO 1 Laboratórios produtores de equivalentes farmacêuticos, segundo o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF)⁴⁵

Equivalente farmacêutico			
Cápsula de cloridrato de tetraciclina 500 mg	Cápsula de fosfato de tetraciclina 500 mg	Cápsula de cloridrato de oxitetraciclina 500 mg	Drágea de cloridrato de doxiciclina 100 mg
<ul style="list-style-type: none"> • SANVAL • FARMOQUÍMICA • BRASMÉDICA • BUNKER • DOVALE • ELOFAR • CAZI • CALBOA • CIBRAN • EUROFARMA • HERALD'S DO BRASIL • INFABRA • NEOQUÍMICA • NEOVITA • WINDSON • PROPOTTI • DELTA • GILTON • MEDIC • LUPER • ENDOTERÁPICA • USMED 	<ul style="list-style-type: none"> • BRISTOL-MYERS-SQUIBB • ARISTON • FARIA 	<ul style="list-style-type: none"> • PFIZER 	<ul style="list-style-type: none"> • PFIZER • UNIÃO QUÍMICA

Equivalentes farmacêuticos adquiridos no mercado e não relacionados no DEF⁴⁵:
DINAFARMA, EMS, SINTERÁPICO, MEDQUÍMICA, ORTOQUÍMICA, INAF.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações sobre a tetraciclina

As tetraciclinas são ativas contra um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo amplamente empregadas na medicina humana e veterinária, no armazenamento de sementes e na indústria de alimentos como aditivos. Nove tetraciclinas estão disponíveis no comércio, dentre as quais a clortetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, rolitetraciclina e tetraciclina sendo permitidas para uso humano¹⁵⁸.

2.1.1. Histórico

O primeiro antibiótico dos derivados da tetraciclina a ser conhecido foi a clortetraciclina, obtida em 1948 após triagem sistemática de amostras de solo colhidas para pesquisa de microrganismos produtores de antibióticos. Após a comprovação da atividade antimicrobiana através de estudos *in vitro* e *in vivo*, as tetraciclinas passaram a ser amplamente empregadas a partir da década de 50²⁰⁰.

2.1.2 Síntese

A tetraciclina foi obtida inicialmente por via fermentativa, sendo a clortetraciclina produzida pelo *Streptomyces aureofaciens*^{144,200}. A tetraciclina é produzida por espécies de *Streptomyces* inoculadas em meio nutriente adequado⁹⁰ e por via semi-sintética através da remoção do cloro da clortetraciclina por hidrogenação^{90,200}. A oxitetraciclina é produzida entre outras cepas, por *Streptomyces rimosus*^{143,199} em meio nutriente adequado. A doxiciclina é obtida através da hidrogenação catalítica de uma suspensão ou dissolução de outro derivado, a metaciclina, em solvente inerte, como metanol, seguido de hidrogenação sob a influência de metais nobres (ródio e paládio), o que conduz

inicialmente a uma mistura de epímeros posteriormente separados por processo cromatográfico. O cloridrato de doxiciclina é obtido a partir de cristalização de uma solução em etanol contendo ácido clorídrico⁹⁰.

2.1.3. Nomenclatura

O núcleo naftaceno da tetraciclina deu origem à sua denominação^{5,200}.

Fármaco	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tetraciclina	H	CH ₃	H	OH	H
Oxitetraciclina	OH	CH ₃	H	OH	H
Doxiciclina	OH	CH ₃	H	H	H
Clortetraciclina	H	CH ₃	Cl	OH	H

FIGURA 1 - Fórmulas estruturais das tetraciclina

Os anéis são identificados pelas letras de A a D da direita para a esquerda, e a numeração, nesta figura, inicia-se na parte inferior do anel A^{5,65,96,125,193,211}.

2.1.4. Descrição

2.1.4.1. Cloridrato de tetraciclina

Tem como fórmula molecular $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ e o seu peso molecular é 480,90, sendo a potência de não menos que 900 μg de cloridrato de tetraciclina por mg^{90,208}. A tetraciclina é um pó cristalino amarelo^{58,90,109,144} e inodoro^{90,144,109}. É moderadamente higroscópico^{90,144} e estável quando em contato com o ar. No entanto, quando exposta a luz intensa e umidade, ocorre o escurecimento do pó⁹⁰. Em pH abaixo de 2 ou em soluções de hidróxidos alcalinos, a tetraciclina é rapidamente degradada. O pH da solução a 1 % está entre 1,8 a 2,8^{90,208}. Para a solução injetável reconstituída a especificação do pH é de 2 a 3^{30,208}.

Menos solúvel em água que a oxitetraciclina, 1 g do cloridrato de tetraciclina dissolve em 10 mL desta e em cerca de 100 mL de álcool^{58,90,113,144,149}. A solução aquosa se turva quando em repouso por determinado tempo, devido à formação da tetraciclina base por hidrólise^{58,90,143}. É praticamente insolúvel em éter^{58,90,113,144} e clorofórmio^{58,90,144}. Muito pouco solúvel em acetona^{58,144} e solúvel em metanol¹⁴⁹.

2.1.4.2. Fosfato de tetraciclina

Tem fórmula molecular $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HPO_3 \cdot \frac{1}{2} NaPO_3$ e peso molecular de 544,80. Sua potência é de não menos que 750 μg de cloridrato de tetraciclina por mg, calculada na base anidra. É um pó amarelo e inodoro¹⁴⁹. A suspensão aquosa a 1 % tem pH de 2 a 4¹⁴⁴. A solução injetável reconstituída possui pH de 2 a 3²⁰⁸. Apresenta solubilidade em água de 1 g para 31 mL, e de 1 g para 130 mL de álcool etílico. É levemente solúvel em água¹⁴⁹, metanol e muito pouco solúvel em acetona¹⁴⁴.

2.1. 4.3. Cloridrato de oxitetraciclina

O cloridrato de oxitetraciclina possui fórmula molecular de $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$ e peso molecular de 496,90. A potência calculada na base anidra é de mais de 835 μg de oxitetraciclina por $mg^{90,208}$.

Consiste de um pó amarelo, inodoro, higroscópico^{58,90,113,144} e de sabor amargo^{90,113}, apresentando-se na forma de cristais^{58,90,113}. Decompõe-se a 180 °C. Quando exposto a intensa luz solar ou a temperatura superior a 90 °C e umidade ocorre o escurecimento do pó, sem perda significativa da potência. Em pH abaixo de 2 a solução de oxitetraciclina perde rapidamente a potência, sendo também degradada em soluções de hidróxidos alcalinas^{90,144}. O pH de solução a 1 % está na faixa de 1 a 3⁹⁰ ou de 2,3 a 2,9³⁰, enquanto que a Farmacopéia Americana²⁰⁸ especifica pH entre 2 a 3 para soluções em geral e de 1,8 a 2,8 para a solução injetável de 2,5 %. O cloridrato de oxitetraciclina é muito solúvel em água^{58,90,113,144,149}, sendo que 1 g dissolve em 2 mL⁹⁰ tornando a solução turva ou opaca devido à formação de tetraciclina base^{58,90,144,149}. A solubilização em álcool etílico é baixa^{90,144}, sendo de 1g para 35 mL⁹⁰. É pouco solúvel em álcool etílico anidro e insolúvel em éter e clorofórmio^{90,113,144}.

2.1.4.4. Cloridrato de doxiciclina

A sua fórmula molecular é $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 1/2 C_2H_6H_2O$ e seu peso molecular 512,9. A sua potência situa-se na faixa de 800 a 920 μg de doxiciclina por $mg^{90,208}$ ou de 880 à menos que 940 μg por mg , sendo na base anidra e livre de substâncias alcoólicas³⁰. O hclato de doxiciclina, formado pela cristalização do cloridrato de doxiciclina com 0,5 mol de água e 0,5 mol de etanol, é um pó cristalino de cor amarela^{58,90,113,144}, inodoro e de sabor amargo⁹⁰. Solúvel em água e soluções de hidróxidos e carbonatos alcalinos, é levemente solúvel em álcool etílico e praticamente insolúvel em éter e clorofórmio^{58,90,113,144,208}. É muito solúvel em metanol^{58,113,144}. Em solução aquosa de 1 % o pH medido é de 2 a 3,

enquanto que a solução injetável apresenta pH 1,8 a 3,3²⁰⁸. Sofre carbonização a 201 °C, sem fundir¹⁴⁹.

2.1.5. Farmacologia e uso terapêutico das tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro, bacteriostáticos^{90,144,200}. O mecanismo de ação destes antibióticos envolve a ligação da tetraciclina com a subunidade 30-S do ribossomo, evitando a ligação do RNA-t, inibindo a síntese protéica e, conseqüentemente, o crescimento celular^{90,200}.

Quando empregadas isoladamente constituem-se em fármacos de escolha no tratamento da cólera, febre recorrente, granuloma inguinal e infecções causadas por várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias e, em particular, por micobactérias, micoplasmas, treponemas, leptospiros, riquetsias, actinomicetos, coxielas, clamídias, e espiroquetas e, ainda, por protozoários como plasmódios.

Juntamente com a eritromicina, a tetraciclina é também fármaco de escolha no tratamento contra *Mycoplasma pneumoniae*^{90,144,200}, resultando em menor duração da febre, da tosse, do mal estar, da fadiga, dos estertores pulmonares e das alterações radiológicas dos pulmões. A doxiciclina é duas vezes mais potente que a tetraciclina em relação às bactérias Gram-positivas, sendo que para a *Streptococcus viridans* é dez vezes mais ativa atuando. ainda, sobre o *Enterococcus faecalis* resistente à tetraciclina, embora a sua atividade contra bactérias Gram-negativas seja duas vezes menor que a da tetraciclina. É freqüentemente empregada no tratamento da “diarréia dos viajantes”, causada por vários microrganismos⁹⁰. No estudo de correlação realizado por MALMBORG¹⁴³, foi comprovado que a doxiciclina poderia substituir com vantagem o seu sal, que apresenta efeito ulcerativo na mucosa do estômago, quando o tratamento se dá por via oral, por serem farmacologicamente equivalentes.

Em associação com outros fármacos a tetraciclina é empregada para tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas pseudomallei*. No caso da

necessidade de tratamento rápido, a associação da tetraciclina com a penicilina não é recomendada devido à ação antagonista dos dois fármacos¹⁴⁴.

Topicamente a tetraciclina é muito utilizada para tratamento da acne^{90,144}.

Em relação ao meningococo, somente a minociclina apresenta atividade⁹⁰.

No tratamento da malária causada por *Plasmodium falciparum* resistente à quinina, é empregada uma associação de quinina com tetraciclina^{90,144}.

Por causar irritação local e alteração da flora intestinal, a tetraciclina apresenta, como reação adversa quando do uso oral, a toxicidade intestinal. Outros efeitos como azia, dificuldade epigástrica, náusea, vômito, diarreia, raramente ocorre ulceração esofageal^{90,144}, além de boca seca, descoloração da língua, estomatite e disfagia¹⁴⁴. Devido ao seu amplo espectro de ação, alterações pronunciadas na flora intestinal podem induzir a multiplicação exagerada dos microrganismos causando superinfecções^{90,144,200}. Dentre estas, a candidíase é a mais comum^{90,144}. Assim, a vulvovaginite¹⁴⁴ por *Candida* e aquelas causadas por estafilococos, enterococos, *Proteus*, *Pseudomonas* ou *Clostridium difficile* podem aparecer. Quando decorrente de estafilococos pode ser fatal e no intestino, ocasiona principalmente a diarreia⁹⁰ devido à resistência de coliformes como *Proteus* e de *Pseudomonas sp*¹⁴⁴. No entanto, em pacientes debilitados ou com baixo número de monília no intestino, as leveduras podem passar para a corrente sanguínea e disseminar pelo corpo⁹⁰.

Reações de hipersensibilidade como urticária, asma ou edema facial ocorrem de maneira incomum^{90,144}.

As preparações de tetraciclina envelhecidas ou fora do prazo de validade, com indícios de deterioração, podem causar hepatotoxicidade severa^{90,144,200}, com reações reversíveis que caracterizam a síndrome do tipo *Falconi*, como poliúria, polidipsia com náusea, glicosúria, aminoacidúria, hipofosfatemia, hipocalcemia, acidose e proteinúria sendo particularmente atribuídas à 4-epianidrotetraciclina, um produto de degradação do antibiótico¹⁴⁴.

As tetraciclina são depositadas nos dentes durante sua formação causando pigmentação irreversível. Podem provocar deficiência na formação do tecido ósseo devido à complexação com sais presentes no mesmo e fixação em

proteínas de sua matriz. Portanto, a administração da tetraciclina deve ser evitada em crianças com mais de seis anos, idade em que os dentes permanentes ainda não se desenvolveram. Em relação à oxitetraciclina, a pigmentação nos dentes é menos pronunciada mas os sintomas gastrointestinais são mais severos^{90,144}. Durante a gravidez o seu uso é contra-indicado.

A administração de tetraciclina por via intravenosa deve ser evitada, a menos que a doença seja severa a ponto de exigir dosagem terapêutica não tolerada por via oral. Doses administradas a adultos por via intravenosa, quando acima de 1g por dia, podem decorrer em óbito do paciente⁹⁰. Na injeção intramuscular, ocorre dor local muito intensa, devendo ser incorporado um anestésico local para possibilitar a aplicação

A absorção gastrointestinal pode ser de 58 a 100 %⁹⁰ ou 60 a 80 %¹⁴⁴. Em função da complexação das tetraciclinas com íons metálicos divalentes e trivalentes, a absorção é muito prejudicada quando administrada simultaneamente com outros medicamentos como anti-ácidos que contêm cálcio, magnésio e alumínio. Preparações contendo ferro bem como leite e outros alimentos consumidos no dia a dia devem ser evitados, ou os horários de administração dos mesmos devem diferir^{90,144}. O fosfato aumenta a absorção da tetraciclina, provavelmente devido à complexação com o cálcio⁹⁰.

Todas as tetraciclinas se ligam às proteínas do plasma na faixa de 35 a 91 %. A sua meia vida é de no máximo 17 horas em indivíduos normais, mas pode ser de 12 a 108 horas quando há falha renal⁹⁰. Em relação aos derivados, a meia vida para clortetraciclina é de cerca de 6 horas, para oxitetraciclina de aproximadamente 9 horas, para tetraciclina cerca de 8 horas e para doxiciclina de 16 a 18 horas¹⁴⁴. A excreção renal^{90,144} e fecal¹⁴⁴ são as principais vias de eliminação, exceto para a minociclina que é excretada na bile e a doxiciclina que é metabolizada ou excretada em mais de 50 % no cólon. A tetraciclina penetra facilmente nos tecidos e fluídos corpóreos, mas sua passagem para o fluído cerebroespinal é baixa quando administrada por via oral. Por questão de toxicidade, a concentração sérica não deve ultrapassar a 15 µg/mL. O pico de concentração plasmática ocorre de uma a três horas após a ingestão. Esta concentração plasmática depende do grau de absorção. Administração oral de

500 mg a intervalos de seis horas geralmente produz concentração de 4 a 5 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que para a doxiciclina a dose de 200 mg produz pico de concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ ^{90,144}.

Quantidades reduzidas de tetraciclina pode ocorrer na saliva, fluídos oculares e pulmões. No leite materno, a concentração da tetraciclina é 60 % maior em relação à do plasma¹⁴⁴.

As incompatibilidades com outros fármacos são numerosas, podendo ocorrer com antibióticos como sulfato de amicacina, benzilpenicilina, carbenicilina sódica, cefalotina sódica, ampicilina sódica, polimixina B¹⁴⁴, cloranfenicol, succinato de sódio, sais de eritromicina e outros. Fármacos como sulfonamida, isoniazida^{90,144}, clorotiazida, clorpromazina, heparina sódica, hidrocortizona, aminofilina e vitaminas do complexo B não devem ser administrados em conjunto com a tetraciclina¹⁴⁴.

2.3. Estabilidade

O estudo da estabilidade da tetraciclina permite conhecer os produtos de degradação e os fatores que podem influenciá-la. Este estudo é importante, e deve ser desenvolvido em condições analíticas que permitam obtenção de resultados confiáveis. As tetraciclinas são conhecidas por possuírem baixa estabilidade em solução aquosa. Particularmente, condições anormais de armazenamento e formulação inadequada do produto são referidas em vários trabalhos como as principais causas para desencadear a formação de produtos de degradação. Sob condições drásticas de calor, pH e umidade a tetraciclina sofre epimerização, reação de primeira ordem, reversível, no C₄, originando mistura de 4-epitetraciclina, anidrotetraciclina, 4-epianidrotetraciclina e tetraciclina^{5,90,103,144,182,193,211,219}. Dentre estas substâncias, a 4-epitetraciclina e 4-epianidrotetraciclina possuem pouca atividade biológica, da ordem de 2 a 5 % da atividade da tetraciclina¹²³. Segundo SOKOLOSKI e colaboradores¹⁹³, a 4-epitetraciclina pode sofrer uma reação de desidratação levando à formação da 4-epianidrotetraciclina, um produto de degradação que apresenta nefrotoxicidade,

mesmo em pequenas concentrações. A desidratação, uma reação irreversível, pode também ocorrer diretamente a partir da tetraciclina para formar a anidrotetraciclina que, por sua vez, sofre epimerização dando a 4-epianidrotetraciclina. Foi constatado que a velocidade de epimerização é maior para a anidrotetraciclina que para a tetraciclina. Outra substância presente em preparações farmacêuticas como impureza de síntese é a clortetraciclina¹⁵⁸.

As reações de degradação que ocorrem são^{128,193,219}.

Estudo da cinética das reações de degradação em diferentes condições de pH sob temperatura de cerca de 60 °C foi realizado por VEJ-HANSEN e colaboradores²¹¹. As determinações quantitativas das substâncias foram feitas empregando-se os métodos espectrofotométrico UV e CLAE. Os autores constataram que a reação de epimerização da tetraciclina formando a 4-epitetraciclina ocorria de forma reversível, atingindo o equilíbrio quando nas concentrações de 62 % para tetraciclina e para a do epímero de 38 %. Verificaram, ainda, que a cinética de degradação seria dependente também do pH, sendo que a cada intervalo de pH ocorria determinada reação de degradação em diferentes níveis. Estas reações em soluções ácidas e alcalinas produziram, respectivamente, anidrotetraciclina e a isotetraciclina, enquanto que a reação de epimerização que levou à formação da 4-epitetraciclina foi predominante em pH entre 2,5 a 6. A estabilidade máxima ocorreu em pH próximo de 3, sendo que a pH entre 3,5 e 10 a taxa de degradação se manteve estável quando na ausência de tampão. No entanto, quando na presença de soluções-tampão fosfato, borato e acetato, forte catálise ácido-base foi observada. Da mesma forma, REMMERS e colaboradores¹⁸², em 1963, observaram que a presença de íons fosfato e citrato

promoviam aumento na velocidade de epimerização, sendo 70 vezes maior em solução-tampão destes íons em pH 4 e temperatura de 23 °C, quando comparado em água destilada nas mesmas condições. No trabalho mencionado¹⁸², a reação atingiu o equilíbrio quando a concentração máxima do epímero formado foi de 55 %, o que ocorreu em pH 3,2, semelhante ao observado por VEJ-HANSEN e colaboradores²¹¹.

YUEN e SOKOLOSKI²¹⁹ empregando solução-tampão fosfato 1 M a pH 1,5, sob quatro diferentes temperaturas e utilizando metodologia CLAE, verificaram que uma epimerização significativa podia ocorrer em pH menor que três. Confirmando este resultado, TSUJI e ROBERTSON¹⁹⁶ verificaram que neste tampão a 0,01 M e pH 4,5, nenhuma epimerização ocorreu em 6 horas.

Quando se considerou somente a variação da temperatura, REMMERS e colaboradores¹⁸² verificaram que, à temperatura de 56 °C, a constante de velocidade de reação foi cerca de 400 vezes maior que a 4 °C.

Em preparações alcoólicas a estabilidade da tetraciclina foi estudada por VANCAILLE e colaboradores²¹⁰ comparando amostras de obtenção comercial em seu diluente correspondente e mistura simulada de tetraciclina e 4-epitetraciclina (44:56) diluída, tanto em solução alcoólica a 40 % como em solução com a mesma concentração alcoólica acrescida de tampão acetato, sob diferentes valores de pH. Nenhuma diferença na estabilidade foi constatada entre as amostras testadas. Para a solução contendo somente a tetraciclina, a epimerização ocorreu mais rapidamente, sendo que a 20 °C a atividade caiu para 90 % em poucos dias. A 50 °C a proporção de tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina não foi alterada, mas a quantidade total de ambas as substâncias diminuiu. Após cerca de 10 dias foi determinado 85 % da quantidade inicial da mistura, sendo que após 50 dias foi encontrado apenas 50 %. Do total de produto degradado, 10 % foi transformado em anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina, enquanto que o restante formou substâncias não detectadas pelo método CLAE empregado na determinação quantitativa. Nas soluções tamponadas, o equilíbrio entre tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina foi estabelecido mais rapidamente quando comparado com a solução alcoólica de tetraciclina.

Em relação à oxitetraciclina, a epimerização também acontece no grupo dimetilamino do C₄ para formar a 4-epioxitetraciclina¹³³. No entanto, a estabilidade para a reação de epimerização da oxitetraciclina é maior em relação a tetraciclina. A reação de degradação que ocorre por desidratação no grupo C₆-OH produz a anidrooxitetraciclina, que é instável em soluções aquosas e origina a α e β -apoxitetraciclina¹²⁴. KHAN e colaboradores¹²⁴ estudaram a estabilidade da forma sólida em 37, 50 e 70 °C por cerca de 6 anos e calcularam, a partir dos resultados obtidos, o tempo necessário para ocorrência de 10 % de degradação, t_{90} . Às temperaturas de 37 e 50 °C não foi detectada degradação significativa, sendo o mesmo resultado encontrado por DIHUIDI e colaboradores⁴⁸ em estudo semelhante por período de cerca de 2 anos. O t_{90} determinado para temperatura de 50 °C foi de 10 anos, enquanto que para 20 °C foi de 50 anos, podendo ser extrapolado para 350 anos^{48,124}.

No trabalho de OZOL¹⁵⁹, o estudo de estabilidade da doxiciclina foi realizado isoladamente ou na presença de excipientes em diferentes condições de umidade. Para isto, ambientes com umidades relativas de 40, 60 e 85 % foram obtidos em dessecadores contendo solução de cloreto de cálcio nas concentrações de 39,62, 31,73 e 19,03 %, respectivamente. A quantificação foi realizada através do método espectrofotométrico, após separação prévia da doxiciclina por cromatografia em camada delgada. Os resultados mostraram que em condições de umidade relativa elevada, de 85 %, o hiclato de doxiciclina após 78 semanas perdeu 13,27 % da potência. Comparativamente a degradação da doxiciclina foi semelhante em umidades relativas de 40, 60 e 85 % após, respectivamente, 78, 68 e 20 semanas. Portanto, quanto maior a umidade relativa mais rápida a degradação da doxiciclina. Na presença de excipientes ocorreu um ligeiro aumento da perda da doxiciclina em cápsulas de gelatina dura.

O comportamento adequado quanto à dissolução do princípio ativo a partir de uma preparação farmacêutica sólida é um importante parâmetro físico-químico, devendo manter-se durante todo o prazo de validade estabelecido para o produto. MURTHY e GHEBRE-SELLASSIE¹⁵³ determinaram que mudanças no perfil da liberação *in vitro* durante período de armazenamento, ocasionadas por alterações das características físico-químicas do produto, poderiam interferir na

biodisponibilidade do princípio ativo. Dentre os fatores que influenciam a estabilidade da formulação quanto à dissolução durante o envelhecimento do produto incluem-se os componentes desta formulação, procedimentos de manufatura, acondicionamento e condições de armazenamento. Os dados obtidos sob condições de estudo acelerado de estabilidade, realizado durante o desenvolvimento do produto, não fornecem uma previsão perfeita da vida de prateleira, sob condições ambientais em relação à sua dissolução. No entanto, possibilita projeção da robustez, correlacionando com o comportamento do produto as diversas possíveis condições de armazenamento e transporte.

Outro estudo de estabilidade, combinando a cromatografia líquida de alta eficiência e o ensaio de dissolução foi realizado por SCHAFER e colaboradores¹⁸⁷, para cápsulas de gelatina dura de cloridrato de tetraciclina e os produtos de degradação 4-epianidrotetraciclina, 4-epitetraciclina, anidrotetraciclina, bem como a clortetraciclina, uma impureza de síntese. No estudo realizado, os autores consideraram a duas metodologias complementares, possibilitando análises confiáveis e garantindo a liberação para o consumo de produtos com alto grau de segurança, eficácia e qualidade. Para amostras de cápsulas de tetraciclina estocadas por 6 a 10 anos, os resultados encontrados de teor e dissolução estavam de acordo com a especificação estabelecida pela Farmacopéia Americana XXI²⁰⁵. Estudo comparativo com cápsulas de doxiciclina indicaram estabilidade superior para a doxiciclina.

2.3. Dissolução de fármacos a partir de preparações farmacêuticas sólidas

A dissolução de preparações farmacêuticas sólidas orais envolve um conjunto de processos que ocorre quando esta entra em contato com uma solução. Para a fase de desenvolvimento do produto, tanto os ensaios *in vitro* como *in vivo* devem ser realizados. Apesar de existirem estudos bem sucedidos da correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, o ensaio de dissolução *in vitro* não permite determinar a biodisponibilidade ou bioequivalência do fármaco¹⁴⁵. Por outro lado, permite obter informações sobre a provável

biodisponibilidade, homogeneidade e qualidade da produção de diferentes lotes¹ e, ainda, diferenciar entre fabricantes ou mesmo filiais do fabricante de determinado produto¹⁴⁵. Assim, somente após estabelecida a correlação *in vitro* e *in vivo* ou obtidas as evidências farmacocinéticas, o método de dissolução *in vitro* pode ser incorporado na especificação como uma ferramenta de controle de qualidade. Portanto, a padronização do aparelho e da metodologia é extremamente importante no desenvolvimento da fórmula padrão^{84,136,177}. A escolha do ensaio *in vitro* para as avaliações de rotina é justificada por fatores como custo, tempo de ensaio, qualificação do quadro técnico, precisão, discriminação entre produtos, permanecendo em pauta a necessidade da correlação entre os ensaios realizados em voluntários doentes e sadios¹⁷⁷.

O ensaio de dissolução *in vitro* deve fornecer dados para várias etapas do desenvolvimento de um produto e deve ser realizado: na fase de estudo da fórmula e do processo de produção, no estudo de estabilidade, na rotina de controle de qualidade e quando há alteração nas condições padronizadas de produção¹⁷⁷. Segundo MATOS e colaboradores¹⁴⁵, dois tipos de estudos podem ser realizados. O primeiro é o ensaio limite no qual, ao final de um determinado período, se determina o teor de princípio ativo dissolvido e, após, o valor obtido é comparado com a especificação estabelecida. No segundo, é realizado um estudo da cinética de dissolução, que permite uma avaliação mais profunda do perfil de dissolução de uma determinada forma farmacêutica.

2.3.1. Dissolução de cápsulas e comprimidos

Segundo REES¹⁷⁷, o ensaio de dissolução tem como objetivo a confirmação de que a quantidade total do princípio ativo liberado é tão próxima quanto possível do conteúdo total da cápsula ou comprimido, sendo a taxa de liberação reprodutível e correspondente à da preparação padrão submetida aos ensaios de biodisponibilidade e clínicos.

Conclusões de SAMYN e JUNG¹⁸⁵ em trabalho realizado em 1970 sobre a dissolução das preparações farmacêuticas na forma de cápsula revelam que esta

não seria significativa, devido à simplicidade desta forma e pela fácil liberação do pó. Muitos outros trabalhos foram desenvolvidos e, cerca de duas décadas depois, MURTHY e GHEBRE-SELLASSIE¹⁵³ e SCHAFER e colaboradores¹⁸⁷ destacaram como um importante parâmetro de avaliação da qualidade do produto, a velocidade de liberação do fármaco a partir de produtos na forma sólida em geral.

CHOWDARY e RAJYALAKSHMI³⁷, em 1987 e MURTHY E GHEBRE-SELLASSIE¹⁵³ em 1993 publicaram trabalhos de revisão comparando as metodologias oficiais. CHOWDARY e RAJYALAKSHMI³⁷ discutiram a teoria de dissolução e ensaios de dissolução descritos nas Farmacopéias Americana e Internacional. Estes pesquisadores concluíram que a dissolução adequada era decorrente não apenas das características das partículas desintegradas da forma sólida mas também da intacta. No trabalho dos autores citados, ficou evidente que a velocidade de dissolução podia ser relacionada com a absorção do princípio ativo no local de absorção, principalmente para fármacos pouco solúveis no meio aquoso de dissolução e no pH fisiológico.

COHEN e colaboradores³⁹ publicaram extenso trabalho de revisão sobre os padrões de dissolução e liberação dos princípios ativos constando na Farmacopéia Americana desde a primeira publicação do teste de desintegração, em 1950 que, no início, foi indiretamente relacionado com a biodisponibilidade e a ação do medicamento. Como o conhecimento da dissolução do princípio ativo era necessário para correlacionar com a sua absorção foi recomendado, em 1962, a inclusão da dissolução de todas as cápsulas e comprimidos na Farmacopéia. Contudo, em 1965, apenas um teste de dissolução foi adotado. Em 1970, na USP XVIII²⁰², 12 monografias apresentaram o teste de dissolução empregando o aparelho com cesto. Em 1975²⁰³, várias outras monografias incluíram o teste de dissolução. O método com as pás foi oficializado em 1978 e apresentou vantagem em relação ao teste de desintegração. O uso de comprimido padrão para a calibração foi adotado após 1978, empregando os comprimidos de prednisolona, como desintegrante e o comprimido de ácido salicílico como não-desintegrante. Em 1976, foram regulamentados os requisitos de dissolução. Foram recomendados os métodos I (cesto) e II (pá) para ensaio de dissolução, com a

finalidade de padronização do ensaio para cada diferente perfil. Foram estabelecidos o tempo de desintegração, o limite de tolerância e a substituição do teste de desintegração pelo ensaio de dissolução, exceto quando sugerido um meio hidroalcoólico. As condições preconizadas do ensaio submetidas a critérios de seleção consideram os meios de dissolução preferencias a água, o fluido intestinal artificial sem enzima ou o tampão com pH entre 4 e 8. Foi recomendada rotação dos aparelhos de cesto a 100 rpm e da pá de 50 rpm. A especificação para a quantidade dissolvida estabelece valores maiores ou iguais a 75 %, em 45 minutos. Em 1980, a Farmacopéia Americana²⁰⁴ incluiu 60 monografias com exigência para teste de dissolução. O dispositivo com a pá a 50 rpm foi recomendado para formas sólidas em que a característica de solubilidade não permitia o uso do cesto. Na edição de 1985²⁰⁵ foi incluído um total de 400 monografias com teste de dissolução e em 1990, no segundo suplemento, 462 monografias em que constam este teste.

O perfil de dissolução de um sólido em um solvente é complexo e muitos fatores podem afetar a cinética do processo de dissolução. MATOS e colaboradores¹⁴⁴ e CARTWRIGHT³³ definiram duas fases no processo de dissolução das cápsulas. Para MATOS e colaboradores¹⁴⁴ na primeira fase ocorre a abertura das cápsulas liberando o conteúdo. O período anterior à abertura da cápsula é conhecido como tempo *lag* e, nesta fase, a própria cápsula de gelatina dura é um fator determinante na dissolução. Na fase seguinte, ocorre a dispersão do conteúdo das cápsulas no meio de dissolução. No trabalho mencionado imediatamente antes, verificou-se que quanto mais rápida a desintegração das cápsulas, maior a velocidade de dissolução. Produto com baixa granulometria favorece a dissolução devido à elevada área superficial em contato com o meio de dissolução. Para CARTWRIGHT³³, as cápsulas de gelatina dura e comprimidos apresentaram perfil de dissolução diferenciados. O autor estudou a dissolução das cápsulas de oxitetraciclina e observou inicialmente, uma fase de lenta desintegração seguida da fase de rápida dissolução. Esta fase deveu-se à formação de pequenas partículas que, sob agitação, favoreceram a liberação do fármaco. Ao estudar comprimidos de tolbutamida, foi constatada uma rápida dissolução na fase de desintegração, seguida de uma fase de dissolução lenta. Presumiu-se que este perfil de dissolução ocorreu devido à permanência das

partículas do comprimido no fundo do frasco, onde a agitação do meio de dissolução foi provavelmente menor.

O fenômeno de dissolução de cápsulas e comprimidos depende das características ligadas à própria forma farmacêutica, como a molhabilidade e penetrabilidade do meio de dissolução, bem como a influência do ar que pode diminuir o contato das partículas com o meio. Considerando a cápsula de gelatina dura, HANNULA e colaboradores⁸⁶ observaram que, em meio ácido, a cápsula de gelatina se desintegrava mais rapidamente. Isto pode decorrer, parcialmente, do entumescimento e dissolução mais rápidos neste pH do que em neutro. Outras características relacionadas com os constituintes da forma farmacêutica podem afetar a velocidade de dissolução. Os mesmos autores anteriormente citados⁸⁶ constataram que a presença do hidróxido de alumínio nas cápsulas ocasionava baixa desintegração e, conseqüentemente, lenta dissolução e absorção do princípio ativo. Isto devido à provável interação deste componente com a parede da cápsula de gelatina, propiciando a formação de gel. DIGENIS e colaboradores⁴⁷ verificaram que sob condições inadequadas, a cápsula de gelatina pode sofrer alterações em sua estrutura molecular através de ligações cruzadas. Este fenômeno pode ocorrer em situação de *stress* como alta temperatura e elevada umidade. Cápsulas de gelatina dura com ligações cruzadas causam mudanças significativas no perfil de dissolução *in vitro* devido à formação de uma membrana intumescida, com consistência de borracha e insolúvel em água, durante o teste de dissolução^{47,183}. Esta película cria restrição à liberação do fármaco.

Os fatores que afetam a área superficial disponível para a dissolução das cápsulas consistem em tamanho, forma e densidade das partículas ou tendência de formar aglomerados, conforme descrito por REES¹⁷⁷. MATOS e colaboradores¹⁴⁵ observaram que a presença de aglomerados menos dispersivos implicava em menor velocidade de dissolução. Outros fatores, como as propriedades dos constituintes não ativos da formulação devem ser considerados na dissolução. Estão relacionados, ainda, com a quantidade e tipo de excipientes como diluentes, desintegrantes, surfactantes, agregantes, lubrificantes, com o modo de incorporá-los ao princípio ativo, com o processo produtivo, tamanho das

partículas do pó ou grânulo, força e velocidade de compressão do comprimido ou enchimento das cápsulas. Deve-se considerar, também, o tipo de revestimento dos comprimidos, a composição e propriedades da cápsula, além de condições ambientais durante a produção e armazenamento e o tempo deste⁵⁴.

Para fármacos pouco solúveis em água, o processo de absorção efetivo no organismo geralmente depende do tempo de desintegração da forma farmacêutica e da quantidade liberada e subsequente dissolução no meio, tornando o fármaco disponível para a absorção¹³⁷. O processo anterior à dissolução, a desintegração, facilita a liberação do princípio ativo pelo aumento da área da superfície exposta ao meio de dissolução. No entanto, não fornece segurança quanto à sua liberação da formulação. A fase de dissolução no meio permite avaliar se a forma farmacêutica sólida libera o princípio ativo quando colocado em ambiente aquoso do trato gastrointestinal¹⁷⁷.

Para fármacos muito solúveis, o principal fator que influi no processo de liberação e absorção do princípio ativo é a técnica de formulação do produto.

Os excipientes presentes na formulação do pó contido nas cápsulas de gelatina dura influenciam, de várias maneiras, a velocidade de dissolução do princípio ativo. GOODHART e colaboradores⁸⁴ verificaram que cápsulas de gelatina dura de cloridrato de fenilpropanolamina, pouco solúveis em água, quando formuladas com grande quantidade do lubrificante estearato de magnésio, mostraram liberação lenta do princípio ativo em água destilada, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Isto ocorreu em decorrência do aumento significativo do tempo de desintegração e da baixa molhabilidade pois, o estearato de magnésio é extremamente hidrófobo, não permitindo que o pó seja umedecido. Foi verificado que a adição de agentes tensioativos, como o lauril sulfato de sódio e o emprego de partículas do fármaco de menor tamanho melhoravam a capacidade de umedecimento do pó, aumentando a velocidade de dissolução em suco gástrico artificial sem enzimas, mas permanecendo lenta a dissolução em água. Agentes desintegrantes como amido ou celulose microcristalina também diminuem o tempo de dissolução, segundo MIYAZAKI e colaboradores¹⁵¹ devido a uma desintegração mais eficiente dos grânulos das partículas primárias de comprimidos e, conseqüentemente, uma maior superfície de contato com o meio.

Por outro lado, os agentes agregantes tendem a retardar a dissolução devido à dificuldade de desintegração do comprimido, formando uma camada de solução viscosa em volta das suas partículas. Outros excipientes inertes, na presença ou ausência do estearato de magnésio, não influenciaram na desintegração¹⁸⁵.

Trabalhos semelhantes com estearato de magnésio, realizados por SAMYN e JUNG¹⁸⁵, NEWTON e RAZO¹⁵⁵ e MIYAZAKI e colaboradores¹⁵¹, confirmaram os resultados obtidos por GOODHART e colaboradores⁸⁴. SAMYN e JUNG¹⁸⁵ demonstraram que os excipientes como o lubrificante estearato de magnésio e os inertes, lactose ou fosfato de cálcio, que formavam misturas de pós em diferentes proporções, influenciavam grandemente a desintegração das cápsulas. A dissolução foi nula para a mistura composta por fosfato de cálcio e 5 % de estearato de magnésio, pois não houve a desintegração do grumo e consequentemente, a liberação do princípio ativo. Foi constatado que este lubrificante retirava a água do meio tornando-o viscoso, o que reduziu a velocidade de dissolução devido à diminuição do contato entre o pó e o meio. Além disso, o fosfato de cálcio colaborou com esta baixa dissolução por ser insolúvel em água. NEWTON e RAZO¹⁵⁵ além de MIYAZAKI e colaboradores¹⁵¹ verificaram que a mistura de lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio em preparações de comprimidos retardava a liberação do princípio ativo. No trabalho de MIYAZAKI e colaboradores¹⁵¹ foi observado que a presença de ambos os excipientes a 1 % na formulação não alterou o tempo de desintegração, mas interrompeu a dissolução. Neste caso, não houve a correlação entre o tempo de desintegração e a velocidade de dissolução. Outros excipientes estudados como a gelatina, goma acácia e PEG 6000 aumentaram o tempo de desintegração devido à diminuição do contato com o meio.

CARTWRIGHT³³, através do estudo colaborativo para o teste de dissolução de comprimidos de tolbutamida e cápsulas de oxitetraciclina, envolvendo oito laboratórios, demonstrou que o nível de vibração provocado pelo aparelho sobre o frasco de dissolução também causava a variação na característica de dissolução do fármaco. Isto foi observado para um dos laboratórios envolvidos no estudo, no qual a alta velocidade de dissolução foi parcialmente relacionada aos efeitos da vibração ocasionada pela agitação.

2.3.2. Dissolução de preparações farmacêuticas contendo tetraciclina

Estudo das características de absorção de preparações orais na forma de cápsulas de tetraciclina e comprimidos de oxitetraciclina foi realizado por BERGAN e colaboradores¹⁵ em 1973. O trabalho envolveu os ensaios de biodisponibilidade, desintegração e dissolução *in vitro*, empregando os métodos das Farmacopéias Americana XVIII e Norueguesa para os ensaios. Os resultados obtidos revelaram diferença na biodisponibilidade do princípio ativo para as diferentes preparações da oxitetraciclina e tetraciclina. Dentre sete amostras, sendo cinco produtores de oxitetraciclina e duas tetraciclina, duas apresentaram nível sérico abaixo dos valores encontrados para as outras amostras. As preparações das tetraciclina resultaram em concentrações séricas superiores às da oxitetraciclina. Estes autores sugeriram tempo de desintegração de cápsulas de 10 minutos como limite que mais se aproximava da realidade, enquanto GOODHART e colaboradores⁸⁴ consideraram tempo de 15 minutos.

SANDELL e colaboradores¹⁸⁶ no estudo de correlação entre os testes de desintegração e dissolução verificaram que preparações comerciais de cápsulas de tetraciclina apresentaram desintegração incompleta. Duas entre três amostras não desintegraram em 10 minutos sendo que uma delas, mesmo após 30 minutos, teve uma desintegração incompleta e apresentaram, simultaneamente, uma baixa velocidade de dissolução. Isto foi associado à formação de um gel a partir da cápsula de gelatina dura no processo de desintegração que encobria o pó do medicamento, não permitindo a dissolução.

MIYAZAKI e colaboradores¹⁵¹ realizaram um extenso trabalho sobre o perfil de dissolução de três tetracilinas em formulações, com diferentes aditivos para a preparação de comprimidos. Os resultados encontrados foram semelhantes àqueles constatados por outros pesquisadores, em trabalhos relacionados com a influência dos excipientes na dissolução de cápsulas e comprimidos^{84,185,155}. A biodisponibilidade a partir da forma farmacêutica sofre influência da interação com a tetraciclina, como a formação do complexo com cátions bi ou trivalentes que impede a liberação do princípio ativo, sendo esta complexação muito aumentada em formulações com múltiplos componentes. Quando agentes ligantes como

gelatina ou goma acácia foram adicionados à formulação, a dissolução dos antibióticos foi retardada. A inibição da dissolução ocorrida foi devido possivelmente à formação de um complexo entre o fármaco e o excipiente, pouco solúvel no meio aquoso e ao aumento da viscosidade do meio.

Ao estudar os fatores que afetam a dissolução da doxiciclina nas formas mononitrato, hidrato e cloridrato diidratado em vários meios, empregando o método de dissolução com agitação por meio de pá e amostras em *pellets*, BOGARDUS e BLACKWOOD¹⁸ observaram que o cloridrato diidratado dissolveu quatro vezes menos em ácido clorídrico 0,1 N do que em água e tampão pH 4 ou 7. Este resultado foi coerente com a solubilidade deste sal, que é influenciada pelos íons cloro, diminuindo a sua dissolução no meio. A dissolução do hidrato e da base livre não foi influenciada pela presença do íon cloro. Isto é significativo para as preparações de uso oral, considerando a alta concentração de íon cloro no suco gástrico. Quando a pH 4, a base dissolveu 100 vezes mais lentamente que a pH 7,0. A forma cloridrato diidratado dissolveu rapidamente em água e sob tampão pH 4,0 e 7,0.

2.3.3. Metodologias desenvolvidas para o ensaio de dissolução *in vitro*

Muitas técnicas *in vitro* para a avaliação do perfil de liberação do fármaco a partir de preparações sólidas estão descritas na literatura^{31,33,84,88,136,161,169,177}.

Em 1960, PERNAROWSKI e SEARL¹⁶¹ desenvolveram equipamento automático de fluxo contínuo para determinar a dissolução. O equipamento apresentava um cesto de aço inox com malha de 10 mesh, acoplado a uma haste giratória e um béquer de um litro. O meio de dissolução era agitado a uma velocidade constante e a amostragem feita automaticamente pela transferência do meio para um frasco coletor, para a dosagem do princípio ativo empregando o método espectrofotométrico. Através da inspeção visual, os autores verificaram que por este método, comprimidos e cápsulas eram submetidos a menor abrasão do que no teste de desintegração da Farmacopéia Americana. Os resultados

obtidos mostraram ausência de correlação entre o tempo de desintegração e a característica de dissolução da cápsula ou comprimido. Os autores sugeriram como especificação, a quantidade total do princípio ativo em determinado período de tempo.

Com o objetivo de obter parâmetros relacionados com a taxa de dissolução do princípio ativo, WITHEY e MAINVILLE²¹⁷ realizaram um estudo de adequação do aparelho de desintegração descrito na Farmacopéia Americana²⁰¹, empregando cápsulas de cloranfenicol. O aparelho de desintegração sem os discos foi o empregado. O volume da solução de suco gástrico recomendado foi de 800 mL à temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. A metodologia da Farmacopéia Americana²⁰¹ sem modificação foi realizada em paralelo. No primeiro método apenas uma cápsula foi colocada no aparelho enquanto que no segundo seis foram colocadas em cada tubo cilíndrico do aparelho. Alíquotas do meio de desintegração foram colhidas em determinados intervalos de tempo, seguindo-se a determinação da quantidade de princípio ativo. A concentração do cloranfenicol no meio de dissolução mostrou melhor resultado no método de cápsula simples. Isto pode ser devido à saturação do meio de dissolução, tanto com o ingrediente ativo como devido à gelatina da cápsula ou aos excipientes, no caso em que as seis cápsulas foram simultaneamente testadas.

SANDELL e colaboradores¹⁸⁶ compararam resultados dos testes de desintegração e dissolução de cápsulas e comprimidos. O teste de desintegração adaptado para relacionar o número e o tamanho das partículas com a dissolução, foi realizado com aparelho consistindo de três pequenas peneiras superpostas, com a abertura da malha em tamanhos decrescentes de cima para baixo, mergulhadas e mantidas firmes no meio de desintegração por meio de um fio. No procedimento do ensaio, a cápsula ou comprimido foram colocados na peneira superior de menor abertura da malhas e mergulhadas em béquer contendo um litro de água a 37 °C. Foi aplicada agitação uniforme às peneiras. Após intervalo de tempo de 10 a 30 minutos, as peneiras foram retiradas e o resíduo colocado para secar e pesado. O teste de dissolução foi realizado em recipiente contendo água a $37 \pm 0,5$ °C, com agitação do meio através de pá com rotação de 50 rpm. Alíquotas do meio de dissolução foram retiradas e quantificadas por

espectrofotometria. Os resultados obtidos para comprimido de meprobamato mostraram que, quando ocorreu a desintegração incompleta, os resíduos permaneceram nas peneiras, sendo observada diferença significativa na velocidade de dissolução. A porcentagem baixa de resíduo na peneira de malha maior resultou em porcentagem maior de fármaco dissolvido.

LIN e colaboradores¹³⁶ em 1971, realizaram estudo comparativo de sete métodos de dissolução. Os métodos empregando pérolas de vidro, placas de aço inox, pás com agitação vigorosa, suporte de plástico com agitação suave, cesto de aço inox com agitação vigorosa, ensaio de desintegração e o método oficial da USP XVII (cesto), foram aplicados para amostras de cápsulas de fármacos anti-diabéticos e diuréticos. Os autores demonstraram que o método oficial²⁰¹ apresentava desvantagens em decorrência da impossibilidade de observação das cápsulas, durante a desintegração, impedida pelo cesto de arame. Também observaram que o cesto com malha de 40 mesh poderia reter os grumos ou bloquear a saída de partículas, sendo por isso sugerido malha de 8 mesh. O perfil de dissolução obtido através das sete técnicas estudadas para amostras de cápsulas foram comparáveis, mas os autores expressaram preferência quanto a simplicidade e versatilidade do método USP desde que os cestos fossem fabricados com malha entre 8 e 40 mesh.

Tendo por meta a melhoria metodológica, GOODHART e colaboradores⁸⁴ desenvolveram aparelho de dissolução que permitia a observação visual da desintegração da cápsula de gelatina dura sem o emprego do cesto. Consistia de béquer apresentando pequenas concavidades no fundo onde as cápsulas e comprimidos eram encaixados para serem testados. As cápsulas foram colocadas na posição vertical, sendo que sua parte superior se dissolveu em 2 ou 3 minutos, liberando o ar presente no seu interior. A rápida liberação de bolhas de ar indicou o imediato umedecimento do pó seguido de completa dissolução sendo, portanto, um método rápido e adequado para os testes de desintegração e dissolução de todas as formas sólidas.

BURGER e NASH³¹ estudaram aparelho de dissolução, consistindo de um recipiente de plástico na forma de "V" que oscilava em relação ao seu centro com uma frequência controlada. Prevvia sistema automático de coleta do meio de

dissolução através de bombeamento, sendo que o registro automático da velocidade de dissolução em termos de porcentagem em função do tempo, fez desnecessária a etapa de construção da reta com valores de absorbância e intervalo de tempo, tornando o método mais rápido e simplificado.

Na metodologia do ensaio de dissolução, segundo REES¹⁷⁷, a agitação excessiva do meio de dissolução invalidava a correlação do teste *in vitro* e *in vivo*, por reduzir a espessura da camada de difusão. A rotação do cesto do aparelho de dissolução a 50 rpm normalmente produzia a melhor correlação com as condições *in vivo*. Mas, nesta velocidade de rotação, a mistura do meio de dissolução era ineficiente e poderia introduzir o erro analítico na amostragem sendo, portanto, comumente empregada velocidade de 100 rpm. POSTI e SALONEN¹⁶⁹ compararam a influência da velocidade da rotação do agitador a 75 e 100 rpm, paralelamente à variação da posição do agitador a 2,5 e 4,5 cm em relação ao fundo do frasco de dissolução, empregando os métodos I e II do teste de dissolução da USP XX²⁰⁴. Os autores concluíram que o método I, do cesto, sofria menor influência da variação na altura e que o da pá era mais sensível, especialmente a velocidades de rotação maiores. No trabalho de HARDWIDGE e colaboradores⁸⁸, três aparelhos de dissolução obtidos comercialmente foram avaliados quanto às condições de agitação e o pH do meio de dissolução. Quando estas condições eram mantidas constantes, os três aparelhos proporcionaram resultados de dissolução equivalentes entre si, e correlacionados com o nível sérico quando do estudo *in vivo* em cães.

CARTWRIGHT³³ publicou em 1979, resultado de um estudo colaborativo realizado para determinar a robustez do ensaio em relação ao procedimento e equipamento. Os autores consideraram para reprodutibilidade a comparação dos resultados obtidos entre diferentes laboratórios, e para repetibilidade, diferenças intra-laboratório. Foi constatado que para cápsula de oxitetraciclina, a reprodutibilidade teve maior variação que a repetibilidade. Outros fatores como variação de temperatura, meio de dissolução, ar dissolvido no meio, adsorção pelo filtro, liberação de substâncias interferentes do filtro, variação na velocidade do motor, dimensões do cesto e diferentes tipos de cesto também podem causar as variações inter e intra-laboratórios.

Para o estudo de dissolução de matéria-prima, BOGARDUS e BLACKWOOD¹⁸ empregaram, no ensaio de dissolução, *pellets* de doxiciclina preparadas pela compressão direta da substância em formas adequadas de 1,27 cm de diâmetro, colocadas em béquer contendo 800 mL de meio de dissolução a $25 \pm 0,2$ °C, sob agitação por pá a 50 rpm. O método espectrofotométrico a 345 nm foi empregado para a determinação quantitativa. A taxa de dissolução variou de acordo com a doxiciclina, base ou sal, e também com o meio de dissolução empregado conforme descrito anteriormente.

Método *in vitro* para avaliar a desintegração da formulação em fase de desenvolvimento foi delineado por HANNULA e colaboradores⁸⁶, empregando um béquer imóvel e um dispositivo para fotografar. A sequência de desintegração das cápsulas foi detalhadamente documentada através das fotografias, permitindo o estudo da dissolução e ruptura do invólucro de gelatina, a formação de bolhas de gás e a saída das partículas do pó das cápsulas. Este método correlacionou o dado de desintegração obtido com a taxa de absorção *in vivo* do princípio ativo, indicando que as condições físicas simuladas eram semelhantes à estomacal. As fotografias, com o auxílio de corantes, permitiram observar a penetração do líquido no pó.

2.4. Considerações gerais sobre os fundamentos da validação

Os métodos analíticos têm por objetivo fornecer informações confiáveis quanto a natureza e a composição dos materiais submetidos a análise. Sabe-se, entretanto, que um certo grau de variabilidade está atrelado a todas as avaliações. Portanto, um dos objetivos de garantia de qualidade é manter em patamar mínimo esta variabilidade.

A validação é parte importante do programa de garantia de qualidade, sendo os procedimentos incluídos nas normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidas pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, e aplicada nas indústrias farmacêuticas americanas desde 1978¹⁵⁴ devendo

também ocorrer conforme as Boas Práticas de Laboratório, do inglês, Good Laboratory Practice (GLP).

Os métodos de ensaio devem ser descritos de forma clara para evitar a interpretação errônea dos resultados analíticos. Alteração no procedimento analítico estabelecido e sua aplicação sem o estudo prévio da influência que poderia ocorrer sobre o ensaio possibilitaria, ter como consequência, a obtenção de resultados inesperados e não confiáveis. A escolha do método deve levar em consideração fatores como a sua adequação à substância analisada, em determinado substrato ou matriz. A precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade são características fundamentais de um método analítico, porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional devem ser também considerados.

2.4.1. Validação do método analítico

A validação envolve não apenas os procedimentos do processo produtivo, mas todos os métodos empregados no controle de qualidade, incluindo a comparação do método estudado com o método oficial ou outro método anteriormente validado. Os erros analíticos podem ocorrer, mas devem ser evitados com treinamento de pessoal, com auxílio de documentação na qual constam todos os procedimentos e especificações e, ainda a análise dos resultados obtidos. Os métodos analíticos apresentam variações que decorrem de todas as medidas obtidas. Esta variabilidade aumenta quando as determinações são realizadas por diferentes analistas em diferentes laboratórios. Um tratado que apresenta e discute com pertinência os erros operacionais normalmente encontrados nos laboratórios foi elaborado por GARFIELD⁸¹.

Para minimizar os erros, DUX⁵¹ enfatiza a necessidade de que os métodos de análise sejam descritos de forma objetiva, simples e clara, de modo que mesmo o profissional pouco treinado possa realizar os ensaios corretamente. Alteração não deve ser introduzida sem a expressa autorização do supervisor do

laboratório. Se necessárias, deverão ser consideradas em uma nova validação. Quando a alteração é pequena a validação pode ser simples através de comparação dos resultados, devendo sempre ser analisada pelo supervisor do laboratório. Quando envolvidas modificações maiores, o estudo de validação deve ser mais completo .

Em relação aos métodos oficiais, a revalidação é recomendada, tendo em conta que um método pode ser válido para uma situação e não aplicável em outra⁸¹.

WILLIG e STROKER²¹⁵ recomendam para a validação do método, a avaliação de atributos como exatidão, desvio, linearidade, precisão, sensibilidade e especificidade. Outro atributo, a robustez, é definida como a capacidade de um processo analítico fornecer resultados equivalentes quando realizado por diferentes analistas, equipamentos ou laboratórios e, também, deve fazer parte do processo de validação^{4,30,81,113}, permitindo redução da variabilidade analítica⁸¹.

Uma das primeiras etapas da validação é a calibração de equipamentos, para assegurar que estejam operando corretamente e não se constituam em fonte de erro para o ensaio. A calibração deve ser periódica, de acordo com o tipo e a frequência de utilização.

As farmacopéias USP XXIII²⁰⁸ e Japonesa, 13ª edição¹¹³ fazem referência à validação analítica de forma destacada, incluindo a definição dos termos e parâmetros analíticos envolvidos nos ensaios de validação. Os atributos do método analítico ou parâmetros de validação estão descritos em inúmeras publicações^{20,51,81,113,116,208,215}.

O procedimento de validação depende do tipo de metodologia analítica utilizada. Os métodos analíticos são classificados por tipo ou categoria, ou seja, categoria I (quantificação), II (teste para determinação de impurezas ou produtos de degradação) e III (determina a característica de desempenho). Para a categoria I, atributos como precisão, exatidão, especificidade, linearidade, intervalo de quantificação e robustez devem ser estudados na validação. A categoria II envolve ensaios de quantificação e ensaios-limite e, além das características descritas para categoria I, deve incluir, também, o limite de

detecção. Na categoria III, são exigidos apenas a precisão e robustez do método analítico²⁰⁸.

A exatidão, um dos atributos primordiais, expressa medida do desvio dos valores obtidos por um determinado método analítico, e indica a diferença entre um valor médio obtido de uma série de valores experimentais e valor verdadeiro^{4,81,208,215}.

Uma forma de determinar a exatidão é através do teste de recuperação, que consiste em adicionar à solução-teste uma quantidade conhecida da substância padrão acima e abaixo daquela esperada na amostra^{81,208,215}. Neste caso, a exatidão é calculada pela diferença da concentração entre a solução adicionada do padrão e da amostra sem adição do padrão, em relação à quantidade da substância adicionada à amostra. O objetivo deste teste é determinar a influência do procedimento ou modificação na amostra e da matriz no resultado da análise realizada nas mesmas condições, com os mesmos reagentes, equipamentos e técnicas⁷⁹. Dois procedimentos diferentes foram descritos por GARFIELD⁸¹. No primeiro, inicialmente a amostra de interesse é analisada em duplicata para assegurar a precisão. Em seguida, uma quantidade exatamente medida e correspondente à metade da quantidade da substância presente na amostra original é adicionada a uma porção desta amostra, sendo a porcentagem recuperada calculada através dos resultados obtidos. No segundo procedimento, diferentes quantidades da substância são adicionadas às porções da amostra-teste e analisadas. Após a obtenção dos resultados, a curva de calibração é construída. Se a concentração calculada após a análise apresenta função linear em relação à substância analisada, o método é adequado. Esta curva de calibração, FUNK e colaboradores⁷⁹ denominaram de curva de recuperação.

O teste de recuperação permite, além da determinação da exatidão do método, verificar a interferência dos componentes da matriz quando não é possível omiti-los da formulação, ou quando não se conhece a composição desta formulação.

Outro importante atributo, a precisão do método, é definida como a medida da proximidade dos resultados do ensaio, obtidos individualmente de várias

amostras de um lote, sendo expressa como variância, coeficiente de variação ou desvio padrão dos valores observados. A precisão, segundo GARFIELD⁸¹, pode ser considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade traduz a precisão dos resultados do ensaio. Na repetibilidade ou precisão intra-dia ou intra-ensaio, é considerada a variação que ocorre quando da realização de réplicas do ensaio, em um curto período de tempo nas mesmas condições operacionais. Quando consideradas variações entre dias, a precisão intermediária está relacionada com análises realizadas em diferentes dias, analistas, instrumentos e reagentes, mas com o mesmo procedimento operacional. No estudo da precisão intermediária do método, o teste de repetibilidade deve ser realizado em dois, três ou pelo menos 10 dias diferentes⁸¹. Comparativamente, a precisão intermediária expressa a precisão dos resultados obtidos em condições analíticas com pequenas alterações, mas realizadas no mesmo laboratório e a reprodutibilidade significa a precisão de resultados obtidos em diferentes laboratórios^{4,81,113,208}. Portanto, a reprodutibilidade está relacionada com procedimentos realizados por dois ou mais laboratórios como ocorre no estudo colaborativo. Assim, FUNK e colaboradores⁷⁹ consideraram a repetibilidade como os ensaios realizados em condições repetidas, enquanto que a reprodutibilidade em condições comparativas.

Na linguagem farmacopéica, a precisão é entendida como a concordância entre os valores de uma série, obtida de análises múltiplas da mesma amostra homogênea sob as condições de ensaio estabelecidas. A precisão reflete a capacidade de reproduzir o mesmo método, mas não necessariamente o resultado correto ou o esperado, toda vez em que seja realizado conforme padronizado^{81,116}. Portanto, o método analítico adequado deve apresentar exatidão e precisão.

A especificidade se constitui em um atributo relacionado com a capacidade de um procedimento analítico para quantificar especificamente a substância para a qual foi desenvolvido, mesmo quando presentes, na amostra, interferentes como os excipientes ou compostos de estrutura química semelhantes²⁰⁸.

O método analítico que apresenta sensibilidade, possui a capacidade de responder adequadamente e detectar quantidades decrescentes da substância.

A averiguação da sensibilidade do método inclui a determinação dos limites de detecção, específica para teste qualitativo, e quantificação, empregada nas determinações quantitativas das impurezas. O limite de detecção é a menor quantidade da substância que é detectada, mas não necessariamente quantificada²⁰⁸, enquanto que o limite de quantificação é a menor concentração ou quantidade que pode ser determinada pelo método, considerado quando o coeficiente de variação entre as respostas for menor que 10 %¹¹³.

O procedimento de validação engloba também a construção da curva de calibração e a verificação de sua linearidade. Através da linearidade pode ser comprovado que o método analítico produz resposta diretamente relacionada com a quantidade ou concentração da substância analisada²⁰⁸. O intervalo de linearidade é definido como o intervalo entre a concentração mais baixa e mais alta em que o método analítico apresenta exatidão, precisão e linearidade. Esta linearidade precisa ser determinada na faixa de concentração em que será realizado o ensaio.

JENKE¹¹⁶ apresenta em seu trabalho de revisão, definições, procedimentos e critérios de aceitação que foram publicados na literatura farmacêutica e, coloca na forma de tabelas, um resumo comparativo com os parâmetros de validação mais frequentemente estudados.

2.4.1.1. Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência

A validação dos métodos cromatográficos tem sido amplamente discutida, e inúmeros trabalhos têm sido publicados na literatura^{4,98,114,116,150,212}. Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência empregando fase reversa, tem sido extensivamente aplicada para a determinação de vários antibióticos.

No início do desenvolvimento do método cromatográfico é fundamental determinar a sua especificidade, através da determinação do produto em análise na presença de possíveis interferentes, como os produtos de degradação ou excipientes para, em seguida, determinar os demais parâmetros⁴. Da mesma forma que para outros métodos analíticos, estes parâmetros são a robustez, linearidade, alargamento e formação da cauda do pico, precisão, limite de quantificação e exatidão do método^{4,51,81,113,150,208}.

A avaliação da robustez de um método cromatográfico envolve o estudo de diferentes condições do ensaio como alteração da composição e velocidade do fluxo da fase móvel, condições e fornecedor da coluna cromatográfica, comprimento de onda do detector, procedimento de preparação do padrão e amostra e temperatura de ensaio. As variações das condições acima citadas podem ser analisadas por meio de valores de fator de capacidade ou resolução^{20,114}.

Após a validação, testes de adequação das condições do sistema cromatográfico devem ser periodicamente realizados, para garantir que o método mantenha o mesmo desempenho analítico. Estes procedimentos para adequação das condições analíticas são considerados como parte fundamental do processo de desenvolvimento e aplicação dos métodos cromatográficos, e envolvem a determinação dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, como a resolução dos picos, fator de alargamento do pico, número de pratos teóricos, tempo de retenção, precisão, fator de capacidade, assimetria do pico e a relação sinal/ruído^{4,80,115}.

Dentre os parâmetros, JENKE¹¹⁶ considerou a resolução (R), como a ferramenta mais importante para testar o desempenho cromatográfico, uma vez que está relacionada com a eficiência (N), seletividade (α) e fator de capacidade (K'). A resolução indica a eficiência de separação de dois componentes em mistura^{4,20,30,58,108,113,208}. A determinação da resolução no cromatograma é realizada pela comparação da distância de dois picos vizinhos, calculado empregando o tempo de retenção e a largura dos picos. Os picos não são completamente separados quando a resolução é igual a 1, que indica picos

sobrepostos. Na análise quantitativa, resolução igual a 1,25 é adequada, porém maior que 1,5 torna o método muito demorado¹⁵⁰.

Para a determinação da precisão, as soluções-teste da substância analisada, usadas para a determinação da curva de calibração, devem ser injetadas pelo menos cinco vezes quando o coeficiente de variação for maior que 2 %, e seis vezes quando para o critério de aceitação, o coeficiente de variação for menor que 3 %²¹⁹ ou 1,5 %⁴.

O número de pratos teóricos (N) é a medida da eficiência da coluna. O aumento deste número indica que o material de empacotamento é o mais indicado, a coluna possui comprimento suficientemente longo e a condição de fluxo da fase móvel é adequada¹⁵⁰.

O fator de resposta (f) não faz parte dos parâmetros de adequação. É obtido pelo quociente da altura ou da área do pico e da quantidade ou concentração da substância injetada correspondente à área do pico²⁰, sendo útil no estudo de adequação de outros parâmetros, por meio de comparação das respostas obtidas para diferentes concentrações da amostra.

A relação sinal/ruído é calculada pelo quociente da altura do pico correspondente à amostra e da altura do pico obtido do ruído a uma certa distância entre os picos, e determina o limite de detecção do método^{20,30}.

Outro parâmetro, o tempo de retenção (t_r), é o tempo de eluição do pico à máxima altura do mesmo, medido a partir da injeção da solução-teste, sendo uma função da velocidade de fluxo da fase móvel e do comprimento da coluna. Quando o tempo de retenção é maior, significa que a substância analisada ficou mais retida na fase estacionária e demorou mais para ser eluída¹⁵⁰. Métodos cromatográficos com tempo de retenção menor apresentam vantagem pela rapidez na obtenção do resultado.

O fator de separação (α) permite caracterizar a distância de separação de dois picos consecutivos. Este fator é calculado a partir da comparação do fator de capacidade das duas substâncias presentes na amostra. O fator de capacidade (K') é a medida do grau de afinidade que a coluna e a fase móvel apresentam para com a substância^{30,113,150,208}.

O fator de assimetria (T) permite verificar a proximidade do pico cromatográfico com a forma gaussiana. Quando a assimetria é acentuada, ocorre a formação dos picos com caudas. Quando o fator de assimetria é menor que um, esta cauda é frontal. A assimetria dos picos pode interferir na precisão da metodologia, pois a altura ou a área do pico assimétrico não está linearmente relacionada com a concentração da substância analisada^{150,208}.

O alargamento do pico pode ocorrer por uma série de fatores que exigem a adequação das condições do ensaio, e estão relacionados ao material de empacotamento, o qual influencia a afinidade entre as moléculas da amostra e a coluna.

Para os testes de adequação, não existe regra para fixar limites, os quais poderão ser definidos durante o desenvolvimento ou validação da metodologia¹¹⁵.

O deslocamento da linha de base durante o ensaio é uma variação lenta que pode alterar o resultado do teste, e a sua influência no ensaio deve ser estudada^{20,99,150}.

2.5. Determinação quantitativa de antibióticos

Métodos químicos e biológicos foram constantemente pesquisados após a descoberta da penicilina. Dentre as linhas metodológicas citadas, características como sensibilidade e especificidade tornaram o método biológico como de escolha, desde que mantenha a exatidão e a precisão. No entanto, mais recentemente o método de cromatografia líquida vem se tornando uma alternativa ao microbiológico, por apresentar características como sensibilidade e especificidade e, particularmente, devido a rapidez na obtenção dos resultados.

2.5.1. Métodos microbiológicos

A potência do antibiótico pode ser constatada pelo seu efeito inibitório sobre microrganismos sensíveis, em condições adequadas. A comparação entre

o efeito causado por uma substância padrão de referência e pela amostra permite determinar a potência desta última.

2.5.1.1. Método de diluição seriada

Este método caracteriza-se por série de tubos contendo diferentes concentrações do antibiótico, adicionadas ao meio de cultura líquido ou sólido contendo o microrganismo-teste. Após a incubação dos tubos por determinado período, dados referentes a leitura por exemplo turbidimétrica, permitem a construção da curva dose-resposta relacionando a concentração do antibiótico com o parâmetro de leitura.

RAMMELKAMP¹⁷² ressaltou, em 1942, desvantagem do método turbidimétrico quanto à necessidade da amostra em solução, fator limitante na determinação de antibiótico em amostras de fluidos biológicos e exsudatos. Assim, propôs teste de diluição utilizando *Streptococcus hemoliticus (pyogenes)* do grupo A, considerado quatro a 16 vezes mais sensível que o *Staphylococcus aureus*. Este ensaio, cujo princípio se fundamenta na intensidade de hemólise, exige cerca de 18 horas para sua execução. Foram empregados 0,2 a 0,9 mL de amostra para o teste, com teor de penicilina de cerca de 0,0039 unidades Florey. HOBBY e colaboradores¹⁰² realizaram estudo comparativo deste método com o de difusão Oxford, tendo-se encontrado erro semelhante para ambos. Foi apresentada como desvantagem do método em placas a variação da espessura e o ressecamento do meio de cultura, sendo o tamanho dos halos de inibição de crescimento limitado pelo tempo da fase *lag* de crescimento do microrganismo. Método de diluição em meio sólido foi também descrito, misturando soluções da penicilina de diferentes concentrações em meio fundido e distribuindo o gel em placas de Petri. Após solidificação foram semeados um ou mais microrganismos, com repiques em estrias.

Na determinação do ácido aspergílico, o teste convencional de diluição em tubos, utilizando o *Streptococcus pyogenes* cepa C-203, exigiu para execução cerca de 18 horas. Este foi substituído por método rápido desenvolvido por RAKE

e colaboradores¹⁷⁵. Estes utilizaram *Photobacterium fischieri*, cepa proveniente da National Collection of Type Cultures (NCTC) e American Type Culture Collection (ATCC), cuja intensidade de luminescência foi relacionada com a atividade antibacteriana, com resposta em cerca de 30 minutos após o preparo dos tubos.

RAKE e JONES¹⁷⁴, em 1943, descreveram procedimento para método de diluição com um microrganismo β -hemolítico. Foram obtidos resultados satisfatórios empregando *Streptococcus pyogenes*, com leitura em 60 a 90 minutos de teste.

Método titulométrico, com técnica de diluição foi descrito por FLEMING⁷⁰ em 1942, tendo sido utilizada a glicose no meio de cultura para compatibilizar o crescimento do *Staphylococcus aureus* na presença de indicador de Andrade. A viragem deste indicador foi devida à presença de ácido. O autor sugeriu o emprego de meio de cultura de composição uniforme e inóculo proveniente da mesma cepa para se obter resultados comparáveis e constantes em diferentes laboratórios.

O mesmo autor⁷², em 1943, descreveu micrométodo com finalidade para determinação da atividade da penicilina em amostras sanguíneas provenientes de pacientes e disponíveis em quantidades mínimas, utilizando lâmina como dispositivo para contato da amostra com o *Staphylococcus aureus*. No entanto, em 1944, o próprio FLEMING⁷¹ publicou trabalho substituindo tal microrganismo por *Streptococcus hemoliticus*, e utilizando o sangue como indicador de crescimento, sendo que o crescimento microbiano foi detectado pela presença de hemólise; este procedimento forneceu ponto final mais definido. Outra alteração foi proposta, também por FLEMING⁶⁹, que empregou tubo capilar, evitando o trabalho de preparação das lâminas. O meio de cultura constou de mistura de glicose, vermelho fenol e soro, que após incubação, possibilitou detectar o crescimento do estreptococo pelo aparecimento de precipitado de cor amarela intensa. A diferenciação entre capilares com ausência ou presença de crescimento foi feita pela cor, sendo que onde o crescimento foi ausente, o meio de cultura apresentou-se vermelho ou vermelho-violeta. Além de amostras sanguíneas, fluído cerebrospinal e urina foram ensaiados pelo método descrito por FIELDING⁶⁶. O procedimento envolveu a fermentação da glicose em meio de

soro aquoso inoculado com *Staphylococcus aureus* cepa Oxford colocado em tubos capilares vedados, sendo observada a produção de ácido e consequente coagulação do soro, uniformemente colorido de rosa devido à presença de indicador, sendo esta a resposta observada como ponto final do teste. Este método mantém a vantagem de requerimento de pequena quantidade de amostra, facilidade de observação do ponto final, exigindo pouca manipulação e suficiente exatidão para propósitos clínicos.

ABRAHAM e DUTHIE², em 1946, mostraram que substâncias ácidas, como a penicilina, eram mais ativas em meio ácido, e que substâncias alcalinas, como a estreptomicina, em meio alcalino. Assim, no método de diluição, a formação de ácido durante a incubação tornou a penicilina mais ativa, provocando a viragem pouco nítida. Por outro lado, a estreptomicina tornou-se menos ativa em meio ácido, proporcionando ponto final de viragem nítida.

Na avaliação quantitativa da estreptomicina, MAY e colaboradores¹⁴⁶, em 1947, estudaram a influência do meio de cultura, das condições atmosféricas, da natureza do microrganismo e do tamanho do inóculo na definição do ponto final do teste de diluição em tubos. Foi recomendado método de ensaio através de meio de cultura adicionado de 1 % de glicose e vermelho fenol empregando *Klebsiella* 41. O trabalho mostrou a influência da condição de anaerobiose na resposta do microrganismo. *Klebsiella* 41, *Escherichia coli* e *Staphylococcus*, no ensaio da estreptomicina, quando em condição de anaerobiose exigem alta concentração de estreptomicina para inibição do crescimento, oposto ao *Streptococcus* que não sofre influência da condição de anaerobiose.

Diferentes meios de cultura líquido foram testados com estreptococos hemolítico, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, bacilo de Friedlander e outros; foram observadas diferenças marcantes, sendo que resultados favoráveis foram conseguidos com soro aquoso contendo glicose e vermelho de fenol. O meio de soro ou caldo diluído dez vezes em água proporcionou resultados adequados, quando comparado com os não diluídos, inoculados com carga microbiana em quantidade considerável, sendo que nestes a redução do inóculo tornou os resultados irregulares. O trabalho envolveu estudo em condição de anaerobiose, quando ocorre a exigência de concentrações maiores de estreptomicina para

inibir completamente o crescimento em tubos capilares selados. Neste trabalho foi destacado o erro inerente à técnica, devido à utilização de uma única pipeta capilar na diluição e homogeneização das soluções-teste. Assim, foi recomendada a execução das diluições em cinco ou seis etapas para evitar erro cumulativo de uma para outra.

Outro recurso titulométrico foi conseguido através da determinação de amônia liberada a partir de uréia quando o microrganismo-teste é produtor da urease. Neste caso, o *Staphylococcus aureus* cepa Oxford foi proposto por VALENTINE e JOHN²⁰⁹. O vermelho de fenol, presente no meio de cultura, passa para coloração amarela quando o pH atinge valor da ordem de 8,3.

Método rápido com meio contendo azul de metileno foi desenvolvido inicialmente com a finalidade de detecção qualitativa de microrganismos no leite, o qual foi usado a seguir por REID e BREWER¹⁸¹ para ensaios quantitativos da penicilina e estreptomicina.

HIRSH¹⁰¹, em 1950, escolheu o método rápido de diluição com o mesmo meio para a determinação da nisina, devido à baixa difusibilidade do antibiótico em meio sólido. Para isto, *Streptococcus cremoris*, microrganismo de crescimento rápido, foi empregado possibilitando encerramento do teste em cerca de 15 minutos. A inibição de crescimento do microrganismo foi distinguida devido ao azul de metileno adicionado ao meio de cultura, indicando o crescimento onde ocorreu a viragem da coloração do indicador de azul para incolor. Num segundo método descrito, a contagem do número de células viáveis de *Streptococcus agalactiae* e sua relação com concentração de nisina permitiu a determinação de sua atividade biológica. Para isto, suspensão com cerca de 800.000 UFC/mL foi empregada. A curva dose-resposta resultava da relação dos valores do logaritmo do número de sobreviventes contra concentração de nisina. Neste trabalho foi observado que com aumento do tempo de incubação havia diminuição da atividade da nisina, falseando o resultado. Assim, foi sugerido relacionar o tempo requerido para o microrganismo iniciar seu crescimento com a concentração do antibiótico. No entanto, a aplicação rotineira de medida do tempo não foi viável, sendo então utilizada satisfatoriamente a medida de pH para relacionar o tempo quando ocorre o início do crescimento do microrganismo. O método foi

denominado ensaio da fase *lag* com emprego de *Streptococcus agalactiae*. A exatidão para o método de diluição com azul de metileno depende do fator adotado entre as diluições. No ensaio com ação bactericida, a exatidão conseguida foi cerca de $\pm 32 \%$, enquanto no de fase *lag*, de $\pm 10 \%$. Método descrito por BERRIDGE e BARRETT¹⁶, utilizando o *Streptococcus agalactiae*, requereu 30 minutos de incubação quando o inóculo se encontrava na fase logarítmica de crescimento, condição em que a turvação aumentou de duas a três vezes. A diluição das amostras foi realizada com seringas padronizadas e os meios de cultura, distribuídos rapidamente com máquina de enchimento de ampolas, operada manualmente e possibilitaram o preparo de sete diluições seriadas, cada conjunto, na razão de um conjunto por minuto.

FALK⁶⁰, em 1953, descreveu procedimentos para laboratórios da rede oficial de saúde, objetivando colaborar no diagnóstico de doenças infecciosas e no estudo da terapia adequada, com vários antibióticos rotineiramente utilizados em setores da saúde pública. O ensaio de escolha foi o método de diluição em tubos, por permitir resultados mais exatos e com distinção entre níveis bacteriostático e bactericida. O autor recomendou controle dos meios de cultura, avaliação quanto à condição de esterilidade de cada lote, a capacidade de crescimento dos microrganismos-teste nos mesmos e conhecimento de sua sensibilidade ao antibiótico em questão.

2.5.1.2. Método turbidimétrico

O primeiro método turbidimétrico considerado preciso, descrito por FOSTER⁷³ em 1942, tratava-se de um procedimento para o ensaio da penicilina empregando *Staphylococcus aureus* cepa denominada Oxford, colocada em caldo nutriente. O ensaio foi realizado com quantidades crescentes da penicilina que produziram inibição de crescimento do microrganismo proporcional à concentração, permitindo realizar determinações quantitativas. O procedimento envolveu a comparação em paralelo quanto à inibição de crescimento microbiano de várias diluições da amostra desconhecida com várias diluições do padrão. O

período de incubação foi de 16 horas sendo reduzido posteriormente para 4 horas. Mas por ser um método ainda pouco empregado foi considerado tedioso e trabalhoso. Trabalho publicado por FOSTER e WOODRUFF⁷⁶ em 1943, descreve diferentes métodos microbiológicos, dos quais, o método turbidimétrico é aquele que proporciona exatidão dos resultados entre 10 a 15 %, sendo porém trabalhoso para ensaios de rotina. Foram relatadas variações no perfil da curva dose-resposta tornando evidente o emprego cuidadoso desta metodologia. Destacaram a influência da presença de glicose no meio de cultura que causariam desvios na turbidimetria, tanto para *Staphylococcus* como para vários outros microrganismos, sendo também confirmado por FOSTER e WILKER⁷⁴. A inativação ou modificação da molécula de penicilina, quando colocada em presença da glicose antes da inoculação ou mesmo a interferência no mecanismo de inibição normal da penicilina podem favorecer a obtenção da curva de inibição de crescimento anormal. Porém, resultados conflitantes foram obtidos por BOND e DAVIES¹⁹, em que apesar da glicose, a curva de crescimento se manteve regular. Ainda sobre a técnica de 4 horas, foi de grande importância para a determinação da penicilina em caldos de fermentação durante o processo produtivo quando a quantidade máxima do antibiótico era atingida. A cultura de *Penicillium notatum* mantinha a potência da penicilina no caldo por curto período de tempo. Desta forma, alta concentração do microrganismo era empregada para acelerar a visualização do crescimento microbiano, ocasionando a diminuição da sensibilidade da metodologia. FOSTER e WILKER⁷⁴ aperfeiçoaram o método empregando *Bacillus adhaerans*, devido ao seu rápido crescimento e sensibilidade à penicilina semelhante à do *Staphylococcus aureus* cepa H, acrescentando procedimento de agitação do meio de cultura durante a incubação para agilizar a obtenção dos resultados. Com tal procedimento o tempo de incubação foi reduzido de 16 para 3 a 5 horas. As variações que podem influenciar nos resultados de leitura turbidimétrica foram aqueles relacionados com a diferença no tamanho dos tubos de ensaio e no ciclo de crescimento e lise dos microrganismos. Amostras de penicilina possuíam bactérias contaminantes provenientes do caldo de fermentação e ocasionavam interferência no ensaio. Assim, foi verificado a necessidade de eliminar os contaminantes através de técnica de filtração ou pasteurização das amostras, desde que amostra e padrão

fossem tratadas da mesma forma para minimizar variação da potência devido ao procedimento de descontaminação. Os autores constataram que o emprego de inóculo de grande concentração e período de incubação de 4 a 5 horas conduzia a resultados mais adequados. A mesma metodologia foi descrita minuciosamente por JOSLYN¹¹⁸ em 1944 empregando *Staphylococcus aureus* (National Institute of Health nº 209) e 4 horas de incubação, tendo a vantagem de realizar a leitura turbidimétrica diretamente no tubo teste após interromper o crescimento microbiano colocando os tubos em banho de água gelada. A leitura óptica considerada satisfatória para o final da incubação e construção da curva dose-resposta foi de 0,27 a 0,34.

LEE e colaboradores¹³⁰ substituíram o *Staphylococcus aureus* pelo *Streptococcus agalactiae* do grupo B de Lancefield empregando também cultura em grande concentração com incubação por no máximo 90 minutos. Neste trabalho, o autor recomendou o emprego de formol para cessar o crescimento microbiano e evitar a variação da turbidimetria que poderia ocorrer durante a etapa de leitura da turbidez. Foi feita a comparação entre a substância padrão e o desconhecido empregando-se 6 tubos para cada padrão e amostra desconhecida em série de concentrações de 0,01 a 0,2 Unidades de penicilina por mL. Também, RAKE e JONES¹⁷⁴ propuseram método turbidimétrico utilizando o *Streptococcus* com possibilidade de leitura em cerca de 3 a 4 horas.

O estudo relacionado com a influência do pH em diferentes concentrações da penicilina no meio de cultura, realizado por FOSTER e WILKER⁷⁴, mostrou que a variação do pH não alterava a inibição de crescimento microbiano quando mantido o pH do meio entre 4,8 a 7,9, faixa em que a penicilina permanece estável, sendo rapidamente inativada fora deste intervalo. O pH de máxima estabilidade foi 5,8.

Em 1944, MACMAHAN¹⁴⁸ descreveu um método turbidimétrico semelhante ao de FOSTER⁷³, empregado para o controle de qualidade de rotina na indústria de produção da penicilina. O meio de cultura utilizado foi o caldo nutriente acrescido de 0,4 % de extrato de levedura que auxilia na obtenção da curva dose-resposta mais adequada. O procedimento técnico envolveu série de tubos em duplicata com até 0,12 mL de uma solução estoque do padrão com concentração

de 5 U/mL. Da mesma forma, de uma solução estoque da substância desconhecida foram transferidos 0,02 a 0,16 mL para série de tubos, cuja concentração estimada estava entre 2 a 5 U/mL. Todos os tubos de ensaio receberam 7 mL de meio de cultura previamente inoculado com 6,5 % de cultura jovem de *Staphylococcus aureus* cepa H. A incubação foi feita simultaneamente a 37 °C por cerca de 3 horas e os tubos colocados no vapor de água por cerca de 10 minutos a fim de esterilizá-los e evitar alteração na turbidimetria durante a leitura. Foi também recomendada a utilização de banho de água provido de agitação durante a incubação dos tubos^{19,148}. Um dispositivo automático para esvaziar por sucção a célula onde é feita a leitura foi desenvolvido para agilizar a leitura no aparelho fotométrico. O método foi comparado com o de diluição seriada e de cilindro em placas. Detectou-se que o tempo dispendido é semelhante ao método do cilindro em placas, sendo que a precisão é maior. O método de diluição seriada foi mais rápido que os anteriores, porém requerendo maior número de repetições do teste para obter a mesma precisão. Consiste portanto em método mais trabalhoso. Outro procedimento para economizar tempo operacional, foi introduzido por JOSLYN¹¹⁸ consistindo do emprego de tubos contendo o meio de cultura que são colocados diretamente no aparelho de leitura. MACMAHAN¹⁴⁷ propôs a utilização de pipetas especiais com medida exata e rápida das soluções-teste. O método turbidimétrico foi adaptado para a determinação de outros antibióticos. No caso de doseamento da penicilina no sangue pelo método de MACMAHAN¹⁴⁷, ocorreram limitações, mas a precisão foi suficiente tendo grande sensibilidade. A curva padrão foi linear na faixa de concentração de 0,001 a 0,01 U/mL após 4 horas de incubação empregando *Streptococcus haemoliticus*.

A exatidão do ensaio turbidimétrico foi estudada em 1948 por BOND e DAVIES¹⁹. Retas paralelas foram obtidas através da metodologia empregando *Staphylococcus aureus* cepa Oxford e a cepa americana NRRL 313. Neste trabalho, foram utilizadas três concentrações do padrão e da amostra. Relacionando-se a resposta medida de turvação com o logaritmo da concentração do antibiótico a linearidade da reta foi observada. No estudo comparativo realizado pelos autores, o erro padrão para os ensaios de diluição em tubos, de cilindros em placas e turbidimétrico foram respectivamente, 10, 4 e

4 %. As desvantagens levantadas no trabalho, comparando-se os métodos de diluição seriada com o turbidimétrico incluem a necessidade de esterilização do meio de cultura e das soluções-teste da penicilina, a necessidade de grande número de tubos para cada amostra e grande erro padrão do método. Dentre as vantagens foram destacadas o emprego de uma série do padrão para todas as amostras simultaneamente analisadas, bem como o tempo de incubação de no máximo 4 horas, tornando dispensável o uso de soluções-teste esterilizadas.

Com o objetivo de desenvolver método adequado para determinação da potência de antibióticos em preparações analíticas, JOSLYN e GALBRAITH¹¹⁹ estudaram curvas de crescimento de várias bactérias patogênicas em diversas condições experimentais. No início do estudo, resultados mostraram que após o período de incubação de 4 horas, o crescimento atinge um máximo e começa a decair. No entanto, na presença de um antibiótico, o crescimento foi regular quando na presença de concentrações crescentes da substância antimicrobiana. Quando a concentração foi muito elevada o crescimento se tornou menos ordenado. Em prosseguimento ao estudo foi determinada vantagem da supressão da fase *lag* de crescimento, empregando um inóculo jovem. O ponto final do ensaio foi determinado como sendo aquele que inibe o crescimento microbiano em 50 % em relação ao tubo controle.

GAVIN⁸³ publicou extensa revisão relacionada com o método turbidimétrico aplicado a antibióticos e vitaminas, destacando as suas vantagens e desvantagens. Fatores que influenciam o método turbidimétrico e a sua precisão, bem como o procedimento para a leitura da turvação foram relatados. O autor classificou o ensaio turbidimétrico em duas categorias, tendo como base o tipo de resposta. A primeira envolvia a resposta tudo ou nada, do tipo qualitativo e a segunda a resposta gradual, método quantitativo.

Outra extensa revisão foi publicada por LOY e WRIGHT¹⁴¹, em 1959, incluindo as vantagens e desvantagens do ensaio turbidimétrico. Todas as etapas de desenvolvimento e aplicação da metodologia foram abordadas no referido estudo. Procedimentos referentes à utilização adequada dos padrões de referência, os microrganismos, os meios de cultura, a preparação da solução-teste, englobando também a preparação dos tubos, a medida da resposta do

teste e as exigências das condições do teste a fim de obter respostas precisas e uniformes foram discutidos. O autor destacou a necessidade da utilização do padrão de referência puro, microrganismo sensível à substância testada, meio de cultura com composição conhecida, amostras preparadas com precisão e em condições de liberar o princípio ativo, eliminação dos interferentes, preparação cuidadosa dos tubos de ensaio e resposta medida com precisão através de métodos exatos como a titulometria, turbidimetria, gravimetria ou outra técnica adequada.

O método turbidimétrico automático para detecção do dióxido de carbono, segundo PLATT e colaboradores¹⁶⁶ apresenta limitação por ter seu uso restrito somente àqueles microrganismos capazes de produzir alta taxa de dióxido de carbono sob as condições de análise. O ensaio foi estabelecido para vários antibióticos com exceção dos antibióticos resistentes ao microrganismo-teste. Foi necessário um período de 24 horas para o ensaio de 50 amostras, sendo que 8 horas foram despendidas com a execução técnico-operacional e 16 horas restantes para encerrar o ensaio.

Método turbidimétrico automático semelhante desenvolvido por Di CUOLLO e colaboradores⁴⁶, cujo equipamento foi denominado Autoanalyzer, introduz continuamente o inóculo, meio de cultura e amostras diluídas no aparelho. A metodologia envolveu a diluição contínua das amostras, através da retirada de volume a fluxo variado e adição de diluente a taxa equivalente. A mistura com meio inoculado permaneceu incubada por 1 hora, e o crescimento foi automaticamente medido em potenciômetro. O ensaio em Autoanalyzer® foi empregado para a determinação da tetraciclina e neomicina, através da construção da curva dose-resposta.

Em 1965, McMAHAN¹⁴⁷ estabeleceu as etapas básicas do ensaio turbidimétrico de antibióticos e vitaminas, tendo como finalidade a transferência de trabalho altamente repetitivo a máquinas, diminuindo erros, bem como a fadiga e monotonia inerentes ao procedimento analítico. Foi obtida uma economia de mão de obra em cerca de 30 % com capacidade para 50 testes por hora.

KAVANAGH¹²¹ demonstrou que a automação nas etapas críticas do ensaio turbidimétrico resultou em aumento significativo da precisão e exatidão. A

interpolação de dados da amostra através de um computador em sistema *on line* permitiu a obtenção de resultado após 5 minutos da última leitura da amostra.

RIPPERE¹⁸⁴ validou o método turbidimétrico obtendo uma curva padrão considerada adequada, na faixa de absorbância de 0,4 a 1,2. O autor destacou a exatidão e precisão do método em relação à difusão. Para a medida do crescimento bacteriano foi estabelecida a importância da seleção do espectrofotômetro para assegurar medidas exatas.

O conhecimento de que os métodos de dosagem microbiológica são menos precisos que os ensaios químicos, levaram BERTANI e colaboradores¹⁷ em 1979, a verificar a grandeza desta menor precisão. Para isto, os autores realizaram ensaios em oito diferentes laboratórios de matérias-primas de vitamina B₁₂ e tetraciclina. Na dosagem da tetraciclina foram obtidos resultados de quatro diferentes laboratórios empregando os métodos turbidimétrico e de difusão em placas. O método turbidimétrico mostrou-se mais preciso que o método em placas. Na determinação de B₁₂, foram encontrados diferenças na precisão em ensaios realizados por diferentes laboratórios.

2.5.1.3. Considerações gerais sobre os métodos de difusão em gel

Este método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de mono ou bicamada, através do qual a substância-teste se difunde. A solução-teste é aplicada sobre a superfície do meio, em uma área restrita, e as placas são então incubadas. O crescimento do microrganismo ocorre respeitando, porém, áreas onde tenha ocorrido a difusão do antibiótico, gerando contraste e resultando a chamada zona de inibição de crescimento. Tal fenômeno originou toda a teoria que embasa o método de difusão.

A necessidade de monitorar caldos de fermentação de penicilinas induziu CHAIN e colaboradores³⁴, em 1940, à busca de metodologias menos exigentes, a fim de medir o halo das zonas de inibição de crescimento, provocado pela amostra, comparativamente ao padrão do antibiótico. Este trabalho foi o início de uma série de experimentos, como o de ABRAHAM e colaboradores³, que um ano

depois, divulgaram estudo sobre os dispositivos de transferência das soluções sobre a superfície do meio de cultura inoculado, os cilindros de vidro ou porcelana vítrea.

Em 1942, FLEMING⁷⁰ propôs melhoria metodológica, passando a dispensar as soluções-teste do padrão e amostra em sulcos no meio de cultura e inóculo na forma de estrias. Contornava-se, assim, a interferência de material particulado presente nas amostras, como no caso do sangue.

Outra evolução metodológica decorreu de estudos de FOSTER e WOODRUFF⁷⁵, pois em vez de derramar a suspensão aquosa do microrganismo sobre o meio já solidificado, efetuava a inoculação do germe no gel ainda fluido para posterior transferência à placa de Petri. Os mesmos autores⁷⁵ sugeriram a substituição do *Staphylococcus aureus* cepa H por *Bacillus subtilis*, uma vez que o primeiro, na presença de penicilina apresentava lise espontânea, ocasionando pouco contraste na zona de inibição de crescimento. Outra vantagem residia no fato de permitir a inoculação dos esporos na temperatura que evitasse a solidificação rápida do meio de cultura. Por sua vez, como envolve germinação de esporos, a distância de difusão do antibiótico era maior no caso do *Staphylococcus aureus*, resultando também em halos maiores.

Em relação ao mecanismo de dispensação do antibiótico, simultaneamente VINCENT e VINCENT²¹¹ e SHERWOOD, colaboradores¹⁸⁹ e BEER e SHERWOOD¹⁴ propuseram, no método de difusão em gel, a substituição dos pequenos cilindros por discos de papel de filtro. Estes eram saturados com solução de penicilina, como reservatório de antibiótico a ser difundido no meio inoculado, reduzindo o trabalho e tempo envolvidos no teste, além de facilitar a manipulação das placas.

A determinação quantitativa da estreptomicina com o *Bacillus subtilis* como microrganismo-teste, descrita por LOO e colaboradores¹⁴⁰ em 1945, evidenciou vantagens da técnica com discos de papel, em comparação com cilindros, além das citadas anteriormente. Permitiu a aplicação da técnica em amostras diluídas em solvente orgânico e a manipulação das placas sem precauções especiais. No entanto, os autores determinaram um ponto crítico para o uso dos discos de papel, que foi a necessidade de aplicação rápida e em quantidade constante das

soluções-teste nos mesmos. Assim, foram descritas técnicas de transferência através de alçadas da solução-teste²⁰⁰ ou de embeber os discos estéreis nas soluções antes de serem colocadas nas placas^{14,214}. Ainda, LOO e colaboradores¹⁴⁰ indicaram como ponto crítico da técnica de disco de papel, a necessidade de distribuição de volume constante de 0,1 mL através de pipeta graduada, tornando o procedimento lento, trabalhoso e redundando em erros sistemáticos. DAVID e McGUIRE⁴¹ descreveram um dispositivo automático para o enchimento e esvaziamento de pipetas, aumentando a velocidade das operações de ensaio de rotina, sendo que a média de distribuição das soluções-teste foi de oito discos por minuto.

Dentre muitas publicações, SCHIMIDT e MOYER¹⁸⁸ e HAYES⁹², respectivamente em 1944 e 1945, descreveram detalhadamente os procedimentos analíticos da técnica de cilindros em placas, relacionando os fatores que afetam o uso do dispositivo de REEVES e SCHIMIDT¹⁷⁸. No trabalho de HAYES⁹², destaque foi dado ao estudo da influência da espessura da camada de ágar na definição e clareza dos halos de inibição de crescimento. SNELL e LEWIS¹⁹² em 1959, alertaram quanto ao cuidado na utilização de cilindros de aço inox, indicados no método oficial da Food and Drug Administration (FDA). Cinco dos sete antibióticos testados mostraram perda da potência resultante do contato das soluções-teste com cilindros de aço inox.

No trabalho de PRATT e DUFRENOY¹⁷⁰, foram citadas a utilização de microrganismos na fase logarítmica de crescimento devido a maior sensibilidade à penicilina. Para isto, foi sugerida a pré-incubação das placas semeadas por 3 horas e 2 horas, respectivamente, para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* antes de colocar as soluções, seguida de reincubação das placas pelo mesmo tempo.

Os estudos envolvendo ensaio de difusão para antibióticos eram inicialmente restritos, não permitindo extrapolações abrangentes aos novos antibióticos que surgiam. Assim, justificava a investigação dos fatores de interferência sobre zonas de inibição e tratamento teórico quanto à inclinação das curvas dose-resposta. Este enfoque iniciou-se com COOPER e WOODMAN⁴⁰ em 1946, que estudando a teoria de difusão em ágar utilizaram solução de cristal

violeta em tubos. A curva construída da relação entre distância de difusão e o tempo conduziu à reta. Os autores pesquisaram a difusão de antissépticos e da penicilina através do ágar e, quando utilizado o cilindro como reservatório da solução-teste encontraram boa correlação entre o diâmetro da zona de inibição de crescimento estabelecido teoricamente e aquele obtido na prática. Contudo, a fórmula derivada para o estudo considerou a difusão linear e não radial, admitindo ser a concentração do antibiótico constante nos cilindros durante as primeiras 8 horas. No entanto, os estudos de RAGHEB¹⁷¹ demonstraram haver relação direta entre volume da solução no cilindro e a distância de difusão, quando se considera uma determinada concentração. Foi incluída na equação o termo que explicaria a influência da espessura da camada de ágar.

No estudo de HUMPHREY e LIGHTBOWN¹⁰⁵, considerou-se a difusão do antibiótico em placas de Petri, a partir de recipientes colocados na superfície do meio de cultura, bem como a espessura da camada de ágar. A concentração do antibiótico ao redor da fonte, onde colocado, pode ser expressa teoricamente por equação envolvendo a concentração inicial a uma dada distância, a espessura da camada de ágar, a constante de difusão e o tempo envolvido. Os autores mostraram que a distância de difusão ao quadrado estava relacionada com o logaritmo da espessura do ágar. Quando camadas do meio com espessura menor que 1 cm foram utilizadas, o tamanho das zonas de inibição de crescimento apresentava menor sensibilidade a variações deste elemento. A validade desta equação foi confirmada pela medida constante de difusão da penicilina, estreptomicina e aureomicina e da concentração crítica dessas substâncias para inibir os microrganismos-teste; foram determinados, também, os valores do tamanho do halo de inibição de crescimento após variar o período de difusão. O fator determinante na inclinação da curva dose-resposta é a constante de difusão do antibiótico, bem como o tempo, pois quando prolongado, poderia aumentar a inclinação.

COOPER e WOODMAN⁴⁰, com a equação proposta para estudo da difusão, relacionaram o diâmetro da zona de inibição a certos parâmetros usados para estudar a influência das variações técnicas dos ensaios. Estudaram o tempo de pré-difusão, densidade do inóculo em relação à sua influência sobre o

tamanho dos halos, composição e espessura do meio de cultura. A equação de Cooper foi utilizada para demonstrar a grandeza do erro devido a variações dos parâmetros da própria equação. Esta equação é aplicável a métodos de disco de papel, cilindros e reservatórios como furo no gel, assim como na difusão linear em tubos da qual foi derivada.

Na teoria de difusão, a concentração crítica foi considerada aquela concentração mínima capaz de inibir o crescimento da população microbiana em questão. Segundo HEWITT¹⁰⁰, a concentração crítica é quatro vezes maior em relação à concentração mínima inibitória.

O tempo crítico, isto é, o tempo de incubação no qual o tamanho dos halos é definido, depende da fase *lag* de crescimento e do tempo de geração do microrganismo sendo, portanto, dependente também da temperatura e do tamanho do inóculo inicial. Por outro lado, a concentração do antibiótico não interfere no tempo crítico¹⁰⁰. Assim, concentração crítica e população crítica são decisivas na definição da posição do limite da zona de inibição de crescimento. Esta zona, então, é influenciada pela difusão do antibiótico ou pelo tempo necessário para alcançar a população crítica.

A necessidade do dimensionamento das zonas de inibição conduz à exigência de inóculo com população microbiana homogênea, proporcionando população crítica constante definida e sem tendência à lise. Assim, através da equação estabelecida foi possível, embora com exatidão reduzida, a determinação teórica dos valores de diâmetro para diferentes concentrações do antibiótico, assim como do tempo de difusão envolvido e cálculo da constante de difusão.

Num estudo similar ao de COOPER e WOODMAN⁴⁰, BRADY e KATZ²¹, consideraram a constituição do meio, volume do cilindro, espessura do ágar e temperatura de incubação como sendo fatores que determinam a otimização do ensaio. Utilizando clortetraciclina e *Bacillus cereus*, quando a temperatura de incubação e nível de nutrientes no meio de cultura foram inferiores aos normalmente utilizados, as zonas de inibição foram maiores. A espessura do ágar foi o fator que mais influenciou a variabilidade da resposta, pois quanto mais fina

a camada, maior o efeito do volume contido no cilindro sobre a distância de difusão.

GAVIN⁸² estudou diferentes aspectos da difusão de substâncias no ágar e as interferências físicas sobre o fenômeno. Assim, a espessura e uniformidade do ágar para uma série de placas é fundamental, o que é conseguido através da seleção de placas com fundo plano, tamanho uniforme e do controle rigoroso do volume de ágar transferido para cada uma. O autor recomendou, ainda, a secagem das placas com meio distribuído para evitar a formação de estrias. Também destacou a influência da qualidade do ágar e da sua origem, bem como a sua concentração sobre o resultado do ensaio.

LEES e TOOTILL¹³² verificaram que o microrganismo tem como exigência básica, o pH da solução-teste, cujo valor da faixa adequada é favorável, também, para a atividade e estabilidade das substâncias testadas. Assim, foi recomendada a utilização de solução-teste com pH próximo àquele de crescimento ótimo do microrganismo como condição ideal, embora o tamanho das zonas de inibição de crescimento variem com o pH. Este autor estabeleceu que a condição ótima de pH das soluções-teste e do meio de cultura deve ser definida empiricamente para cada caso. Em relação à temperatura de incubação, os mesmos autores estabeleceram que deve haver uma combinação entre tempo e temperatura de incubação. A substância a ser testada pode requerer uma temperatura de incubação específica, sendo que o tempo pode variar de 3 a 30 horas, dependendo do microrganismo-teste.

HEATLEY⁹⁴ verificou que o *Bacillus subtilis* mostra resultados satisfatórios em 3,5 horas para temperatura de incubação de 37 °C ou em 18 horas de incubação entre 25 a 28 °C. Sendo a velocidade de difusão da substância no ágar determinante do tamanho da zona de inibição, GAVIN⁸² considerou que somente após a difusão da substância testada, antes da multiplicação microbiana, ocorre a formação do halo de inibição de crescimento. Assim, zonas de inibição maiores podem ser obtidas alterando a fase *lag* do crescimento através da refrigeração das placas ou mantendo as placas a temperatura ambiente após a colocação das soluções-teste.

Em 1954, DeNUNZIO e colaboradores⁴³ e FRIEDMAN e KIRSHBAUM⁷⁸ relataram metodologias para ensaio de mistura de antibióticos. O primeiro trabalho descreveu metodologia para ensaio de neomicina na presença de diidroestreptomicina, utilizando o *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* resistente a este último. No segundo trabalho, o procedimento para dosagem de bacitracina e penicilina na presença de diidroestreptomicina foi apresentado. Para isto, cepas de *Micrococcus flavus* foram preparadas para adquirir resistência à diidroestreptomicina quando o ensaio era da bacitracina, e *Sarcina lutea*, para penicilina. Na determinação da potência de cada um dos antibióticos composto por neomicina e polimixina B, THOMAS e THOMPSON¹⁹⁵ verificaram que, apesar de não ser recomendada pelas autoridades oficiais, bem como envolver pesquisa dispendiosa, a utilização de padrões em mistura na determinação da atividade em amostras contendo mais de um antibiótico é a técnica de escolha.

DiCUOLLO e colaboradores⁴⁶ descreveram método microbiológico automatizado para determinação da penicilina, utilizando placas grandes em que 96 amostras foram testadas simultaneamente. Para maior rapidez do ensaio, as amostras foram inclusive diluídas automaticamente. Após incubação, as placas foram fotografadas em filme polaróide, seguida de revelação e os diâmetros, medidos através de aparelho com capacidade de aumentar em 20 vezes a imagem dos halos de inibição. Os dados foram impressos e a potência calculada manualmente. Dentre as vantagens do método estão a economia de tempo e custo material em aproximadamente dois terços, uniformidade na aplicação das amostras e diminuição da possibilidade de erro humano. No trabalho, os autores utilizaram solução de cloreto de trifêniltetrazólio a 0,04 %, adicionado ao meio superfície inoculado com o microrganismo-teste. As zonas de inibição de crescimento foram facilmente visualizadas pelo contraste devido a cor vermelha originada pela redução do corante, formando uma substância insolúvel, o formazano. As fotografias foram feitas empregando filtro azul que aumentava o contraste de cor devido à redução do corante, cuja documentação apresentou a vantagem de manter o registro dos resultados do ensaio, disponíveis para referência futura. Empregando o mesmo corante YAMAMOTO e PINTO²¹⁸ padronizaram método rápido de difusão em placas para a determinação da potência da neomicina em preparações farmacêuticas. As placas em bicamada

foram preparadas conforme a metodologia oficial empregando o *Staphylococcus epidermidis* como microrganismo-teste e diferentes períodos de incubação. Após períodos de incubação de 4 a 24 horas, o cloridrato de trifeniltetrazólio foi aplicado sobre o meio de cultura inoculado. Foi verificado que com 7 horas de incubação e subsequente revelação por meio do corante, contraste dos halos de inibição foi adequado e possibilitou a sua leitura em aparelho óptico. A comparação deste método empregando o revelador, com o método oficial convencional que requer de 18 a 24 horas de incubação, mostrou a aplicabilidade do recurso com redução no tempo de incubação, sendo comprovada pela análise estatística dos resultados.

KABAY¹²⁰ em 1971, propôs um método de ensaio rápido, tendo sido testados 14 antibióticos com o mesmo. As placas com *Bacillus stearothermophilus* e cilindros foram incubadas por 4 horas a 65 °C; os halos foram facilmente medidos a olho nú. O autor comparou este novo método com o convencional recomendado pelo Code of Federal Regulation (CFR), tendo sido detectada diferença na precisão entre os dois; o coeficiente de variação para réplicas de testes foi menor que 2 % para ambas.

Dentre os fatores que influenciam o ensaio microbiológico está o meio de cultura. Assim, FREEMAN e colaboradores⁷⁷ estudaram cerca de 1.000 libras de meio de cultura, perfazendo o total de 100.000 amostras testadas anualmente. Para isto, cada lote, antes de sua liberação ao mercado, foi submetido a série de triagens para investigar a obediência às exigências estabelecidas quanto aos fatores biológicos e físicos, em paralelo aos meios de cultura controle. O estudo envolveu procedimentos iniciando com registros do número do lote do meio, datas da preparação, pesagens e medidas efetuadas, tempo e temperatura de autoclavação e condições de armazenamento. Foram anotados, também, o tempo de incubação das placas, tamanho dos halos de inibição de crescimento, grau de turvação, inclinação da reta-padrão, diluições das soluções-teste, técnicas de diluição com a manutenção e calibração dos equipamentos.

O meio de cultura considerado ideal deve ter cor padronizada, ser de fácil manipulação e não apresentar formação de espuma. De 1973 a 1976 foram testados 31 lotes de meio de cultura. Destes, apenas 15 foram aceitáveis, sendo

que 12 não apresentaram sensibilidade dose-resposta e sete evidenciaram fatores de crescimento inaceitáveis. Falta de reprodutibilidade causou rejeição de quatro lotes, dentre os quais tiveram como causa fatores físico-químicos, viscosidade, dificuldade de manuseio, pH impróprio e falta de contraste nas zonas de inibição de crescimento. Inadequação de três lotes a um ou mais antibióticos testados levou à reprovação dos mesmos. Desta forma, oito tiveram falhas em várias categorias.

KONDO e ROSTAMIBASHMAN¹²⁷ relacionaram os fatores que alteram o contraste das zonas de inibição de crescimento, através da triagem dos aminoglicosídeos. Assim, foram considerados a sensibilidade do microrganismo-teste para o antibiótico, a variação dos meios de cultura, o pH do meio, o volume ou espessura do meio, a concentração do inóculo, o volume das soluções-teste contidos nos reservatórios, o tempo e temperatura de incubação. Em relação ao meio de cultura, os autores indicaram que em pH 7,9 os microrganismos apresentavam maior atividade. Diferentes recursos de aplicação da solução-teste, como discos de papel de filtro, reservatórios em formas de copo e de *swab*, apresentaram resultados semelhantes na distância de difusão. Meio de cultura em espessura menor, leva a maiores halos de inibição de crescimento. Por sua vez, de forma antagônica, aminoglicosídeos apresentam como característica a baixa difusibilidade¹²⁷, para se valorizar o aumento de sensibilidade provocado pelo primeiro; recurso adicional é portanto o da redução de carga microbiana, que também conduz a maiores halos de inibição de crescimento. Objetivando aperfeiçoamento dos métodos de difusão apresentados nos compêndios oficiais, por serem trabalhosos e morosos, BRADY e KATZ²² propuseram alternativas baseando-se no conceito de que o padrão e o desconhecido podem se constituir em ensaio de duas placas, com precisão e exatidão equivalentes ao método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC)⁹. Fizeram testes para bacitracina, clortetraciclina, oxitetraciclina e estreptomicina e os resultados obtidos com o método simplificado mostraram-se favoráveis quando confrontados com o ensaio da AOAC⁹ com relação à precisão e exatidão, tendo sido o coeficiente de variação para 10 réplicas de 2,5 a 6,8 %, com média de 4,3 %.

2.6. Determinação quantitativa das tetraciclinas

2.6.1. Métodos microbiológicos desenvolvidos

Em 1957, WINTERMERE e colaboradores²¹⁶ descreveram método empregando *Escherichia coli* ATCC 10536 como microrganismo-teste para o ensaio de vários antibióticos, inclusive a tetraciclina. Este método foi desenvolvido para antibióticos não associados ou que, quando em mistura, eram previamente separados. O pH do meio de dosagem após esterilização foi estabelecido como 7,0 a 7,1. A suspensão do microrganismo foi padronizada através de colorímetros para 40 % de transmitância em 650 nm. Após a preparação das soluções do padrão em ácido clorídrico 0,01 N para a construção da curva de calibração e da amostra, foi feita a transferência para os tubos, seguida da adição do meio inoculado com *Escherichia coli*. Imediatamente todos os tubos foram colocados a 37 °C por 3 a 4 horas em banho de água. No final do tempo de incubação foi adicionado a cada tubo formaldeído para cessar o crescimento microbiológico. A leitura da turvação foi em espectrofotômetro a 530 nm. A determinação da potência envolveu a construção da reta de melhor ajuste através do cálculo dos pontos mais baixo (*L*) e mais alto (*H*) desta reta, empregando os valores de transmitância obtidos e as concentrações correspondentes das soluções-teste do padrão, conforme descrito no CFR³⁸. A determinação da concentração da amostra foi feita através da extrapolação da resposta obtida para a amostra nesta reta de calibração.

Os métodos microbiológicos para determinação da tetraciclina foram empregados para amostras que não apresentaram resultados confiáveis através de ensaios físico-químicos. Foram descritos métodos de diluição em meio líquido, turbidimétrico e de difusão em placas com recursos e modificações para agilizar a obtenção do resultado.

VIOLA e colaboradores²¹⁴ em 1970, compararam os métodos empregando *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* ATCC 9634. O estudo foi realizado por método turbidimétrico automático para a tetraciclina em mistura. A dificuldade

apresentada na metodologia empregando o *Bacillus cereus*, foi a sua esporulação incompleta, tendo como resultado, a precipitação da carga microbiana no fundo do tubo durante o período de incubação. Este problema foi contornado pela obtenção da esporulação completa do microrganismo, cultivado em meio de cultura contendo vários íons como magnésio, ferro, manganês e outros, possibilitando a padronização adequada da suspensão microbiana. Para a validação deste método, os resultados obtidos foram comparados com aqueles do método de difusão em placa, sendo demonstrada a correspondência entre as metodologias. A comparação através da análise estatística dos métodos comprovaram a validade do método turbidimétrico automatizado, que possibilita a agilização na obtenção dos resultados com economia de tempo de análise, mantendo a precisão e exatidão. Da mesma forma, a comparação entre os métodos em placa e o turbidimétrico automatizado mostraram resultados equivalentes.

ARRET e colaboradores⁷ apresentaram em 1971, trabalho de revisão dos métodos microbiológicos de ensaio de antibióticos, tanto de métodos novos como modificados. Em relação ao ensaio de difusão em placas para a determinação da doxiciclina, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 era recomendado como microrganismo-teste, com meio em dupla camada e curva padrão entre 0,064 a 0,156 µg/mL preparados em ácido clorídrico 0,1 N. O mesmo método com pequenas alterações foi descrito para o ensaio de oxitetraciclina e tetraciclina, sendo a curva-padrão de 0,64 a 1,56 µg/mL para ambas. No ensaio turbidimétrico recomendou-se o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, com uma curva-padrão para a doxiciclina de 0,064 a 0,156 µg/mL, enquanto que para a oxitetraciclina e tetraciclina a concentração era de 0,64 a 1,56 µg/mL. Os autores colocaram em tabelas, os dados referentes aos métodos de análise, incluindo o emprego de meio em dupla camada com volumes de 21 e 4 mL, para as camadas basal e superfície, respectivamente. No ensaio turbidimétrico, o volume de meio inoculado transferido para cada tubo foi estabelecido para 9 mL, sendo 1 mL da amostra. Indicaram o procedimento para a preparação da solução estoque do antibiótico no que se refere à concentração final para a construção da curva de calibração. Os valores sugeridos são aqueles recomendados pela FDA, que adotou por sua vez

os resultados obtidos dos laboratórios que receberam as certificações de registro do produto.

Um método potenciométrico com sensor de amônia foi descrito por SIMPSON e KOBOS¹⁹⁰, para o ensaio microbiológico de cloridrato de tetraciclina em preparações farmacêuticas. O método foi baseado no efeito inibitório do antibiótico na produção da amônia pelo microrganismo devido à redução do seu crescimento, sendo a *Escherichia coli* ATCC 23716 apresentada como reagente biológico mais adequado. Neste método, embora o crescimento da suspensão microbiana a uma quantidade que possa ser detectada exija um tempo de incubação de cerca de 16 horas, mudança da atividade metabólica, no entanto, pode ser detectada antes que o crescimento celular possa ser observado. Este método mostrou-se mais sensível para a determinação da tetraciclina, comparativamente ao método respirométrico¹⁹¹.

Os métodos de difusão para a determinação da tetraciclina recomendados em compêndios oficiais como AOAC¹⁰ ou CFR³⁸ e USP²⁰⁸ são laboriosos e demorados, devido principalmente à necessidade de preparação de grande quantidade de placas para minimizar as variações das respostas obtidas de diferentes placas. Neste sentido, método de análise desenvolvido para reduzir o número de placas necessário à dosagem de antibióticos por técnica de difusão foi desenvolvido por BRADY e KATZ²². A oxitetraciclina foi doseada com *Bacillus cereus* ATCC 11778 através do método de difusão em placas, modificado. Todas as soluções do padrão para a obtenção da curva de calibração e da amostra foram colocados na mesma placa. Portanto, cada placa consistiu em um ensaio independente. Estudo comparativo deste método simplificado empregando placa única ou réplicas de duas e três placas, com o método convencional foi realizado pelos pesquisadores. Resultados de coeficiente de variação e do teste de recuperação mostraram vantagem do ensaio em duplicata. Este método minimiza procedimentos analíticos e os custos sem a perda da exatidão, sensibilidade ou repetibilidade, quando comparado com a metodologia convencional.

2.6.2. Métodos microbiológicos oficiais

Os métodos descritos nas farmacopéias ao longo dos anos têm sofrido pequenas alterações quanto ao meio de cultura, espécie microbiana e inóculo, concentração da curva-padrão, natureza do diluente, camada de meio de cultura, mas o fundamento do método permanece inalterado.

2.6.2.1. Cloridrato e fosfato de tetraciclina

A Farmacopéia Americana publicou em 1955¹⁶⁴ o primeiro método microbiológico para a determinação do cloridrato de tetraciclina. Observação referente à comparação dos métodos microbiológicos com os físico-químicos recomenda o emprego do primeiro, quando existe a necessidade de determinar a perda da atividade do antibiótico. A técnica turbidimétrica recomendada nesta edição, empregava como substância de referência, o cloridrato de tetraciclina, no intervalo de concentração de 0,04 a 0,4 µg/tubo e 0,24 µg/tubo da quantidade teórica da amostra em solução-tampão fosfato pH 4,5. O microrganismo-teste recomendado foi o *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* PCI n° 209-P e ATCC 6538-P, cuja suspensão era preparada em caldo peptona e padronizada em espectrofotômetro para obter transmitância de 85 % a 650 nm. Desta suspensão, 4 a 5 % era transferida para o meio de dosagem específico, o caldo peptona. A temperatura de incubação recomendada foi de $37 \pm 0,5$ °C, com os tubos mergulhados em banho de água, por 3 a 4 horas. Para o controle do crescimento foi estabelecida a preparação de 20 tubos, sendo metade correspondente ao branco da leitura espectrofotométrica e outra metade aos tubos contendo meio inoculado e a solução do padrão de concentração mediana. A interrupção do crescimento microbiano após a incubação, realizada através da adição de 0,5 mL de formaldeído diluído foi recomendada, seguida de leitura à 580 nm. A potência mínima exigida foi de 85 % do teor declarado. A determinação da potência foi pela construção da reta de melhor ajuste através da obtenção dos pontos mais baixo (L) e mais alto (H) desta reta, conforme descrito no CFR³⁸.

Recomendou-se o reteste após ajuste nas concentrações das soluções-teste da amostra, no caso em que o resultado de teor se apresentasse menor que 50 e maior que 150 %.

A partir da XVI edição¹⁶⁵, a Farmacopéia Americana incluiu as monografias do cloridrato de tetraciclina, da matéria-prima e formas farmacêuticas, constando as especificações de qualidade. Nesta edição, somente o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P foi indicado como microrganismo-teste. Após a obtenção da suspensão microbiana, recomendou-se a preparação do meio de dosagem com inoculação da suspensão a 2 %. Foi estabelecido no método, a preparação da substância padrão nas concentrações de 0,146 a 0,395 µg/mL em solução-tampão fosfato 0,1 M a pH 4,5 a partir de uma solução-estoque de 1000 µg/mL preparada pela diluição ácido clorídrico 0,1 N, que poderia ser utilizada no intervalo de uma semana, quando armazenada sob refrigeração. Os cálculos para determinação da potência do antibiótico, descritos na edição anterior¹⁶⁵, permanecem inalterados.

Na sua XVII edição²⁰¹ a Farmacopéia Americana resumiu os parâmetros de determinação quantitativa em tabelas, mantendo a descrição do procedimento geral. A partir desta edição, não houve diferença metodológica significativa. Ocorreu alteração do tempo de armazenamento da solução-estoque do antibiótico em geladeira para um dia. A concentração do inóculo no meio de dosagem passou a ser de 0,2 a 0,6 %. Nas edições da USP XVIII²⁰² e XIX²⁰³, indicou-se a padronização da suspensão microbiana através do espectrofotômetro a 580 nm para obter transmitância de 25 %. Desta suspensão, foi estabelecido a transferência de volume entre 0,1 a 2,0 mL para cada 100 mL do meio de dosagem. Nas edições seguintes^{204,205,206,208}, recomendou-se inóculo de 0,1 % da suspensão, permitindo alteração desta concentração quando necessário para obter uma relação dose-resposta mais adequada. O microrganismo-teste recomendado para o ensaio turbidimétrico à partir da 20ª edição²⁰⁴ foi o *Staphylococcus aureus* ATCC 29737.

A especificação do teor foi de 90 a 120 %, presente na USP XIX²⁰³, e 90 a 125 % nas edições seguintes^{204,205,206,208}.

A monografia de cápsula de fosfato de tetraciclina foi descrita a partir na USP XX²⁰⁴, sendo recomendada a mesma metodologia descrita para cloridrato de tetraciclina.

Ensaio limite para 4-epianidrotetraciclina foi exigido a partir da 20ª edição²⁰⁴, sendo o limite estabelecido de 3 % para cápsula de cloridrato de tetraciclina.

No ensaio turbidimétrico, na 23ª edição²⁰⁸, pequena alteração foi constatada na metodologia em relação à temperatura de incubação que foi especificada entre 36 e 37,5 °C. No terceiro suplemento da USP XXIII²⁰⁷, a temperatura de incubação recomendada foi de 37 °C.

O procedimento para a determinação da potência do cloridrato de tetraciclina constou pela primeira vez na Farmacopéia Britânica em 1958²⁴, sendo descrito o método de difusão em placa ou em bandeja. O meio de cultura inoculado com *Bacillus pumilus* NCTC 8241 a 1 % foi recomendado. Diluente em pH de 5,8 e substância padrão no intervalo de concentração de trabalho de 2 a 20 UI/mL, e incubação das placas entre 37 a 39 °C, foram estabelecidos para a metodologia. Nas edições seguintes, o método de difusão permaneceu inalterado, exceto, a partir de 1973²⁷ quando a temperatura de incubação sugerida passou à faixa de 30 a 37 °C. A partir desta edição²⁷ também o método turbidimétrico foi incluído. Neste método, foi estabelecido *Staphylococcus aureus* NCTC 6751 como microrganismo-teste, solução de trabalho do antibiótico no intervalo de 0,015 a 0,04 UI/mL, com incubação dos tubos entre 35 e 37 °C por 3 a 4 horas.

A especificação do teor da parte ativa foi inicialmente de 80 a 120 % na Farmacopéia Britânica de 1963²⁵, sendo alterada nas edições seguintes^{26,27,28,29,30} para 95 a 105 %.

Em 1971, a Farmacopéia Européia⁵⁵ apresentou as duas metodologias, difusão em placas e turbidimetria, empregando *Bacillus pumilus* NCTC 8241, solução do antibiótico entre 2 e 20 UI/mL e temperatura de incubação entre 35 e 37° C e também *Bacillus cereus* ATCC 11778, solução do antibiótico entre 1 a 4 UI/mL e temperatura de incubação entre 35 a 37° C para o ensaio de difusão. Na turbidimetria, a metodologia recomendada empregava *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 e ATCC 6538-P, com solução do antibiótico diluído em tampão pH

8,0 para concentrações entre 0,015 e 0,04 UI/mL e temperatura de incubação entre 35 e 37 °C. Na edição seguinte⁵⁷, o microrganismo-teste recomendado para o método de difusão foi *Bacillus pumilus* NCTC8241 e CIP 7618 com temperatura de incubação de 30 a 37 °C. Além das duas cepas recomendadas na edição anterior⁵⁵, no ensaio turbidimétrico, a cepa de *Staphylococcus aureus* CIP 53156 foi sugerida. Tanto no ensaio de difusão como turbidimetria, as soluções-estoque do antibiótico preparadas em água, foram posteriormente diluídas em solução-tampão fosfato 0,1 M a pH 4,5 para obter as soluções-teste, sendo a temperatura de incubação recomendada de 35 a 37 °C.

As farmacopéias, Européia⁵⁸ e Internacional¹⁰⁶ apresentam somente monografia da matéria-prima de cloridrato de tetraciclina. Alterações mínimas dos procedimentos apresentados nas duas farmacopéias foram constatadas. Na Farmacopéia Internacional de 1979¹⁰⁶, os microrganismos recomendados foram *Bacillus pumilus* ATCC 14884 e NCTC 8241 e *Bacillus cereus* ATCC 11778, constando apenas o método de difusão em placas. As soluções-teste diluídas em solução-tampão fosfato com pH 4,5, nos intervalos de concentração de 2 a 20 UI/mL e 0,5 a 2 UI/mL e temperaturas de incubação de 37 a 39 °C e 30 a 33 °C foram determinadas, respectivamente, para *Bacillus pumilus* e *Bacillus cereus*. Em 1981 e 1988, a Farmacopéia Internacional^{107,108} publicou monografia contendo metodologias de dosagens microbiológicas idênticas às descritas na edição de 1979¹⁰⁶.

A metodologia que consta da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 2ª edição⁶³, emprega como microrganismo-teste *Sarcina lutea*, sendo recomendados dois delineamentos. A técnica de duas doses com concentrações das soluções do antibiótico de 10 e 20 µg/mL e 5 e 20 µg/mL, e técnicas da curva-padrão empregando soluções-teste com concentrações de 8 a 36 µg/mL foram descritas. A 3ª edição⁶¹, de 1977, apresenta a monografia da matéria-prima do cloridrato de tetraciclina, mas exclui a metodologia de determinação quantitativa. Na edição de 1988⁶² a Farmacopéia Brasileira não incluiu a monografia da tetraciclina, porém descreve os procedimentos gerais para os ensaios microbiológicos quantitativos. Para a tetraciclina foi recomendado o método turbidimétrico empregando o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P com os

mesmos procedimentos e condições técnicas apresentadas na Farmacopéia Americana 23ª edição²⁰⁸.

A Farmacopéia Francesa¹⁶³, apresenta a monografia da matéria-prima do cloridrato de tetracilina. Duas metodologias, de difusão e turbidimétrica, foram descritas para a quantificação do teor. O procedimento envolve, no método de difusão, a preparação da solução-estoque de 1000 µg/mL em solução de ácido clorídrico 0,01 N, sendo permitido seu armazenamento por uma semana a 20° C. As soluções-teste em tampão fosfato 0,1 M a pH 4,5, nas concentrações de 0,25 a 4 µg/mL e inóculo de *Bacillus cereus* e var. *mycoides* ATCC 9634 foram sugeridos para a dosagem. O método turbidimétrico foi apresentado empregando a mesma solução-estoque anterior, e soluções-teste nas concentrações de 0,06; 0,04; 0,03 e 0,02 ou de 0,08 a 0,015 µg/mL para curva padrão de cinco pontos e 0,08; 0,04 e 0,03 µg/mL para a amostra, com inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P foram sugeridos.

2.6.2.2. Cloridrato de doxiciclina

O procedimento metodológico para doxiciclina é semelhante ao da tetraciclina, sendo que a doxiciclina constou inicialmente na Farmacopéia Americana na edição de 1975²⁰³. O ensaio turbidimétrico empregando o microrganismo-teste, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, foi recomendado. O procedimento metodológico envolvia a preparação da suspensão microbiana com a padronização em espectrofotômetro a 650 nm e 25 % de transmitância, seguido de transferência para meio de dosagem na proporção de 0,1 a 2,0 %. O procedimento da preparação de solução-estoque de 1000 µg/mL em ácido clorídrico 0,1 N foi descrito, sendo recomendado seu armazenamento por 5 dias em geladeira. Para a preparação das soluções-teste cuja concentração era de 0,1 µg/mL o diluente recomendado foi a solução-tampão fosfato 0,1 M a pH 7,5. A especificação exigida para a cápsula de doxiciclina foi de 90 a 120 %. Nas edições seguintes pequenas alterações foram realizadas nos procedimentos descritos.

A partir da USP XX ²⁰⁴, as soluções-teste preparadas em água e inóculo de 0,1 % da suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 foram recomendadas para o ensaio turbidimétrico. Nas monografias, a partir de 1990²⁰⁶, o método recomendado foi o cromatográfico, estando o método microbiológico descrito no procedimento geral. Não consta da Farmacopéia Americana a forma farmacêutica drágea.

Em 1973, o cloridrato de doxicilina foi descrito pela primeira vez na Farmacopéia Britânica²⁷. O método de difusão em ágar, empregava o *Bacillus cereus* NCTC 10320 como microrganismo-teste, soluções-teste na concentração de 0,2 a 2,0 UI/mL, sendo a incubação de 30 a 37 °C. Outro método sugerido, turbidimétrico, tinha como microrganismo-teste o *Staphylococcus aureus* NCTC 7447, soluções-teste de 0,003 a 0,010 UI/mL e temperatura de incubação de 35 a 37 °C. Nas edições seguintes^{28,29,30} a metodologia não foi alterada, sendo que a forma farmacêutica drágea não foi descrita nas edições desta Farmacopéia.

Nas Farmacopéias Internacional¹⁰⁸ e Européia⁵⁷ as metodologias de ensaio microbiológico diferenciavam-se muito pouco. O procedimento recomendado, o método de difusão em placas, envolvia emprego de *Bacillus cereus* NCTC 10320 ou ATCC 11778¹⁰⁸ ou CIP 6452⁵⁷, com intervalo de concentração da solução-teste entre 0,2 a 2 µg/mL¹⁰⁸ e temperatura de incubação de 35 a 39 °C sem apresentar o intervalo de concentração do antibiótico⁵⁷.

A Farmacopéia Européia⁵⁷ recomendou tanto o método de difusão citado como o método turbidimétrico. Neste, era indicado o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, NCTC 7447 e CIP 53156 como microrganismo-teste, além de soluções-teste preparadas em água destilada e temperatura de incubação entre 35 a 37° C.

A Farmacopéia Brasileira incluiu pela primeira vez, a monografia da matéria-prima do cloridrato de doxiciclina na sua 3ª edição⁶¹, porém não descreveu método de quantificação. A 4ª edição⁶² apresenta a descrição geral dos métodos microbiológicos que inclui o método turbidimétrico para a determinação da doxiciclina empregando o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P. O procedimento foi semelhante ao descrito pela Farmacopéia Americana 23ª edição²⁰⁸.

2.6.2.3. Cloridrato de oxitetraciclina

O cloridrato de oxitetraciclina constou inicialmente na Farmacopéia Americana¹⁶⁴ em 1955, na forma farmacêutica de cápsula. Nesta edição, o único método de quantificação recomendado foi o físico-químico espectrofotométrico. A especificação recomendada para este método foi de mais que 90 % da quantidade declarada no rótulo. Em todas as publicações seguintes desta Farmacopéia, a metodologia de dosagem para a oxitetraciclina foi semelhante à da tetraciclina, diferenciando-se basicamente na concentração da solução-teste do antibiótico.

Nas edições de 1960¹⁶⁵ e 1965²⁰¹ a oxitetraciclina não foi descrita como monografia, voltando a constar na edição de 1970²⁰². Nesta última edição²⁰², foi descrita a solução-estoque de oxitetraciclina preparada em ácido clorídrico 0,1 N, a qual poderia ser empregada no intervalo de até quatro dias quando armazenada sob refrigeração. Desta solução recomendou-se a diluição das soluções-teste em tampão-fosfato 0,1 M a pH 4,5. A solução-teste com concentração mediana de 0,24 µg/mL foi estabelecida, da mesma forma que a suspensão do microrganismo-teste *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P em meio de dosagem

na concentração entre 0,1 a 0,2 %. A especificação estabelecida foi de 90 a 120 % do cloridrato de oxitetraciclina, mantida nas edições posteriores^{203,204,205,206,208}.

O microrganismo-teste indicado passou a ser *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, a partir da USP XX²⁰⁴, sendo que a concentração recomendada no inóculo foi de 0,1 %, sendo sugerida a alteração quando necessária, a fim de otimizar a relação dose-resposta.

Na Farmacopéia Britânica²⁴ de 1958, foi pela primeira vez incluída a metodologia de determinação microbiológica por difusão para a determinação da oxitetraciclina. Esta técnica analítica apresenta procedimentos semelhantes aos da tetraciclina em todas as suas edições^{24,25,26,27,28,29,30}. Em 1973, foi incorporado o método turbidimétrico. Os limites de especificação dos ensaios para o cloridrato de oxitetraciclina apresentadas nas edições de 1958 até 1993, sofreram modificações, constando teor de cloridrato de oxitetraciclina de mais que 94 % do valor declarado²⁴ e mais que 92,5 %²⁵ para a matéria-prima, e de 95 a 105 % nas edições seguintes^{26,27,28,29,30} para cápsulas de cloridrato de oxitetraciclina.

Nas Farmacopéias Internacional^{107,108}, Européia^{55,57} e Brasileira⁶³ as metodologias são semelhantes àquelas já descritas para o cloridrato de tetraciclina. Na 3ª edição da Farmacopéia Brasileira⁶¹, não foi incluída a monografia do cloridrato de oxitetraciclina. Na sua 4ª edição⁶², o método recomendado foi semelhante ao descrito para a tetraciclina, conforme relatado acima.

2.6.3. Determinação da tetraciclina através de métodos físico-químicos cromatográficos

Muitos trabalhos envolvendo a determinação das tetraciclinas e de seus produtos de degradação química ou fisiológica, por cromatografia líquida de alta eficiência, têm sido publicados^{6,8,11,13,32,35,64,65,91,96,98,112,196,197,198}. A determinação por métodos microbiológicos ou espectrofotométricos não permite a identificação ou diferenciação entre as próprias tetraciclinas, bem como de seus produtos de degradação, apresentando baixa sensibilidade e seletividade para detectar estas

substâncias. Portanto, o método CLAE tem sido o de escolha, devido à alta seletividade e sensibilidade de detecção, sendo muito empregado na determinação de produtos de degradação e impurezas, que estão presentes em pequenas quantidades na amostra.

As tetraciclinas são bases fortemente hidrófilas, que possuem na sua estrutura diferentes grupos funcionais, os quais tornam complexos os mecanismos de retenção nos sistemas cromatográficos. Por ser um composto muito polar, as fases móveis contendo grande proporção de água são empregadas¹⁴⁵. As formas anidro que possuem dois anéis aromáticos, são mais fortemente retidas em relação à tetraciclina e 4-epitetraciclina, com apenas um anel aromático.

Métodos cromatográficos em camada delgada foram inicialmente desenvolvidos no processo de separação das tetraciclinas por FERNANDEZ e colaboradores⁶⁵ e DIJKHUIS e BROMMETT⁵⁰ por volta de 1970. Métodos espectrofotométricos foram empregados para a determinação da 4-epitetraciclina, mas não conseguiram determinar pequenas quantidades da substância em amostras comerciais, principalmente devido à interferência da 4-epianidrotetraciclina. Assim, DIJKHUIS e BROMMETT⁵⁰ descreveram método de cromatografia em camada delgada empregando Kieselghur impregnado com solução de tampão citrato-fosfato a pH 5,5, contendo 10 % de glicerina com a finalidade de quantificar a 4-epitetraciclina e clortetraciclina presentes em amostras comerciais. Após a separação detectada pela formação das manchas nas placas cromatográficas, a porção correspondente à mancha foi retirada quantitativamente e eluída em ácido clorídrico 0,1 N. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro e fluorímetro, respectivamente, para a 4-epianidrotetraciclina e a clortetraciclina. O método apresentado permitiu obter boa separação e manchas com zonas bem definidas, podendo ser aplicado para determinar impurezas de outras tetraciclinas. O mesmo suporte, Kieselghur, impregnado com EDTA (etilenodiaminotetracético) a pH 7,5 e fase móvel contendo acetato de etila-acetona-água (10:20:3) e a pH 9 e fase móvel contendo água-acetona (1:10), empregados para a determinação quantitativa de tetraciclina, 4-epitetraciclina, anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina presentes em amostras de tetraciclina

foi estudado por FERNANDEZ e colaboradores⁶⁵, em 1969. Para as duas condições de pH, a separação foi possível para soluções com concentrações entre 20 e 40 µg/mL. As soluções-amostra foram obtidas por eluição do suporte após a separação, em ácido clorídrico 2 N e a medida da absorbância das soluções foi por espectrofotometria a 430 nm. Trabalhando com coluna cromatográfica, envolvendo a separação dos quatro compostos estudados por FERNANDEZ e colaboradores⁶⁵, ASCIONE e CHREKIAN⁸ empregaram a terra diatomácea adequadamente tratada com tampão a pH 7,0, para a análise de amostras de xarope de tetraciclina. As frações coletadas correspondentes aos compostos pesquisados foram diluídas em clorofórmio e a leitura da absorbância foi obtida a 366 nm. O teste de recuperação realizado para a mistura sintética de tetraciclina resultou em recuperação de 98 a 102 % para as quatro substâncias, mostrando ser um método exato. Esta mistura apresentava 10 %, tanto da anidrotetraciclina como da 4-epianidrotetraciclina. Para amostras comerciais que possuem quantidades de impurezas em décimos de porcentagem, a separação não foi precisa, tendo sido necessário um procedimento prévio de concentração. Com esta finalidade, FIKE e BRAKE⁶⁷ modificaram o método anterior empregando duas porções separadas da amostra. Uma das porções foi empregada para análise da tetraciclina e 4-epitetraciclina e a outra, para os derivados anidros. As condições cromatográficas foram as mesmas para as duas porções. A leitura espectrofotométrica da primeira porção ocorreu em 366 nm empregando célula de 1 cm. Porém, esta leitura não foi possível na fração 2, sendo necessário o emprego da célula de 5 cm em 435 nm para um ensaio exato. A precisão do método foi de 0,5 % para a determinação de amostras de tetraciclina.

LODI e colaboradores¹³⁹, considerando mais importante a determinação quantitativa da 4-epianidrotetraciclina em relação à 4-epitetraciclina propuseram em 1969, método de cromatografia em camada delgada empregando a celulose microcristalina em solução de cloreto de amônio a 0,05 % e corrida da fase móvel bidimensional, sendo as fases móveis de solução de EDTA 0,1 M com cloreto de amônio 0,1 % e de solução de clorofórmio saturado com EDTA 0,1 M com cloreto de amônio 0,1 %. Após o tempo de corrida, a área correspondente às manchas foram removidas das placas, e eluídas em ácido clorídrico metanólico 0,1 N. A

leitura da absorbância foi a 430 nm. Este método, no entanto, foi estabelecido para amostras contendo 2 % ou mais de anidrotetraciclina.

Em 1970, método de cromatografia em coluna foi publicado por GRIFFITHS e colaboradores⁸⁵ empregando Sephadex G-25 em coluna com 1,8 por 25 a 28 cm que foi equilibrado com tampão tris em cloreto de sódio 0,025 M a pH 9,0 para o ensaio de amostras de cápsulas, comprimidos e suspensão oral. A tetraciclina apresentou eluição mais rápida, a anidrotetraciclina foi intermediária e a 4-epianidrotetraciclina foi mais lenta. Este método de cromatografia em gel forneceu uma avaliação quantitativa e qualitativa sensível para a determinação de derivados anidros da tetraciclina em formulações complexas da tetraciclina.

Os métodos cromatográficos descritos, no entanto, são muito demorados e trabalhosos, não sendo suficientemente sensíveis para a detecção de pequenas quantidades de impurezas com boa precisão quando comparados com outros métodos cromatográficos.

A aplicação dos métodos CLAE para a determinação das tetraciclinas tem sido preferida dentre todos os métodos, como pode ser constatado pelo grande número de publicações descritas na literatura. Numa destas publicações, TSUJI e ROBERTSON¹⁹⁶, em 1974, relataram trabalho relacionado com o desenvolvimento de método cromatográfico para a determinação de várias tetraciclinas, empregando coluna polimérica com comprimento de um metro, e duas fases móveis, a primeira contendo metanol e EDTA 0,001 M em ácido fosfórico 0,01 M e fosfato dibásico de sódio 0,02 M, e a segunda composta por acetonitrila em EDTA 0,001 M e ácido fosfórico 0,01 M e fosfato dibásico de sódio 0,02 M, ambas a pH 2,5, modificando-se a concentração dos solventes através da eluição gradiente. A leitura após a eluição foi a 280 nm, sendo empregado como padrão interno, a prednisolona. A separação da tetraciclina, anidrotetraciclina, 4-epitetraciclina, 4-epianidrotetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foi possível em menos que 30 minutos, embora tenha ocorrido resolução pobre entre os picos da tetraciclina e 4-epitetraciclina e entre a anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina. O melhor sistema cromatográfico empregou fase móvel com metanol na concentração de 13 %, fluxo de 0,85 mL/minuto. A determinação da precisão do método, considerando oito réplicas de injeção da solução-teste da

substância referência, resultou em coeficiente de variação de 1,02 %. O limite de detecção de aproximadamente 10 ng de tetraciclina injetada, comprovou a sensibilidade do método. Na comparação deste método com aquele empregando coluna de terra diatomácea, a separação da tetraciclina requereu cerca de 6 minutos e 3 horas, respectivamente, para cada método. Ao investigar discrepância nos resultados de teor dos produtos de degradação resultantes da aplicação dos métodos CLAE em relação aos de cromatografia gasosa em coluna diatomácea, os autores indicaram que a possível formação destes compostos ocorria devido à epimerização nos dois últimos métodos mencionados. Foi constatado, também, que a epimerização pode ocorrer durante e após a preparação da solução-teste da tetraciclina em diferentes solventes, sendo recomendado a dissolução da amostra imediatamente antes da análise.

Com o objetivo de reduzir o tempo de análise e melhorar a separação das tetraciclinas do método descrito, TSUJI e ROBERTSON¹⁹⁷ trocaram a coluna polimérica por outra de 30 cm contendo octadecilsilano (ODS) ligado à partículas de sílica, mantendo a monitoração com UV a 280 nm. A fase móvel com fluxo gradiente de acetonitrila de 10 a 60 % e tampão-fosfato 0,02 M a pH 2,5 e fluxo de 1 mL/minuto por 11 minutos foi empregada com pressão resultante de 1000 psi. Foram analisadas amostras de cápsulas, comprimidos revestidos, xarope e suspensão oral. Pela comparação deste método com o anteriormente descrito, a resolução entre 4-epitetraciclina e tetraciclina aumentou de 0,93 para 2,29 e entre 4-epianidrotetraciclina e anidrotetraciclina passou de 0,43 para 1,50. O tempo de análise total, de cerca de 25 minutos foi reduzido para aproximadamente 16 minutos. A sensibilidade do método permaneceu a mesma, 10 ng. O coeficiente de variação com 7 réplicas foi de 0,66 % e a recuperação de 4-epianidrotetraciclina adicionada à tetraciclina apresentou faixa de regressão linear de 0,3 a 100 %. Em relação à tetraciclina em xarope e cápsulas de gelatina, a recuperação foi de 99,6 e 99,9 %, respectivamente. O método apresentou coeficiente de variação de 1,1 %, quando empregadas oito réplicas no ensaio de cápsulas. Devido à excelente separação de produtos de degradação e à sensibilidade do método CLAE, os autores recomendaram este método para o estudo de estabilidade de preparações contendo tetraciclina

Alguns autores^{103,193} constataram que as tetraciclinas sofrem epimerização em pH entre 3 e 5 e desidratação em pH mais baixo. Assim, métodos cromatográficos empregando fase móvel com pH entre 1,5 e 5 eram inadequados, pois poderiam conduzir à formação de produtos de degradação durante a corrida cromatográfica ou durante o procedimento de dissolução para a preparação das soluções-teste ou, ainda, comprometer a eficiência da coluna. Estudo de sistema cromatográfico empregando fase móvel com pH 8,0 foi descrito por HERMANSSON e ANDERSSON⁹⁶ para evitar a degradação das tetraciclinas durante o ensaio. Foi empregado sistema formado por coluna contendo octilsilano (C₈), detector UV a 280 nm e fase móvel preparada com fosfato monobásico de sódio 0,1 M ou 0,05 M com pH 8,0 ou 8,2, os contra-íons, tripropilamina e N,N-dimetiloctilamina, e diferentes quantidades de acetonitrila. O N,N-dimetiloctilamina proporcionou melhor eficiência de separação, simetria dos picos e permitiu alterar o fator de capacidade pela modificação da concentração deste contra-íon. A concentração mais adequada da acetonitrila para separar as tetraciclinas de suas impurezas, foi de 30 % na fase móvel.

CHAPPELL e colaboradores³⁵ em 1986, descreveram método em fase reversa semelhante, para a determinação de oxitetraciclinas em produtos veterinários. A fase móvel empregada consistiu de acetonitrila, tampão-fosfato 0,1 M preparado com fosfato monobásico de sódio, EDTA 0,006 M e N,N-dimetiloctilamina a pH 8. A coluna foi a C₈, que mostrou eficiente separação da oxitetraciclina de outras tetraciclinas como 4-epioxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina. O tempo de retenção esteve entre 1,5 a 5 minutos. Os autores compararam este método com o microbiológico, encontrando boa correlação entre ambos. A precisão do método determinada entre dias e no mesmo dia e os coeficientes de variação foram, respectivamente, 4,9 e 7,9.

Método empregando fase móvel contendo tampão-fosfato a pH 2,2 e acetonitrila em sistema gradiente de 12 a 22 % com coluna fenílica foi descrito em 1980 por MUHAMMAD e BODNAR¹⁵², para a determinação da tetraciclina e das suas impurezas. O tempo total de análise foi de 22 minutos. Os valores de coeficiente de variação obtidos com seis ensaios foi de no máximo 7,60 % para a clortetraciclina, anidrotetraciclina, 4-epianidrotetraciclina e 4-epitetraciclina

presentes na amostra de tetraciclina e a recuperação foi de 96, 104, 85 e 102 %, respectivamente.

Técnicas gradientes trabalhosas, sistemas solventes complexos e fase móvel contendo substâncias corrosivas ou com altas concentrações de sais, levaram ASZALOS e colaboradores¹¹ a desenvolver um método CLAE simples, capaz de separar nove tetraciclinas. Neste método, os autores empregaram como fase móvel a mistura de EDTA 0,001 M com pH 6,6 e metanol, tendo sido a coluna C₁₈. O detector foi operado a 380 nm para todas as tetraciclinas testadas. No pH de 6,6 nenhuma reação de epimerização ocorreu durante o período de análise. Este método foi aplicado às preparações comerciais para quantificar pequenas quantidades de 4-epitetraciclina em preparações de tetraciclina, demeclociclina em minociclina e tetraciclina em clortetraciclina. Na separação da tetraciclina e 4-epitetraciclina, fase móvel com 18 % de metanol com fluxo de 1 mL/minuto forneceu tempo de retenção de 10,4 e 7,2 minutos para tetraciclina e 4-epitetraciclina, respectivamente. O desvio-padrão empregando seis réplicas de injeções foi de 0,3 %. No caso da minociclina, a fase móvel mais adequada foi aquela com concentração de metanol de 25 %, sendo o fluxo de 2,3 mL/minuto. O tempo de retenção da minociclina foi de 3,2 minutos, apresentando boa resolução com o pico da demeclociclina. Para a determinação da clortetraciclina condição cromatográfica com fase móvel contendo 20 % de metanol e fluxo a 2,5 mL/minuto foi estabelecida. O desvio padrão para o ensaio quantitativo foi menor que 1 %.

KNOX e JURAND¹²⁶ empregaram, para a determinação da 4-epitetraciclina, anidrotetraciclina, clortetraciclina e 4-epianidrotetraciclina, vários tipos de material suporte. Dois destes materiais foram detalhadamente estudados. O primeiro foi ODS-sílica, tratado com grupos trialkylsilil para substituir grupos de silanóis residuais. O segundo foi uma amostra de sílica gel, que teve a maior parte dos grupos silanóis substituídos por grupos Si-O-SiR₃, em que R corresponde a grupos alquila de cadeia curta. No trabalho preliminar, os resultados obtidos mostraram que os métodos clássicos apresentaram resolução pobre das tetraciclinas. Com a cromatografia de troca iônica usando ZIPAX SCX (trocador de cátion), a eluição foi realizada em meio de solvente alcalino, neutro

ou ácido, sendo a eluição mais lenta no meio ácido. Na separação da anidrotetraciclina a eluição ocorreu antes da tetraciclina, mas para as formas epi e normal a separação não foi possível. Em todos os casos, a eficiência da coluna e a forma dos picos deixaram a desejar. Quando empregado o PARTISIL (trocador de cátion), a tetraciclina foi eluída em solvente aquoso ácido. No entanto, os picos foram largos, com formação de cauda e sobrepostos. Melhor resultado foi obtido com Sil-X (sílica) empregando fase com tampão perclorato e 33 % de acetonitrila, resultando em separação eficiente. Contudo, a eficiência da separação das formas epi e normal foi pobre. Ao trabalhar com cromatografia de partição líquido-líquido, empregando CORASIL com PEG 400, foi obtido pico com melhor simetria mas o tempo de retenção não foi reproduzível. Picos muito largos correspondendo a compostos anidro foram obtidos quando coluna de ODS-Sílica e soluções aquosas contendo acetonitrila e ácido perclórico foram empregados, devido à forte retenção dos compostos. A separação da 4-epitetraciclina e clortetraciclina da tetraciclina foi eficiente em meio com baixa porcentagem de acetonitrila. Neste estudo preliminar, os autores concluíram que o formato inadequado do pico obtido em coluna de troca iônica, adsorção e cromatografia líquido-líquido está associado com o silanol livre na superfície do suporte. Mesmo na presença de água que é muito adsorvida pelo suporte, aparentemente existe um pequeno número de sítios de silanóis livres, em que a tetraciclinas podem trocar com a água e ficar fortemente adsorvida. Esta retenção, mesmo que pequena, produz picos com formação de cauda acentuado. Com acetonitrila 20 % em água, a tetraciclina é mais fortemente retida por grupos com hidrocarbonetos que por grupos silanóis. Quando estes silanóis foram eliminados através de reações de silanização com grupos triálquilas, o formato do pico tornou-se adequado, bem como a retenção. A forte retenção pela fase hidrocarboneto era inesperada, devido à baixa solubilidade da tetraciclina na forma de base ou sal em solventes de hidrocarbonetos. Os resultados deste trabalho mostraram que fase estacionária com hidrocarbonetos ligados pode ser empregada com eficiência na cromatografia de partição de íon-par de fase reversa para análise de bases fortemente hidrofílicas como a tetraciclina. A fase estacionária composta por Partisil silanizada, para substituir todos os grupos silanóis com grupos de trisilialquil de cadeias curtas (SC-TAS-sílica) apresentou grande eficiência para

microanálises dos produtos relacionados com a tetraciclina. Do ponto de vista técnico, a etapa de lavagem da coluna com EDTA para evitar a formação de complexo metálico, que pode levar à perda da tetraciclina, não foi considerado essencial provavelmente devido ao pH da fase móvel estar em torno de 1,5 a 2,0.

No método CLAE de fase reversa, separação baseada na sílica como fase estacionária pode causar baixa eficiência na separação, devido à possível adsorção de pequenas quantidades de tetraciclinas no grupo silanol residual do material de empacotamento, descrito por KNOX e JURAND¹²⁶. Por isso, REEUWIJK e TJADEN¹⁷⁹ estudaram o emprego de coluna não ionogênica para a cromatografia da tetraciclina e seus produtos de degradação. Quando comparado com a coluna de sílica, a curva de calibração apresentou melhor linearidade, mesmo em quantidade de nanogramas. Coluna de resina de Amberlite XAD e PRP-1, materiais fortemente hidrofóbicos, foram preparadas com polímero de estireno divinilbenzeno.

Ensaio CLAE para determinação de oxitetraciclina contida em plasma necessitavam longo pré-tratamento, que se tornava crítico no monitoramento das concentrações plasmáticas. Desta forma, UENO e colaboradores¹⁹⁹ propuseram o emprego do método CLAE com a injeção direta do plasma, empregando coluna polimérica ligada à sílica e fase móvel contendo metanol-ácido oxálico 0,2 M (10:90) a pH 7,0. O detector empregado foi o espectrofotométrico a 360 nm. O coeficiente de variação para ensaios intra-dia (n=5) foi menor que 3 % e o inter-dias (mais de seis dias) foi de no máximo 4,7 % dependendo da amostra. Este método mostrou-se rápido e não comprometeu a coluna cromatográfica mesmo após mais de 1000 injeções.

Método CLAE com injeção direta de amostras de urina para monitoramento das tetraciclinas foi desenvolvido por KNOX e JURAND¹²⁵. O procedimento envolveu o emprego de colunas C₁₈ e C₁ com duas diferentes fases móveis, compostas por água e os modificadores orgânicos em cada fase, acetonitrila e dimetilformamida. Foi estabelecido que a coluna C₁ a pH de 3 a 5 apresentou alta eficiência de separação das tetraciclinas. Nesta faixa de pH foi necessário adicionar EDTA 0,001 M. O modificador orgânico que proporcionou picos simétricos foi a dimetilformamida na concentração entre 10 a 25 %. Os autores

verificaram que a adição de nitrato de potássio na fase móvel auxiliava na obtenção de picos simétricos, sendo que o ácido acético, cítrico ou nítrico deveria ser empregado para estabilizar o pH.

OKA e colaboradores¹⁵⁶ desenvolveram métodos cromatográficos combinando o método CLAE com a cromatografia em camada delgada. Oito tetraciclinas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de alta eficiência, cromatografia em camada delgada em fase reversa e CLAE. Boa separação foi obtida nos dois primeiros métodos empregando fases móveis constituídas de clorofórmio, metano e EDTA 5 % e de metanol, acetonitrila e ácido oxálico 0,5 M, respectivamente. A combinação destas duas metodologias permitiu a identificação das oito tetraciclinas separadas. No método CLAE a separação foi possível empregando coluna C₈ e fase móvel composta por metanol-acetonitrila-ácido oxálico 0,01 M a pH 3,0. A desvantagem do método CLAE é a necessidade do equipamento especial.

O método cromatográfico empregado no trabalho desenvolvido por RAY e HARRIS¹⁷⁶ foi comparado com o ensaio microbiológico da Farmacopéia Britânica de 1988²⁹. O sistema cromatográfico consistia em detector a 280 nm, integrador computadorizado, forno a 40 °C, volume de injeção de 10 µL, e coluna ODS (5 µm) com dimensões de 250 x 4,6 mm. A fase móvel composta por oxalato de amônio 0,2 M, EDTA 0,1 M e dimetilformamida (55:20:25 v/v/v) foi bombeada para a coluna com fluxo de 1 mL/minuto. O coeficiente de correlação entre a quantidade de tetraciclina medida e os valores de integração das áreas foi de 0,99. O coeficiente de correlação entre os resultados obtidos pelo método CLAE e o método microbiológico foi de 0,96. A réplica dos seis valores para cada amostra apresentou coeficiente de correlação menor que 4 %, com exceção da clortetraciclina, em que foi de 7 %. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C para evitar a possível precipitação do tampão oxalato e melhorar a resolução do pico. Concluiu-se que o método cromatográfico pode ser facilmente adaptado para uso em diferentes colunas disponíveis no comércio, por ajustes mínimos nas condições do teste como a velocidade do fluxo ou a temperatura.

HOU e WANG¹⁰⁴ desenvolveram método de cromatografia líquida com detecção eletroquímica para a determinação das tetraciclinas. Esta técnica

envolveu o emprego de eletrodos de trabalho em vidro-carbono, eletrodo de referência de prata-nitrato de prata e eletrodo de prata. O eletrodo de trabalho foi eletroquimicamente tratado através do polimento empregando pó de hidróxido de alumínio com partículas de 0,3 a 1 μm , seguido de tratamento em banho de água com ultrassom por 30 segundos e posterior anodização em fosfato monobásico de potássio 0,1 M a pH 7,0 a + 1,80 V por 5 minutos e catodização a – 1,20 V por 10 segundos. O sistema cromatográfico constou de coluna ODS (C_{18}), detector a 350 nm e fase móvel composta por 23 % de acetonitrila e tampão fosfato com pH de 2,5. A separação e quantificação da oxitetraciclina, doxiciclina, clortetraciclina e tetraciclina foram satisfatórias. O método desenvolvido provou ser, além de sensível, também seletivo, sendo duas vezes mais sensível que a detecção por espectrofotometria. O limite de detecção foi de 0,2 ng para a oxitetraciclina e tetraciclina, 1,2 ng para a clortetraciclina e 4 ng para a doxiciclina. Embora tenha apresentado grande seletividade na detecção, os detectores eletroquímicos são pouco empregados, comparativamente aos detectores espectrofotométricos ou fluorimétricos.

Acrescentando experiências, método CLAE com detecção por fluorescência, rápido e preciso para a determinação das tetraciclinas presentes em preparações farmacêuticas e tecidos de peixe, foi desenvolvido por IWAKI e colaboradores¹¹¹. No entanto, os autores verificaram que quelação da tetraciclina com traços de íons de metais presentes no material de empacotamento e na superfície da coluna produziam picos assimétricos e aumentavam a interação das tetraciclinas com o grupos silanóis residuais, consequentemente diminuindo a sensibilidade do método. Para solucionar este problema, foram adicionados cloreto de cálcio e EDTA à fase móvel neutra, tendo sido empregado material de empacotamento C_{18} livre de íons metálicos, resultando em intensidade da fluorescência maior na presença dos dois compostos na fase móvel. A fase móvel, além do cloreto de cálcio e EDTA, continha tampão acetato 0,1 M e metanol. Foi empregado detector com comprimento de onda de extinção e emissão de 390 e 512 nm, respectivamente. Em pH entre 6,5 e 7,5 a fluorescência foi constante para todas as tetraciclinas, sendo que em pH mais baixo a intensidade foi também menor. Os coeficientes de variação para a tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina, obtidos pela análise dos dados dos

testes intra-ensaios e inter-ensaios, foram inferiores a 2,2 %, indicando boa precisão do método. O limite de detecção por fluorimetria e espectrofotometria UV foi de no máximo 0,190 ng e 9,6 ng, respectivamente. Em outro trabalho, estes autores¹¹² aplicaram método semelhante para a determinação de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em soro. Por se tratar de amostras séricas, procedimento para pré-tratamento foi realizado para a desproteinização, evitando a precipitação das proteínas que poderiam interferir com a injeção da amostra na coluna. O limite de detecção foi de 30, 10 e 35 ng/mL, respectivamente para tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina. A recuperação foi constante para várias concentrações e resultou em valores de 100,1 a 102,9 % para oxitetraciclina, 99,5 a 100,3 % para tetraciclina e 94,3 a 101,2 % para clortetraciclina. A precisão deste método aplicado à determinação de tetraciclina no soro foi de no máximo 2,31 % em termos de coeficiente de variação.

Método cromatográfico empregando coluna trocadora de cátion e tampão de EDTA 0,3 M em pH neutro foi desenvolvido por LINDAUER e colaboradores¹³⁷, para a determinação de anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina. A resposta foi linear para as duas substâncias testadas e o limite de detecção foi de 12 ng de anidrotetraciclina e 7 ng de 4-epianidrotetraciclina, a 429 nm. A recuperação destes compostos quando adicionados à tetraciclina resultaram em 99,4 % e 101,0 % de teor e o coeficiente de variação para a determinação quantitativa foi de 0,7 e 1,4 %, respectivamente, para anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina. Em relação ao procedimento técnico empregando coluna polimérica, a fase móvel foi otimizada, através do estudo da influência do aumento da concentração de EDTA, de 0,005 M para 0,3 M. Com este aumento, ocorreram a diminuição do fator capacidade da 4-epitetraciclina, 4-epianidrotetraciclina e anidrotetraciclina, o aumento da seletividade e a melhora da linha de base a 254 nm. TSUJI e ROBERTSON¹⁹⁷ empregando também coluna polimérica, verificaram que o EDTA minimizava o aparecimento do cauda e não interferia com a forma do pico. No entanto, concentrações de EDTA maiores que 0,001 M na fase móvel podem interferir com a análise em virtude da alta absorção UV das soluções de tetraciclina. Outra variável estudada por LINDAUER e colaboradores¹³⁷ em 1978, a temperatura do ensaio, mostrou-se adequada a 35 °C. A seleção do comprimento de onda variou de acordo com vários fatores, incluindo a

disponibilidade de detectores adequados e a presença de substâncias interferentes que formam complexo com a tetraciclina. Na determinação da amostra de tetraciclina comercial, detector a 280 nm é adequado. Os autores no entanto, sugeriram comprimento de onda de 429 nm para substâncias de degradação devido ao aumento da seletividade para a anidrotetraciclina, sendo que na região visível não ocorreu interferência devido aos excipientes.

No mesmo ano, STEINBACK e STRITTMATER¹⁹⁴ publicaram método CLAE para a determinação das tetraciclina e seus produtos de degradação em 29 preparações de cápsulas, comprimidos e drágeas. Colunas empacotadas com material octadecilsilano (ODS), fases móveis com água, ácido perclórico e acetonitrila com diferentes proporções de acetonitrila e água, sendo a detecção UV a 254 nm foram empregadas. Com menor quantidade de acetonitrila (22 %), eficiente separação da tetraciclina e 4-epitetraciclina foi conseguida. Os derivados anidros só puderam ser separados da tetraciclina em fase móvel rica em acetonitrila (37 %). Das amostras, três apresentaram concentrações de 4-epitetraciclina significativamente mais altas, sendo que duas com diminuição correspondente do teor de tetraciclina. Os autores provaram que este método apresentou suficiente precisão e sensibilidade, alta resolução, rapidez e boa correlação com o método microbiológico. A influência da concentração da acetonitrila na fase móvel sobre a separação das tetraciclina, também em coluna ODS, foi estudado por HOU e WANG¹⁰⁴, os quais verificaram que o aumento gradual da acetonitrila aumentava o fator de capacidade (K') da clortetraciclina e o diminuía para a doxiciclina, enquanto que para o oxitetraciclina e tetraciclina a alteração foi pouco significativa.

ALI e STRITTMATTER⁶ em 1978 publicaram trabalho de determinação das tetraciclina e seus produtos de degradação para análises de amostras de comprimidos, drágeas e cápsulas de gelatina dura e mole, empregando método idêntico ao de STEINBACK e STRITTMATTER¹⁹⁴. Os valores de fator de capacidade encontrados na separação da tetraciclina e 4-epitetraciclina em fase móvel contendo 22 % de acetonitrila foram de 1,69 e 2,5, enquanto na separação da tetraciclina, 4-epianidrotetraciclina e anidrotetraciclina em fase móvel com 37 % de acetonitrila, foram de 0,55, 1,91 e 2,64, respectivamente. A

separação da 4-epianidrotetraciclina da anidrotetraciclina em coluna ODS foi influenciada tanto pela concentração do ácido como do ânion perclorato. Assim, com concentração do ácido a 0,2 M, os picos se apresentaram simétricos e bem definidos para os quatro compostos. Concentração menor do ácido perclórico não permitiu a eluição dos derivados anidros devido à forte adsorção. A fase com maior concentração da acetonitrila favoreceu a eluição destes derivados por solvatação.

A influência da concentração da acetonitrila presente na fase móvel sobre a retenção das tetraciclinas foi estudada por EKSBERG e EKQVIST⁵³. Foram empregadas nove diferentes colunas. Os autores verificaram que o fator de capacidade das tetraciclinas apresentavam forte dependência da concentração de acetonitrila, sendo maior com o aumento desta. A seletividade, ao contrário, diminuiu com o aumento da concentração da acetonitrila. Grande diferença na retenção das tetraciclinas foi observada empregando colunas de diferentes fornecedores. Quando se empregou concentração de 30 % de acetonitrila, as colunas LiChrosorb e ZORBAX BP apresentaram K' 15 vezes maior que a coluna com Nucleosil, apesar de todas se caracterizarem pelo mesmo tamanho de cadeia alquílica. No entanto, quando a composição da fase móvel foi mantida constante, apenas pequenas variações na seletividade foram observadas para diferentes suportes alquílicos. A adição de compostos de amônio na fase móvel resultou em diminuição significativa da retenção das tetraciclinas, embora a seletividade não tenha sido alterada.

BARNES e colaboradores¹³ verificaram que a determinação de oxitetraciclina por CLAE, conforme recomendado pela Farmacopéia Britânica²⁹, requeria coluna trocadora de cátion não disponível no mercado, tendo que ser preparada no próprio laboratório. Para contornar este problema, os autores optaram pelo estudo da determinação da oxitetraciclina empregando o mesmo método descrito para a monociclina da USP XXI²⁰⁵. Coluna C_8 e fase móvel contendo oxalato de amônio 0,2 M, EDTA dissódico 0,1M e dimetilformamida foram empregados. Na comparação dos resultados obtidos pelos métodos descritos nas duas farmacopéias, o método da USP XXI adaptado

proporcionou melhor separação, sendo que a repetibilidade determinada para área dos picos de seis injeções teve desvio de 2,4 % e a reprodutibilidade medida em seis dias com seis ensaios independentes proporcionou desvio padrão de 1,52 %. Segundo o método da Farmacopéia Britânica, a repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram desvios padrão de 5,3 e 5,2 %, respectivamente, ocorrendo também a redução da eficiência da coluna por envelhecimento. O fator de capacidade para o método da Farmacopéia Britânica foi de 4,8 e da Farmacopéia Americana foi de 2,2, sendo a eluição deste último mais rápida. Os valores de pratos teóricos do método da Farmacopéia Britânica foi de 6332/minuto e do método da USP XXI foi 29687/minuto, indicando resolução superior do métodos de fase reversa da USP XXI. Assim como constatado por CHAPPELL e colaboradores³⁵, na comparação entre o método da Farmacopéia Americana e o microbiológico empregando o *Bacillus pumilus* NCTC 8241, os resultados encontrados por BARNES e colaboradores¹³ mostraram boa correlação entre as duas metodologias.

Vários trabalhos de revisão para determinação das tetraciclinas têm sido constantemente publicados^{114,142,160}. LUN¹⁴² reuniu vários procedimentos analíticos desenvolvidos de 1980 a 1996, com descrição das metodologias que possibilitam a sua reprodução no laboratório. Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência para as tetraciclinas e derivados foram também descritos.

Tanto os métodos microbiológicos como as técnicas fluorimétricas mostraram ser poucos eletivos na determinação de doxiciclina em amostras biológicas. O método de cromatografia gás-líquido, devido ao considerável peso molecular e a elevada polaridade da doxiciclina também apresentou dificuldade na sua execução. Por isso, um método CLAE de fase reversa combinado com detecção UV foi desenvolvido por LEENHEER e NELIS¹³¹ em 1977, com coluna C₁₈. A fase móvel consistiu de solução-tampão ácido e acetonitrila ou metanol injetada por gradiente. Além da doxiciclina, separação de oxitetraciclina, dimetilclortetraciclina e tetraciclina foi obtida com fase móvel contendo no mínimo 4 % de acetonitrila.

As impurezas da tetraciclina que podem estar presentes em amostras comerciais analisadas por método não específico podem ocasionar sérios erros no ensaio. Assim, LANMAN e colaboradores¹²⁸ desenvolveram método de separação em cromatografia de camada delgada seguido de mapeamento radiocromatográfico das placas. Placas de Kieselghur G e N e de sílica gel ácida e básica foram empregadas e a eluição foi em metiletilcetona saturada com tampão de *McIlvaine* a pH 4,7 e também, butanol, metanol e ácido cítrico. Tetraciclinas marcadas com radioatividade (Tritio) e não marcadas foram colocadas nas placas, então reveladas através de lâmpada fluorescente, sendo que para aquelas radioativas foi empregado o *scanner* radiocromatográfico. Foi possível determinar a quantidade relativa da tetraciclina e os principais produtos de degradação, a 4-epitetraciclina, 4-epianidrotetraciclina e anidrotetraciclina.

OKA e UNO¹⁵⁷ em 1984 desenvolveram método de cromatografia líquida de alta eficiência com sistema isocrático usando fase móvel contendo metanol, acetonitrila e solução de ácido oxálico, colunas C₈ e C₁₈ e detector a 360 nm. A concentração do ácido foi de 0,01 M para as tetraciclinas e 0,2 M para as impurezas da tetraciclina, proporcionando separação adequada para as substâncias testadas e, pela influência na resolução e assimetria dos picos, indicaram a adequação da metodologia. As resoluções e assimetrias dos picos de tetraciclina dependem do pH da solução de ácido oxálico, sendo o pH ótimo igual a 2.

Determinação das tetraciclinas em preparações farmacêuticas e matéria-prima foi descrita por KAZEMIFARD e MOORE¹²³. A separação foi por meio de coluna C₁₈ com fase móvel composta por tampão fosfato dibásico de potássio 0,005 M, a pH 2,5 e acetonitrila, e a detecção foi por eletrodo de vidro-carbono. A técnica se baseou na oxidação de grupos fenólicos na posição 10 e no substituinte dimetilamino na posição 4 destes compostos e os contaminantes, medidos através deste eletrodo a 1,2 V. O procedimento de extração foi simples e permitiu a separação das tetraciclinas dos produtos de degradação. O limite de detecção foi de 0,1 a 1,0 ng/μl e a recuperação foi de 99,1 a 100,4 % para todas as amostras. Não foi observada interferência de excipientes presentes nas formulações farmacêuticas. A precisão foi determinada para o tempo de retenção

e altura do pico por repetidas análises da solução-padrão a cada quatro dias. O coeficiente de variação para ensaio no mesmo dia foi de zero a 0,62 % para tempo de retenção e 0,3 a 1,4 % para altura da placa. A precisão inter-dias foi de 1,1 a 2,4 % para alturas dos picos e 0,2 a 0,7 % para os tempos de retenção. A especificidade do método foi determinada pela resolução entre todos os compostos apresentando separação adequada dos picos quando a resposta foi cerca de três vezes o ruído do detector.

No estudo da estabilidade de cloridrato de tetraciclina na forma sólida, DIHUIDI e colaboradores⁴⁸ descreveram método CLAE empregando coluna fenólica, fase móvel em sistema de gradiente e detecção a 280 nm. As fases móveis foram metanol, água e ácido fosfórico 1 M com misturas de (5:90:5) e (75:20:5). Os coeficientes de correlação obtidos para a tetraciclina, 4-epitetraciclina, anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina foram entre 0,996 e 0,999. Quando a amostra foi analisada seis vezes no mesmo dia, o coeficiente de variação foi quatro vezes menor que quando analisada em sete dias diferentes. A vantagem do uso da coluna fenólica em relação à C_8 ou C_{18} foi a possibilidade de empregar fase móvel com metanol. A vantagem da escolha do comprimento de onda a 280 nm foi a obtenção de picos bem definidos em relação à linha de base, pois a interferência do modificador orgânico é menor em comprimentos de onda maiores.

Método CLAE isocrático desenvolvido por DIHUIDI e colaboradores⁴⁹, empregando coluna de copolímero de estireno-divilbenzeno a 60 °C, com detecção a 254 nm permitiu separar a oxitetraciclina, 4,6-epidoxíciclina, 4-epidoxíciclina, metaciclina, 6-epidoxíciclina e doxiciclina para a análise de preparações farmacêuticas cápsulas, comprimidos e suspensões de doxiciclina bem como a matéria-prima. A fase móvel foi preparada pela mistura de tetrahidrofurano, tampão fosfato 0,2 M a pH 8,0, tetrabutilamônio 0,2 M a pH 8,0, EDTA 0,1 M com pH 8,0 e água. O fluxo foi de 1mL/minuto, e 40 µg da amostra foi injetada no cromatógrafo. Quando a amostra foi analisada 22 vezes por oito dias, o coeficiente de variação para a doxiciclina foi de 0,6 %. A vida útil da coluna foi superior a seis meses devido a boa estabilidade sob condições extremas de pH.

Método CLAE isocrático desenvolvido por KHAN e colaboradores¹²⁴ envolveu o emprego de coluna de copolímero de poliestireno-divinilbenzeno que proporcionou completa separação da oxitetraciclina e das impurezas, 4-epioxitetraciclina, tetraciclina, anidrotetraciclina, α - e β -apoxitetraciclina. A fase móvel consistiu de butanol, tampão-fosfato 0,2 M com pH de 8,0, sulfato de tetrabutilamônio 0,02 M a pH 8,0, EDTA 0,0001 M com pH 8,0 e água (5,9:10:5:10:78,1). Neste método, a temperatura da coluna foi de 60 °C e a detecção ocorreu a 254 nm. A resolução da oxitetraciclina e seu derivados muito similares, 2-acetil-2-carboxamido-oxitetraciclina, foi incompleta. No entanto, empregando a eluição em gradiente, tanto a separação como o limite de detecção foram mais adequados. Modificadores orgânicos como acetonitrila, metanol e dimetil sulfóxido foram testados, mas a separação mais adequada ocorreu com o emprego de butanol e tetrahydrofurano

HASAN e COOPERMAN⁹¹ desenvolveram um método CLAE de fase reversa empregando fase móvel volátil para a separação das tetraciclina e fotoprodutos. Coluna C₁₈, detector a 280 nm e fase móvel em 2 sistemas gradientes, o primeiro contendo 10-80 % de acetonitrila e 90-20 % de água contendo 0,1 % de ácido trifluoracético (1) e o segundo, contendo respectivamente, 24-50 %, 76-50 % e 0,1 % (2). Outra coluna fenilica com sistema isocrático e fase móvel contendo metanol e água (40:60) com 0,1 % de ácido trifluoracético (3) foi usada. A minociclina foi separada de seus precursores sintéticos nas condições de gradiente (1), a 9-aminno 6-demetil-6-deoxitetraciclina e seus precusores nas condições de gradiente (2) e a tetraciclina e clortetraciclina nas condições cromatográficas (3). Este método foi adequado para separações de preparações em semi-micro ou micro escala. A recuperação foi de 75 a 90 %.

Outro trabalho para a determinação de impurezas presentes em cápsula, comprimidos, xaropes, pós e medicamentos de uso veterinário foi desenvolvido por OKA e SUZUK¹⁵⁸ em 1984, e envolveu a comparação de métodos estabelecidos aplicados às amostras, como a cromatografia líquida de alta eficiência (1), cromatografia líquida de fase reversa em camada delgada seguida de densitometria (2), cromatografia líquida de fase reversa em camada delgada seguida de detecção por reagentes em nebulizador (3) e cromatografia em sílica

gel de alta eficiência seguida de densitometria (4). O método 1 apresentou coeficiente de variação relativamente melhor que para o método 2. O método 3 foi o menos preciso de todos, mas apresentou vantagem em relação à simplicidade técnica, rapidez e mostrou melhor limite de detecção que o método 2. Os autores recomendaram o emprego de uma associação do método 3 com os métodos 1 ou 2, sendo o método 1 para a realização do "screening", e os outros dois para a determinação quantitativa.

PESEK e MATYSKA¹⁶² em 1996, publicaram técnicas para a determinação de várias misturas de tetraciclina, a eletrocromatografia capilar e a eletroforese capilar de alta eficiência, comparando os resultados obtidos entre as duas metodologias e também com o método CLAE. As técnicas inovadoras abrangidas neste trabalho, envolveram o emprego de tubos capilares, preenchidos com a fase estacionária e a separação dos compostos, transportados por uma fase móvel por processos de mobilidade eletroforética ou de eletroosmose. As amostras comerciais de oxitetraciclina possuem como impurezas, a 4-epioxitetraciclina, α -apo-oxitetraciclina e tetraciclina. Nas amostras comerciais, as impurezas presentes estudadas foram a metaciclina e a oxitetraciclina. Os autores concluíram que análises efetuadas pelos métodos CEC e ECAE apresentaram resultados semelhantes ou melhores que o método CLAE, em coluna mono-ol ou diol. Da mesma forma, quando a comparação foi com o método CLAE empregando colunas poliméricas, comprovadamente um dos procedimentos mais eficientes, a separação foi igual ou melhor, geralmente acompanhada também de um tempo de retenção menor. O limite de detecção de 5-10 $\mu\text{g/mL}$ para o método CEC é comparável para os métodos CLAE e ECAE. Devido à simplicidade do sistema instrumental, e considerando o baixo consumo de solvente, os dois métodos pesquisados apresentam-se como alternativas para o método CLAE na determinação de mistura de tetraciclina.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância em conhecer aspectos da qualidade dos produtos farmacêuticos disponíveis para consumo, assim como melhor entendimento das técnicas analíticas alternativas, idealizou-se este trabalho. Os objetivos abrangeram a avaliação da qualidade das cápsulas de cloridrato de oxitetraciclina, cloridrato e fosfato de tetraciclina e drágeas de cloridrato de doxiciclina adquiridas no mercado, no que se refere aos aspectos físicos, atendimento às exigências legais, determinação da dissolução e teor dos princípios ativos e do produto de degradação.

Objetivou-se, também, estudo de correlação entre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método microbiológico turbidimétrico aplicado às amostras comerciais de tetraciclina. Para isto, procedeu-se ao estudo dos parâmetros envolvidos na validação e adequação das condições analíticas do método cromatográfico.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O material do presente trabalho constituiu-se de substâncias químicas de referência de tetraciclina na forma de cloridrato, e da impureza derivada de seu processo, assim como dos derivados doxiciclina e oxitetraciclina. Abrangeu ainda amostras comerciais de especialidades farmacêuticas da tetraciclina. Os demais reagentes empregados foram de grau analítico, espectrofotométrico e cromatográfico, procedentes da MERCK e EM SCIENCE.

4.1.1. Substâncias químicas de referência

As substâncias químicas de referência empregadas apresentavam as seguintes potência e origens:

P1-Cloridrato de tetraciclina, 994 $\mu\text{g}/\text{mg}$, cedido pelo Laboratório BRISTOL-MYERS-SQUIBB do BRASIL SA, lote: 9505000456.

P2-Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina), potência 901 $\mu\text{g}/\text{mg}$, fornecido pelo Laboratórios PFIZER LTDA, lote: L-04-53QCQS-435.

P3-Cloridrato de doxiciclina (Vibramicina), potência 866 $\mu\text{g}/\text{mg}$, fornecido pelo Laboratórios PFIZER LTDA, lote: L-04-58QCQS-433.

Foi empregada também a substância química de referência de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, potência 830 $\mu\text{g}/\text{mg}$, adquirida da UNITED STATES OF PHARMACOPEIAL CONVENTION, lote: 1, cat nº 23650.

4.1.2. Amostras de especialidades farmacêuticas

O teor da substância ativa nas amostras de medicamentos considerado para os ensaios teve por base informação impressa no rótulo e/ou bula do produto:

Cápsulas de cloridrato de oxitetraciclina 500 mg, três lotes provenientes de um laboratório produtor (A).

Drágeas de cloridrato de doxiciclina 100 mg, três lotes provenientes de um laboratório produtor (A).

Cápsulas de cloridrato de tetraciclina 500 mg, de um a quatro lotes provenientes de 10 laboratórios produtores (B, C, D, E, F, G, H, I, J, K).

Cápsulas de fosfato de tetraciclina 500 mg, quatro lotes provenientes de um laboratório produtor (L).

4.1.3. Microrganismo-teste como revelador biológico

Staphylococcus aureus ATCC* 29737.

* ATCC-American Type Culture Collection.

4.1.4. Equipamentos e material auxiliar

Além dos recursos empregados rotineiramente em laboratório de controle de qualidade de matérias-primas e medicamentos, destacam-se equipamentos:

- Balança analítica METTLER TOLEDO AG 204
- Aparelho de dissolução HANSSON RESEARCH – Modelo 6454 SOFT FLO

- Espectrofotômetro UNICAN LTD UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY-modelo HELIOS α .
- Espectrofotômetro MICRONAL[®]-modelo 3.382
- Bomba WATERS[™] 510 PUMP
- Forno WATERS[™] TEMPERATURE CONTROL MODULE
- Detector WATERS[™] 486 TUNABLE ABSORBANCE DETECTOR UV/VIS
- Programa MILLENIUM[™] desenvolvido pela WATERS[™]
- Aparelho de ultrafiltração MILLI-Q PLUS-ULTRA-PURE WATER SYSTEM[™] da MILLIPORE[™]
- Aparelho de banho de água ultrassônico da marca BRANSON 2210R-MT
- Dispositivo de filtração HPLC GELMAN SCIENCES[™]
- Potenciômetro ORION 900 A

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Amostragem

As amostras de especialidades farmacêuticas foram adquiridas do comércio em vários locais da cidade de São Paulo, à exceção de uma amostra proveniente de um laboratório farmacêutico da cidade de Juiz de Fora-Minas Gerais que foi adquirida nesta cidade.

4.2.2. Determinação do peso médio das cápsulas de gelatina dura e drágeas

Conforme procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira IV⁶².

4.2.3. Descrição do material de embalagem primária

A descrição do tipo e das condições do material de embalagem primária foi, após inspeção visual, efetuada para todas as amostras.

4.2.4. Aparência das amostras

Constatação por inspeção visual de características físicas que diferissem de especificação ou que se mostrassem divergentes do conjunto das amostras foi descrita.

4.2.5. Ensaio *in vitro* de dissolução dos antibióticos²⁰⁸

4.2.5.1. Preparação das soluções-teste das substâncias químicas de referência

A solução-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina foi preparada inicialmente através da obtenção de quantidade exatamente pesada de 30,0 mg do princípio ativo presente na substância química de referência de cloridrato de tetraciclina e a transferência para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, completou-se ao volume com o diluente, agitando a fim de homogeneizar a solução. Desta, 2,0 mL foram diluídos em balão volumétrico de 50 mL empregando o mesmo diluente, obtendo-se solução com 12,0 µg/mL.

Para a determinação do cloridrato de tetraciclina empregou-se como diluente a água destilada, e para o fosfato de tetraciclina foi utilizado o ácido clorídrico 0,1 N.

A solução-teste de cloridrato de doxiciclina foi preparada a partir de uma solução-estoque obtida pela pesagem analítica equivalente a cerca de 25,0 mg do

princípio ativo presente na substância química de referência de cloridrato de doxiciclina e sua diluição volumétrica em 50 mL de ácido clorídrico 0,1 N. Desta solução, tomou-se 2,0 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL diluindo ao volume com ácido clorídrico 0,1 N. A solução preparada resultou em concentração de 10,0 µg/mL.

A solução-teste de cloridrato de oxitetraciclina foi preparada pesando-se analiticamente quantidade correspondente a 27,8 mg da substância química de referência. Sua transferência quantitativa para balão volumétrico de 100 mL foi realizada com o auxílio de água destilada, completando-se em seguida o volume. Desta solução transferiu-se alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada.

4.2.5.2. Preparação das soluções-teste das amostras

Para as amostras na forma de cápsula, após o período de dissolução, de cada cuba, volume de cerca de 30 mL foi filtrado, desprezando-se os primeiros 10 mL. Do filtrado, alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Em seguida, foram efetuadas diluições ao volume com água destilada e ácido clorídrico 0,1 N, respectivamente, para o cloridrato de tetraciclina e oxitetraciclina, e para o fosfato de tetraciclina, obtendo-se soluções com concentração estimada de 11,1 µg/mL.

Para as amostras na forma de drágea, o procedimento foi conforme o descrito para cápsulas, sendo a alíquota de filtrado de 1,0 mL e o diluente, o ácido clorídrico 0,1 N.

4.2.5.3. Condições experimentais do ensaio

As condições para execução do ensaio de dissolução de cápsulas de cloridrato de oxitetraciclina, cloridrato de tetraciclina e fosfato de tetraciclina, foram conforme descrito na Farmacopéia Americana²⁰⁸. Para amostras de

drágeas de cloridrato de doxiciclina as condições foram as seguintes: ácido clorídrico 0,1 N como meio de dissolução, agitação da pá a 75 rotações por minuto durante 60 minutos, sendo a pá situada a 45 ± 2 mm do fundo da cuba, leitura das soluções-teste a 276 nm e valor de **Q** igual a 85 %.

Para cada antibiótico o resultado obtido foi comparado com o valor **Q** especificado na Farmacopéia Americana^{207,208}.

4.2.6. Método de doseamento microbiológico turbidimétrico²⁰⁸

4.2.6.1. Preparação dos meios de cultura

O meios complexos desidratados (Difco) destinados à manutenção da cultura estoque do microrganismo e ao doseamento dos antibióticos foram reconstituídos em água destilada e esterilizados de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante.

4.2.6.2. Padronização da suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737

O microrganismo-teste, *Staphylococcus aureus*, foi semanalmente repicado, em estrias, sobre superfície inclinada do meio de cultura para dosagem de antibióticos número 1, contido em tubo de ensaio, seguido de incubação a 36 ± 1 °C por cerca de 18 horas. No dia do ensaio, com o auxílio de 5 mL de solução fisiológica estéril e agitação, foi recolhida a massa celular resultante e esta suspensão foi transferida para recipiente esterilizado.

Através da diluição da suspensão microbiana concentrada com solução fisiológica estéril, foi ajustada a transmitância para 25 %, em espectrofotômetro a 580 nm para leitura e como branco, solução fisiológica estéril.

4.2.6.3. Preparação do meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* ATCC 29737

Preparou-se o meio de cultura para dosagem de antibióticos número 3 de acordo com o procedimento recomendado pelo produtor. A esterilização foi em autoclave a 121 °C por 15 minutos. No dia do teste, volume de 2 mL da suspensão padronizada foi empregado como inóculo para porções de 100 mL de meio de cultura estéril.

4.2.6.4. Preparação das soluções-teste de antibióticos

A substância química de referência de cloridrato de tetraciclina, com potência de 994 µg/mg foi empregada para a preparação da solução-estoque de 1000 µg/mL. Para isto, pesou-se analiticamente cerca de 50,0 mg do princípio ativo presente na substância química de referência. Seguiu-se a transferência quantitativa para balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de ácido clorídrico 0,1 N estéril, completando ao volume com a mesma solução. Esta solução-estoque foi mantida em refrigerador e usada por um dia. A partir desta, as soluções-teste foram preparadas no dia do ensaio, empregando água destilada estéril como diluente a fim de obter concentrações de 0,16; 0,20; 0,25; 0,32 e 0,39 µg/mL.

A solução-estoque de cloridrato de oxitetraciclina foi preparada utilizando-se o substância química de referência de cloridrato de oxitetraciclina com potência de 901 µg/mg, pesando-se quantidade suficiente para corresponder a 50,0 mg e diluindo-se ácido clorídrico 0,1 N estéril. A solução-estoque com concentração de 1000 µg/mL foi mantida em refrigerador e utilizada durante quatro dias. O procedimento subsequente foi semelhante ao descrito no item anterior.

Para o cloridrato de doxiciclina a solução-estoque foi preparada pesando-se quantidade exatamente correspondente a 50,0 mg do princípio ativo a partir de uma substância química de referência de potência 866 µg/mg e transferindo-se

quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de ácido clorídrico 0,1 N estéril. Após a diluição, o volume foi completado com a mesma solução. Esta solução foi guardada sob refrigeração por no máximo cinco dias. No dia do ensaio, a partir da solução obtida, foram preparadas soluções-teste do cloridrato de doxiciclina em água destilada estéril nas concentrações de 0,052; 0,072; 0,100; 0,140 e 0,196 µg/mL.

4.2.6.5. Preparação das soluções-teste da amostra

Quantidade da amostra de cápsulas de cloridrato e fosfato de tetraciclina correspondente a 100,0 mg de cloridrato de tetraciclina, exatamente pesada, foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e diluída ao volume com ácido clorídrico 0,1 N estéril. Seguiu-se à filtração e diluição em água destilada estéril para obtenção da solução-teste na concentração de 0,25 µg/mL.

Para a preparação das soluções-teste das amostras de cápsulas de cloridrato de oxitetraciclina-500 mg procedeu-se conforme descrito no item anterior.

Para as amostras de drágeas de cloridrato de doxiciclina-100 mg, determinou-se o peso médio de cada lote. As drágeas foram trituradas a pó fino, transferindo-se o equivalente a 100,0 mg de cloridrato de doxiciclina exatamente pesado para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de ácido clorídrico 0,1 N estéril. Completou-se ao volume com o mesmo diluente. A solução-teste foi preparada empregando-se a água destilada estéril como diluente para obter solução com 0,1 µg/mL.

4.2.6.6. Procedimento para o ensaio

No dia do ensaio, alíquotas de 1,0 mL de cada diluição das soluções-teste da substância química de referência e da amostra foram transferidas para cada um de três tubos de ensaio previamente esterilizados. A seguir, foram

adicionados a cada tubo 9 mL de meio para doseamento de antibióticos número 3, previamente inoculado com *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 (num total de 15 tubos para cada ensaio). Dois tubos controle contendo 1,0 mL de água destilada estéril sem o antibiótico e 9 mL de meio inoculado foram preparados. Os tubos de ensaio foram colocados aleatoriamente na grade e incubados em banho termostatzado com refluxo de água sob temperatura controlada, mantida a cerca de 36 °C por 3,5 a 4 horas, sob constante agitação. Após o término da incubação, adicionou-se 0,1 mL de solução de formaldeído PA a 37 °C em cada tubo. A transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530 nm, empregando como branco uma solução contendo 1,0 mL de diluente e 9 mL de meio de cultura não inoculado.

Para calcular a potência foi inicialmente construída a curva dose-resposta. Para isto, as médias aritméticas dos dados experimentais de cada concentração da solução da substância química de referência e da amostra da série de três tubos foram determinadas. A partir destes valores, foram calculados os pontos L (*Low*) e H (*High*) de acordo com a fórmula apresentada pela FDA³⁸. A curva padrão de melhor ajuste foi construída em papel semi-logarítmico. O valor da média aritmética da amostra foi interpolada na reta, obtendo-se a concentração do desconhecido. Esta, multiplicada pelo fator de diluição correspondente forneceu a potência do antibiótico na amostra.

4.2.7. Estudo do método de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de tetraciclina em amostras comerciais na forma de cápsulas

4.2.7.1. Preparação dos diluentes e soluções-teste

A preparação do ácido clorídrico metanólico 0,01 M, ácido oxálico 0,1 M e oxalato de amônio 0,1 M, foi conforme procedimentos de diluição estabelecidos na Farmacopéia Britânica³⁴. A preparação das soluções de oxalato de amônio

0,09 M e 0,1 M e fosfato dibásico de amônio 0,2 M e 0,18 M foi conforme procedimentos de diluição descritos na Farmacopéia Americana²⁰⁸.

4.2.7.1.1. Preparação do solvente diluente (S₁) de acordo com o procedimento da Farmacopéia Americana²⁰⁸

Para a preparação do solvente diluente, 680 mL de oxalato de amônio 0,1 M foram misturados com 270 mL de dimetilformamida, grau analítico para ensaio espectrofotométrico.

4.2.7.1.2. Preparação da solução-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina de 1000 µg/mL de acordo com o procedimento da Farmacopéia Britânica³⁰

Uma tomada de ensaio equivalente a 25,0 mg do cloridrato de tetraciclina foi pesada e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL. Cerca de 20 mL de ácido clorídrico metanólico 0,01 M foi adicionado e após agitação, o volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se solução com concentração de 1000 µg/mL. A solução obtida foi filtrada através de membrana PVDF HPLC de 0,2 µm de poro e 25 mm de diâmetro da GELMAN SCIENCES®.

4.2.7.1.3. Preparação da solução-teste da substância química de referência de cloridrato 4-epianidrotetraciclina de acordo com o procedimento da Farmacopéia Americana²⁰⁸

Cerca 10 mg da substância química de referência de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina de potência de 830 µg/mg foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 10 mL e diluído ao volume com S₁, obtendo-se uma

solução com 1000 µg/mL. A partir desta, soluções-teste com concentrações de 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01, 0,005 e 0,0025 µg/mL foram preparadas no mesmo diluente.

4.2.7.1.4. Preparação das soluções-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina de acordo com o procedimento da Farmacopéia Americana²⁰⁸

Da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina de potência 994 µg/mg, pesou-se exatamente uma quantidade equivalente a 50,0 mg do princípio ativo. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, seguido de diluição no S₁, obtendo-se solução com concentração de 1000 µg/mL. Aliquotas desta solução foram diluídas no mesmo S₁ de modo a se obter as seguintes concentrações (µg/mL): de 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 100,0; 200,0; 250,0 e 500,0.

4.2.7.1.5. Preparação das soluções-teste da amostra.

O procedimento envolveu inicialmente a pesagem analítica do pó da amostra, equivalente a 100,0 mg do cloridrato de tetraciclina. Este foi quantitativamente transferido para balão volumétrico com auxílio do solvente diluente S₁. Após agitação do pó em cerca de 50 mL do S₁ o volume foi completado para 100 mL com o mesmo diluente. A solução obtida foi filtrada e soluções nas concentrações de 25 e 100 µg/mL foram preparadas e filtradas segundo o item 4.2.7.1.2.

4.2.7.1.6. Preparação da fase móvel segundo procedimento da Farmacopéia Britânica de 1993 (BPI)

A fase móvel foi obtida pela mistura de 50 mL de dimetilformamida e 950 mL de ácido oxálico 0,1 M. O pH da solução foi ajustado para 3,9 com trietilamina. Em seguida, procedeu-se à filtração através de membrana HV em PVDF, com poro de 0,45 μm , da MILLIPORE™. A desgaseificação da solução foi realizada pelo procedimento paralelo de filtração empregando bomba à vácuo e agitação em banho de água com ultrassom

4.2.7.1.7. Preparação da fase móvel segundo procedimento da Farmacopéia Britânica de 1993 (BP11)

Misturou-se 100 mL de dimetilformamida, 120 mL de acetonitrila e 780 mL de ácido oxálico 0,1 M. Após a homogeneização, acertou-se o pH para 3,9 com trietilamina. O procedimento de filtração e desgaseificação foi de acordo com o descrito no item anterior.

4.2.7.1.8. Preparação da fase móvel segundo procedimento da Farmacopéia Americana 23 edição²⁰⁸

Foram misturados sequencialmente, 680 mL de oxalato de amônio 0,1 M, 270 mL de dimetilformamida e 50 mL de fosfato dibásico de amônio 0,2 M. Após agitar e esfriar a solução, acertou-se o pH entre 7,6 a 7,7 com ácido fosfórico 3 N ou hidróxido de potássio 3 N, quando necessário. Em seguida, procedeu-se à filtração e desgaseificação conforme o item 4.2.7.1.6.

4.2.7.1.9. Preparação da fase móvel modificada

A fase móvel foi preparada pela mistura sequencial de 639 mL de oxalato de amônio 0,09 M, 320 mL de dimetilformamida e 47 mL de fosfato dibásico de amônio 0,18 M. A mistura foi agitada e esfriada à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para valor entre 7,6 a 7,7. Seguiu-se procedimento de filtração e degaseificação, conforme o item 4.2.7.1.6.

4.2.7.2. Estudo comparativo dos métodos da Farmacopéia Britânica³⁰ e Americana²⁰⁸

4.2.7.2.1. Estudo preliminar

Para este estudo as condições cromatográficas foram determinadas empregando uma solução-teste dos padrões de cloridrato de tetraciclina e de 4-epianidrotetraciclina.

4.2.7.2.1.1. Método da Farmacopéia Britânica³⁰

Procedimento do ensaio para o estudo do método para o cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

Condição do sistema cromatográfico:

Coluna: μ -Bondapak C₁₈

Fluxo da fase móvel: 2 mL/minuto

Temperatura da coluna: 40 °C

Detector UV: 280 nm

Um volume de 20 μL das soluções-teste dos padrões de cloridrato de tetraciclina-1000 $\mu\text{g/mL}$ e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina-100 $\mu\text{g/mL}$ foram injetados no cromatógrafo empregando, respectivamente as fases BPI e BPII.

4.2.7.2.1.2. Método da Farmacopéia Americana²⁰⁸

Condições do sistema cromatográfico estabelecidas pela Farmacopéia Americana:

Coluna cromatográfica de fase reversa SYMMETRY™ C₈, 250 x 4,6 mm, partículas de sílica de 5 μm .

Pré-coluna SYMMETRY™ C₈, 30 x 4,6 mm, partículas de sílica de 10 μm .

Fase móvel: descrita no item 4.2.7.1.8.

Fluxo: 2,0 mL/minuto

Detector UV: 280 nm

Soluções-teste do padrão e da amostra com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ foram recomendadas para serem injetadas no cromatógrafo a fim realizar a determinação quantitativa.

4.2.7.3. Estudo de adequação dos parâmetros do método cromatográfico de fase reversa para a determinação da tetraciclina empregando o método da Farmacopéia Americana²⁰⁸

A pressão na condição do sistema cromatográfico estabelecida pela Farmacopéia Americana²⁰⁸ foi determinada para a velocidade do fluxo da fase móvel através da coluna com o seu aumento gradual até atingir a pressão máxima de 4000 psi.

A velocidade do fluxo da fase móvel empregando uma solução-teste do padrão de cloridrato de tetraciclina e a determinação do tempo de retenção da

tetraciclina foram estudadas com solução de concentração de 250 µg/mL injetada no cromatógrafo a um volume de 20 µL. Foram realizadas três injeções da solução para cada velocidade do fluxo da fase móvel estudado: 0,8, 1,0 e 1,2 mL/minuto. Os cromatogramas foram registrados e analisados no programa MILLENIUM™ e o correspondente tempo de retenção da tetraciclina obtido.

O estudo da influência da composição da fase móvel nas condições do sistema cromatográfico considerou a modificação da concentração dos sais: oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio. A proporção dos componentes das fases eluentes permaneceram constantes, alterando-se a concentração das soluções do oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio, de acordo com a Tabela 1.

Experimentalmente as concentrações das soluções aquosas foram diminuídas para 80, 90 e 95 % em relação às soluções recomendadas na metodologia oficial. O pH foi mantido entre 7,6 e 7,7.

TABELA 1 Composição da fase móvel destinada ao estudo da influência da concentração do oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio presentes na fase móvel, sem alteração da proporção de cada componente

	Concentração (molar)		Concentração relativa (%)
	Oxalato de amônio	Fosfato dibásico de amônio	
Sem alteração (USP)	0,1	0,2	100
Fase móvel I	0,095	0,19	95
Fase móvel II	0,09	0,18	90
Fase móvel III	0,08	0,16	80

Concentração (%) = concentração das soluções em relação àquela sem alteração

Da solução-teste do padrão de 250 µg/mL, três réplicas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo para cada fase móvel estudada. Procedeu-se o ensaio a diferentes velocidades do fluxo da fase móvel: 0,8, 1,0 e 1,2 mL. O tempo de retenção da tetraciclina foi obtido pelo registro e análise dos dados do cromatograma no programa MILLENIUM™.

O estudo envolveu também, a alteração da proporção de dimetilformamida. O volume da dimetilformamida foi aumentado em relação à composição total da fase móvel, procedendo-se à diminuição do mesmo volume das soluções aquosas recomendadas na metodologia oficial, mantendo o volume final constante. Os volumes da dimetilformamida foram aumentados em 10, 25 e 50 mL, conforme Tabela 2.

O pH permaneceu entre 7,6 a 7,7.

TABELA 2 Composição da fase móvel com aumento da proporção de dimetilformamida e diminuição das soluções de oxalato de amônio 0,1 M e fosfato dibásico de amônio 0,2 M

Fase móvel	Proporção (mL)			Volume adicional (mL)
	Oxalato de amônio 0,1 M	Dimetilformamida	Fosfato dibásico de amônio 0,2 M	Dimetilformamida
Sem alteração	680	270	50	-
IV	670	280	45	10
V	667,5	295	37,5	25
VI	655	320	25	50

Da solução-teste do padrão de 250 µg/mL, três réplicas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo para cada fase móvel estudada. Procedeu-se o ensaio a diferentes velocidades do fluxo da fase móvel: 0,8, 1,0 e 1,2 mL. O tempo de

retenção da tetraciclina foi obtido pelo registro e análise dos dados do cromatograma no programa MILLENIUM™.

A alteração concomitante da proporção de dimetilformamida e da concentração e proporção das soluções aquosas foram estudadas. Os eluentes estudados nesta etapa do trabalho estão apresentados na tabela a seguir.

TABELA 3 Composição da fase móvel com aumento da proporção da dimetilformamida e da diminuição da proporção e concentração das soluções de oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio

	Proporção (mL)				Volume adicional (mL)	
	Oxalato de amônio		Dimetilformamida	Fosfato dibásico de amônio	Dimetilformamida	
Fase móvel	0,09 M	0,1 M	-	0,18 M	0,2 M	-
Sem alteração	-	680	270	-	50	-
VII	-	630	320	-	50	50
VIII	639	-	320	47	-	50

Nas duas fases testadas o volume da dimetilformamida foi aumentado de 50 mL. Na fase móvel VII, aumentou-se o volume do oxalato de amônio 0,1 M mantendo-se inalterada a proporção da solução de fosfato dibásico de amônio 0,2 M. A fase móvel VIII teve o volume de dimetilformamida aumentado de 50 mL, sendo proporcionalmente diminuído o volume das duas soluções aquosas, cuja concentração foi aquela com 90 % em relação à recomendada no método oficial. O pH foi acertado para valor entre 7,6 a 7,7.

Foram realizadas réplicas de cinco injeções de 20 µL da solução de 250 µg/mL de cloridrato de tetraciclina, no cromatógrafo, mantendo-se o fluxo da fase

móvel a 1,2 mL/minuto. Foram determinados os tempos de retenção da tetraciclina para cada cromatograma.

4.2.7.4. Procedimento do ensaio para o estudo do método para a determinação do cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

Após a adequação do sistema cromatográfico, volumes de 20 μ L das duas soluções-teste das substâncias químicas de referência de cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina nas concentrações de 500 e 100 μ g/mL respectivamente, foram injetados no cromatógrafo e obtidos os cromatogramas correspondentes.

4.2.7.5. Validação da metodologia

4.2.7.5.1. Construção da curva de calibração

A condição do sistema cromatográfico foi:

Coluna cromatográfica de fase reversa SYMMETRY™ C₈, 250 x 4,6mm, partículas de sílica de 5 μ m.

Pré-coluna SYMMETRY™ C₈, 30 x 4,6 mm, partículas de sílica de 10 μ m.

Fase móvel: descrita no item 4.2.7.1.9.

Fluxo: 1,2 mL/minuto

Detector UV: 280 nm

Volume de injeção: 20 μ L

A coluna foi mantida à temperatura controlada de 30 °C

Para cada concentração da solução-teste nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 100,0; 200,0; 250,0 e 500,0 μ g/mL foram realizadas cinco injeções no cromatógrafo. Os cromatogramas foram registrados e os dados analisados pelo programa MILLENIUM™. A curva de calibração foi obtida a partir

de resultados de área do pico e concentração das soluções-teste e foi construída empregando o programa citado. O valor de correlação foi obtido e para cada grupo de resultados correspondendo a uma concentração foram calculados os valores de coeficiente de variação.

4.2.7.5.2. Estudo da reprodutibilidade de resposta quando empregados diferentes números de lote da coluna SYMMETRY™

Procedeu-se à determinação dos valores de área do pico nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL com 3 colunas SYMMETRY™ de diferentes números de lote. De cada concentração foram realizadas cinco injeções. As áreas dos picos foram obtidas através do registro e cálculo empregando o programa MILLENIUM™. A comparação foi realizada pela análise da variação da resposta entre as colunas. Para isto, determinaram-se os valores do coeficiente de variação em relação ao fator de análise

4.2.7.5.3. Padronização das soluções-teste do padrão e amostra empregados na determinação quantitativa do cloridrato de tetraciclina em amostras comerciais

Para estabelecer as soluções-teste do padrão e amostra empregados nos ensaios, foram efetuados doseamentos em que se variou as soluções do padrão frente às soluções da amostra.

4.2.7.5.3.1. Determinação quantitativa do princípio ativo, empregando a curva padrão com cinco concentrações e uma solução-teste da amostra.

A curva foi construída mediante as condições experimentais empregadas no item 4.2.7.2.1.2.. para as soluções da substância química de referência entre 10 a 500 $\mu\text{g/mL}$.

Uma amostra foi empregada para este ensaio. Réplicas de cinco injeções das soluções da amostra de 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram efetuadas. Os cromatogramas foram obtidos, e as áreas do pico determinadas.

Através dos cromatogramas obtidos foi construída a curva de calibração, empregando os valores de área do pico e as concentrações correspondentes. O cálculo para a quantificação do teor nas amostras foi individualmente realizado para cada concentração testada da amostra frente à curva de calibração.

A variação dos resultados para todas as injeções foi analisada obtendo-se o valor do coeficiente de variação a fim de verificar a repetibilidade dos resultados.

4.2.7.5.3.2. Determinação quantitativa do cloridrato de tetraciclina em amostra de concentração única frente a diferentes soluções-teste do padrão

Soluções do padrão nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e da amostra de 50 $\mu\text{g/mL}$ foram empregadas nesta etapa do trabalho.

Foram realizadas seqüencialmente cinco injeções da solução da amostra e cinco injeções da solução padrão na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, o mesmo procedimento foi repetido empregando as soluções de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e as soluções de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do padrão.

Cada conjunto de soluções do padrão e da amostra injetadas seguidamente foi considerado um ensaio individual. Calculou-se o teor de cloridrato de tetraciclina, comparando-se os valores de área do pico do conjunto

de padrão e amostra injetados seguidamente. Para a comparação, foi determinado o valor do coeficiente de variação entre todos valores de teor obtidos.

A dosagem da amostra empregando soluções-teste do padrão e amostra nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, foram feitos com dois ensaios independentes, empregando-se inicialmente as duas soluções do padrão e as duas soluções da amostra. Em seguida, outro ensaio independente realizado foi empregando as soluções padrão de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e a solução da amostra de 50 $\mu\text{g/mL}$. Para o estudo, três amostras diferentes foram determinadas.

O teor foi calculado pela comparação dos resultados do cromatograma do padrão e amostra. Nos dois ensaios anteriores, o teor foi calculado considerando a resposta para as soluções empregadas em cada ensaio. Os resultados dos dois ensaios realizados para este estudo foram comparados em relação à variação entre os dados das três amostras, através da determinação do coeficiente de variação.

4.2.7.5.4. Determinação do limite de detecção para o cloridrato de tetraciclina

As soluções-teste preparadas nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 e 0,005 $\mu\text{g/mL}$ foram injetadas no cromatógrafo nas mesmas condições do sistema cromatográfico apresentadas no item 4.2.7.2.1.2. Foram injetadas cinco réplicas para cada solução. Os cromatogramas foram registrados, e o limite de detecção determinado pela análise do cromatograma. Este limite é definido como aquele que produz uma resposta à solução do padrão duas vezes maior que o ruído observado no cromatograma.

4.2.7.5.5. Estudo da repetibilidade do ensaio de determinação quantitativa da tetraciclina, aplicado às amostras comerciais nas condições experimentais estabelecidas

O ensaio foi aplicado a 5 amostras escolhidas aleatoriamente. O ensaio foi repetido por 4 a 6 vezes em diferentes dias. O teor foi obtido através do programa MILLENIUM™ após a injeção das soluções do padrão e amostra. Um total de cinco injeções foram efetuadas para cada solução-teste.

Após a obtenção da área do pico de cada cromatograma da amostra, o fator de análise foi calculado. O coeficiente de variação em relação ao fator de análise e o teor encontrados para cada lote de amostra analisado foram calculados.

4.2.7.5.6. Teste de recuperação

As soluções-teste do padrão e amostra foram preparadas na concentração de 500 µg/mL.

As soluções para o teste de recuperação, obtidas pela mistura das duas soluções anteriores em balão volumétrico de 50 mL e diluídas ao volume com o solvente diluente S₁, foram preparadas segundo a descrição apresentada na Tabela 4.

Neste estudo, 10 ensaios de amostras foram realizados. Para isto, foram injetadas no cromatógrafo, réplicas de cinco injeções para cada mistura estudada das amostras.

TABELA 4 Preparação das soluções empregadas no teste de recuperação

Solução-teste de recuperação	Volume da solução-teste (mL)		Volume final (mL)
	Padrão	Amostra	
1	0	5,0	50,0
2	3.0	5,0	50,0
3	5.0	5,0	50,0
4	10.0	5,0	50,0

A quantidade e porcentagem de recuperação para o método cromatográfico nas condições estabelecidas foi calculada segundo as fórmulas:

Quantidade recuperada $F = O/S$

% de recuperação $\% F = O/S \times 100$ (10)

F = concentração do cloridrato de tetraciclina encontrada na solução para o teste de recuperação em que a amostra foi adicionada da substância química de referência

O = concentração da amostra sem a adição da substância química de referência

S = concentração da substância química de referência

4.2.7.6. Determinação da adequação do método cromatográfico para o doseamento de tetraciclina para a metodologia aplicada

4.2.7.6.1. Determinação da resolução (R) entre os picos

A determinação da resolução dos picos (R) da 4-epianidrotetraciclina e do desconhecido eluido imediatamente antes foi

realizada após a obtenção do cromatograma das soluções da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina de 50 e 100 µg/mL.

O grau de separação dos picos foi determinada:

$$\text{Resolução} \quad R = \frac{V_2 - V_1}{0,5(W_1 + W_2)} \quad (208)$$

V_1 = Volume de retenção do primeiro pico

V_2 = Volume de retenção do segundo pico

W_1 = Largura do primeiro pico formado pela tangente traçada no pico

W_2 = Largura do segundo pico formado pela tangente traçada no pico

A determinação da resolução dos picos (R) obtidos da solução da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina adicionada da substância química de referência de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina foi realizada a partir das soluções das substâncias químicas de referência de cloridrato de tetraciclina de 500 µg/mL e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina de 50 µg/mL, foram tomadas alíquotas e diluídas no mesmo balão volumétrico com solvente diluente (item 4.2.7.1.1.) para obter as concentrações de 12,5 µg/mL do cloridrato de tetraciclina substância química de referência e 50 µg/mL do cloridrato de tetraciclina em mistura.

Os cromatogramas obtidos de cinco injeções da solução de resolução no cromatógrafo, nas condições experimentais definidas foram empregadas para o cálculo da resolução.

4.2.7.6.2. Determinação da seletividade ou fator de separação (α) entre a tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina.

Empregando os cromatogramas obtidos no ensaio anterior, a seletividade (α) foi calculada como segue:

A partir de:

$$\text{Seletividade} \quad \alpha = \frac{K'_2}{K'_1} \quad (207)$$

K'_1 = fator de capacidade relativo ao primeiro pico

K'_2 = fator de capacidade relativo ao segundo pico

4.2.7.6.3. Determinação da assimetria do pico (T)

A determinação da assimetria do pico permite verificar a adequação das condições do sistema cromatográfico. Para isto, calculou-se a partir dos cromatogramas da tetraciclina a assimetria do pico (T) determinada à 5 % da altura total do pico:

$$\text{Fator assimetria} \quad T = \frac{b_{0,05}}{2 \times a_{0,05}} \quad (208)$$

$a_{0,05}$ = a distância entre o início do pico e a metade do pico medido a altura 0,05 h

$b_{0,05}$ = a distância entre a metade do pico e o final do pico medido a 0,05 h

h = altura do pico

Cromatogramas obtidos da solução de 50 µg/mL foram empregados para esta determinação. A média de cinco determinações para cada concentração testada forneceu o valor de assimetria do pico (T).

4.2.7.6.4. Estudo da alteração da eficiência da coluna após frequentes injeções das soluções-teste e fase móvel

A averiguação da alteração do fator de capacidade no início e final da utilização da coluna envolveu o procedimento do estudo para verificar a alteração do fator de capacidade (K')

Os valores de fator de capacidade (K') foram calculados para cromatogramas de injeções das soluções-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, no início e final da utilização da coluna, após cerca de 1000 injeções. As médias de cinco determinações para cada concentração foram obtidas para esta determinação.

O fator de capacidade indica a retenção da amostra pela coluna e foi calculado empregando-se o tempo de retenção para o pico da tetraciclina e o volume morto da coluna.

$$\text{Fator de capacidade} \quad K' = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \quad (150)$$

V_0 = Volume morto da coluna, obtido com a injeção de solvente não retido pela coluna, o metanol

V_1 = Volume de eluição do pico

Também foi determinada a eficiência (N) da coluna após uso frequente. A eficiência ou número de pratos teóricos (N) foi calculado para os cromatogramas da solução-teste da substância química de referência de cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Foi obtida a média do valor de eficiência a partir de cinco valores de eficiência para cada concentração. Os cromatogramas estudados foram obtidos no início de utilização da coluna e no final, após cerca de 1000 injeções das soluções-teste.

Empregando a fórmula de largura do pico à metade de sua altura ($L_{0,5h}$), cuja constante é 5,54, calculou-se a eficiência como segue:

$$\text{Eficiência } N = 5,54 \left(\frac{V_{\text{retenção}}}{L_{0,5h}} \right)^2 \quad (208)$$

$V_{\text{retenção}}$ = Volume de retenção do pico

$L_{0,5h}$ = largura do pico à meia altura do pico

4.2.7.7. Comparação das duas metodologias

A comparação foi feita através da análise dos cromatogramas obtidos com as soluções dos padrões de cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina. Tempo de retenção e observação do pico foram considerados na escolha do método.

4.2.8. Doseamento do teor de cloridrato e fosfato de tetraciclina em preparações farmacêuticas comerciais na forma de cápsulas de 500 mg empregando método da Farmacopéia Americana²⁰⁸

Inicialmente foi realizada a determinação do peso médio do conteúdo das cápsulas, sendo o pó colocado em um gral e triturado para homogeneizar. Deste, tomou-se uma quantidade exatamente pesada de cerca de 100,0 mg equivalente ao cloridrato de tetraciclina e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico, com o auxílio do solvente diluente (item 4.2.7.1.1). Da solução obtida, foi preparada uma outra com concentração de 50 µg/mL, no mesmo solvente anterior, tomando-se para tanto alíquota de 1,0 mL e diluindo-se volumetricamente para 10 mL. A solução-teste da amostra foi filtrada.

As condições do ensaio foram aquelas descritas no item 4.2.7.2.1.2. Para o doseamento do teor, foram efetuadas cinco injeções subsequentes da solução-teste da substância química de referência com concentração de 50 µg/mL e cinco injeções da solução-teste da amostra.

A quantidade de tetraciclina presente na amostra foi calculada pela comparação das áreas do pico obtidas para o padrão e amostra, realizada pelo programa MILLENIUM™.

4.2.9. Estudo para a determinação de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

Neste estudo o cloridrato de 4-epianidrotetraciclina foi determinado quanto à obtenção e análise da curva de calibração, dosagem do produto, limite de detecção e determinação da resolução em relação ao produto de degradação, desconhecido, detectado no cromatograma imediatamente antes da eluição da 4-epianidrotetraciclina.

4.2.9.1. Construção da curva de calibração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

Para esta etapa do trabalho, uma solução com 500 µg/mL foi preparada tomando-se o equivalente a 12,5 mg, exatamente pesada do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina presente na substância química de referência e diluindo-se em solvente diluente (item 4.2.7.1.1.). Desta, alíquotas foram pipetadas e diluídas volumetricamente para obter soluções com concentrações de: 0,0025; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL

As condições do sistema cromatográfico foram idênticas às descritas no item (4.2.7.2.1.2). Todas as soluções preparadas foram injetadas em réplicas. Os cromatogramas foram obtidos e registrados pelo programa MILLENIUM™.

A curva foi construída empregando o programa desenvolvido pela WATERS™, MILLENIUM™. O valor de correlação foi obtido, sendo que para cada grupo de resultados correspondendo a uma concentração foram também calculados os valores de coeficiente de variação.

4.2.9.2. Limite de detecção do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

O procedimento para este ensaio foi realizado conforme o item 4.2.9.1, com a finalidade de obter a menor concentração que pode ser detectada por esta metodologia nas condições do ensaio estabelecido. Este limite foi determinado para a concentração que apresentou resposta duas vezes superior ao ruído observado no cromatograma.

4.2.10. Quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina na substância química de referência de cloridrato de tetraciclina

Duas concentrações da solução de cloridrato de tetraciclina foram preparadas, sendo de 50 e 100 µg/mL e também outras com 0,1; 0,25 e 0,5 µg/mL de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina.

As soluções-teste da substância química de referência e da amostra foram injetadas no cromatógrafo. Réplicas de 5 injeções para cada solução-teste foram realizadas. Os cromatogramas foram obtidos e os cálculos de teor da 4-epianidrotetraciclina realizados no programa MILLENIUM™. O teor foi determinado em µg da 4-epianidrotetraciclina por mg da substância química de referência da tetraciclina.

4.2.11. Dosagem do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina em amostras comerciais

Injeções das soluções-teste da substância química de referência e da amostra foram realizadas em número de 5 para cada concentração. Os cromatogramas foram obtidos e a concentração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina calculado em mg por cápsula de cloridrato ou fosfato de tetraciclina, empregando o programa MILLENIUM™. O teor em porcentagem na cápsula foi obtido empregando o valor de peso médio do conteúdo da cápsula.

4.2.12. Análise estatística

4.2.12.1. Procedimento para o estudo comparativo dos métodos de CLAE e microbiológico aplicado à cápsula de de tetraciclina de 500 mg

Para comparar os métodos de CLAE e microbiológico na determinação do conteúdo de tetraciclina, sendo o valor teórico de 500 mg, o procedimento de análise estatística foi de acordo com a descrição a seguir.

Para cada laboratório foram avaliados de um a quatro lotes, com análises em um a seis dias diferentes de acordo com cada lote testado, e no mesmo dia foram realizadas entre 3 a 13 repetições da análise. Os resultados das determinações de teor obtidos para amostras de 11 laboratórios foram considerados neste estudo.

A análise estatística efetuada a partir dos dados de teor de tetraciclina nas amostras de cápsula envolveu estudos de determinação da precisão e erro de análise, ilustrados na forma de gráficos de controle para os métodos de CLAE e microbiológico turbidimétrico.

4.2.12.2. Determinação da precisão do método

Este estudo foi feito através do cálculo do valor de desvio, a partir dos resultados de teor, obtidos das repetições dos ensaios cromatográfico e microbiológico.

4.2.12.3. Averiguação da influência do erro analítico na aprovação ou reprovação do lote

A relação entre o desvio da análise e o desvio do processo produtivo foi calculada, e comparada com as probabilidade de aceitação ou rejeição do lote, através do gráfico de aceitação/rejeição⁵².

4.2.12.4. Comparação dos resultados de teor obtidos através dos métodos cromatográfico e microbiológico empregando o teste-*t*

A diferença entre as médias dos teores dos dois métodos foi determinada através do cálculo do valor *t*, que foi comparado com a tabela de *t* ($p < 0,001$)⁶⁸.

4.2.12.5. Comparação dos métodos cromatográfico e microbiológico pelo coeficiente de correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson⁶⁸ foi calculado a partir dos valores das médias do teor, obtidos pelos métodos cromatográfico e microbiológico, para verificar se ocorre uma associação linear entre as duas metodologias.

4.2.12.6. Determinação da porcentagem de resultados fora do limite de especificação

Foram calculadas as porcentagens de resultados obtidos pelos métodos cromatográfico e microbiológico que se apresentavam fora do limite de especificação. Considerou-se resultados individuais de ensaio de amostras de cada laboratório. Para o ensaio microbiológico foram determinadas as porcentagens de resultados acima e abaixo do limite.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características da aparência e do material de embalagem

A qualidade do medicamento deve ser avaliada em todas as etapas do processo produtivo, mesmo após o acondicionamento na embalagem final. Deficiências no controle do processo produtivo e do produto final podem ser evidenciadas pela apresentação de produtos com características físicas não esperadas. Para as amostras analisadas, estas características foram observadas e descritas na Tabela 5.

TABELA 5 Descrição das características físicas de aparência do invólucro da cápsula de gelatina dura e do seu conteúdo, que diferem em relação ao total das amostras de cápsulas observadas

Laboratório	Substância ativa	Lote	Características de destaque
A	Cloridrato de oxitetraciclina	1,2,3	Inscrições TETRA 500 e <i>PFIZER</i> impressas na tampa e no corpo da cápsula, respectivamente.
B	Cloridrato de tetraciclina	3	Cápsulas levemente impregnadas de pó.
C	Idem ao anterior	1	Envelope contendo uma cápsula e metade de outra aberta embaladas juntas.
		2	Cápsulas impregnadas de pó.
		3	Cápsulas não completamente encaixadas e impregnadas de pó.
D	Idem ao anterior	1	Pó fino amarelo pardo, com presença de grânulos com granulometria maior, de cor amarelo canário.
		3	Cápsulas impregnadas com corante azul da embalagem (blister de alumínio azul).
E	Idem ao anterior	3	Pó não homogêneo de cor amarelo pardo, com presença de grumos maiores, quase brancos, de difícil trituração.
		4	Cápsulas impregnadas de pó.
F	Idem ao anterior	1	Cápsulas de cor vinho.
H	Idem ao anterior	1,2,3,4	Inscrição LUPER impressa na tampa e corpo da cápsula.

TABELA 6 Características observadas na embalagem primária das amostras comerciais

Laboratório	Substância ativa Forma farmacêutica	Lote	Embalagem primária
Ar	Cloridrato de doxicilina Drágea	1,2,3	Com número de lote. Blister com 15 drágeas.
A	Cloridrato de oxitetraciclina Cápsula	1,2,3	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas juntas.
B	Cloridrato de tetraciclina Cápsula	1,2,3	Com número de lote. Envelope com 4 unidades individualmente embaladas.
C	Idem ao anterior	1	Com número de lote. Blister com 4 unidades embaladas separadamente.
		2,3	Sem número de lote. Envelope com 4 individualmente embaladas.
D	Idem ao anterior	1	Sem número de lote. Blister com 4 unidades embaladas individualmente.
		2	Com número de lote. Blister com 4 unidades embaladas individualmente apresentando rebarbas.
		3	Com número de lote. Blister com 4 unidades embaladas individualmente.
E	Idem ao anterior	1,2,3,4	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas 2 a 2.
F	Idem ao anterior	1	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas individualmente.
G	Idem ao anterior	1,2	Sem número de lote. Blister com 4 unidades embaladas individualmente.
		3	Com número de lote. Blister com 4 unidades individualmente embaladas.
H	Idem ao anterior	1,2,3,4	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas 2 a 2.
I	Idem ao anterior	1,2	Com número de lote. Blister com 4 unidades embaladas individualmente.
		3	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas individualmente.
J	Idem ao anterior	1	Sem número de lote. Blister com 4 unidades embaladas individualmente.
K	Idem ao anterior	1,2	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas juntas.
		3	Sem número de lote. Envelope contendo 4 unidades colabadas.
L	Fosfato de tetraciclina Cápsula	1,2,3,4	Com número de lote. Envelope com 4 unidades embaladas juntas.

O material de embalagem tem como um dos principais objetivos proteger o medicamento. A embalagem primária, secundária ou terciária deve apresentar requisitos compatíveis com a finalidade citada. A variabilidade de tipo de embalagem primária observada para amostras comerciais foi descrita na Tabela 6.

5.2. Determinação do peso médio das preparações farmacêuticas

Na Tabela 7, apresentada na página a seguir, estão demonstrados os valores de peso médio obtidos para os diferentes lotes de produtos, determinados através da média de 10 a 20 valores individuais.

5.3. Ensaio de dissolução *in vitro*

Fator adicional de influência sobre a qualidade e a eficácia terapêutica do medicamento consiste na dissolução do princípio ativo, imprescindível para sua absorção. Para investigar se as formulações permitiam a liberação adequada dos produtos, procedeu-se aos ensaios de dissolução, conforme exigido nos compêndios farmacêuticos para as preparações farmacêuticas sólidas ou que apresentem pouca solubilidade em meio aquoso. Neste estudo, os resultados do ensaio de dissolução de preparações farmacêuticas das tetraciclina estão apresentadas nas Tabelas 8 e 9.

Para a interpretação dos resultados, quando o valor de teor foi menor que o limite mínimo (**Q**) estabelecido, aplicou-se o critério de aceitação da metodologia geral para o teste de dissolução, descrita na Farmacopéia Americana^{207,208}. Nas Tabelas 10, 11 e 12, estão descritos os critérios de aceitação aplicados para cápsulas de cloridrato de tetraciclina, fosfato de tetraciclina e drágea de cloridrato de doxiciclina.

TABELA 7 Valores obtidos de peso médio das amostras comerciais da tetraciclina, a partir de 10 a 20 determinações individuais

Laboratório	Substância ativa Forma farmacêutica	Lote	Peso médio (mg)	CV (%)	Unidades fora do limite de variação (%)
A	Cloridrato de doxiciclina Drágea	1	256,1	2,4	Zero
		2	258,1	2,6	Zero
		3	254,0	1,4	Zero
A	Cloridrato de oxitetraciclina Cápsula	1	589,5	3,0	8,3
		2	588,1	2,1	Zero
		3	585,8	1,4	Zero
B	Cloridrato de tetraciclina Cápsula	1	547,2	5,8	10
		2	538,4	3,1	Zero
		3	581,4	3,8	Zero
C	Idem ao anterior	1	557,0	1,9	Zero
		2	516,0	3,1	Zero
		3	520,5	1,7	Zero
D	Idem ao anterior	1	513,1	6,8	20
		2	468,6	2,2	Zero
		3	544,4	3,5	Zero
E	Idem ao anterior	1	544,5	1,4	Zero
		2	551,7	3,0	Zero
		3	560,2	5,4	Zero
		4	548,2	5,7	18
F	Idem ao anterior	1	547,3	2,9	Zero
G	Idem ao anterior	1	527,4	3,9	8,3
		2	513,8	2,3	Zero
		3	530,8	6,6	10
H	Idem ao anterior	1	526,78	2,1	Zero
		2	525,24	3,2	Zero
		3	529,0	3,5	Zero
		4	542,1	4,5	10
H	Idem ao anterior	1	507,8	3,8	Zero
		2	512,2	4,4	5
		3	522,3	5,8	18
I	Idem ao anterior	1	526,8	1,2	Zero
K	Idem ao anterior	1	519,17	2,7	Zero
		2	487,9	4,6	10
		3	530,3	3,1	Zero
L	Fosfato de tetraciclina Cápsula	1	668,7	2,0	Zero
		2	654,3	1,2	Zero
		3	665,1	1,8	Zero
		4	686,2	2,0	Zero

CV = Coeficiente de variação

TABELA 8 Resultados da média da porcentagem de dissolução obtidos para amostras comerciais de cápsulas de tetraciclina, de acordo com a metodologia presente na Farmacopéia Americana²⁰⁸

Laboratório	Lote	Teor (%) (E1)	Número de unidades com teor abaixo do valor Q	CV (%)
A	1; 2; 3	97,7; 94,6; 97,3	0; 1; 0	1,1; 9,7; 2,9
A	1; 2; 3	91,5; 100,3; 97,8	0; 0; 0	5,7; 3,2; 4,7
B	1; 2; 3	89,9; 100,0; 96,5	1; 0; 0	11,1; 14,1; 11,6
C	1; 2	97,4; 92,3	0; 0	8,8; 4,2
D	1; 2; 3	44,0; 93,2; 57,5	6; 0; 6	4,2; 4,7; 4,2
E	1; 2; 3; 4	87,5; 90,7; 90,0; 91,2	0; 0; 0; 0	4,8; 4,0; 5,6; 7,6
F	1	95,3	0	5,2
G	1; 2; 3	101,7; 92,3; 104,3	0; 0; 0	4,5; 7,6; 2,8
H	1; 2; 3; 4	98,7; 91,5; 96,1; 95,2	0; 0; 0	3,9; 8,5; 5,1; 4,4
I	1; 2; 3	92,0; 95,5; 96,0	0; 0; 0	3,1; 4,7; 2,5
J	1	94,6	0	4,7
K	1; 2; 3	92,6; 91,1; 88,3	0; 0; 0	3,6; 4,2; 4,7
L	1; 2; 3	90,6; 89,2; 96,1	0; 0; 0	4,5; 3,7; 3,4

Aa, Ab = Drágeas de cloridrato de doxiciclina e cápsulas de oxiteraciclina do laboratório A, respectivamente; B-K = Cápsulas de cloridrato de tetraciclina; L = Cápsulas de fosfato de tetraciclina; CV = Coeficiente de variação; E1 = Estágio 1 do teste

TABELA 9 Resultados da média da porcentagem de dissolução de amostras retestadas, de acordo com o critério de aceitação da Farmacopéia Americana²⁰⁸

Laboratório	Lote	Teor(%) Reteste	Número de unidades com teor abaixo do valor Q – 15 %	CV (%)	Média do teor (%) (E2)
Aa	2	91,8	0	7,0	93,2
B	1; 2	106,9; 107,4	0; 0	8,0; 3,0	98,4; 103,7
D	1; 3	43,9; 56,5	12; 12	4,4; 3,4	44,0; 57,0

Aa = Drágeas de cloridrato de doxiciclina do laboratório A; B e D = Cápsulas de cloridrato de tetraciclina; CV = Coeficiente de variação; E2 = Estágio 2 do teste

As Tabelas a seguir, 10, 11 e 12, apresentam aspectos do procedimento para a realização do ensaio de dissolução e do reteste, com o critério de aceitação e interpretação dos resultados em cada estágio do ensaio, segundo a Farmacopéia Americana²⁰⁸.

TABELA 10 Critério de aceitação para a cápsula de cloridrato de tetraciclina e oxitetraciclina, segundo a farmacopéia Americana²⁰⁸

Estágio do ensaio	Número de cápsulas testadas	Critério de aceitação
E ₁	6	Cada unidade testada deve apresentar teor maior que 85 % (Q + 5 %). Se uma unidade testada ou mais apresentar teor menor que 85 %, seguir para o estágio 2 (E ₂).
E ₂	6 (E ₁) + 6 = 12	A média das 12 unidades testadas deve ser igual ou maior 80 % (Q) e nenhuma unidade deve apresentar teor menor 65 % (Q – 15 %). Se uma das unidades testadas ou mais apresentar teor menor que 65 %, segue-se o estágio 3.
E ₃	12 (E ₁ + E ₂) + 12 = 24	A média das 24 unidades testadas (E ₁ + E ₂ + E ₃) deve ser igual ou maior que 80 % e não mais que 2 unidades devem apresentar teor menor que 65 %.

Q = Limite mínimo de teor de cloridrato de tetraciclina em porcentagem estabelecido na monografia

TABELA 11 Critério de aceitação para a cápsula de fosfato de tetraciclina segundo a Farmacopéia Americana²⁰⁸

Estágio do ensaio	Número de cápsula testado	Critério de aceitação
E ₁	6	Cada unidade testada deve apresentar teor maior que 80 % (Q + 5 %). Se uma unidade testada ou mais apresentar teor menor que 80%, seguir para o estágio 2 (E ₂).
E ₂	6 (E ₁) + 6 = 12	A média das 12 unidades testadas deve ser igual ou maior 75 % (Q) e nenhuma unidade deve apresentar teor menor 60 % (Q – 15 %). Se uma das unidades testadas ou mais apresentar teor menor que 60%, segue-se o estágio 3.
E ₃	12 (E ₁ + E ₂) + 12 = 24	A média das 24 unidades testadas (E ₁ + E ₂ + E ₃) deve ser igual ou maior que 75 % e não mais que 2 unidades devem apresentar teor menor que 60 %.

Q = Limite mínimo de teor de fosfato de tetraciclina em porcentagem estabelecido na monografia.

TABELA 12 Critério de aceitação para o ensaio de dissolução empregado na interpretação do resultado para drágea de cloridrato de doxiciclina segundo a Farmacopéia Americana²⁰⁸

Estágio do ensaio	Número de cápsula testado	Critério de aceitação
E ₁	6	Cada unidade testada deve apresentar teor maior que 90 % (Q + 5 %). Se uma unidades testada ou mais apresentar teor menor que 90%, seguir para o estágio 2 (E ₂).
E ₂	6 (E ₁) + 6 = 12	A média das 12 unidades testadas deve ser igual ou maior 85 % (Q) e nenhuma unidade deve apresentar teor menor 70 % (Q – 15 %). Se uma das unidades testadas ou mais apresentar teor menor que 70 %, segue-se o estágio 3.
E ₃	12 (E ₁ + E ₂) + 12 = 24	A média das 24 unidades testadas (E ₁ + E ₂ + E ₃) deve ser igual ou maior que 85 % e não mais que 2 unidades devem apresentar teor menor que 70 %.

Q = Limite mínimo de teor de cloridrato de doxiciclina em porcentagem estabelecido na monografia

5.4. Estudo da determinação do método CLAE para a quantificação da tetraciclina em amostras comerciais na forma de cápsula

5.4.1. Comparação entre os métodos descritos na Farmacopéia Americana²⁰⁸ e Britânica³⁰

Para verificar a aplicabilidade das metodologias das Farmacopéia Britânica³⁰ e Farmacopéia Americana²⁰⁸, um ensaio preliminar foi realizado para confirmar a adequação da condição do sistema cromatográfico estabelecido.

Empregando o ensaio descrito na Farmacopéia Britânica³⁰, os cromatogramas obtidos para a 4-epianidrotetraciclina e tetraciclina estão representados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. O valor de fator de capacidade para a 4-epianidrotetraciclina foi determinado como 5,5 e para a tetraciclina foi de 10,5. A pressão nas condições do ensaio foi de 2282 psi.

Para o método da Farmacopéia Americana²⁰⁸, a variabilidade dos parâmetros determinados na metodologia oficial foi inicialmente pesquisada com a averiguação da influência da velocidade de fluxo da fase móvel sobre a pressão no sistema. Aplicou-se aumentos sucessivos da velocidade de fluxo, determinando-se a pressão observada até um máximo de 4000 psi, como apresentada na Tabela 13.

FIGURA 2 Cromatograma referente ao padrão de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ obtido pelo método cromatográfico descrito na Farmacopéia Britânica³⁰, sob a condição do sistema cromatográfico: coluna $\mu\text{-Bondapak C}_{18}\text{-125 A-10 } \mu\text{m-3,9 x 300 mm}$, temperatura de 40 °C, fluxo de 1,5 mL/minuto, detecção a 280 nm, volume de injeção de 20 μL e fase móvel: dimetilformamida: acetonitrila: ácido oxálico 0,1 M (10:12:78).

FIGURA 3 Cromatograma referente ao padrão de cloridrato de tetraciclina na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ obtido pelo ensaio cromatográfico descrito na Farmacopéia Britânica³⁰, sob a condição do sistema: coluna $\mu\text{-Bondapak C}_{18}\text{-125 A-10 } \mu\text{m-3,9 x 300 mm}$, temperatura de 40 °C, fluxo de 1,5 mL/minuto, detecção a 280 nm, volume de injeção de 20 μL e fase móvel: Dimetilformamida: ácido oxálico 0,1 M (5:95)

TABELA 13 Pressão registrada com o aumento da velocidade de fluxo da fase móvel na coluna sob as condições do sistema cromatográfico: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 µm, detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,1 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,2 M (68:27:5)

Velocidade de fluxo da fase móvel (mL/minuto)	Pressão (psi)
0,8	1788
0,9	2071
1,0	2400
1,1	2682
1,2	2918
1,3	3200
1,4	3435
1,5	3694
1,6	Ultrapassou 4000 (Máxima)

Uma vez determinado o comportamento da pressão aplicada no sistema em relação à velocidade do fluxo da fase móvel, estudou-se o tempo de retenção e a pressão aplicada à coluna com velocidade de fluxo de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/minuto. Os resultados podem ser observados na Tabela 14.

TABELA 14 Valores de tempo de retenção (minuto) e pressão (psi) para a solução padrão de tetraciclina a 250 µg/mL, frente a diferentes velocidades de fluxo da fase móvel, composta por oxalato de amônio 0,1 M, dimetilformamida e fosfato dibásico de amônio 0,2 M (68:27:5), bombeado para o cromatógrafo no sistema consistindo de coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 µm, detector a 280 nm, temperatura a 30 °C

Velocidade de fluxo da fase móvel (mL/minuto)	Pressão (psi)	Tempo de retenção (minuto)	Média (minuto)
0,8	1989	13,0	13,1
		13,3	
		13,0	
1,0	2400	9,0	9,0
		9,1	
		9,0	
1,2	2941	8,2	7,8
		7,7	
		7,6	

Na Tabela 15, foram apresentados resultados de pressão e tempo de retenção quando da variação da concentração das soluções aquosas do oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio, frente à velocidade do fluxo da fase móvel de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/minuto.

TABELA 15 Valores de tempo de retenção (minuto) obtidos com a injeção da soluções-teste do padrão de 250 µg/mL, para fases eluentes com diferentes concentrações do oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio. Foram realizadas três injeções para cada fase móvel e velocidade do fluxo

Fase móvel	Velocidade de fluxo da fase móvel (mL/minuto)	Pressão (psi)	Tempo de retenção (minuto)	Média (minuto)
I	0,8	1929	15,2	15,2
		1929	15,2	
		1929	15,2	
	1	2471	12,2	11,8
		2471	11,7	
		2988	11,6	
	1,2	1988	10,1	10,2
		2988	10,1	
		2988	10,4	
II	0,8	1906	15,3	14,2
		1906	13,6	
		1859	13,4	
	1	2400	10,7	10,5
		2376	10,7	
		2400	10,7	
	1,2	2918	8,9	8,9
		2918	8,9	
		2918	8,9	
III	0,8	1859	14,2	14,2
		1859	14,2	
		1859	14,1	
	1	2424	11,4	11,3
		2424	11,4	
		2424	11,4	
	1,2	2918	9,5	9,5
		2941	9,5	
		2918	9,5	

Prosseguindo à averiguação da influência da composição da fase móvel, os resultados da Tabela 16 mostram a variação do tempo de retenção e pressão a diferentes velocidade de fluxo, quando a proporção do componente menos polar (dimetilformamida) é aumentada.

TABELA 16 Resultados de tempo de retenção (minuto) empregando a fase móvel com volumes maiores de dimetilformamida e redução equivalente do volume das soluções aquosas de oxalato de amônio 0,1 M e fosfato dibásico 0,2 M, mantendo o volume final

Fase móvel	Velocidade de fluxo da fase móvel (mL/minuto)	Pressão (psi)	Tempo de retenção (minuto)	Média (minuto)
IV	0,8	2188	14,5	14,2
		2188	14,2	
		2141	14,1	
	1,0	2729	11,3	11,2
		2706	11,2	
		2682	11,2	
	1,2	3082	9,0	9,1
		3129	9,1	
		3224	9,3	
V	0,8	2329	13,4	13,0
		2353	12,7	
		2353	12,7	
	1	3012	10,3	10,3
		3012	10,3	
		3012	10,3	
	1,2	3647	8,6	8,9
		3647	8,6	
		3647	8,6	
VI	Precipitou à temperatura ambiente	—	—	—

Os resultados obtidos empregando a fase móvel VIII estão expressos na Tabela 17. A fase móvel VII precipitou quando a temperatura ambiente foi inferior a 25 °C, causando interrupção do bombeamento.

TABELA 17 Valores de tempo de retenção (minuto) e pressão (psi) para solução-teste do padrão frente a mesma velocidade de fluxo da fase móvel injetado no cromatográfico líquido de alta eficiência

Fase móvel	Pressão (Psi)	Tempo de retenção (minutos)
VII	Precipitou à temperatura ambiente inferior a 25 °C	-
	2988	9,1
	2988	9,1
VIII	2988	9,1
	2988	9,1
	2988	9,0

Portanto, a fase móvel modificada (VIII) composta por oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida e fosfato dibásico de amônio 0,18 M na proporção de 63,9:32,0:4,7 foi estabelecida para os ensaios, após a obtenção dos cromatogramas do cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, tendo as condições de coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 µm, detector a 280 nm, temperatura a 30 °C. As Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, os cromatogramas com os picos do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina e cloridrato de tetraciclina.

5.5. Validação do método CLAE descrito na Farmacopéia Americana²⁰⁷

5.5.1. Construção da curva de calibração do cloridrato de tetraciclina

Os dados referentes à construção da curva de calibração estão apresentadas na Tabela 18, onde consta a média da área do pico e do fator de análise para cada concentração testada. Através destes dados, a curva de calibração foi construída conforme ilustrada na Figura 6. O coeficiente de correlação foi 0,9996 e o coeficiente de variação entre os valores do fator de análise foi 3,9 %.

Os resultados de coeficiente de variação entre as injeções foram menores que 2 %, valor recomendado como limite pela Farmacopéia Americana²⁰⁸, para ensaios com cinco injeções. Sabendo-se que a saturação de coluna e conseqüente diminuição de sua vida útil, depende também da concentração da substância testada, a curva de calibração da tetraciclina foi obtida nas concentrações inferiores de 0,5 até 25 µg/mL, como representado na Figura 7, resultando no coeficiente de correlação de 0,9990.

Na Figura 8 está apresentado o cromatograma obtido da injeção de uma solução de 100 µg/mL do padrão de cloridrato de tetraciclina.

TABELA 18 Resultados obtidos de área do pico para soluções-teste do cloridrato de tetraciclina no intervalo de 0,5 a 500 µg/mL, no ensaio cromatográfico para a construção da curva de calibração segundo as condições cromatográficas da Farmacopéia Americana, modificadas²⁰⁸. A média da área do pico foi obtida de cinco injeções para cada concentração

Concentração (µg/mL)	Média da área do pico	Fator de análise	CV (%)
0,5	13159	26318	1,3
1	28681	28681	6,7
5	139345	27869	0,5
10	308720	30872	3,5
25	698908	27996	0,5
50	1414984	28300	0,3
100	2846615	28466	0,4
200	5601890	28009	0,5
250	7072055	28288	0,1
500	14280021	28560	0,2
CV (%)		3,9	
R		0,9999	

CV = Coeficiente de variação

R = Valor da correlação da curva de calibração

Fator de análise = Área do pico/concentração correspondente

TABELA 19 Reprodutibilidade dos resultados experimentais referentes a 3 concentrações da solução-teste do padrão de cloridrato de tetraciclina (10, 50 e 100 µg/mL) injetadas em 3 colunas (SYMMETRY™), com diferentes número de lote, empregadas no ensaio cromatográfico da tetraciclina

Solução-teste Concentração (µg/mL)		Coluna								
		1		2		3				
		Área do pico	Fator de análise	CV (%)	Área do pico	Fator de análise	CV (%)	Área do pico	Fator de análise	CV (%)
10		284384	28438	2,0	322237	32224	3,5	300363	30036	0,5
		283083	28308		310965	31097		299183	29918	
		291190	29119		304926	30492		296771	29677	
		297034	29703		296751	29675		296771	29677	
		287324	28732		-	-		-	-	
50		1495636	29913	0,6	1414822	28296	0,3	1498401	29659	0,5
		1493340	29867		1412546	28251		1482960	29712	
		1495793	29916		1413791	28276		1485614	29587	
		1481510	29630		1412062	28241		1479328	29564	
		1500698	30014		1421699	28434		1478219	29767	
100		3020806	30208	0,2	2843847	28438	0,4	2976728	29762	0,3
		3023581	30236		2843684	28437		2964517	29645	
		3020723	30207		2840001	28400		2961547	29615	
		3028728	30287		2841121	28411		2951302	29513	
		3015510	30155		2864420	28644		2953654	29537	
CV (%)		2,3			4,2			0,6		
Reprodutibilidade entre colunas CV (%)				2,9						

CV = Coeficiente de variação
Fator de análise: $\frac{\text{área do pico}}{\text{concentração correspondente}}$

FIGURA 4 Cromatograma do padrão de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina obtido de solução a 100 $\mu\text{g/mL}$, com picos com tempo de retenção de 5,3 minutos. Condições do sistema cromatográfico da Farmacopéia Americana, modificadas²⁰⁸: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de sílica de 5 μm , detector a 280 nm, volume de injeção: 20 μL , temperatura a 30 °C, fluxo: 1,2 mL/minuto e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32,0:4,7)

FIGURA 5 Cromatograma obtido da solução padrão de cloridrato de tetraciclina a 500 $\mu\text{g/mL}$, nas condições do sistema cromatográfico da Farmacopéia Americana, modificadas²⁰⁸: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de sílica de 5 μm , detector a 280 nm, volume de injeção: 20 μL , temperatura a 30 °C, fluxo: 1,2 mL/minuto e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida, fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32,0:4,7)

FIGURA 6 Curva de calibração do cloridrato de tetraciclina para o ensaio cromatográfico. As soluções-teste injetadas representaram concentrações no intervalo de 0,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina e as áreas dos picos determinadas nas condições do sistema cromatográfico da Farmacopéia Americana, modificadas²⁰⁸: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida, fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32,0:4,7)

FIGURA 7 Curva de calibração obtida para o cloridrato de tetraciclina a partir de soluções-teste nas concentrações de 0,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$ segundo o método cromatográfico recomendado pela Farmacopéia Americana²⁰⁸ nas condições do sistema cromatográfico modificadas: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida, fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:4,7)

FIGURA 8 Cromatograma do padrão de cloridrato de tetraciclina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ com tempo de retenção de 7,2 minutos e condição do sistema cromatográfico modificado, estabelecido a partir do método da Farmacopéia Americana²⁰⁸: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

5.5.2. Estudo de reprodutibilidade de resposta quando empregados diferentes números de lote da coluna SYMMETRY™

A reprodutibilidade do ensaio cromatográfico quando a coluna é de diferentes números de lote foi verificada através do ensaio com três colunas contendo mesmo material (C₈), de diferentes números de lote, testada nas mesmas condições. Na Tabela 19, estão registrados os valores de coeficiente de variação do conjunto de ensaios obtidos da mesma concentração da solução padrão, bem como do conjunto de ensaios para cada coluna e para o conjunto total de respostas, obtidos através dos valores de fator de resposta.

5.5.3. Estudo da padronização do número de soluções do padrão e amostra para a aplicação do ensaio cromatográfico

No estudo do método cromatográfico, a quantificação da tetraciclina presente na amostra foi realizada frente à curva de calibração cuja faixa de concentração foi de 10 a 500 µg/mL, empregando em paralelo, duas soluções-teste da amostra. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 20.

TABELA 20 Teor de cloridrato de tetraciclina determinado frente a curva de calibração do padrão, na faixa de concentração de 10 a 500 µg/mL, empregando duas soluções da amostra nas concentrações de 25 e 100 µg/mL

Teor (mg/cápsula)		
	Solução-teste da amostra (µg/mL)	
	25	100
	465,7	454,1
	463,1	453,6
	462,0	453,6
	461,0	453,5
	460,4	453,0
CV (%)	0,5	0,1
Média (µg/mL)	462,4	453,5
Média (%)	92,5	90,7
Repetibilidade do ensaio	1,1	
CV (%)		

CV = Coeficiente de variação

A correlação (R) para a curva de calibração foi de 0,9999

Reduzindo o número de soluções-teste do padrão da tetraciclina e variando o número destas soluções em cada ensaio, o método cromatográfico foi aplicado a uma amostra de tetraciclina com concentração de 50 µg/mL. Os resultados estão expressos na Tabela 21, evidenciando os três ensaios independentes realizados, cada um com cinco valores de teor por cápsula como mostra a tabela.

TABELA 21 Teor de cloridrato de tetraciclina determinado frente a soluções-teste da substância de referência, cloridrato de tetraciclina, com 25; 25 e 50; e 25, 50 e 100 µg/mL, aplicado a amostra comercial empregando a cromatografia líquida de alta eficiência nas condições estabelecidas na Farmacopéia Americana²⁰⁸, modificadas

Teor (mg/cápsula)			
	Concentração da solução-teste da substância de referência (µg/mL)		
	25	25, 50	25, 50 e 100
	25	25, 50	25, 50 e 100
	525,3	513,0	517,7
	526,5	514,2	519,0
	527,0	514,7	519,4
	526,9	514,5	519,3
	527,7	514,4	520,1
CV (%)	0,2	0,2	0,2
Repetibilidade do ensaio CV (%)		1,0	

CV = Coeficiente de variação

O método foi aplicado a três diferentes amostras, empregando dois ensaios cuja diferenciação ocorre no número de soluções-teste da amostra. Para o ensaio 1, uma única concentração é empregada, sendo de 50 µg/mL, enquanto que no ensaio 2 são empregadas duas concentrações, 50 e 100 µg/mL. Nos dois ensaios, a determinação foi frente a duas concentrações da solução do padrão, de 50 e 100 µg/mL, com resultados expressos na Tabela 22.

TABELA 22 Resultados de teor de cloridrato de tetraciclina encontrados para três amostras comerciais doseadas com o emprego de soluções-teste do padrão nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Dois ensaios foram realizados, sendo empregadas em ambos, as duas soluções do padrão

	Teor (mg/cápsula)					
	Amostra					
	1		2		3	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
	498,7	501,8	530,2	531,2	501,4	501,6
	497,8	501,8	530,5	530,3	501,7	500,9
	497,3	501,4	530,2	529,6	501,4	500,6
	497,6	501,6	530,3	529,5	501,4	500,4
	498,0	503,0	530,3	529,6	501,3	500,3
CV (%)	0,1	0,9	0,0	0,2	0,0	0,2
Repetibilidade ou CV (%)	0,4		0,1		0,9	

CV = Coeficiente de variação

Ensaio 1 = Solução da amostra na concentração de 50 µg/mL

Ensaio 2 = Soluções da amostra nas concentrações de 50 e 100 µg/mL

5.5.4. Construção da curva de calibração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

A Tabela 23 apresenta os dados referentes aos picos das soluções de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina na faixa de 0,005 a 50 µg/mL, graficamente representados na Figura 9. Cada resultado apresentado de área do pico, fator de análise e coeficiente de variação é proveniente da média de cinco determinações. O coeficiente de correlação encontrado foi igual a 0,9999.

TABELA 23 Resultados obtidos na construção da curva de calibração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina para o ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência empregando o método da Farmacopéia Americana modificado²⁰⁸. Cada concentração apresenta valores resultantes da média efetuada a partir de réplicas de cinco injeções

Concentração (µg/mL)	Tempo de retenção (minuto)	Área do pico	Fator de análise	CV (%)
0,005	-	Não detectado	-	-
0,01	5,1	828	82500	3,1
0,025	5,1	1277	51080	4,2
0,05	5,1	2534	50680	9,5
0,10	5,1	5195	51950	1,1
0,25	5,1	12083	48332	1,7
0,50	5,1	24972	49944	1,8
1,00	5,1	50086	50086	0,8
2,50	5,1	124450	49780	0,8
5,00	5,1	527837	51567	0,8
10,00	5,1	498139	49813	0,3
25,00	5,1	1218594	48744	0,2
50,00	5,1	2487736	49755	0,6
R		0,9999		

CV = Coeficiente de variação

R = Valor da correlação da curva de calibração

FIGURA 9 Representação gráfica dos resultados obtidos para a construção da curva de calibração da 4-epianidrotetraciclina no intervalo de 0,005 a 50 $\mu\text{g/mL}$, nas condições do sistema cromatográfico, modificado, recomendado pela Farmacopéia Americana²⁰⁸. Resultados fornecidos pelo programa MILLENIUM™ da WATERS™

O cromatograma obtido da solução padrão de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina apresentou, além do pico principal a 5,5 minutos, correspondente cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, um segundo pico a 21,5 minutos, de substância desconhecida, como pode ser observado na Figura 10.

FIGURA 10 Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão de 100 µg/mL do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina nas condições sistema cromatográfico da Farmacopéia Americana²⁰⁸, modificado: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 µm, detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47), apresentando um pico desconhecido (2) eluído após 21,5 minutos.

5.5.5. Determinação do limite de detecção do cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

O limite de detecção é definido como a concentração que apresentou o pico de altura duas vezes maior que o ruído. Através da observação dos cromatogramas, o limite foi determinado como 0,01 µg/mL. Nas Figuras 11 e 12, os cromatogramas estão representados com o pico do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina. Os cromatogramas do cloridrato de tetraciclina apresentaram resposta semelhante.

As Figuras 11 e 12 referem-se aos cromatogramas do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina obtidos de soluções com concentrações de 0,01 e 0,005 µg/mL, sobrepostos, sendo respectivamente, representados pela cor preta e azul. A Figura 11 mostra os picos registrados tendo como referência o pico do diluente. Para visualizar os picos da substância estudada, a atenuação foi diminuída, possibilitando diferenciá-los do ruído, conforme a Figura 12, que mostra os mesmos cromatogramas da Figura 11.

FIGURA 11 Sobreposição dos cromatogramas referentes ao cloridrato de 4-epianidrotetraciclina nas concentrações de 0,01 e 0,005 $\mu\text{g/mL}$, apresentando o pico no tempo de retenção de 5,0 minutos. Cromatogramas na cor preta e azul correspondem às concentrações respectivamente citadas. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 12 Sobreposição dos cromatogramas referentes ao cloridrato de 4-epianidrotetraciclina nas concentrações de 0,01 e 0,005 $\mu\text{g/mL}$, apresentando o pico no tempo de retenção de 5,0 minutos. Cromatogramas na cor preta e azul correspondem às concentrações respectivamente citadas, com atenuação diminuída

5.6. Determinação do teor de cloridrato e fosfato de tetraciclina em preparações farmacêuticas comerciais

Os resultados da quantificação de amostras comerciais de drágea contendo cloridrato de doxiciclina e cápsula de cloridrato de oxitetraclina pelo método microbiológico estão na Tabela 24. As amostras de cápsula de fosfato e cloridrato de tetraciclina analisadas pelos métodos microbiológico e CLAE, têm os valores resultantes de teor apresentados nas Tabelas 25 e 26.

TABELA 24 Teor de doxiciclina em drágeas de 100 mg e oxitetraclina em cápsulas de 500 mg, produzidos pelo laboratório A, analisados por método microbiológico turbidimétrico empregando *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, recomendado pela Farmacopéia Americana ²⁰⁸

Princípio ativo	Lote	Teor-mg/unidade (%)
Cloridrato de doxiciclina	1	106,9 (106,9)
	2	107,0 (107,0)
	3	107,5 (107,5)
Cloridrato de oxitetraclina	1	515,0 (103,0)
	2	547,2 (109,4)
	3	534,1 (106,8)

TABELA 25 Teor de tetraciclina obtido para amostras comerciais de cápsula de tetraciclina-500 mg, pelos métodos de cromatográfico líquida de alta eficiência estabelecido e o microbiológico, segundo a Farmacopéia Americana ²⁰⁸

Laboratório	Princípio ativo	Lote	Teor-mg/cápsula (%)			
			CLAE	CV (%)	Microbiológico	CV (%)
B	Cloridrato de tetraciclina	1	534,0 (106,8)	2,8	572,8 (114,6)	2,1
		2	529,9 (106,0)	1,1	599,4 (119,0)	0,7
		3	547,2 (109,4)	0,4	594,9 (119,0)	5,4
C	Cloridrato de tetraciclina	1	548,2 (109,6)	1,9	557,8 (11,6)	1,6
		2	507,7 (101,5)	1,5	561,0 (112,6)	1,7
		3	501,5 (100,3)	0,3	520,6 (104,1)	5,3
D	Cloridrato de tetraciclina	1	243,6 (48,7)	3,1	277,6 (55,5)	3,4
		2	460,1 (92,0)	3,9	525,5 (105,1)	4,1
		3	317,0 (63,4)	3,4	347,7 (68,7)	5,4
E	Cloridrato de tetraciclina	1	486,4 (97,3)	0,5	533,2 (106,6)	1,5
		2	479,3 (95,9)	3,1	518,2 (103,6)	4,0
		3	517,6 (103,5)	2,3	571,3 (114,6)	3,4
		4	479,1 (95,8)	0,8	510,4 (102,1)	2,0
F	Cloridrato de tetraciclina	1	514,0 (102,8)	1,0	556,3 (111,2)	1,7
G	Cloridrato de tetraciclina	1	520,9 (104,1)	1,7	594,2 (118,8)	5,5
		2	524,0 (104,8)	2,3	569,2 (113,8)	0,4
		3	507,5 (101,5)	0,3	521,8 (104,4)	3,3
H	Cloridrato de tetraciclina	1	526,5 (105,3)	0,5	562,3 (112,5)	2,2
		2	513,6 (102,7)	1,9	571,1 (114,2)	4,8
		3	517,6 (103,5)	1,2	566,8 (113,4)	3,2
		4	531,0 (106,2)	2,9	563,6 (112,7)	4,3

CV = Coeficiente de variação

TABELA 26 Teor de tetraciclina obtido para as amostras de cápsula de tetraciclina de 500 mg, pelos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência estabelecido e microbiológico, segundo a Farmacopéia Americana²⁰⁸

Laboratório	Princípio ativo	Lote	Teor – mg/cápsula (%)			
			CLAE	CV (%)	Microbiológico	CV (%)
H	Cloridrato de tetraciclina	1	498,2 (99,6)	1,3	540,9 (108,2)	1,1
		2	504,3 (100,9)	2,7	546,2 (109,2)	2,2
		3	511,6 (102,3)	2,1	585,9 (117,2)	6,7
I	Cloridrato de tetraciclina	1	466,9 (93,4)	4,0	506,5 (101,3)	0,0
K	Cloridrato de tetraciclina	1	513,2 (102,6)	4,6	588,1 (117,6)	3,3
		2	485,3 (97,1)	1,4	554,3 (110,9)	2,7
		3	487,2 (97,4)	2,0	555,4 (111,1)	2,5
L	Fosfato de tetraciclina	1	498,5 (99,7)	0,7	553,5 (110,7)	0,6
		2	516,5 (98,2)	5,3	582,9 (116,6)	1,1
		3	498,3 (99,7)	2,4	553,4 (110,7)	1,2
		4	483,8 (96,8)	1,6	524,8 (105,0)	2,0

CV = Coeficiente de variação

5.7. Avaliação da precisão do método CLAE de determinação quantitativa da tetraciclina em amostras comerciais

O teste para verificação de precisão do ensaio cromatográfico foi aplicado a cinco amostras, estando os resultados apresentados individualmente por amostra, nas Tabelas 27, 28, 29, 30 e 31. O coeficiente de correlação empregado para avaliar a repetibilidade entre os resultados de cada ensaio e entre os diferentes ensaios, empregando diferentes soluções padrão e amostra, está representado em cada tabela.

5.8. Teste de recuperação empregando amostra comercial de cápsula de tetraciclina

Na Tabela 32, estão demonstrados os valores de teor obtidos no teste de recuperação pela adição do padrão de cloridrato de tetraciclina em soluções-teste de diferentes amostras comerciais de cápsula de tetraciclina. Os resultados referem-se às soluções-teste de amostra com adição de 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do padrão à solução da amostra, de 50 $\mu\text{g/mL}$. A exatidão e especificidade do método CLAE, podem ser avaliadas pelos valores em porcentagem de tetraciclina recuperada a partir de cada solução-teste.

5.9. Quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina

5.9.1. Quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina presente no padrão de cloridrato de tetraciclina com potência de 994 $\mu\text{g/mg}$

Os valores de teor do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina na substância padrão com potência de 994 $\mu\text{g/mg}$, determinados pelo método CLAE nas condições estabelecidas, estão apresentados na Tabela 33.

TABELA 27 Teste de repetibilidade do método CLAE aplicado à cápsula de tetraciclina—L. Em cada dia de ensaio, réplicas de cinco determinações foram efetuadas, num total de seis diferentes dias de ensaio

Dia do ensaio	Teor (mg/cápsula)	Repetibilidade do ensaio CV (%)
1	531,2 531,5 531,2 530,8 529,6	0,1
2	530,2 530,5 530,2 530,3 530,3	0,0
3	501,6 501,5 501,7 502,7 503,6	0,2
4	546,6 545,0 548,0 545,9 548,0	0,2
	453,3 451,6 451,9 451,4 456,4	0,5
6	519,1 518,7 519,7 520,1 518,0	0,2
CV (%) Repetibilidade entre dias		5,2
CV = Coeficiente de variação		

TABELA 28 Teste de repetibilidade do método CLAE aplicado à cápsula de tetraciclina—I. Em cada dia de ensaio, réplicas de cinco a sete determinações foram efetuadas, num total de quatro diferentes dias de ensaio

Dia do ensaio	Teor (mg/cápsula)	CV (%) Repetibilidade do ensaio
1	507,8 507,9 507,6 59,03 508,4	0,1
2	512,8 512,9 513,0 510,5 510,7	0,3
3	493,0 490,4 491,5 492,0 495,8	0,4
4	517,6 515,5 517,1 516,2 518,6 517,3 516,9	0,2
CV (%) Repetibilidade entre dias		1,9

CV = Coeficiente de variação

TABELA 29 Teste de repetibilidade do método CLAE aplicado à cápsula de tetraciclina-H. Em cada dia de ensaio, réplicas de cinco determinações foram efetuadas, num total de cinco diferentes dias de ensaio

Dia do ensaio	Teor (mg/cápsula)	Repetibilidade do ensaio CV (%)
1	529,0 529,0 528,5 528,6 429,7	0,1
2	513,2 512,6 511,7 512,2 513,0	0,1
3	496,9 496,5 495,9 497,6 498,3	0,2
4	516,4 515,8 515,1 513,9 515,3	0,2
5	511,4 509,8 509,9 509,9 510,6	0,1
CV (%) Repetibilidade entre dias		1,9

CV = Coeficiente de variação

TABELA 30 Teste de repetibilidade do método CLAE aplicada a cápsula de tetraciclina–G. Em cada dia de ensaio, réplicas de cinco determinações foram efetuadas, num total de quatro diferentes dias de ensaio

Dia do ensaio	Teor (mg/cápsula)	Repetibilidade do ensaio CV (%)
1	534,0 532,2 538,6 530,4 534,4	0,6
2	511,6 513,0 511,4 511,8 512,6	0,1
3	504,4 504,2 503,7 504,8 505,7	0,1
4	536,4 535,0 535,0 534,1 535,0	0,2
CV (%) Repetibilidade entre dias		2,5
CV = Coeficiente de variação		

TABELA 31 Teste de repetibilidade do método CLAE, aplicado à cápsula de tetracilina–B. Em cada dia de ensaio, réplicas de cinco determinações foram efetuadas, num total de cinco diferentes dias de ensaio

Dia do ensaio	Teor (mg/cápsula)	Repetibilidade do ensaio CV (%)
1	538,9 538,5 538,7 538,3 537,1	0,1
2	541,6 543,7 544,6 544,0 543,5	0,2
3	548,7 547,7 547,3 547,6 547,2	0,1
4	508,2 507,7 508,0 508,8 508,7	0,1
5	516,7 516,7 517,5 516,4 517,6	0,1
CV (%) Repetibilidade entre dias		2,8

CV = Coeficiente de variação

TABELA 32 Resultados obtidos no teste de recuperação do padrão de tetraciclina, empregando o método CLAE estabelecido, aplicado a diferentes amostras de cápsulas. Os valores apresentados de quantidade recuperada representam a média de cinco determinações

Amostra	Quantidade adicionada ($\mu\text{g/mL}$)					
	30	50,0	100,0	30,0	50,0	100,0
	Quantidade recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			Quantidade recuperada (%)		
1	30,4	50,4	98,5	101,4	100,8	98,5
2	29,7	50,8	101,0	98,8	101,7	101,0
3	30,7	51,0	101,5	102,3	102,0	101,5
4	30,6	51,4	98,6	102,0	102,7	98,6
5	30,8	50,0	101,1	102,7	100,2	101,0
6	29,5	50,2	100,3	98,2	100,3	100,3
7	30,1	49,7	100,4	100,3	99,4	100,4
8	29,2	49,20	99,4	97,3	98,4	99,4
9	29,3	50,4	100,5	97,7	100,8	100,5
10	28,7	48,2	97,9	95,5	96,5	97,9

TABELA 33 Resultados experimentais obtidos para o teor do cloridrato de 4-epianidrotetracilina ($\mu\text{g}/\text{mg}$) presente no padrão de cloridrato de tetraciclina, obtidos através do ensaio cromatográfico. Cada valor representa uma injeção da solução padrão nas condições cromatográficas modificadas do método da Farmacopéia Americana²⁰⁸: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de sílica de 5 μm , detector a 280 nm, volume de injeção de 20 μL , temperatura de 30 °C, fluxo de 1,2 mL/minuto e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida, fosfato dibásico de amônio 0,018 M (63,9:32,0:4,7). Resultados fornecidos pelo programa MILLENIUM™ da WATERS™

Ensaio	Teor		CV (%)
	($\mu\text{g}/\text{mg}$)	(%)	
1	2,2	0,2	5,8
	2,3	0,2	
	2,0	0,2	
	2,2	0,2	
2	2,2	0,2	5,4
	2,3	0,2	
	2,2	0,2	
	2,0	0,2	
	2,2	0,2	
3	2,4	0,2	3,2
	2,5	0,2	
	2,5	0,3	
	2,6	0,3	
	2,4	0,2	
	2,4	0,2	
4	2,6	0,3	3,1
	2,4	0,2	
	2,5	0,2	
	2,4	0,2	
	2,6	0,3	
	2,4	0,2	
Média	2,3	0,2	
CV (%)			
Repetibilidade entre os ensaios	8,0		

CV = Coeficiente de variação

5.9.2. Dosagem do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina em amostras comerciais

Os resultados obtidos para as amostras referentes ao teor de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina empregando o método cromatográfico estão demonstrados nas Tabelas 34 e 35. Cada determinação foi repetida cinco vezes, e os resultados proporcionaram os valores de coeficiente de variação entre as injeções de cada lote de amostra.

5.10. Estudo da adequação do método CLAE para as condições estabelecidas

5.11. Determinação da resolução dos picos de 4-epianidrotetraciclina e do desconhecido eluído imediatamente antes

A Figura 13, representa o cromatograma de uma solução-teste do padrão de cloridrato de tetraciclina 100 µg/mL, que mostra os picos da 4-epianidrotetraciclina e de desconhecido, com altura do pico maior e tempo de retenção menor. A resolução dos picos (R) foi calculada através dos cromatogramas obtidos, e os valores expressos na Tabela 36, permitem verificar a interferência do pico desconhecido (1) no ensaio da 4-epianidrotetraciclina.

TABELA 34 Resultados experimentais obtidos para o teor de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina em cápsula de tetraciclina pelo método cromatográfico modificado, da Farmacopéia Americana²⁰⁸. O resultado para cada lote é proveniente da média de cinco determinações

Laboratório	Lote	Teor/cápsula		CV (%)
		(mg)	(%)	
B	1	1,7	0,3	0,5
	2	1,9	0,4	1,2
	3	0,9	0,2	4,2
C	1	1,4	0,3	0,2
	2	1,2	0,2	0,7
	3	0,9	0,2	3,2
D	1	1,4	0,3	2,1
	2	0,8	0,2	5,6
	3	1,4	0,5	2,0
E	1	1,7	0,3	1,8
	2	1,5	0,3	1,7
	3	1,2	0,2	4,7
	4	1,7	0,3	2,2
F	1	1,9	0,3	2,8
G	1	1,5	0,3	2,5
	2	1,9	0,4	1,6
	3	1,3	0,2	2,7

CV = Coeficiente de variação

TABELA 35 Resultados experimentais obtidos para o teor de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina em cápsula de tetraciclina pelo método cromatográfico modificado, recomendado na Farmacopéia Americana²⁰⁸. O resultado de cada lote é proveniente da média de cinco determinações

Laboratório	Lote	Teor/cápsula		CV (%)
		mg	(%)	
H	1	1,7	0,3	9,1
	2	1,6	0,3	2,7
	3	2,0	0,4	1,9
	4	2,3	0,4	3,1
H	1	1,9	0,4	1,0
	2	1,9	0,4	2,2
	3	4,0	0,7	2,5
I	1	1,6	0,3	3,3
K	1	1,8	0,4	2,0
	2	1,1	0,2	1,3
	3	1,8	0,3	4,6
L	1	2,0 0,8	0,1	2,9
	2	0,8	0,1	1,0
	3	0,8	0,1	13,2
	4	0,9	0,1	6,0

CV = Coeficiente de variação

FIGURA 13 Cromatograma de solução de padrão de cloridrato de tetraciclina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo as condições do sistema cromatográfico modificado coluna SYMMETRY™ C8-250 x 4,6 mm- partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47), recomendado pela Farmacopéia Americana²⁰⁸

TABELA 36 Valores de resolução (R) entre a 4-epianidrotetraciclina e um desconhecido eluído imediatamente antes, calculados a partir de cromatogramas obtidos da injeção das soluções de cloridrato de tetraciclina padrão de 50 e 100 µg/mL

Solução padrão (µg/mL)	Resolução (R)
50	1,6
100	1,5

R = Resolução

O grau de separação ou resolução (R) foi calculado como descrito no item 4.2.7.6.1.

5.12. Determinação da resolução dos picos (R) da tetraciclina e da 4-epianidrotetraciclina e seletividade ou fator de separação (α) a partir de uma solução-teste de mistura dos 2 padrões segundo procedimento da Farmacopéia Americana²⁰⁸, modificado

A resolução (R) e seletividade (α) indicam o grau de separação entre dois picos eluídos. Na determinação de resolução mede-se a distância entre dois picos vizinhos, enquanto que a determinação da seletividade indica o grau de separação relacionado com o fator de capacidade. Na Tabela 37, foram colocados os valores de resolução (R) e seletividade (α), calculados à partir de cromatograma da mistura de padrões.

O cromatograma obtido da mistura dos dois padrões está ilustrado na Figura 14.

TABELA 37 Valores de resolução (R) e seletividade (α) entre a tetraciclina e a 4-epianidrotetraciclina, calculados a partir de cromatogramas obtidos da mistura das duas substâncias padrão, respectivamente, nas concentrações de 50 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (4:1). Cinco determinações foram efetuadas

Cromatograma	Resolução (R)	Seletividade (α)
1	3,67	1,5
2	3,67	1,5
3	3,67	1,5
4	3,4	1,5
5	3,9	1,5
Média	3,7	1,5

R = Resolução α = Seletividade

A seletividade (α) foi calculada segundo o item 5.12.

FIGURA 14 Cromatograma referente à solução mistura de resolução com 50 $\mu\text{g/mL}$ do cloridrato de tetraciclina e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, soluções-padrão nas condições modificadas, coluna SYMMETRY[™] C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47), da Farmacopéia Americana²⁰⁸

5.13. Determinação da assimetria do pico

Ainda, para determinar a adequacidade do sistema cromatográfico, a assimetria do pico (T) é calculada com a finalidade de verificar a confiabilidade dos resultados de integração e precisão. Picos simétricos são aqueles em que a metade ascendente e a metade descendente do pico são semelhantes e o valor de assimetria do pico (T) requerido é próximo de 1. Este valor foi obtido a partir dos picos da tetraciclina da solução padrão de 50 µg/mL, estando apresentados na Tabela 38.

TABELA 38 Valores de assimetria do pico (T), calculados a partir de cromatogramas referentes a solução de padrão de cloridrato de tetraciclina 50 µg/mL. Os resultados apresentados representam os valores resultantes de cromatogramas obtidos de cinco injeções

Cromatograma	Assimetria do pico (T)
1	1,1
2	1,2
3	1,1
4	1,0
5	1,0
Média	1,1

T = Assimetria do pico

A assimetria do pico (T) foi calculada segundo o item 5.13.

5.14. Estudo da alteração da eficiência (N) da coluna após várias injeções das soluções-testes e fase móvel

O procedimento para averiguar a adequação do sistema cromatográfico através de estudo da capacidade de eluição da coluna foi estudado, determinando-se os valores de fator de capacidade (K') e eficiência (N) de separação da coluna, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 39. O estudo envolveu a verificação da condição da coluna no início de sua utilização e após cerca de 1000 injeções.

TABELA 39 Resultados obtidos de fator de capacidade (K') e de eficiência (N), calculados a partir de cromatogramas de soluções do padrão de cloridrato de tetraciclina 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Os valores resultaram de cromatogramas registrados no início e no final da utilização da coluna, após cerca de 1000 injeções de 20 μl no cromatógrafo. Foram realizadas médias de cinco determinações para cada concentração.

Utilização da coluna	Concentração da solução padrão ($\mu\text{g/mL}$)			
	50		100	
	K'	N	K'	N
Início	3,4	6630	3,4	6122
	3,4	6898	3,4	5238
	3,34	5852	3,4	5501
	3,4	5281	3,4	5786
	3,4	5814	3,4	6457
Média dos valores	3,4	6095	3,4	5582
Final	2,7	2977	2,7	3032
	2,6	2869	2,7	3059
	2,7	2783	2,7	3816
	2,7	2659	2,7	2816
	2,7	2309		2816
Média dos valores	2,7	2877	2,7	2951

K' = Fator capacidade

N = Eficiência

O fator de capacidade (K') e a eficiência (N) foram calculados segundo o item 4.2.7.6.4.

5.15. Recursos do programa MILLENIUM™ para análise dos cromatogramas

O programa MILLENIUM™ desenvolvido pela WATERS™, analisa e registra os dados referentes aos cromatogramas e possui além de outros recursos, o procedimento que permite sobrepor os cromatogramas de interesse. Nas Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, os cromatogramas foram sobrepostos com a finalidade de estudar a semelhança ou diferença no tamanho e tempo de retenção dos picos.

FIGURA 15 Sobreposição de cromatogramas obtidos à partir de soluções do padrão de cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, provenientes de uma curva de calibração. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 16 Sobreposição de cromatogramas, obtidos para a determinação da curva de calibração da 4-epianidrotetraciclina, formados pelos picos das soluções com concentrações no intervalo de 0,025 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 17 Sobreposição dos cromatogramas obtidos de soluções de epianidrotetraciclina a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Azul) e da solução mistura de padrões de cloridrato de tetraciclina a 50 $\mu\text{g/mL}$ e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Preta), preparados para o ensaio de resolução. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm- partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 18 Sobreposição de cromatogramas obtidos da solução de cloridrato de tetraciclina a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Azul) e da solução de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina 50 $\mu\text{g/mL}$ (Preta), representados na mesma escala. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 19 Sobreposição de cromatogramas de uma solução padrão de 4-epianidrotetraciclina a 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (Azul) e outra de cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Preta), representados na mesma escala. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm- partículas de 5 μm , detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 20 Sobreposição de cromatogramas da solução padrão de 4-epianidrotetraciclina a 0,25 µg/mL (Preta) e da solução de tetraciclina a 50 µg/mL (Azul), representados na mesma escala. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 µm, detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

FIGURA 21 Sobreposição dos cromatogramas obtidos das soluções dos padrões do cloridrato de tetraciclina a 50 µg/mL (Preto) e do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina a 0,025 µg/mL (Azul), sem considerar a escala, mostrando o pico do desconhecido (1) e da 4-epianidrotetraciclina. Condições: coluna SYMMETRY™ C₈-250 x 4,6 mm-partículas de 5 µm, detector a 280 nm, temperatura a 30 °C e fase móvel: oxalato de amônio 0,09 M: dimetilformamida: fosfato dibásico de amônio 0,18 M (63,9:32:47)

5.16. Análise estatística

Os resultados do estudo comparativo dos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência²⁰⁸ e microbiológico turbidimétrico²⁰⁸, através do ensaio estatístico dos dados estão apresentados à seguir.

Na Tabela 40, encontram-se as medidas resumo estimadas para cada laboratório e ensaio.

TABELA 40 Médias das análises cromatográfica e microbiológica por laboratório empregando os dados de teor por cápsula. Os resultados individuais foram centrados na média de cada Laboratório/lote/data

Laboratório	Ensaio	n	Média do teor	DP	Mínimo	Máximo
B	Cromatográfico	60	535,6	12,7	507,7	549,5
B	Microbiológico	14	592,8	23,6	558,8	637,1
C	Cromatográfico	34	513,1	21,6	486,2	558,4
C	Microbiológico	19	544,9	25,7	474,2	574,6
D	Cromatográfico	40	337,9	89,7	237,1	472,6
D	Microbiológico	30	390,4	122,5	264,6	555,2
E	Cromatográfico	53	492,4	17,3	468,3	523,1
E	Microbiológico	20	551,9	28,6	503,5	592,6
F	Cromatográfico	8	515,1	4,9	508,4	519,5
F	Microbiológico	4	548,9	9,6	538,4	560,4
G	Cromatográfico	54	521,2	11,7	503,7	538,6
G	Microbiológico	13	560,7	35,5	506,8	642,1
H	Cromatográfico	71	520,4	12,1	495,9	552,9
H	Microbiológico	26	573,0	26,1	528,0	624,9
I	Cromatográfico	53	504,7	11,5	487,6	527,0
I	Microbiológico	12	563,7	33,8	532,4	646,2
J	Cromatográfico	23	466,5	10,1	445,0	479,9
J	Microbiológico	3	516,4	0,0	516,4	516,4
K	Cromatográfico	45	499,5	16,8	470,6	530,1
K	Microbiológico	36	566,0	33,1	519,5	651,9
L	Cromatográfico	78	504,5	24,0	451,4	548,0
L	Microbiológico	14	554,7	21,8	510,9	586,9

n = Número de réplicas do ensaio

DP = Desvio padrão

A partir das análises repetidas em cada laboratório/lote/data pode ser estimada a precisão da análise (desvio padrão). Na Tabela 40 ilustram-se os erros de análise por laboratório/lote/data. Estes erros de análise estão representados na Figura 22. Não se observam grandes discrepâncias entre as dispersões da análise para as distintas combinações laboratório/lote/data. Na Figura 23 foi feito um histograma de todos os erros da Figura 22. Observa-se que os erros apresentam distribuição bastante simétrica em torno do zero.

FIGURA 22 Ilustração da variabilidade da análise por laboratório, lote e data a partir dos dados da Tabela 40

Figura 23 Histograma dos erros de análise

A partir da variabilidade interna para as combinações laboratório/lote/data foi estimada a precisão da análise. O desvio padrão estimado foi de 4,00 mg/cápsula.

Na Figura 24 ilustrou-se o efeito que os erros da análise podem produzir ao avaliar um lote como conforme ou não conforme. Neste caso, apresentou-se uma situação com limites de especificação simétricos em torno do valor médio da especificação. No presente estudo os limites de especificação são de 450 a 625 mg/cápsula. Na Figura 25 foram calculadas as probabilidades de:

1. aceitar um produto não conforme e a relação σ_a/σ_p para distintos posicionamentos dos limites de especificação, corrigidos pelo erro da análise
2. rejeitar um produto conforme e a relação σ_a/σ_p para distintos posicionamentos dos limites de especificação corrigidos pelo erro da análise.

LEi = Limite inferior de especificação
LEs = Limite superior de especificação

LECi = Limite inferior de especificação corrigido
LECs = Limite superior de especificação corrigido

FIGURA 24 O erro da análise nos extremos do limite de especificação segundo a distribuição normal

FIGURA 25 Ilustração dos erros cometidos ao aprovar um lote em decorrência do erro analítico

Na mesma figura, σ_a representa o desvio padrão da análise e σ_p representa o desvio padrão do processo produtivo (um sexto da largura da especificação). Exemplifica-se situação em que o valor estimado de σ_a/σ_p foi de $4/[(625-450)/6]$,

ou seja = 0,14, mostrando que o erro de análise tem pouco efeito no aumento das probabilidades 1 e 2 citadas⁵².

Na Figura 26 ilustraram-se os resultados individuais das análises cromatográficas observados por laboratório. Os resultados obtidos para amostras de cada laboratório foram separados por linhas verticais.

LEs = Limite superior da especificação
Alvo = Valor médio
LEi = Limite inferior da especificação

FIGURA 26 Resultados individuais cromatográficos por laboratório

Na Figura 27 foram representados os resultados das análises cromatográficas e microbiológicas, e na Figura 28 diagramas de dispersão dos resultados cromatográficos e microbiológicos, representando os valores individuais por cada combinação Laboratório/Lote/Data, e também as médias de cada combinação. Nos gráficos das Figuras 27 e 28 observa-se que os valores obtidos pelo método microbiológico foram superiores aos obtidos pelo método cromatográfico. A média da análise microbiológica foi de 537,8 mg/cápsula contra 497,1 mg/cápsula para a análise cromatográfica.

Para quantificar a importância da correlação entre as médias das análises microbiológicas e cromatográficas foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, o qual foi elevado e significativo: 0,9491 ($p < 0,001$)⁶⁸.

Também foi feito um teste *t* de Student de amostras dependentes para verificar se a diferença média entre os métodos microbiológico e cromatográfico

foi diferente de zero. O resultado observado foi altamente significativo: $t = 12,76$ ($p < 0,001$)⁶⁸.

FIGURA 27 Resultados cromatográficos e microbiológicos

As Figuras 27, 28 e 29 são representações gráficas dos resultados do ensaio cromatográfico comparado com o microbiológico.

FIGURA 28 Relação entre os resultados cromatográficos e microbiológicos

Para avaliar as diferenças entre os laboratórios foi estimada a proporção de resultados fugindo à especificação para amostras de cada laboratório. Na Tabela 41, encontra-se a porcentagem de resultados abaixo do limite inferior para os dois métodos, e a porcentagem de resultados fora de especificação para o método microbiológico. O método cromatográfico não apresentou resultados acima do limite

Tabela 41 Porcentagens de resultados fugindo aos limites de especificação (450 a 625 mg/cápsula), para os métodos microbiológico e cromatográfico

Ensaio cromatográfico			
Laboratório	Pontos fora do limite	n	%
B	0	60	0,0
C	0	34	0,0
D	31	40	77,5
E	0	53	0,0
F	0	8	0,0
G	0	54	0,0
H	0	71	0,0
I	0	53	0,0
J	1	23	4,4
K	0	45	0,0
L	0	78	0,0
Análise microbiológica: abaixo do limite inferior			
Laboratório	Pontos abaixo	n	%
B	0	14	0,0
C	0	19	0,0
D	18	30	60,0
E	0	20	0,0
F	0	4	0,0
G	0	13	0,0
H	0	26	0,0
I	0	12	0,0
J	0	3	0,0
K	0	36	0,0
L	0	14	0,0
Análise microbiológica: acima do limite superior			
Laboratório	Pontos acima	n	%
B	1	14	7,14
C	0	19	0,00
D	0	30	0,00
E	0	20	0,00
F	0	4	0,00
G	1	13	7,69
H	0	26	0,00
I	1	12	8,33
J	0	3	0,00
K	2	36	5,56
L	0	14	0,00

superior, conforme representado na Figura 27. O laboratório D apresentou uma alta porcentagem de resultado abaixo da especificação inferior. A análise microbiológica mostrou resultados de muitos laboratórios fora do limite de especificação superior.

Limite inferior: 450 mg/cápsula

Limite superior: 625 mg/cápsula

FIGURA 29 Porcentagens de análises fora dos limites de especificação corrigidos pelo erro analítico

Na Figura 29 as porcentagens de resultados de teor obtidas do ensaio individual das amostras de cada laboratório, com limite fora de especificação para os métodos cromatográfico e microbiológico foram representadas por meio de histograma.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A produção de medicamentos envolve etapas de desenvolvimento do produto e de processos, implantação dos sistemas de manufatura e de qualidade, incluindo aspectos de conformidade, do atendimento à expectativa de desempenho após a liberação do produto para o mercado, devendo abranger o estudo da estabilidade. Para este fim, faz-se necessário pessoal qualificado, treinado e designado especificamente para cada atribuição. A obtenção da qualidade do produto somente é possível através da implantação de um amplo programa de garantia de qualidade, objetivando um produto que contemple as exigências do consumidor final.

Esta preocupação com a qualidade deve ser de responsabilidade de todos os segmentos da empresa e faz parte dos princípios gerais do controle de qualidade total. As falhas no sistema de qualidade no setor de produção ou de controle de qualidade farmacêutico podem representar sérios riscos à saúde dos usuários e por outro lado, perdas irreparáveis, confiabilidade abalada e prejuízo financeiro. Todos os setores da empresa influem efetivamente na qualidade final do produto propriamente dito, dos aspectos éticos, de suporte técnico e atendimento a ele vinculado.

No setor produtivo e de controle de qualidade, procedimentos de validação são fundamentais, devendo ser implantados de maneira planejada e documentada. Também os procedimentos de operação devem ser padronizados, com a finalidade de obter produtos de acordo com as especificações determinadas durante o desenvolvimento.

A discordância dos resultados obtidos em relação às especificações significa falha em alguma etapa da cadeia do processo produtivo, merecendo localização do erro e imediato acionamento de procedimentos corretivos, tendo como referência a documentação do produto.

Apesar da Lei nº 6.360¹³³, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos os medicamentos, os fármacos, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, publicada

no Diário Oficial da União (DOU) do dia 24 de setembro do mesmo ano, e regulamentada pelo Decreto nº 79.094⁴² de 5 de janeiro de 1977, publicado no mesmo dia, sua aplicação é ainda incipiente. Embora numerosas portarias e regulamentos técnicos tenham objetivado disciplinar a questão, e muito se discuta sobre a reformulação do Sistema de Vigilância Nacional, relatos amplamente divulgados pela mídia fazem saber sobre a grande incidência de falsificação de medicamentos enquanto, em contrapartida, se discute a questão dos medicamentos genéricos, os quais foram estabelecidos para produtos farmacêuticos pela Lei nº 9787 de 10 de fevereiro de 1999¹³³ e regulamentada pela Lei nº 391 de 10 de agosto de 1999¹⁸⁰.

Dentre as publicações mais recentes que regulamentam a produção e controle de qualidade de produtos farmacêuticos, merece menção a Portaria nº 16¹⁶⁷ do Ministério da Saúde, publicada no Diário Oficial em 06 de março de 1995, onde constam as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Apesar do impacto que causou, as mais grotescas fraudes na área farmacêutica foram posteriores a ela, confirmando falha no sistema vigente.

Segundo WILLIG e STOKER²¹⁵ as normas de BPF não são estáticas, o que exige da empresa não somente implantar as normas em vigor, mas estar atenta a inovações que possam colaborar para a melhoria da qualidade. Um medicamento produzido de acordo com as normas de BPF deve apresentar todas as características inerentes a um produto seguro e com eficácia terapêutica.

As normas de BPF contemplam os distintos grupos de produtos, fazendo distinção entre aqueles destinados a administração parenteral e oral, entre outras particularidades. Os produtos orais, como é o caso das cápsulas, têm para sua fabricação exigências compatíveis com o risco que representam, seja no aspecto clínico ou de estabilidade do produto, abrangendo aspectos de contaminação cruzada, microbiana e de condicionamento ambiental.

A produção de cápsulas envolve procedimento relativamente simples de enchimento do corpo destas com o medicamento pulverizado e posterior encaixe da parte complementar. São encontradas no comércio cápsulas de tetraciclina fornecidas por vários laboratórios produtores, sendo mais comumente encontrado o cloridrato de tetraciclina.

Embora o processo de fabricação não apresente grande complexidade, o presente trabalho permitiu a constatação de amostras comerciais de cápsulas de tetraciclina que indicaram falhas do mesmo, como pode ser observado na Tabela 5. As cápsulas devem ser submetidas à inspeção visual mesmo quando na fase de embalagem final¹⁶³. Evidências de alteração física podem ser demonstradas por mudanças grosseiras na aparência, como endurecimento, amolecimento, quebra, umedecimento, aparecimento de manchas ou descoloração da cápsula⁵⁸. Uma constatação freqüente foi a impregnação de pó na parte externa da cápsula. Outras observações foram de cápsulas sem brilho e presença do corante da embalagem impregnado na superfície das mesmas, indicando umidade relativa inadequada. Segundo DIGENIS e colaboradores⁴⁷ a cápsula é produzida com umidade de 13 a 16 %. Quando a umidade é menor que 13 % a cápsula pode se desintegrar com o manuseio. Se superior a 18 % pode ocorrer o amolecimento e deformação, que podem alterar o tamanho da cápsula e causar problemas no processo de enchimento automático. Evidência na falha do processo de enchimento foi constatada pela presença de cápsulas abertas, quebradas e não completamente encaixadas. Como consequência da alta umidade DIGENIS e colaboradores⁴⁷ citaram que a umidade do conteúdo da cápsula deve ser controlada para evitar a ação da umidade na sua parede. As farmacopéias recomendam que o medicamento contido na cápsula não deve causar sua deterioração⁵⁸ ou apresentar incompatibilidade^{28,88,163} com a mesma e que deve ser vulnerável ao fluido digestivo para que seu conteúdo seja liberado^{58,88}. Segundo DIGENIS e colaboradores⁴⁷, condições de umidade, temperatura elevada e algumas substâncias podem ocasionar ligações cruzadas na estrutura molecular da gelatina alterando propriedades físico-químicas, podendo provocar considerável modificação no perfil de dissolução. As farmacopéias recomendam que as cápsulas sejam estocadas em recipientes hermeticamente fechados sob temperatura abaixo de 30 °C^{58,88}, protegidos da luz, da umidade excessiva, e de condições de ambiente por demais seco⁸⁸.

O processo de produção também pode ser avaliado através da observação da Tabela 5, que descreve material não homogêneo contido nas cápsulas, sendo que unidades do mesmo lote e de diferentes lotes de um mesmo laboratório apresentaram variação na tonalidade da cor amarela.

Outra observação é quanto a coloração da própria cápsula. Aquelas provenientes do laboratório F apresentavam cor vinho, que diverge das provenientes de outros laboratórios, na cor preta e amarela. Embora não haja uma padronização oficial de cores para cada princípio ativo ou medicamento, tal fato pode confundir o paciente.

Na Tabela 6, a descrição da embalagem primária das cápsulas mostra embalagens contendo 4 unidades. Com exceção das amostras provenientes dos Laboratórios A e L, todas as demais foram adquiridas em embalagem secundária de 100 unidades. Considerando que o consumo por paciente deste medicamento para tratamento terapêutico é inferior a 100 cápsulas, também nas embalagens primárias devem estar impressas informações que incluem o nome do produto, identificação e teor dos princípios ativos, o número de cápsulas, data de produção e prazo de validade, condições de armazenamento e manipulação, nome e endereço do produtor^{109,167}. Na amostragem efetuada, foram encontradas sete amostras produzidas por cinco laboratórios sem informações quanto ao número do lote e prazo de validade. Este fato impede o rastreamento de amostras que apresentam problemas, detectados após a liberação do produto no mercado. Para a aplicação das exigências descritas na Portaria 2.814 no seu artigo 5º, datada de 29 de maio de 1998¹⁶⁸ em relação à notificação de produtos falsificados ou com suspeita de falsificação, deve haver no produto a indicação do número de lote, para possibilitar também a apreensão do produto e orientação aos possíveis usuários no sentido de interrupção do seu uso, seguido de acompanhamento médico. Foi observada, em um lote, rebarba no blister de alumínio representando risco de corte durante o manuseio. Tanto o material de embalagem como o rótulo devem estar de acordo com as especificações de qualidade para serem aprovados e liberados²¹⁵.

No que se refere a produto medicamentoso contido nas cápsulas, aspecto fundamental diz respeito ao peso médio, tendo sido portanto incluso no presente trabalho sua determinação. O peso médio das amostras foi obtido pela determinação do peso individual de cada unidade, e os valores foram comparados com a média. A porcentagem de unidades foi considerada fora do limite de variação, quando diferindo da recomendação da Farmacopéia Brasileira⁶² em que

no máximo duas cápsulas podem apresentar variação de $\pm 10\%$ e $\pm 7,5\%$, dentre 20 drágeas ou cápsulas, respectivamente. De acordo com a Farmacopéia⁶², proporcionalmente o máximo de 10 % do total das unidades poderiam estar fora do limite estabelecido. Os resultados expressos na Tabela 7, mostraram três amostras fora do limite especificado para o teste, sendo requerido o reteste envolvendo pesagem de 40 cápsulas adicionais. No entanto, a dificuldade de aquisição do produto inviabilizou o reteste. Estes mesmos lotes apresentaram coeficiente de variação em valor próximo de 6,0, indicando a homogeneidade de conteúdo de pó nas amostras.

Na monografia da Farmacopéia Americana XXIII²⁰⁸, enquanto para cápsulas é recomendado o ensaio da uniformidade de conteúdo, para comprimidos de hiclato de doxiciclina é preconizada a determinação da variação de peso. Estes testes não estão descritos nas monografias da Farmacopéia Britânica³⁰. As empresas A e L produziram cápsulas com quantidade de excipiente superior em relação aos demais laboratórios, seguindo procedimento adequado para preencher todo o espaço interno da cápsula. Dentre as amostras, duas apresentaram peso médio menor que o conteúdo declarado de 500 mg do princípio ativo, sendo o tamanho das cápsulas igual as outras amostras, deixando espaço vazio que com maior probabilidade promove degradação do princípio ativo.

No Quadro 1, estão listados 23 laboratórios produtores de cápsulas de cloridrato de tetraciclina-500 mg, relacionados no DEF⁴⁵. Os produtos constituem-se em especialidades farmacêuticas similares e portanto intercambiáveis, por apresentarem o mesmo princípio ativo, na mesma concentração e na mesma forma farmacêutica. O teste de desintegração foi empregado até o final dos anos 60 como método oficial para determinar e estudar o perfil de dissolução do princípio ativo, que tende a aumentar quando a superfície da área exposta dos grânulos aumenta. Mas, CHOWDARY e RAJYALASHMI³⁷ mostraram que para a ação terapêutica esperada do medicamento, é imprescindível a dissolução do princípio ativo no local de absorção e em quantidade adequada para se atingir o nível plasmático desejado após a absorção. A dissolução é avaliada por método *in vitro*, descrito conforme as farmacopéias^{30,208}, sendo teste exigido para

preparações farmacêuticas pouco solúveis em meio aquoso¹. Muitos trabalhos publicados^{33,86,177} mostraram a interferência dos excipientes na dissolução de cápsulas de tetraciclina. Da mesma maneira a qualidade do invólucro representado pela própria cápsula de gelatina pode afetar o perfil de dissolução e liberação do princípio ativo⁴⁷.

Neste estudo, o ensaio de dissolução foi realizado para as preparações farmacêuticas e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Dentre as amostras, foram encontrados dois lotes de cápsulas de cloridrato de tetraciclina apresentando teor individual e média dos teores muito abaixo do especificado (Tabelas 8 e 9), que é de no mínimo 80 % (**Q**) do teor declarado no rótulo. Os valores de ambos foram 43,9 e 57,5 %, respectivamente para os lotes 1 e 3 do laboratório D. Todos os valores individuais de teor estavam abaixo do valor de **Q**. Nas tabelas citadas inicialmente, observamos que para o lote 2 de drágeas de cloridrato de doxiciclina, lotes 1 e 2 de cápsula do laboratório B e o lote 2 de cápsulas do laboratório C, foram requeridos retestes. Para a interpretação dos resultados do teste e reteste, quando o teor encontrado foi menor que o valor **Q**, empregaram-se as tabelas de aceitação/rejeição que constam na Farmacopéia Americana²⁰⁸ (Tabelas 10, 11 e 12). Particularmente, a restrita quantidade de amostra do laboratório C não permitiu o reteste, que foi possível para as outras três amostras, conduzindo a aprovação. As duas amostras reprovadas apresentaram coeficiente de variação em relação aos teores em valores próximos de 4,0 %, contrastando com aquelas retestadas, em que o coeficiente de variação foi maior (14,2 %) tendo os teores variando de 75,9 a 115,4 % para o lote 2 do laboratório B. Outros nove lotes, embora aprovados para o teste de dissolução, também apresentaram coeficiente de variação superior a 5 %. A metodologia da Farmacopéia Americana²⁰⁸ exige que o teor encontrado e a média sejam superiores ao valor de **Q**, mas não impõe limite de variação dos resultados. Em relação às amostras de drágea de cloridrato de doxiciclina, o lote 2 apresentou uma unidade com teor inferior a 85 % no teste, sendo portanto realizado o reteste com mais seis unidades. A média dos valores de teor obtidos das 12 unidades testadas foi de 93,2 % como apresentado na Tabela 8. Sendo que nenhuma das unidades apresentou o valor de teor inferior a 70 %, de acordo com a especificação colocada na Tabela 12, a amostra foi aprovada. A metodologia de

ensaio de dissolução para drágeas de cloridrato de doxiciclina não está descrita nas farmacopéias. Desta forma, o método empregado foi aquele recomendado pelo laboratório produtor, cujos parâmetros foram colocados na metodologia descrita anteriormente. As condições do ensaio foram semelhantes àquela apresentada para comprimido de hiclato de doxiciclina na Farmacopéia Americana²⁰. O meio de dissolução, no entanto, foi ácido clorídrico 0,1 N em substituição à água destilada. Embora BOGARDUS e BLACKWOOD¹⁸ tenham concluído em seu trabalho, que a solubilidade do cloridrato de doxiciclina é superior em água destilada quando comparada com meio contendo ácido clorídrico, foi empregado neste trabalho, o ácido clorídrico 0,1 N como meio de dissolução por se tratar de uma preparação na forma de drágea. Contudo, para isto foi realizado um teste preliminar objetivando verificar a dissolução do padrão de cloridrato de doxiciclina em ácido clorídrico 0,1 N. Na quantidade empregada para este ensaio ocorreu a dissolução rápida deste fármaco no meio ácido. Deve-se considerar que mesmo sendo menos solúvel em meio ácido, seu emprego justifica-se pois nas condições ambiente da drágea no organismo será de concentração elevada do ácido clorídrico.

Tendo em vista a necessidade da biodisponibilidade do antibiótico para a eficácia do tratamento terapêutico, garantido pela manutenção do nível plasmático, o perfil de dissolução do princípio ativo deve ser relativamente homogêneo, objetivando a liberação e absorção em quantidade e no tempo adequados. A preocupação quanto a falsos resultados do teste de dissolução levou ao acompanhamento sistemático dos ensaios com um branco, anulando assim a interferência do corante da cápsula gelatinosa na determinação da absorbância da amostra. Algumas amostras apresentaram diferencial de 3,3 % de transmitância devido ao corante, e embora para outras não houvesse qualquer interferência, foi possível constatar o risco de diferença significativa nos resultados. GOODHART e colaboradores⁸⁴ realizaram o ensaio de dissolução de preparações farmacêuticas empregando uma matriz, que foi testada nas mesmas condições das amostras, e que foram empregadas, como neste trabalho, apenas para correção dos valores da leitura espectrofotométrica da amostra. Em relação ao cloridrato de doxiciclina, as Farmacopéias Americana²⁰⁸ e Britânica³⁰ não descrevem metodologia para o teste de dissolução de drágeas da mesma.

Em relação ao procedimento técnico, a degaseificação do meio de dissolução antes do ensaio tem por finalidade a eliminação de bolhas de ar, que quando aderidas às formas farmacêuticas, poderiam interferir com o processo de dissolução do fármaco pela diminuição do contato destas com o meio de dissolução. Com o mesmo objetivo, vários autores^{136,145,161} adotaram o emprego de dispositivos para evitar a flutuação das cápsulas na superfície do meio de dissolução e mantê-las completamente imersas. Estes dispositivos de diversos tipos de materiais inertes, apresentam forma de espiral e envolvem as cápsulas, tendo função semelhante à de uma âncora. MATOS e colaboradores¹⁴⁵ empregaram espirais de prata no ensaio de dissolução de cápsulas de doxiciclina. Neste trabalho, optou-se pela não adoção deste procedimento, pois segundo WHITEY e MAINVILLE²¹⁷ a flutuação das cápsulas ocorre por breve período de tempo, de 2 a 5 minutos, sendo que se dissolvem após cerca de 5 minutos liberando o seu conteúdo. Portanto, estes autores não recomendam procedimento para evitar a flutuação, como o uso de âncoras, nas quais as cápsulas de gelatina podem ser aderidas, ocasionando o contato irregular das cápsulas com o meio de dissolução, e introduzindo variáveis não reprodutíveis no ensaio. LIN e colaboradores¹⁵⁶ e PERNAROWSKI e colaboradores¹⁶¹ sugeriram o aparelho de dissolução com cesto para evitar a flutuação das cápsulas, e para minimizar a sua aderência na cuba, pá e haste de agitação.

A importância da avaliação da biodisponibilidade de uma preparação farmacêutica foi destacada por STEINBACK e STRITTMATER¹⁹⁴, pois os autores propuseram condicionar a aprovação das amostras à apresentação de teor dentro do limite especificado, com os critérios de biodisponibilidade obedecidos.

Para a análise de antibióticos, além dos métodos físico-químicos descritos nas monografias das farmacopéias mais recentes, os métodos microbiológicos permanecem como recomendação. Encontram-se descritos na forma de métodos gerais, sendo eletivos nos casos decisivos de avaliação de um produto quanto à potência, devido à sua maior sensibilidade para os diferentes grupos de antibióticos e por representarem a atividade antimicrobiana. Embora os métodos microbiológicos sejam oficiais, apresentam desvantagem pois são dispendiosos e demorados, além de possuir menor precisão e freqüentemente menor exatidão

quando comparados com os métodos físico-químicos. No ensaio microbiológico os produtos de degradação ou os contaminantes eventualmente presentes nas amostras de tetraciclina, também podem apresentar propriedades antimicrobianas, que serão determinadas em adição à resposta da tetraciclina. Assim, a potência obtida não necessariamente representa aquela correspondente à da substância que se tem por analisar.

Embora recentemente os ensaios microbiológicos tenham sido com frequência substituídos por outros métodos, em particular a CLAE, a fim de se assegurar quanto a adoção de métodos sensíveis e específicos para detectar as tetraciclina a baixos níveis de concentração, considerou-se fundamental incluir neste estudo a determinação da potência do antibiótico através de ensaio microbiológico turbidimétrico. Procedeu-se conforme método recomendado pela Farmacopéia Americana²⁰⁸, empregando como reagente biológico o *Staphylococcus aureus* ATCC 29737. Nas Tabelas 24, 25 e 26, estão colocados os valores de potência em miligramas, obtidos por cápsula ou drágea. À exceção de duas amostras, todos os resultados foram concordantes com a especificação estabelecida pela Farmacopéia Americana²⁰⁸, que exige teor de 90 a 125 % em relação ao valor declarado no rótulo, ou seja de 450 a 625 mg/cápsula de cloridrato de tetraciclina, de 90 a 120 % ou 450 a 600 mg/cápsula de cloridrato de oxitetraciclina e 90 a 120 % ou 90 a 120 mg/drágea de cloridrato de doxiciclina. As duas amostras em desacordo com a especificação foram obtidas dos lotes 1 e 3 de cloridrato de tetraciclina da D, cujos resultados foram 55,5 e 68,7 %, respectivamente. A porcentagem de amostras fora do limite definido de potência foi de 5,3 %, em relação ao total analisado.

O laboratório de controle de qualidade tem como um dos principais objetivos a obtenção de resultados analíticos exatos e confiáveis através de métodos de ensaio que atendam à finalidade proposta. Deseja-se que a metodologia analítica apresente, além da eficácia, uma boa relação custo-benefício, que seja inclusa dentre os procedimentos do sistema de qualidade, devidamente documentada²¹⁵. É ainda desejável que permita a compatibilização técnica para a obtenção rápida dos resultados.

Esta característica tem provocado uma busca intensa por métodos alternativos rápidos, particularmente em substituição aos microbiológicos convencionais, os quais envolvem respostas demoradas, pela dependência do número de gerações microbianas para a revelação do parâmetro determinado no teste. Muitos são os métodos desta natureza descritos para testes de contagem microbiana¹¹⁷ e ensaios de dosagem de antibióticos^{118,121,174,176,190,191,218}.

Aliados à evolução tecnológica, muitos métodos rápidos têm sido constantemente desenvolvidos. A escolha de um método de análise leva em consideração a capacidade operacional do laboratório, que também tende a maior satisfação, vencendo limitações técnico-operacionais e incorporando maior rapidez na obtenção do resultado. Isto pode ser observado nas farmacopéias e compêndios oficiais^{30,38,28} mais recentes que a cada nova edição vêm substituindo métodos convencionais por outros, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A CLAE, além da rapidez na execução, apresenta atributos indispensáveis como sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão, que tornam o seu emprego vantajoso em relação a outras metodologias.

As Farmacopéias Americana²⁰⁸ e Britânica³⁰ adotaram a CLAE de fase reversa para a determinação quantitativa da tetraciclina. A Farmacopéia Americana²⁰⁸ recomenda o emprego de coluna de octilsilano (C₈) e a Britânica³⁰ a coluna de octadecilsilano (C₁₈), sempre ligadas quimicamente ligadas às partículas de sílica. Na literatura, ambas as colunas são empregadas para a dosagem de tetraciclina, no entanto, HEYDEN e colaboradores⁹⁹ constataram o melhor desempenho da coluna C₈ na etapa de separação.

Para a escolha do método a ser empregado neste trabalho, uma comparação entre os dois métodos foi realizada sob as condições analíticas estabelecidas nos métodos oficiais, através da injeção de soluções-teste das substâncias padrão de cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina. No método da Farmacopéia Britânica³⁰, a passagem da fase móvel constituída de dimetilformamida, acetonitrila e ácido oxálico 0,1 M pela coluna C₁₈ empregada, foi a uma velocidade de 1,5 mL/minuto. A pressão no sistema, de cerca de 2282 psi, não se constituiu em fator de risco para perda da

coluna, possibilitando a injeção da solução-teste do padrão sem modificação das condições iniciais do ensaio. No cromatograma obtido por esta metodologia, apresentado na Figura 3, o pico referente ao cloridrato de tetraciclina foi eluído após 22,6 minutos, enquanto que para o cloridrato de 4-epianidrotetraciclina o tempo de retenção foi de 12,8 minutos. No método da Farmacopéia Americana²⁰⁸, a velocidade de fluxo da fase móvel é de 2 mL/minuto, entretanto, no ensaio preliminar, a passagem da fase móvel constituída por oxalato de amônio 0,1 M, dimetilformamida e fosfato dibásico de amônio 0,2 M pela coluna, nas condições recomendadas provocou o aumento da pressão ultrapassando 4000 psi, a pressão máxima aplicada à coluna para a manutenção da sua integridade. Sendo assim, testes de adequação do sistema cromatográfico foram necessários para a aplicação desta metodologia. De início foi determinada a pressão correspondente à cada velocidade de fluxo da fase móvel. A pressão máxima foi atingida a 1,6 mL/minuto (Tabela 13). A vida útil da coluna, entre outros fatores, é influenciada pela pressão aplicada no material de empacotamento. Portanto, pressão menor aumenta o tempo de uso da coluna. No entanto, por estar diretamente relacionada com a velocidade de fluxo, mantendo outras condições constantes, uma velocidade de fluxo menor corresponde a uma pressão menor e pode interferir no tempo de retenção de uma substância. Para verificar esta interferência, os tempos de retenção para a eluição da tetraciclina com fluxo de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/minuto foram determinados, sendo os resultados apresentados na Tabela 14. A pressão registrada para cada velocidade de fluxo da fase móvel foi reproduzida em relação ao teste anterior (Tabela 13). A média do tempo de retenção para a maior velocidade de fluxo testada, 1,2 mL/minuto, foi de 7,8 minutos e para a menor velocidade, 13,1 minutos. Considerando que a pressão é adequada para a coluna e o tempo de retenção é menor, foi verificada a vantagem da diminuição da velocidade de fluxo de 2 mL/minuto para 1,2 mL/minuto. Para o tempo de retenção maior, a desvantagem consiste no dispêndio maior de tempo de análise. LINDAUER e colaboradores¹³⁷ verificaram que para velocidade de fluxo diferentes, mas mantidas constantes, foram obtidas determinações exatas. Ainda, os autores verificaram que a diminuição da velocidade da fase móvel de 1,12 para 0,35 mL/minuto provocou um aumento da eficiência para a 4-epianidrotetraciclina de 37 para 87, quando empregaram

coluna trocadora de cátions e fase móvel de solução aquosa de EDTA e hidróxido de sódio a pH 7,0.

Outro procedimento para adequação das condições da análise é a modificação da proporção dos componentes da fase móvel. O método da Farmacopéia Americana²⁰⁸, recomenda fase móvel composta de oxalato de amônio 0,1 M, dimetilformamida e fosfato dibásico de amônio 0,2 M, na proporção de 69:27:5. A fase aquosa está proporcionalmente maior em relação à fase orgânica. Contudo, a concentração dos sais na fase móvel é elevada, o que provoca a elevada pressão no sistema. Fase móvel modificada com a diminuição da proporção dos sais foi empregada. A fase orgânica, dimetilformamida, foi mantida constante e os resultados mostraram tempo de retenção menor para a fase móvel quando o sal foi reduzido em 10 % (Tabela 15). A menor concentração o sal na fase móvel permite prolongar a vida útil da coluna¹¹ e minimiza a possibilidade do seu entupimento e de perda da pedra de safira, de custo elevado, que integra o dispositivo para o controle do bombeamento da fase móvel no cromatógrafo. Ao aumentar a proporção de dimetilformamida na fase móvel, a fase móvel VI apresentada na Tabela 16, com volume adicionado de 50 mL, precipitou à temperatura ambiente, pela diminuição da fase aquosa, meio em que os sais são solúveis. Este aumento da fase orgânica, menos polar que a água, resultou na diminuição do tempo de retenção que também foi proporcional ao volume de dimetilformamida adicionado, quando comparado as fases com 10 e 25 mL de dimetilformamida, como pode ser observado na Tabela 16. Resultado semelhante foi obtido por TSUJI e ROBERTSON¹⁹⁶ quando estudaram a influência da concentração de metanol na fase móvel aquosa. O tempo de retenção do pico da tetraciclina foi de 9,7 minutos com a fase móvel contendo 4 % de metanol, de 6,2 minutos com concentração de 10 % e de 5,1 minutos com 13 %, empregando fluxo constante. Após este estudo, a fase móvel foi definida com modificação na proporção da fase aquosa e orgânica e na concentração do sal. Como foi observado no estudo anterior, aumento do volume de dimetilformamida de 50 mL na fase móvel resultou em formação de precipitado, enquanto que quando a concentração dos sais das soluções de oxalato de amônio e fosfato dibásico de amônio foi diminuída proporcionalmente, tal fato não ocorreu. Analisando os resultados, é possível observar que a fase móvel

contendo oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida e fosfato dibásico de amônio 0,18 M na proporção de 63,9:32:4,7 foi mais adequada (Tabela 15, 16 e 17). O procedimento da preparação das fases móveis envolveu etapa de ultrafiltração para retenção de partículas maiores que cerca de 0,22 μm , seguido de degaseificação, que tiveram como objetivo a eliminação de partículas e bolhas de ar que podem obstruir a coluna cromatográfica e causar a interrupção do ensaio.

Os cromatogramas ilustrados nas Figuras 4 e 5 mostram os picos das duas substâncias testadas pelo método da Farmacopéia Americana²⁰⁸, modificado. Os tempos de retenção para o cloridrato de tetraciclina e o cloridrato de 4-epianidrotetraciclina foram de 9,0 e 5,3 minutos e de 22,6 e 12,8 minutos, respectivamente para o método modificado da Farmacopéia Americana²⁰⁸ e Britânica³⁰. Na escolha do método deve ser considerada a rapidez na obtenção dos resultados, baseada na eluição mais rápida. Neste sentido, o método modificado da Farmacopéia Americana mostrou-se favorável. Na comparação do perfil da curva, deve ser considerada segundo BOURQUIN²⁰ a forma gaussiana da curva para obter maior precisão e reprodutibilidade no ensaio. Neste estudo, os picos do cromatograma obtido através do método da Farmacopéia Britânica³⁰ mostraram alargamento da base do pico para o cloridrato de tetraciclina e assimetria acentuada do pico do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina. O fator capacidade calculado de 10,5 para o cloridrato de 4-epianidrotetraciclina foi muito elevado, caracterizando um ensaio demorado. A otimização das condições cromatográficas incluiu o estudo da modificação da concentração dos componentes na fase móvel, pH e a temperatura da coluna. A metodologia da Farmacopéia Britânica³⁰ empregando fase móvel composta por modificadores orgânicos, dimetilformamida e acetonitrila, pode ser alterada para obter condições do sistema cromatográfico mais adequadas.

Nas colunas cromatográficas de sílica, como na coluna μ -Bondapak empacotada com octadecilsilano, empregada na metodologia da Farmacopéia Britânica³⁰, os grupos silanóis estão presentes e mesmo que em pequenas quantidades, adsorvem a tetraciclina no lugar da água causando o alargamento do pico. Tais agrupamentos podem ser eliminados através de reações de

silanização com o material de octadecilsilano quimicamente ligado a grupos trialquilas, originando pico com formato mais adequado e tempo de retenção menor. HEYDEN e colaboradores⁹⁸ comparam a coluna C₈ e C₁₈, empregadas respectivamente, nos métodos das Farmacopéias Americana²⁰⁵ e Britânica²⁹, e melhores resultados foram obtidos com a coluna C₈.

Segundo VANCILLE e colaboradores²¹⁰ e VEJ-HANSEN e colaboradores²¹¹, também em relação ao pH da fase móvel, o método da Farmacopéia Americana apresenta vantagem. Em pH de cerca de 2 a 6, a tetraciclina em solução, se epimeriza para 4-epitetraciclina. Portanto, no método da Farmacopéia Britânica²⁹ a epimerização pode ocorrer durante o ensaio, devido ao pH da fase móvel de 3,9. A reação é reversível a valor de pH elevado, porém em pH baixo, além da epimerização, ocorre a desidratação da tetraciclina e 4-epitetraciclina.

Os métodos oficiais descritos nas farmacopéias e compêndios oficiais são elaborados através de estudo colaborativo que inclui avaliação rigorosa de todos os parâmetros que possam influenciar os resultados do teste. Mesmo adotando a metodologia oficial, existe a necessidade de alterações para obtenção de métodos confiáveis, o que ocorre devido às diferentes condições do ensaio. Segundo as normas de Boas Práticas de Laboratório²¹⁵, regulamentadas pela FDA, qualquer alteração na metodologia analítica exige que uma revalidação seja efetuada. No entanto, alguns trabalhos publicados^{80,115,116} colocam em discussão a questão da necessidade de validação, e em que casos uma adequação do método é aceitável. Desta forma, o primeiro parâmetro estudado foi a linearidade da resposta em relação à concentração. A curva de calibração do cloridrato de tetraciclina foi construída apresentando linearidade na faixa estudada de 0,5 a 500 µg/mL com coeficiente de correlação (R) de 0,9999, que pode ser observado na Figura 6. Mesmo a concentração de 0,5 µg/mL, o coeficiente de variação foi de 1,3 % para 5 réplicas de resultados de fator de análise (Tabela 18), sendo que a Farmacopéia Japonesa¹¹³ recomenda coeficiente de variação de no máximo 10 % para determinação do limite de quantificação. O coeficiente de variação entre todos os resultados para diferentes concentrações foi de 3,9 %, confirmando a característica de repetibilidade do método empregado, ou seja, a precisão.

Considerando que a saturação com a substância testada pode afetar a vida útil da coluna, curva de calibração com concentração menor das soluções-teste para a determinação da tetraciclina foi construída. Empregou-se solução-teste de dosagem com os pontos correspondentes às concentrações de 0,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$, tendo sido o coeficiente de correlação igual a 0,9999, comparando a linearidade da curva (Figura 7). A metodologia oficial da Farmacopéia Americana²⁰⁷ estabelece o ensaio comparativo entre uma solução do padrão e uma da amostra. Porém, o cromatógrafo equipado com um programa computadorizado permite o emprego de soluções-teste adicionais em diferentes concentrações, possibilitando a obtenção de resultados mais precisos, sem dispêndio adicional de tempo para a realização dos cálculos. Desta maneira, foi analisada a variação dos resultados através do coeficiente de variação para ensaios empregando diferentes números de soluções-teste do padrão e amostra. Ao determinar o teor de cloridrato de tetraciclina em uma amostra empregando duas soluções-teste da mesma, de 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e curva padrão nas concentrações de 10 a 500 $\mu\text{g/mL}$, o coeficiente de variação obtido foi de 1,1 % para todas as 10 réplicas, como pode ser observado na Tabela 20, evidenciando a precisão da metodologia.

Comparando os resultados provenientes de cada solução-teste da amostra obtida com a mesma curva de calibração, tendo como referência o coeficiente de variação que foi de 0,5 % e 0,1 %, respectivamente para as soluções com 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$, a reprodutibilidade de resposta para cada concentração foi satisfatória, resultando em pequena variação do teor encontrado (Tabela 20). Diminuindo o número de concentrações testadas de amostra e padrão foram estudadas as variações nos resultados. Uma única solução-amostra com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi testada frente a três grupos de solução-padrão. No primeiro grupo, a solução-padrão empregada foi somente a de 25 $\mu\text{g/mL}$, no segundo, as soluções de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e no terceiro, as soluções de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Os coeficientes de variação de cada um dos ensaios foram muito baixos, e todos semelhantes entre si, como pode ser observado na Tabela 21. Ao considerar o conjunto de resposta, o coeficiente de variação foi de 1,0 %, mostrando portanto a precisão dos ensaios nas condições testadas. Prosseguindo as determinações, as soluções-teste empregadas foram as mesmas, de 50 e

100 µg/mL, alterando-se as concentrações das soluções da amostra. Num dos dois ensaios a solução da amostra foi de 50 µg/mL e no outro foram de 50 e 100 µg/mL. O estudo envolveu a aplicação dos testes para três diferentes amostras. Na análise dos resultados, a diferença entre as amostras bem como entre os ensaios foi pequena, conforme os valores de coeficiente de variação apresentados na Tabela 22. Tendo em vista os resultados obtidos, tanto de teor como os picos dos cromatogramas, a solução-teste com concentração de 50 µg/mL foi selecionada para o ensaio de determinação do teor. Uma vez que a Farmacopéia Americana²⁰⁸ recomenda concentração 10 vezes superior (500 µg/mL), esta solução-teste é adequada, pois a saturação da coluna torna-se mais lenta, prolongando sua vida útil.

EKSBORG e EKQVIST⁵³ investigaram os materiais de enchimento das colunas com o mesmo comprimento da cadeia alquílica, porém de diferentes fornecedores. Diferença significativa na retenção foi observada. Em outro estudo, IRVERSEN e colaboradores¹¹⁰, constataram diferenças no desempenho da mesma coluna ciano de diferentes números de lote e mesmo fornecedor no ensaio de oxitetraciclina. Mas nas condições ótimas, resultados satisfatórios foram facilmente obtidos, pela mudança na fase móvel. DIHUIDI e colaboradores⁴⁹ empregando três diferentes colunas de PRP-1 para o ensaio de doxiciclina, obtiveram separações comparáveis, com coeficiente de variação entre os resultados menor que 1 %. Com a finalidade de verificar a reprodutibilidade do método cromatográfico estabelecido, foi realizado um estudo comparativo entre os resultados cromatográficos de fator de análise, obtidos empregando colunas com o mesmo material de empacotamento e provenientes do mesmo fornecedor, SYMMETRY™, mas com número de lote diferentes. O coeficiente de variação foi de 2,9 %, para todos os resultados obtidos a partir das 3 colunas (Tabela 19). Para este fator de variação, o método mostrou ser reprodutível. Segundo autores citados¹¹⁰, um dos fatores para o aparecimento de picos com formação de cauda (*tailing*) está relacionado com a formação de quelatos por complexação das tetraciclinas com íons metálicos, que ficam adsorvidos nas colunas de fase reversa ligadas a cadeias alquílicas, como o octilsilano, empregado neste trabalho. Porém, a formação deste *tailing* foi evitada por meio do emprego de fase

móvel contendo tampão oxalato, que possui a capacidade de complexar com os íons metálicos¹⁶⁰.

Nas farmacopéias e compêndios oficiais^{30,38,58,208} é exigida a determinação do limite da impureza, o cloridrato de 4-epianidrotetraciclina. Portanto a validação deve abranger o método da determinação do teor da impureza. A curva de calibração foi construída na faixa de 0,005 a 50 µg/mL, obtendo-se coeficiente de correlação de 0,9999, mostrado na Figura 9 e Tabela 23. Nas concentrações abaixo de 0,05 µg/mL o coeficiente de variação foi maior, de 9,5 %, mas ainda abaixo do valor especificado na Farmacopéia Japonesa¹¹³.

Na determinação do limite de detecção os resultados foram semelhantes para a tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina. O limite de detecção encontrado para as tetraciclinas, por vários autores^{104,110,123,137,197,212} está próximo de 4 a 12 ng, sendo a razão pico/ruído entre 2 e 3. O limite de detecção determinadas para as duas substâncias neste trabalho foi de 0,2 ng, que indicou uma grande sensibilidade do método empregado.

A Figura 11 mostra a sobreposição dos cromatogramas correspondentes às soluções de 0,01 e 0,005 µg/mL de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina. O pico da concentração maior aparece de forma discreta no tempo de retenção de 5,0 minutos, enquanto que para a concentração de 0,005 µg/mL não há evidência de pico. Com maior atenuação dos picos, e considerando a sobreposição dos dois picos anteriores, mostrados na Figura 12, pode-se observar a presença, no cromatograma de 0,01 µg/mL, de um pico que se diferencia do ruído da linha de base, enquanto que no outro cromatograma, no mesmo tempo de retenção, o pico é menor que o dobro da altura do ruído.

Empregando soluções-teste do padrão a 50 e 100 µg/mL e amostra a 50 µg/mL, a quantificação do cloridrato de tetraciclina e fosfato de tetraciclina foi efetuada com o método cromatográfico estabelecido e os resultados representados nas Tabelas 25 e 26. Os resultados apresentados na Tabela 25 indicam duas amostras com teor abaixo do especificado, sendo de 243,6 e 317,0 mg/cápsula, respectivamente para os lotes 1 e 3 do laboratório D. As outras

amostras testadas apresentaram valores de teor dentro do limite especificado pela Farmacopéia Americana, de 90 a 125 % do valor declarado no rótulo.

Os resultados discrepantes em cerca de 50 % do teor declarado no rótulo, foram semelhantes aos obtidos pelo método microbiológico, e também pelo ensaio de dissolução.

A precisão do método cromatográfico adotado foi determinada para amostras de cinco diferentes laboratórios, cujos resultados estão expressos nas Tabelas 27 a 31. Para cada amostra foram efetuadas de quatro a seis repetições do ensaio, em dias diferentes, sendo cinco determinações para cada ensaio. O coeficiente de variação para cada ensaio foi muito baixo, de até 0,6 %, evidenciando portanto boa precisão. Analisando os resultados obtidos para um mesmo laboratório, foi possível constatar a precisão do ensaio, característica que se manteve mesmo quando considerados aqueles obtidos para os diferentes laboratórios produtores.

Outro parâmetro importante, a exatidão, foi determinada através do teste de recuperação aplicado a diferentes amostras. Pelos resultados apresentados na Tabela 32, a quantidade recuperada do padrão de cloridrato de tetraciclina adicionado foi próxima de 100 % para as três diferentes quantidades de cloridrato de tetraciclina testadas, sendo o menor valor recuperado de 95,5 % para a amostra 10 e o maior, 102,7 % para a amostra 4. Foi confirmada portanto, a exatidão do método testado para amostras provenientes de diferentes laboratórios produtores. A interferência de excipientes ou impurezas de síntese ou de degradação não foi significativa para esta metodologia. A sensibilidade do método não foi alterada, nas concentrações das soluções de recuperação de 80, 100 e 150 µg/mL testadas.

A Farmacopéia Americana²⁰⁸ recomenda limite máximo de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina de 3 %. Neste trabalho, após verificar o limite de quantificação do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina para o método (0,10 µg/mL), a menor concentração com coeficiente de variação inferior a 10 % (Tabela 23), foi realizada a dosagem desta substância no padrão de cloridrato de tetraciclina de potência 994 µg/mg empregado nos ensaios, e nas amostras comerciais. Para determinar a concentração adequada da solução-teste do cloridrato de tetraciclina

padrão, o cromatograma do padrão de cloridrato de tetraciclina foi analisado na Figura 13, onde o pico da 4-epianidrotetraciclina aparece eluído, imediatamente depois de um pico desconhecido de área maior. A sobreposição dos cromatogramas do padrão de cloridrato de tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina representados nas Figuras 20 e 21, confirmou como sendo o pico menor o da 4-epianidrotetraciclina, sendo que os picos foram semelhantes na forma e área para a concentração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina de 0,25 µg/mL. Portanto, as soluções-teste 0,10, 0,25 e 0,50 µg/mL foram adotadas para a determinação quantitativa nas amostras comerciais. O padrão primário de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina empregado neste trabalho, adquirido da Farmacopéia Americana, apresentou um pico de impureza eluído em cerca de 21,5 minutos (Figura 10). A altura deste pico corresponde a apenas cerca de 0,03 % da altura do pico da 4-epianidrotetraciclina, mas nas injeções sucessivas interfere com o pico principal devido a pela sobreposição. Portanto, durante o ensaio, foi necessário tempo maior para a eluição deste pico, de forma a eliminar sua interferência. Os valores de teor de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina no padrão de cloridrato de tetraciclina estão apresentados na Tabela 33. A porcentagem de teor obtida para a amostra foi de 0,2 % ou 2,3 µg/mg. O coeficiente de variação para este ensaio foi de 8,0 %, abaixo do recomendado pela Farmacopéia Japonesa¹¹³, mostrando a precisão do método para diferentes ensaios, embora o coeficiente de variação para as réplicas de um ensaio fosse maior que 2 %, valor recomendado de coeficiente de variação para réplica de cinco injeções do cloridrato de tetraciclina. O pico de uma substância desconhecida eluída imediatamente antes foi identificado por HEYDEN e colaboradores⁹⁹, como da 4-epitetraciclina, empregando as mesmas condições cromatográficas deste trabalho, também adaptadas da USP XXIII²⁰⁸.

Nas amostras comerciais o cloridrato de tetraciclina foi determinado através do mesmo procedimento, fornecendo os resultados expressos nas Tabelas 34 e 35. Todas as amostras apresentaram teor menor que 3 % de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, com valores entre 0,1 a 0,8 %. Para os dois lotes de amostras reprovadas quanto ao teor de cloridrato de tetraciclina, provenientes do

laboratório D, o teor de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina foi também inferior a 3 %.

TSUJI e colaboradores¹⁹⁸ analisaram amostras comerciais de fosfato de tetraciclina com prazo de validade vencido encontrando apenas uma amostra com mais de 3 % de 4-epianidrotetraciclina. Isto pode ser devido à grande estabilidade da tetraciclina na forma sólida. No entanto, outros estudos de estabilidade realizados, mostraram que enquanto amostras de cápsulas de gelatina contendo cloridrato de tetraciclina mantiveram a estabilidade por 8 a 9 anos, o fosfato de tetraciclina permaneceu estável por cerca de 4 anos. Este fato foi atribuído à presença do fosfato, que catalisa a reação de epimerização^{182,193} ou influi favoravelmente na formação de complexos metálicos, ocasionando uma diminuição da tetraciclina disponível¹⁹². Neste trabalho, os resultados de teor para fosfato e cloridrato de tetraciclina não evidenciaram diferença significativa em relação ao total das amostras.

Seguindo a recomendação da Farmacopéia Americana²⁰⁸, a resolução (R) entre os picos da tetraciclina e de 4-epianidrotetraciclina foi calculada a partir de uma solução de resolução com a mistura dos dois padrões, modificando a concentração, porém mantendo a proporção da concentração das substâncias. Para isto, foi empregado cromatograma obtido desta solução de resolução como representado na Figura 14. O valor médio da resolução foi de 3,7 (Tabela 37). Para avaliar o método de determinação da 4-epianidrotetraciclina em relação ao desconhecido (1), foram empregados cromatogramas de soluções-teste da tetraciclina, sendo os resultados apresentados na Tabela 36. A separação pode ser claramente observada nos cromatogramas, sendo que melhor separação ocorreu entre a 4-epianidrotetraciclina e a tetraciclina, como pode ser constatado nos cromatogramas respectivos, Figuras 13 e 14. Outro parâmetro estudado com a mesma solução de resolução, foi a seletividade do método. A seletividade apresentou valor médio de 1,52, mostrando diferença no tempo de eluição entre tetraciclina e 4-epianidrotetraciclina.

No sistema cromatográfico adequado, os picos devem apresentar simetria para garantir resultados precisos e minimizar o erro. A assimetria (T) do pico foi calculada através do cromatograma obtido para a solução de cloridrato de

tetraciclina de 50 µg/mL (Tabela 38). Constatou-se pelos valores de assimetria (T) muito próximos de 1, que os picos são simétricos.

Segundo a FDA, alterações nos métodos cromatográficos oficiais não são permitidas. Mas, para Farmacopéia Americana, importante fonte de referência para os métodos oficiais, modificações podem ser realizadas com a finalidade de otimizar as condições analíticas. No entanto, estas alterações devem ser adotadas após o estudo de adequação do método aplicado às amostras. Para diferentes laboratórios, as alterações podem diferir de acordo com a disponibilidade técnica, de material e pessoal, não sendo considerados no estudo de adequação do método. A validação envolve o estudo de reprodutibilidade e robustez do método analítico^{81,113,208} e permite identificar as fontes de variação.

CARTWRIGTH³³ descreveu um estudo colaborativo do ensaio de dissolução *in vitro* de preparações sólidas, empregando o método da Farmacopéia Britânica²⁷ em oito diferentes laboratórios. Diferença no perfil de dissolução das preparações, encontrada para os diferentes laboratórios, foi atribuída a diferenças constatadas no nível de vibração das cubas do aparelho de dissolução. Foi constatado que as discrepâncias entre os resultados obtidos não estavam relacionadas com o produto analisado, mas com o equipamento empregado em cada laboratório. Considerando a grande diversidade de fornecedores de matérias-primas, reagentes, solventes, de equipamentos, de aprimoramento técnico e pessoal, entre outras fontes de variação, a exigência da revalidação periódica dos métodos analíticos, é fundamental, assim como estudos colaborativos envolvendo vários laboratórios, para determinar a reprodutibilidade e garantir a confiabilidade das metodologias analíticas. A validação, considerando as exigências de suporte material, pessoal, de espaço físico e documentação aumenta o custo analítico em 20 a 25 %. Para o futuro, o processo de validação deve ser realizado e estratégias devem ser definidas com a finalidade de reduzir os custos, sem no entanto comprometer a qualidade do produto¹⁵⁴.

Quando ocorrem as modificações dos métodos cromatográficos, os limites para que estas modificações não descaracterizem a natureza do método oficial foram estudados por FURMAN e colaboradores⁸⁰. Dentre os ajustes possíveis estão a troca da coluna para melhorar seu desempenho, a sensibilidade, redução

no consumo de solvente, adequação da pressão e do tempo de retenção. O estudo deve iniciar com o procedimento do método oficial, e as alterações devem ser realizadas somente quando necessárias, como sugeridos foram, em relação à concentração do sal de $\pm 10 \%$, pH $\pm 0,2$, comprimento da coluna de $\pm 70 \%$, diâmetro interno da coluna de $\pm 25 \%$, variação do tamanho da partícula do material de empacotamento e do fluxo da fase móvel de $\pm 50 \%$ e a temperatura de $\pm 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Neste trabalho, foram necessários ajustes quanto à velocidade de fluxo da fase móvel para diminuir a pressão na coluna, e da composição da fase móvel. Estas alterações ocorreram respeitando os limites estabelecidos pelos autores.

Aspecto prático a ser considerado consiste no fato de que a coluna cromatográfica, após sucessivas injeções vai se tornando saturada, ou sofre degradação pelo emprego de fases muito agressivas ao material de empacotamento. No sentido de verificar o envelhecimento da coluna após várias injeções de amostra e passagem de grande quantidade de fase móvel, foram determinados os valores de fator de capacidade (K') e eficiência (N) da coluna no início e no final do seu uso, após cerca de 1000 injeções de volumes de 20 μL . Pelos resultados da Tabela 39, verifica-se que ocorreu uma perda de eficiência da coluna em cerca de 50 %. A resolução foi alterada de 3,39 para 2,69 quando determinada para picos de solução do padrão de 50 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de tetraciclina, e de 3,37 para 2,73 para solução de 100 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a comparação entre os resultados obtidos para as diferentes concentrações das soluções, no início das injeções ou após várias injeções, não apresentaram diferenças significativas. Para IVERSEN e colaboradores¹¹⁰, após 400 injeções de amostra de plasma para análise da oxitetraciclina, a pré-coluna foi saturada e a linha de base tornou-se não uniforme. Em relação à coluna, mais de 3000 injeções foram efetuadas sem a mudança nos resultados, sendo o volume de injeção de 14 μL , indicando a possibilidade do emprego da coluna.

O programa de *Software* interligado ao cromatógrafo oferece grande vantagem, registrando e processando os dados, permitindo o armazenamento e revisão destes quando requerido. O grande número de informações cumulativo de ensaios é analisado, proporcionando exatidão e rapidez na obtenção dos

resultados. Por sua vez o programa MILLENIUM™, que faz parte do cromatógrafo empregado neste trabalho, oferece recurso que possibilita diminuir o tempo total de análise e armazenar dados para serem posteriormente trabalhados. Outro recurso possível é alterar a atenuação e sobrepor vários picos cromatográficos, permitindo analisar e comparar as respostas de maneira detalhada.

A especificidade e sensibilidade do método cromatográfico estudado neste trabalho podem ser observadas através da comparação entre os cromatogramas das Figuras 15 a 21. Assim, nas Figuras 15 e 16, foram feitas as sobreposições dos cromatogramas de cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, respectivamente, obtidos de soluções de concentração crescentes, na razão de 1:2. Pode-se observar a semelhança, o mesmo tempo de retenção e a proporcionalidade da área dos picos. Na Figura 17, foram sobrepostos dois cromatogramas. O primeiro foi obtido da solução de resolução contendo 12,5 µg/mL de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina (cromatograma com traçado na cor preta). O outro, de uma solução de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, também na concentração de 12,5 µg/mL (cromatograma com traçado na cor azul). Observa-se a sobreposição exata dos picos da solução de resolução e do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, que possuem a mesma concentração.

Na Figura 18, a sobreposição dos dois cromatogramas permite determinar o pico correspondente ao cloridrato de 4-epianidrotetraciclina e mostra a semelhança dos picos desta substância com o pico da tetraciclina com a mesma concentração. Da mesma forma, nas Figuras 19 e 20, pode-se identificar pico da 4-epianidrotetarciclina, presente em pequena concentração na solução de cloridrato de tetraciclina 50 µg/mL, através da observação da posição dos picos, apresentando tempo de retenção semelhante. Na Figura 21, mesmo a uma baixa concentração do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, pode-se verificar o aparecimento do pico no mesmo tempo de retenção que o pico do cloridrato da mesma substância, presente na solução desta, quando obtido nas mesmas condições cromatográficas.

No estudo estatístico, a precisão dos métodos microbiológico e cromatográfico foi calculada através da obtenção do desvio-padrão (Tabela 40).

Não foram observadas grandes dispersões para as distintas combinações laboratório/lote/dia do ensaio, fato verificado pelos limites máximo e mínimo de teor de cloridrato de tetraciclina para cada laboratório e no gráfico da Figura 22. Considerando a comparação entre os dois métodos através dos valores de coeficiente de variação obtidos para cada amostra analisada, confirmou-se uma precisão relativamente maior do método cromatográfico estudado. Os valores de coeficiente de variação foram maiores para grande parte das amostras analisadas, como pode ser verificado nas Tabelas 25 e 26. Na Figura 23, os erros da análise foram ilustrados através do histograma, observando-se a concentração dos erros em torno do zero. Para determinar o efeito do erro da análise, com o objetivo de determinar a conformidade ou não do lote, as Figuras 24 e 25 foram empregadas. O erro de análise também apresentou limites de especificação simétricos em torno desta.

A representação gráfica do desvio padrão da análise e do processo produtivo foi ilustrado na Figura 25, havendo baixa probabilidade em se aceitar um produto fora de especificação, o que viria a ter consequências graves devido ao risco do consumidor, e de rejeitar um produto conforme a especificação.

Na Figura 26 foi ilustrado o gráfico de controle com os resultados individuais da determinação do teor pelo método cromatográfico. Todos os resultados estiveram próximos do valor esperado de 500 mg/cápsula, situando-se fora do limite especificado dois resultados, correspondentes a duas amostras do laboratório D.

A detecção dos dois desvios, se de um lado aparenta despreocupante pela incidência, de outro é gravíssimo se lembrada a falha na eficácia terapêutica, certamente característica de todas as unidades inerentes aos lotes em questão, indevidamente distribuídos para o consumo. Gráfico semelhante ao anterior foi preparado com os resultados obtidos dos métodos microbiológico e cromatográfico, podendo ser observado na Figura 27. Segundo KAZEMIFARD¹²³ a vantagem apresentada pelo método microbiológico em dimensionar a atividade biológica, consiste simultaneamente em limitação pois também considera os produtos de degradação ou contaminantes das tetraciclinas, com atividade, que estejam presentes em diferentes quantidades em matérias-primas e produtos

acabados. Assim, os resultados obtidos por este método não são restritos à potência da tetraciclina presente na preparação¹⁷⁶.

Tal fato conduz em primeira instância a considerar o diferencial oriundo da atividade biológica de produtos derivados da tetraciclina, adicionalmente. Não se pode entretanto, no presente trabalho, afirmar como certa esta premissa, uma vez que o método cromatográfico, que poderia confirmá-la, foi apenas aplicado à tetraciclina e à 4-epianidrotetraciclina, um derivado não ativo. A comparação dos dois métodos, também visualizada nas Figuras 28 e 29, permite confirmar os resultados do ensaio microbiológico sempre superiores ao cromatográfico, e o forte indício de veracidade da hipótese apresentada. Vários autores estudaram a correlação do método CLAE com o microbiológico^{11,12,35,65,85,104,196,197} para a determinação das tetraciclinas e seus produtos de degradação. Boa correlação foi encontrada em todos os trabalhos realizados, exceto para AZSALOS e colaboradores¹¹. Os resultados da determinação da potência da tetraciclina pelo método microbiológico recomendado no CFR mostrou valores de teor 2 a 6 % superiores aos encontrados pelo método CLAE, como ocorrido neste estudo. Parte desta diferença foi atribuída pelos autores, à diferença do teor da tetraciclina e outras impurezas, como a clortetraciclina, que juntos poderiam contribuir com a potência microbiológica do antibiótico. Portanto, a diferença obtida nos resultados, entre os dois métodos, foi explicada pela diferença nas atividades das impurezas que não foram quantificadas pelo método CLAE.

Tendo em vista esta diferença entre os resultados obtidos pelas duas metodologias, e com a meta de obter informações quanto à correlação entre ambas, aplicou-se o emprego do teste *t* de Student⁶⁸. Este teste tem como objetivo determinar se estatisticamente existe diferença significativa entre as médias de duas séries de resultados analíticos a um dado nível de probabilidade.

O valor de *t* calculado para avaliar a diferença entre a média dos resultados de teor obtidos pelos métodos cromatográfico e microbiológico foi de 12,76 para $p < 0,001$, portanto superior ao *t* tabelado, evidenciado diferença significativa entre as duas metodologias.

Com a mesma finalidade, determinou-se adicionalmente o coeficiente de correlação de Pearson⁶⁸, que também decorreu na conclusão quanto à

significância da diferença estatística entre os dois métodos ($r = 0,9491$, $p < 0,001$).

A porcentagem de resultados individuais fora do limite especificado para os dois métodos foi determinada, bem como a porcentagem acima e abaixo da especificação para cada laboratório para o método microbiológico e colocados na Tabela 41. O laboratório D, apresentou porcentagem muito alta, de 77,5 % fora do limite especificado para o método cromatográfico, e 60,0 % abaixo do limite inferior para o ensaio microbiológico. Estes resultados colocados na Tabela 41 foram representados na forma de histograma (Figura 29) para melhor visualização dos dados obtidos. Ainda conforme pode ser observado na Tabela 41, além do laboratório D, o laboratório J apresentou 4,4 % dos ensaios individuais com teor fora do limite especificado no ensaio cromatográfico, embora o seu teor médio se apresentasse dentro do limite especificado. Para o ensaio microbiológico, apenas o laboratório D com as amostras reprovadas, mostrou resultados abaixo do limite especificado, enquanto que em relação ao limite superior, quatro laboratórios, B, G, I e K, tiveram resultados individuais superiores ao limite de especificação nas porcentagens de, 7,1; 7,7; 8,3 e 5,6 %, respectivamente. Estes resultados reforçam a diferença existente entre as duas metodologias.

A constatação dos valores obtidos de teor de tetraciclina, particularmente para amostras representativas de um dos laboratórios produtores, abaixo dos limites especificados, leva a consideração quanto ao risco do paciente, recebendo medicação que não permita eficácia terapêutica. Resultados obtidos quanto a ensaios de dissolução das mesmas amostras apenas confirmam a existência de motivo de preocupação. O Ministério da Saúde, devido às freqüentes denúncias e comprovação da existência de medicamentos falsificados sendo comercializados, de forma pertinente publicou a Lei nº 9.677¹³⁴, de 02 de julho de 1998, que considera crime hediondo, os delitos praticados contra a saúde pública, como a falsificação, adulteração ou alteração de produtos destinados a fins terapêuticos. Os produtos considerados falsificados incluem aqueles em desacordo com a fórmula do registro, sem as características de identidade e qualidade, com redução do seu valor terapêutico ou atividade, de procedência ignorada, sem registro ou adquiridos de estabelecimentos sem licença da autoridade sanitária.

Fica evidente que, apenas com investigações quanto a conformidade aos itens especificados nos compêndios farmacêuticos, com ênfase para determinações de teor e dissolução, pode-se avaliar a qualidade dos produtos destinados à população. Ainda, os resultados obtidos evidenciam que indicativo de falhas grosseiras, detectadas por análise visual criteriosa, possam ser fortes indicativos de desvios na qualidade sob o ponto de vista da qualidade físico-química.

Ao se pensar na aplicação da legislação que contempla o conceito de medicamento genérico, em processo de aprovação no Brasil e simultaneamente considerando distintos patamares de atendimento aos conceitos de qualidade por diferentes laboratórios produtores, assim como limitações que ainda enfrentam o Sistema de Vigilância Sanitária no país, e mesmo a escassez momentânea de laboratórios certificados, há que se tratar o assunto por graus de prioridade. Assim, mesmo anteriormente a exigências amplas de ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência, há que se exigir dos produtos farmacêuticos atendimento aos padrões de qualidade farmacopêicos, através de ensaios *in vitro* de dissolução, assim como ensaios de teores dos princípios ativos e limites de impurezas, desenvolvidos em laboratório que observem as Boas Práticas de Laboratório.

Estas considerações estão pautadas nos resultados experimentais deste trabalho, uma vez que se tomou para o seu desenvolvimento amostras de produtos farmacêuticos disponíveis ao consumo pela população. Somando-se esta providência à das inspeções periódicas nas empresas quanto a adoção de BPF, certamente se poderá contar, em breve, com a dispensação de medicamentos que possam incorporar as características indispensáveis de qualidade.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 7.1. As amostra de cápsulas de tetraciclina avaliadas permitiram detectar falhas no atendimento às exigências legais, às características de qualidade do produto, e inferir quanto a desvios do processo industrial.
- 7.2. O peso individual de drágeas e o conteúdo das cápsulas avaliadas foram no geral adequados, exceto para um lote de um dos produtores de cápsulas (Laboratório D).
- 7.3. Os antibióticos do grupo da tetraciclina disponíveis para consumo apresentam incidência de lotes com desvios de teor (5,3 %) e de dissolução (5,3 %) que podem comprometer a eficácia terapêutica do tratamento.
- 7.4. Resultados de coeficiente de variação (cinco amostras com valores próximo ou superior a 10 %) obtidos do ensaio de dissolução dos antibióticos do grupo da tetraciclina podem ser associados a falha na homogeneidade do processo industrial.
- 7.5. Estudo comparativo de metodologias CLAE de quantificação aplicadas ao cloridrato de tetraciclina e cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, conforme as Farmacopéias Americana e Britânica privilegia a primeira, em que se obteve menor tempo de retenção e pico com forma gaussiana.
- 7.6. Constatou-se que a aplicabilidade do método CLAE apresentado nas Farmacopéias Americana e Britânica exige condições modificadas, de forma a permitir resultados confiáveis.

- 7.7. Pode-se empregar na determinação quantitativa de cloridrato de tetraciclina, soluções-teste do padrão e amostra de cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, individualmente ou em conjunto, com a mesma precisão.
- 7.8. Todas as amostras, assim como o padrão de cloridrato de tetraciclina apresentaram teor de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina dentro do limite especificado (3 % para amostra e 2 % para o padrão).
- 7.9. O método cromatográfico modificado apresenta boa precisão para amostras provenientes de diferentes laboratórios, tanto para variações intra-dia e inter-dia de ensaios.
- 7.10. O método cromatográfico modificado permitiu boa separação dos picos do cloridrato de tetraciclina e do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina, bem como dos picos do cloridrato de 4-epianidrotetraciclina e do desconhecido eluido imediatamente antes.
- 7.11. Os resultados de teor de cloridrato de tetraciclina nas amostras de cápsulas obtidos pelo método turbidimétrico foram sempre superiores em relação ao método cromatográfico empregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABDOU, H.M. Dissolution. In: *Remington's pharmaceutical sciences*. 18.ed. Easton: Mack Publishing, 1990. cap.31. p.589-602
2. ABRAHAM, E.P., DUTHIE, E.S. Effect of pH of the medium on activity of streptomycin and penicillin. *Lancet*, London, v.1, p.455-459, 1946.
3. ABRAHAM, E.P., GARDNER, A.D., CHAIN, E., FLETCHER, C.M., HEATLEY, N.G., JENNINGS, M.A., FLOREY, H.W. Further observations on penicillin. *Lancet*, London, v.241, n.6155, p.177-186, 1941.
4. ADAMOVICS, J.A. *Chromatographic analysis of pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker, 1990. p.3-60, 167-211.
5. ALI, S.L. Tetracycline hydrochloride. *Anal. Prof. Drug. Subst.*, Orlando, v.13, p.597-653, 1984.
6. ALI, S.L., STRITTMATLER, T. Separation and quantitative determination of tetracycline, epitetracycline epianhydrotetracycline and anhydrotetracycline by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.1, n.5, p.185-188, 1978.
7. ARRET, B., JOHNSON, D.P., KIRSHBAUM. Outline of details for microbiological assay of antibiotics: second revision. *J. Pharm. Sci*, Washington, v.60, n.11, p.1689-1694, 1971.
8. ASCIONE, P.P., CHREKIAN, G.P. Separation and determination of anhydrotetracycline, 4-epianhydrotetracycline, tetracycline, and 4-epitetracycline in a tetracycline mixture. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.59, n.10, p.1480-1482, 1970.
9. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC*. 14.ed. Arlington, 1984. p.813-815.

* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1997.

- 10 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC*. 15.ed. Arlington, 1990. v.1, p.xvii.
- 11 ASZALOS, A., HANEKE, C., HAYDEN, M. J., CRAWFORD, J. Analyses of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.15, n.6, p.367-373, 1982.
- 12 BARNES, W.N., RAY, A, BATES, L.J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the assay of tetracycline. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.347, n.1, p.179-182, 1985.
- 13 BARNES, W.N., RAY, A., BATES, L.J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the assay of oxytetracycline. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.347, n.1, p.173-178, 1985.
- 14 BEER, E.J., SHERWOOD, M.B. The paper-disc agar plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.49, p.101-104, 1945.
- 15 BERGAN, T., OYDYIN, B., LUNDE, I. Biological availability and *in vitro* release from oxytetracycline and tetracycline preparations. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Oslo, v.33, p.138-156, 1973.
- 16 BERRIDGE, N.J., BARRETT, J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.6, p.14-20, 1952.
- 17 BERTANI, S., BURINATO, C., CARAZZONE, M., GENOVA, R., GUERRATO, G., NERI, G., PAPAKRISTO, G., RECUSANI, F., USSI, F., VERONESE, M. Esame comparativo di titolazioni microbiologiche fra vari laboratori. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v.118, n.6, p.301-307, 1979.
- 18 BOGARDUS, J.B., BLACKWOOD Jr., R.K. Dissolution rates of doxycycline free base and hydrochloride salts. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.68, n.9, p.1183-1184, 1979.
- 19 BOND, C.R., DAVIES, D.L. The microbiological assay of penicillin by the turbidimetric method, using *Staphylococcus aureus*. *Analyst*, London, v.73, p.251-254, 1948.

- 20 BOURQUIN, T., BORDI, D., BOUNINE, J.P., COMPAGNON, P.A., DROUIN, J.E., FATRAS, A., LECOINTRE, L., LEPABIC, C., MOTTU, P., PENCHINAT, L., RICHARD, F., VERNEYRE, N. Les tests de conformité en chromatographie en phase liquide. Rapport d'une commission SFSTP. *STP Pharma Prat.*, Paris, v.4, n.3, p.170-176, 1994.
- 21 BRADY, M.S., KATZ, S.E. Factors influencing optimization of diffusion assays for antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.73, n.2, p.202-205, 1990.
- 22 BRADY, M.S., KATZ, S.E. Simplified plate diffusion system for microbial assays of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.70, n.4, p.641-646, 1987.
- 23 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1953. p.794-797.
- 24 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1958. p.451-452, 669-671, 909-916.
- 25 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1963. p.551-552, 821-823, 1097-1105.
- 26 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1968. p.700-701, 1000, 1312-1318.
- 27 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1973. p.168-169, 338, A102-A106.
- 28 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.1, p.532, 798, v.2, p.A122-A126.
- 29 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1988. v.1, 212-213, 409-411, 563, v.2, p.A146-A152.
- 30 BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, London, 1993. v.2, p.243-244, 473-474, 893, 1039, 1125-1126, A165-A169.

- 31 BURGER, J.M., NASH, R.A. Simplified automatic determination of *in vitro* drug dissolution rates using direct concentration recording. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.60, n.2, 1971.
- 32 BUTTERFIELD, A.G., HUGHES, D.W., WILSON, W.L., POUND, N.J. Simultaneous high-speed liquid chromatographic determination of tetracycline and rolitetracycline in rolitetracycline formulations. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.64, n.2, p.316-320, 1975.
- 33 CARTWRIGHT, A.C. Sources of variation during collaborative evaluation of *in vitro* dissolution tests for two solid preparations. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.31, p.434-440, 1979.
- 34 CHAIN, E., FLOREY, H.W., GARDNER, A.D., HEATLEY, N.G., JENNINGS, M.A., ORREWING, J., SAUDERS, N.G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, London, v.239, n.6104, p.226-228, 1940.
- 35 CHAPPELL, G.S., HOUGIUM, J.E., KELLEY, W.N. Determination of oxytetracycline in premixes and veterinary products by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Arlington, v.69, n.1, p.28-30, 1986.
- 36 CHARLES, B.C., COLE, J.J., RAVERNSCROFT, P.J. Method for rapid determination of urinary tetracycline by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.222, p.152-155, 1981.
- 37 CHOWDARY, K.P.R., RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. *East. Pharm.*, New Delhi, v.30, n.350, p.51-54, 1987.
- 38 CODE of Federal Regulation. *Food and Drugs*. Part 300-499. Washington: US Government Printing Office, 1992. p.296-312, 362-365, 716-721.
- 39 COHEN, J.L., HUBERT, B.B., LEESON, L.J., RHODES, C.T., ROBINSON, J.R., ROSEMAN, T.J., SHEFTER, E. The development of USP dissolution and drug release standards. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.7, n.10, p.983-987, 1990.
- 40 COOPER, K.E., WOODMANN, D. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *J. Pathol. Bacteriol.*, Edinburgh, v.58, p.75-84, 1946

- 41 DAVID, W.W., McGUIRE, J.M. Some new procedures and instrumentation useful for microbiological antibiotic testing by diffusion methods. II. An antibiotic delivery pippete for use with porous disks. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Washington, v.38, p.462-464, 1949.
- 42 Decreto nº 79.054 de 5 de janeiro de 1977. *Diário Oficial*, Brasília, 5 de janeiro de 1977. Submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, fármacos, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros.
- 43 DeNUNZIO, J.C., BOWMAN, F.W., KIRSHBAUM, A. The biologic assay of neomycin in combination with dihydrostreptomycin using a test organism made resistant to dihydrostreptomycin. *Antibiot. Chemother.*, Washington, v.4,p.300-303, 1954.
- 44 DESVIGNES, A. Les possibilítes de l'analyse par voie microbiologique. *Mises Point Chim. Anal. Pure Appl. Anal. Bromatol.*, Paris, n.8, p.31-60, 1960.
- 45 DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 26.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1997/1998. p. 118-119
- 46 DiCUOLLO, C.J., IONNO, M.B., PAGANO, J.F. Automated turbidimetric continuous dilution bioassay of antibiotics. *Bacteriol. Proc.*, Ann Arbor, v.47, p.8, 1965.
- 47 DIGENIS, G.A., GOLD, T.B., SAHAH, V.P. Cross linking on gelatin capsules and its relevance to their *in vitro*–*in vivo* performance. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.83, n.7, p.915-921, 1994.
- 48 DIHUIDI, K., ROETS, E., HOOGMARTENS, J., VANDERHAEGHE. Influence of temperature on stability of solid tetracycline hydrochloride, measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.246, n.2, p.350-355, 1982.
- 49 DIHUIDI, K., KUCHARSKI, M.J., ROETS, E., HOOGMARTENS, J., VANDERHAEGHE, H. Quantitative analysis of doxycycline and related substances by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.325, n.2, p.413-424, 1985.

- 50 DIJKHUIS, I.C., BROMMET, M.R. Determination of epitetracycline and chlortetracycline in tetracycline by quantitative thin-layer chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.59, n.4, p.558-560, 1970.
- 51 DUX, J.P. *Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. p.32-58, 59-77
- 52 EAGLE, A.R. Handling erros and measuring. *Ind. Qual. Cont.*, New York, v.10, p. 10-15, 1954
- 53 EKSborg, S., EKQVIST, B. Reversed-phase ion-pair liquid chromatography of tetracyclines. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.209, n.2, p.161-173, 1981.
- 54 EL-YAZIGI, A. Disintegration – dissolution analysis of percent dissolved–time data. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.70, n.5, p.535-537, 1981.
- 55 EUROPEAN Pharmacopoeia. Paris: Maisonneuve, 1971. p.49-52, 431-439.
- 56 EUROPEAN Pharmacopoeia. 2.ed. Paris: Maisonneuve, 1980. p. v.2.2.1-viii, 198-198-4, 210-210-5.
- 57 EUROPEAN Pharmacopoeia. 2.ed. Paris: Maisonneuve, 1984. p.v.2.2.1-v.2.2.4-4, viii.4-1-viii.4-14, 272-272-6
- 58 EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997. p.128-131, 788-790, 1274, 1625-1627, 1748.
- 59 FAINE, S., KNIGHT, D.C. Rapid microbiological assay of antibiotics in blood and other body fluids. *Lancet*, London, v.2, n.7564, p.375-378, 1968.
- 60 FALK, C.R. Adaptation of antibiotic assay methods for routine use. *Am. J. Publ. Health*, Boston, v.43, p.419-425, 1953.
- 61 FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p. 265-267, 337-338.
- 62 FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1, p.v.5.2.17-v.5.2.17-15.

- 63 FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.285-286, 301-302, 996-1002.
- 64 FEDENIUK, R.W., RAMAMURTHI, S., McCURDY, A.R. Application of reversed-phase liquid chromatography and prepacked C₁₈ cartridges for the analysis of oxytetracycline and related compounds. *J. Chromatogr. B.* Amsterdam, v.677, n.2, p.291-297, 1996.
- 65 FERNANDEZ, A.A., NOCEDA, V.T., CARRERA, E.S. Simultaneous separation and quantitative determination of tetracycline, anhydrotetracycline, 4-epitetracycline, and 4-epi-anhydrotetracycline in degrade tetracyclines by thin-layer chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.58, n.4, p.443-446, 1969.
- 66 FIELDING, J. A simple method of estimating penicillin and other bacteriostatics. *Br. Med. J.*, Edinburgh, p.136-137, 1947.
- 67 FIKE, W.W., BRAKE, N.W. Modified method for determining tetracycline, 4-epitetracycline, and anhydrotetracyclines in tetracycline base or hydrochloride. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.61, n.4, p.615-617, 1972.
- 68 FISHER, L.D, BELLE, G.V. *Biostatistics. A methodology for the health sciences*. New York: Jonh Wiley. 1993. p.103-115, 145-175, 369-389.
- 69 FLEMING, A. Estimation of penicillin in serum use of glucose, phenol red, and serum water. *Lancet*, London, v.252, n.6448, p.401-402, 1947.
- 70 FLEMING, A. *In-vitro* tests of penicillin potency. *Lancet*, London, v.242, n.6199, p.732-733, 1942.
- 71 FLEMING, A. Micromethods of estimating penicillin in blood serum. *Lancet*, London, v.247, n.6324, p.620-621, 1944.
- 72 FLEMING, A. Streptococcal menningitis treated with penicillin. Measurement of bacteriostatic power of blood and cerebrospinal fluid. *Lancet*, London, v.245, n.6267, p.434-434, 1943.

- 73 FOSTER, J.W. Quantitative estimation of penicillin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.144, p.285-286, 1942.
- 74 FOSTER, J.W., WILKER, B.L. Microbiological aspects for penicillin. II. Turbidimetric studies on penicillin inhibition. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.46, p.377-389, 1943.
- 75 FOSTER, J.W., WOODRUFF, H.B. Improvements in the cup assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.148, p.723, 1943.
- 76 FOSTER, J.W., WOODRUFF, H.B. Microbiological aspects of penicillin. I. Method of assay. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.46, p.187-202, 1943.
- 77 FREEMAN, K.A., JOHNSON, D.P., GARTH, M.A. Assuring reliable performance of antibiotic assay media. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.60, n.6, p.1261-1265, 1977.
- 78 FRIEDMAN, S., KIRSHBAUM, A. The use of resistant organisms for the assay of antibiotic mixtures in preparations and body fluids. *Antibiot. Chemother.*, Washington, v.4, p. 1216-1221, 1954.
- 79 FUNK, W., DAMMANN, V., DONNEVERT, G. *Quality assurance in analytical chemistry*. New York: VCH. 1995. 238p.
- 80 FURMAN, W.B., DORSEY, J.G., SNYDER, L.R. Testes de sensibilidade do sistema para métodos oficiais de cromatografia líquida e gasosa: ajustes versus modificações. *Pharm. Technol.*, São Paulo, v.2, n.4, p.35-38, 1998.
- 81 GARFIELD, F.M. *Quality assurance principles for analytical laboratories*. Gaithersburg: AOAC International, 1997. p.64-94.
- 82 GAVIN, J.J. Analytical microbiology. II. diffusion methods. *Appl. Microbiol.*, Baltimore, v.5, p.25-33, 1957.
- 83 GAVIN, J.J. Analytical microbiology. III. Turbidimetric methods. *Appl. Microbiol.*, Baltimore, v.5, p.235-243, 1957.

- 84 GOODHART, F.W., McCOY, R.H., NINGER, F.C. New *in vitro* desintegration and dissolution test method for tablets and capsules. *J.Pharm. Sci.*, Washington, v.62, n.2, p.304-310, 1973.
- 85 GRIFFITHS, B.W., BRUNET, R., GREENBERG, L. Quantitative evaluation of 4-epi-anhydrotetracycline in commercial tetracycline products. *Can. J. Pharm. Sci.*, Toronto, v.5, n.4, p.101-103, 1970.
- 86 HANNULA, A.M., MARVOLA, M., RAJAMAKI, M. Evaluation of desintegration of hard gelatin capsules with static beacker method based on photograph. *Acta Pharm. Fenn.*, Helsinki, v.100, p.229-236, 1991.
- 87 HANSEN, S.H. Titration of tetracyclines in nonaqueous medium with perchloric acid. *Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed.*, Copenhagen, v.1, n.5, p.89-92, 1973.
- 88 HARDWIDGE, E.A., SARAPU, A.C., LAUGHLIN, W.C. Comparison of operacional characteristics of different dissolution testing systems. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.67, n.12, p.1732-1735, 1978.
- 89 HARRIS, D.A. Use of microorganisms as analytical tools. *Anal. Chem.*, Washington, v.27, p.1690-1694, 1955.
- 90 HARVEY, S.C.H. Antimicrobial drugs. In: *Remington's pharmaceutical sciences*. 18.ed. Easton: Mack, 1990. cap.62, p.1163-1241.
- 91 HASAN, T., COOPERMAN, B.S. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tetracycline derivatives using volatile mobile phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.321, n.2, p.462-466, 1985.
- 92 HAYES, W. The effect of agar depth in the plate method for the assay of penicillin. *J. Pathol. Bacteriol.*, Edinburgh, v.57, p.457-466, 1945.
- 93 HEATLEY, N.G. A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.*, London, v.38, p.61-65, 1948.
- 94 HEATLEY, N.G. Methods of penicillin assay: their purpose, scope and validity. Biological methods for penicillin assay. *Analyst*, London, v.73, p.244-250, 1948.

- 95 HENDLIN, D. Analytical microbiology. *Anal. Chem.*, Washington, v.31, n.6, p.971-974, 1959.
- 96 HERMANSSON, J., ANDERSSON, M. Reversed-phase ion-pair chromatography of tetracycline, tetracycline analogs, and their potential impurities. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.71, n.2, p.222-229, 1982.
- 97 HEYDEN, Y.V., BOURGEOIS, A., MASSART, D.L. Influence of the sequence of experiments in a ruggedness test when drift occurs. *Anal. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.347, p.369-384, 1997.
- 98 HEYDEN, Y.V., LUYPAERT, K., HARTMANN, C., MASSART, D.L., HOOGMARTENS, J., DeBEER, J. Ruggedness tests on the high-performance liquid chromatography assay of the United States Pharmacopeia XXII for tetracycline hydrochloride: a comparison of experimental designs and statical interpretations. *Anal. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.312, p.245-262, 1995.
- 99 HEYDEN, Y.V., MASSART, D.L., ZHU, Y., HOOGMARTENS, J., DeBEER, J. Ruggedness tests on the high performance liquid chromatography assay of the United States Pharmacopeia 23 for tetracycline HCl: comparison of different columns in an interlaboratory approach. *J. Pharm. Biom. Anal.*, Amsterdam, v.14, n.8/10, p.1313-1326, 1996.
- 100 HEWITT, N. *Microbiological assay*. Orlando: Academic Press, 1977. p.17-68, 136-150, 214-242.
- 101 HIRSCH, A. The assay of the antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.4, p.70-86, 1959.
- 102 HOBBY, G.L., MEYER, K., CHAFFE, E. Activity of penicillin *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, v.50, n.2, p.277-280, 1942.
- 103 HOENER, B.A., SOKOLOSKI, T.D., MITSCHER, L.A., MALSPEIS, L. Kinetics of dehydration of tetracycline in solution. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.73, n.12, p.1901-1904, 1974.

- 104 HOU, W., WANG, E. Liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics at an electro chemically pre-treated glassy carbon electrode. *Analyst.*, London, v.114, p.699-702, 1989.
- 105 HUMPHREY, J.H., LIGHTBOWN, J.W. A general theory for plate assay of antibiotics with same practical applications. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.7, n.1-2, p.129-143, 1952.
- 106 INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 3.ed. Geneve: World Health Organization, 1979. v.1, p.145-151.
- 107 INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 3.ed. Geneve: World Health Organization, 1981. v.2, p.266-271.
- 108 INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 3.ed. Geneve: World Health Organization, 1988. v.2, p.107-109, 234-237, v.3, p.145-151.
- 109 INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 3.ed. Geneve: World Health Organization, 1994. p. 1747-1754
- 110 IVERSEN, B., AANESRUD, A., KOLSTAD, A.K. Determination of oxytetracycline in plasma from rainbow trout using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.493, n.1, p.217-221, 1989.
- 111 IWAKI, K., OKUMURA, N., YAMAZAKI, M. Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.623, n.1, p.153-158, 1992.
- 112 IWAKI, K., OKUMURA, N., YAMAZAKI, M. Rapid determination of tetracycline antibiotics in serum by reversed phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.619, n.2, p.315-323, 1993.
- 113 JAPANESE Pharmacopoeia. 13.ed. Tokyo: The Society of Japanese Pharmacopoeia, 1996. pt.1, p.355, 658-659, 1071-1074.

- 114 JEHL, F., GALLION, C., MONTEIL, H. High-performance chromatography of antibiotics. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.531, p.509-548, 1990.
- 115 JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. Part III. Ruggedness, Re-validation, and system suitability. *Instrum. Sci. Technol.*, Monticello, v.26, n.1, p.19-35, 1998.
- 116 JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practice and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters. *Instrum. Sci. Technol.*, Monticello, v.26, n.2, p.1-18, 1998.
- 117 JOHNSON, T., FORBES, B.A., O'CONNOR-SCARLET, M., MACHINSKI, A., McLATHEY, K.D. Rapid method of determinations utilizing tetrazolium reduction. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, v.83, n.1-3, p.374-378, 1985.
- 118 JOSLYN, D.A. Penicillin assay. Outline of four-hour turbidimetric method. *Science*, Washington, v.99, p.21-22, 1944.
- 119 JOSLYN, D.A., GALBRAITH, M. A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.59, n.711-716, 1950.
- 120 KABAY, A. Rapid quantitative microbiological assay of antibiotic and chemical preservative of a nonantibiotic nature. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.22, n.5, p. 752-755, 1971
- 121 KAVANAGH, F., Automated system for analytical microbiology. V. Calibration lines for antibiotics. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.64, n.5, p.844-850, 1975.
- 122 KAVANAGH, F., RAGHEB, H. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: considerations for assuring accuracy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.62, n.4, p.943-950, 1979.
- 123 KAZEMIFARD, A.G., MOORE, D.E. Evaluation of amperometric detection for the liquid chromatographic determination antibiotics and their

- common contaminants in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biom. Anal.*, Amsterdam, v.16, n.4, p.689-696, 1997.
- 124 KHAN, N.H., ROETS, E., HOOGMARTENS, J., VANDERHAEGHE, H. Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.405, p.229-245, 1987.
- 125 KNOX, J.H., JURAND, J. Mechanism of reversed-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.186, p.763-782, 1979.
- 126 KNOX, J.H., JURAND, J. Separation of tetracyclines by high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.110, p.103-115, 1975.
- 127 KONDO, F., ROSTAMIBASHIMAN, M. An improved method for detection of aminoglycoside antibiotics by microbiological screening. *Myazaki Daigaku Nogakoku Kenku Hokoku*, Myazaki, v.36, n.1, p.77-83, 1989.
- 128 LANMAN, R.C., LUDDEN, T.M., SCHANKER, L.S. Tetracycline degradation products in commercially available tetracycline-7-³H. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.62, n.9, p.1461-1463, 1973.
- 129 LeDUC, B.W., GREENBLETT, D.J., FRIEDMAN, H. Automated high-performance liquid chromatographic analysis of tetracycline in urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.490, p.474-477, 1989.
- 130 LEE, S.W., FOLEY, E.J., WALLACE Jr, J.H. Improvement in the turbidimetric assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.152, p.485-486, 1944.
- 131 LEENHEER, A.P., NELIS, H.J.C.F. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of doxycycline. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.140, n.3, p.293-299, 1977.
- 132 LEES, K.A., TOOTILL, J.P.R. Microbiological assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.152, p.485-486, 1944.

- 133 Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, *Diário Oficial*, Brasília, 24 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância que ficam sujeitos os medicamentos, os fármacos, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos e dá outras providências.
- 134 Lei nº 9.670, de 02 de julho de 1998, *Diário Oficial*, Brasília, 03 de julho de 1998. Dispõe sobre alteração do dispositivo do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo crimes hediondos contra a Saúde Pública, e dá outras providências.
- 135 Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999, *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização dos nomes genéricos em produtos farmacêuticos e de outras providências.
- 136 LIN, S.L., MENIG, J., SWARTZ, C.J. Comparative evaluation of various dissolution apparatus for capsule dosage forms. *J.Pharm. Sci.*, Washington, v.59, n.7, p.989-994, 1970.
- 137 LINDAUER, R.F., COHEN, D.M., MUNNELLY, K.P. Determinations of anhydrotetracycline in tetracycline by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v.48, n.2, p.1731-1734, 1978.
- 138 LINDSAY, S. High performance liquid chromatography. 2.ed., Chichester: John Wiley, 1992. 337p.
- 139 LODI, L., MEINARDI, G., ROSSI, E. Chromatographic methods for the determination of tetracycline by products. *Farmaco, Ed. Prat.*, Pavia, v.24, n.12, p.759-765, 1969.
- 140 LOO, Y.H., SKELL, P.S., THORNBERRY, H.H., EHRLICH, J., MCGUIRE, J.M., SAVAGE, G.M., SYLVETER, J.C. Assay of streptomycin by paper disc plate method. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.50, p. 701-709, 1945.

- 141 LOY, H.W., WRIGHT, W.W. Microbiological assay of amino acids, vitamins and antibiotics. Application of tube methods. *Anal. Chem.*, Washington, v.31, n.6, p.971-974, 1959.
- 142 LUNN, G., SCHUFF, N. *HPLC for pharmaceutical analysis*. New York: John Wiley. 1997. p.1321-1335.
- 143 MALMBORG, A.S. Bioavailability of doxycycline monohydrate. *Chemother.*, Basel, v.30, p.76-80, 1984.
- 144 MARTINDALE. *The extra pharmacopeia*. 23.ed. London: Pharmaceutical Press, 1993. p.224-225, 259-260, 285-289.
- 145 MATOS, J.C., GOMES, S.O., LOUREIRO, R.D. Estudo comparativo da cinética de dissolução de doxiciclina em cápsulas. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v.40, n.3/4, p.32-41, 1990.
- 146 MAY, J.R., VOUREKA, A.E., FLEMING, A. Some problems in the titration of streptomycin. *Br. Med. J.*, London, v.1, p.627-630, 1947.
- 147 McMAHAN, J.R. A new automated system for microbiological assays. *Ann. New York Acad. Sci.*, New York, v.130, p.680-685, 1965.
- 148 McMAHAN, J.R. An improved short time turbidimetric assay penicillin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.153, p.249-258, 1944.
- 149 MERCK Index. 12.ed. Whitehouse Station: Merck., 1996. p.3496, 7111, 9338.
- 150 MEYER, V.R. *Practical high-performance liquid chromatograph*. 2.ed. West Sussex: John Wiley, 1994. p.17-169, 243-279.
- 151 MIYAZAKI, S., ENDO, H., NADAI, T., ARITA, T., NAKANO, M. Effect of formulation additives on the dissolution behavior of tetracycline antibiotics. *Chem. Pharm. Bull.*, Tóquio, v.25, n.6, p.1186-1193, 1977.

- 152 MUHAMMAD, N., BODNAR, J.A. Separation and quantitation of chlortetracycline, 4-epitetracycline, 4-epianhydrotetracycline, and anhydrotetracycline in tetracycline by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.69, n.8, p.928-930, 1980.
- 153 MURTHY, K.S., GHEBRE-SELLASSIE, I. Current perspectives on the dissolution stability of solid oral dosage forms. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.82, n.2, p.113-126, 1993.
- 154 NASH, R.A. Process validation: a 17-year retrospective of solid-dosage forms. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.22, n.1, p.25-34, 1996.
- 155 NEWTON, J.M., RAZZO, F.N. The *in vitro* bioavailability of various drugs formulated as hard gelatin capsules. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.29, n.4, p.205-208, 1977.
- 156 OKA, H., IKAI, Y., KAWAMURA, N., UNO, K., YAMADA, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. X. Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.393, n.2, p.285-296, 1987.
- 157 OKA, H., UNO, K. Improvement of chemical analysis of antibiotics. V. A simple method for the analysis of tetracyclines using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.298, p.435-443, 1984.
- 158 OKA, H., SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. VII. Comparison of analytical methods for determination of impurities in tetracycline pharmaceutical preparations. *J. Chromatogr.* Amsterdam, n.314, p.303-311, 1984.
- 159 OZOL, T. Stability of doxycycline hyclate in hard gelatine capsules. *Acta. Pharm Turcica*, Istambul, v.26, n.3, p.41-45, 1984.

- 160 PENA, A., LINO, C.M., SILVEIRA, M.I.N. Tetraciclina: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v.47, n.4, p.149-153, 1997.
- 161 PERNAROWSKI, M., WOO, W., SEARL, R.O. Continuous flow apparatus for the determination of the dissolution characteristics of tablets and capsules. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.57, n.8, p.1419-1421, 1968.
- 162 PESEK, J.J., MATYSKA, M.T. Separation of tetracyclines by high-performance capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.736, n.1/2, p.313-320, 1996.
- 163 PHARMACOPEE Française. 8.ed. Paris: Codex Medicamentarius Gallicus, 1965. p.1207-1210, 1061-1619.
- 164 PHARMACOPEIA of United States of America. 15.ed. Easton: Mack, 1955. p.492-493, 738-739, 808, 848-861.
- 165 PHARMACOPEIA of United States of America. 16.ed. Easton: Mack, 1960. p. 748, 859-862, 864-868.
- 166 PLATT, T.B., GENTILE, J., GEORGE, M.J. An automated turbidimetric system for antibiotic assay. *Ann. New York Acad. Sci.*, New York, v.130, n.1, p.664-671, 1965.
- 167 Portaria nº 16, de 06 de março de 1995, *Diário Oficial*, Brasília, 06 de março de 1995, Dispõe sobre as Normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o roteiro para a inspeção na Indústria Farmacêutica.
- 168 Portaria nº 2.814, de 29 de maio de 1998, *Diário Oficial*, Brasília, 29 de maio de 1998. Dispõe sobre a apuração e punição na forma da lei, daqueles que praticarem a produção de medicamentos falsificados, adulterados e fraudados, que constitui infração de natureza sanitária, prevista na Lei nº 6.437/77

- 169 POSTI, J., SALONEN, M. A comparative study of USP XX *in vitro* dissolution methods, the basket and the paddle method. *Acta Pharm. Fenn.*, Helsinki, v.92, n.2, p.113-120, 1983.
- 170 PRATT, R., DUFRENOY, Y. Practical three-hour and two-hour cylinder plate assays for penicillin. *Nature*, London, v.159, n.4043, p.576-578, 1947.
- 171 RAGHEB, B.S. Effect of volume of solution per cylinder on estimation of antibiotic potency in diffusion assay. *J. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.71, n.5, p. 1071-1074, 1988
- 172 RAMMELKAMP, C.H. A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exudates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, v.51, n.1, p.95-97, 1942.
- 173 RAPER, K.B., ALEXANDER, D.F., COGHILL, R.D. Penicillin. II. Natural variation and penicillin production in *Penicillin notatum* and allied species. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.48, p.639-659, 1944.
- 174 RAKE, G., JONES, H. A rapid method for estimation of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, v.54, p.189-190, 1943.
- 175 RAKE, G., MACKEE, C.M., JONES, H. A rapid test for the activity of certain antibiotic substances. *Proc. Soc. Exp. Med.*, New York, v.51, n.2, p.273-274, 1942.
- 176 RAY, A., HARRIS, R. High performance chromatography as an alternative to microbiological measurements in the assay of tetracyclines. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.67, n.2, p.430-435, 1989.
- 177 REES, J.E. *In vitro* dissolution tests for solid oral dosage forms. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v.166, p. 499-505, 1977.
- 178 REEVES, M.D., SCHIMIDT, W.H. Penicillin. IV. A device for placing cylinders on assay plates. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.49, n.4, p.395-400, 1945.

- 179 REEUWIJK, H.J.E.M., TJADEN, U.R. High-performance liquid chromatography of tetracyclines. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.353, p.339-350, 1986.
- 180 Regulamentação nº 391, de 10 de Agosto de 1999, Diário Oficial da União, Brasília, aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos.
- 181 REID, R.D., BREWER, J.H. The reductase method for the determination of penicillin concentrations in body fluids. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.52, p.251-254, 1946.
- 182 REMMERS, E.G., SIEGER, G.M., DOERSCHUK, A.P. Some observations on the kinetics of the C₄ epimerization of tetracycline. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.52, p.752-756, 1963.
- 183 RIDGWAY, K. *Hard capsules development and technology*. London: Pharmaceutical Press, 1987. 309p.
- 184 RIPPERE, R.A. Some principles of microbiological turbidimetric assays of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.62, n.4, p.951-956, 1979.
- 185 SAMYN, J.C., JUNG, W.Y. *In vitro* dissolution from several experimental capsula formulations. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.59, n.2, p.169-175, 1970.
- 186 SANDELL, E., ERIKSON, K., MELLSTRÖM, G. A desintegration test for evaluation of drug availability from tablets and capsules. *Acta Pharm. Suec.*, Stockholm, v.7, p.559-556, 1970.
- 187 SCHAFFER, V.U., OELSCHLAGER, H., STRICKER, H. Haltbarkeit von tetracyclin hydrochlorid - Kapseln. *Pharm. Ind.*, Aulendorf, v.50, n.5, p.588-593, 1988.
- 188 SCHIMIDT, W.H., MOYER, A.J. Penicillin. I. Methods of assay. *J. Bacteriol.*, Washington, v.47, n.2, p.199-208, 1944.

- 189 SHERWOOD, M.B., FALCO, E.A., DeBEER, E.J. A rapid, quantitative method for determination of penicillin. *Science*, Washington, v.99, n.2569, p.247-248, 1944.
- 190 SIMPSON, D.L., KOBOS, R.K. Microbiological assay of antibiotics based on inhibition of ammonia production monitored with an ammonia electrode. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.164, p.273-277, 1984.
- 191 SIMPSON, D.L., KOBOS, R.K. Microbiological assay of tetracycline with a potentiometric CO₂ gas sensor. *Anal. Letters.*, New York, v.15, n.316, p.1345-1359, 1982.
- 192 SNELL, N.S., LEWIS, J.C. Errors caused by stainless-steel cylinders in plate bioassays. *Antibiot. Chemother.*, Washington, v.9, n.10, p.609-612, 1959.
- 193 SOKOLOSKI, T.D., MITSCHER, L.A., YUEN, P.H., JUVARKAR, J.V., HOENER, B. Rate and proposed mechanism of anhydro-tetracycline epimerization in acid solution. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.66, n.8, p.1159-1165, 1977.
- 194 STEINBACH, D., STRITTMATTER, T. Untersuchungen zum gehalt und auf zersetzungsprodukte bei tetracyclin-handelspräparaten. *Pharm. Ztg.*, Frankfurt, v.123, n.25, p.1083-1087, 1978.
- 195 THOMAS, N., THOMPSON, C.W. Investigation into the problem of assaying mixed antibiotics. *Anal. Proc.*, London, v.27, n.7, p.176-178, 1990.
- 196 TSUJI, K., ROBERTSON, J.H., BEYER, W.H. High pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines. *Anal. Chem.*, Washington, v.46, n.4, p.539-543, 1974.
- 197 TSUJI, K., ROBERTSON, J.H. Analysis of tetracycline in pharmaceutical preparations by improved high-performance liquid chromatographic method. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.65, n.3, p.400-404, 1976.

- 198 TSUJI, K., ROBERTSON, J.H., BEYER, W.F. High-pressure chromatographic determination of tetracyclines. *Anal. Chem.*, Washington, v.48, n.4, p.539-543, 1974.
- 199 UENO, R., UNO, K., AOKI, T. Determination of oxytetracycline on blood serum by high performance liquid chromatograph with direct injection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.573, p.333-335, 1992.
- 200 UNER, J.E.K., SANDE, M.A, CHAMBES, H.F. Antimicrobial agents. Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In: GOODMAN & GILMAN: *The pharmacological basis of therapeutics*. 9 ed. New York: McGraw-Hill, 1995. cap.47. p.1123-1153.
- 201 UNITED States of Pharmacopoeia. 17.ed. Easton: Mack, 1965. p.710-711, 786, 832-840.
- 202 UNITED States of Pharmacopoeia. 18.ed. Easton: Mack, 1970. p.468, 722-723, 857-864.
- 203 UNITED States of Pharmacopoeia. 19.ed. Rockville, 1975. p.162, 355-356, 498, 650-651, 699.
- 204 UNITED States of Pharmacopoeia. 20.ed. Rockville, 1980. p.267, 781-782, 578, 882-888.
- 205 UNITED States of Pharmacopoeia. 21.ed. Rockville, 1985. p.360, 772, 1035, 1039, 1160-1165.
- 206 UNITED States of Pharmacopoeia. 22.ed. Rockville, 1990. p.1488-1493.
- 207 UNITED States of Pharmacopoeia. 23.ed. Rockville, 1995. suppl.2, p.2682, suppl.3, p.115.
- 208 UNITED States of Pharmacopoeia. 23.ed. Rockville, 1995. p.559, 1510-1511, 1690-1696.

- 209 VALENTINE, F.C.O., JOHN, R.G.S. A suggested method for the titration of certain antibiotics. *Lancet*, London, v.257, p.1033-1034, 1949.
- 210 VANCAILLIE, R., DIHUIDI, K., ROETS, E., HOOGMARTENS, J., VANDERHAEGHE, H. Determination by high performance liquid chromatography of the stability of alcoholic solutions for topical use containing tetracycline and 4-epitetracycline. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v.40, n.3, p.168-172, 1985.
- 211 VEJ-HANSEN, B., BUNDGAARD, H. Kinetic study factors affecting the stability of tetracycline in aqueous solution. *Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed.*, Copenhagen, v.6, n.6, p.201-214, 1978.
- 212 VIENNEAU, D.S., KINDBERG, C.G. Development and validation of a sensitive method for tetracycline in gingival crevicular fluid by HPLC using fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v.16, n.1, p.111-117, 1997.
- 213 VINCENT, J.G., VINCENT, H.W. Filter paper disc modification of Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, v.55, n.1, p.162-164, 1944.
- 214 VIOLA, L., VIANELLO, S., CAVATORTA, L. L'automazione nelle analisi microbiologiche: dosaggio di tetracicline con il *B. cereus* e di vitamina B₁₂ con il *L. leichmannii*. *Farmaco, Ed. Prat.*, Pavia, v.25, n.5, p.315-331, 1970.
- 215 WILLIG, S.H., STOKER, J.R. *Good manufacturing practices for pharmaceuticals: a plan for total quality control*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, p.77-117, 123-147, 1992.
- 216 WINTERMERE, D.M., EISENBERG, W.H., KIRSHIBAUM, A. Turbidimetric assay of tetracycline, chloranfenicol, neomycin and polymixin using a single test organism. *Antibiot. Chemother.*, London, v.7, n.4, p.189-192, 1957.

- 217 WITHEY, R.J., MAINVILLE, C.A. A critical analysis of a capsule dissolution test., *Anal. Chem.*, Washington, v.58, n.9, p.1120-1126, 1969.
- 218 YAMAMOTO, C.H., PINTO, T.J.A. Rapid determination of neomycin by a microbiological agar diffusion assay using triphenyltetrazolium chloride. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern.*, Arlington, v.79, n.2, p.434-440, 1996.
- 219 YUEN, P.H., SOKOLOSKI, T.D. Kinetics of concomitant degradation of tetracycline to epitetracycline, anhydrotetracycline, and epianhydrotetracycline in acid phosphate solution. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.66, n.11, p.1648-1650, 1977.

RESUMO

RESUMO

As tetraciclinas são encontradas no mercado sob várias formas farmacêuticas, sendo provenientes de diversos laboratórios farmacêuticos. Com o objetivo de avaliar a qualidade destes medicamentos, foram realizados os ensaios de dissolução *in vitro* e determinação quantitativa. Um total de 38 amostras de cápsulas de cloridrato de tetraciclina, fosfato de tetraciclina e cloridrato de oxitetraciclina e drágea de cloridrato de doxiciclina, englobando 12 fabricantes, foram analisadas. A dissolução do princípio ativo foi determinada para todas as amostras, conforme o método recomendado pela USP XXIII. Das amostras, duas foram reprovadas e outras quatro foram aprovadas após o reteste. A variação dos valores individuais obtidos no ensaio de dissolução para cada amostra, foi significativa, apresentando coeficiente de variação de até 14,2 %. A determinação quantitativa através do método microbiológico turbidimétrico empregando *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, resultou em duas amostras de um mesmo fabricante com potência muito abaixo do limite especificado de 90 a 125 % do valor rotulado, com 55,5 e 68,7 %. Estudo comparativo desta metodologia com o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizado. Para isto, o método da USP XXIII foi escolhida após o ensaio preliminar, seguido de determinação dos parâmetros de validação e adequação do método. O sistema cromatográfico estabelecido consistiu de coluna de fase reversa SYMMETRY™ C₈ e fase móvel composta de oxalato de amônio 0,09 M, dimetilformamida e fosfato dibásico de amônio 0,18 M (64:32:4,7) com pH entre 7,6 e 7,7. Os resultados para determinação de cloridrato de tetraciclina confirmaram os valores obtidos no ensaio microbiológico, sendo reprovadas duas amostras. O teor máximo encontrado de 4-epianidrotetraciclina foi de 0,5 %, abaixo do limite de 3 % especificado na USP XXIII. Na comparação entre os dois métodos, foram observados resultados sempre superiores para o método microbiológico. A análise estatística destes resultados mostrou diferença significativa entre as médias das determinações obtidas a partir de cada método.

SUMMARY

SUMMARY

Aspects of the quality of tetracycline in solid pharmaceutical formulations.

Correlation between HPLC and microbiological methods

Tetracyclines are available under several pharmaceutical forms and manufactured by different laboratories. Aiming at the evaluation of the quality of these medicines, assays of *in vitro* dissolution and quantitative determination have been performed in 38 samples of tetracycline hydrochloride and phosphate and oxytetracycline hydrochloride capsules and docycycline hydrochloride coated tablet taken from 12 manufactures. The range of dissolution of the substance was determined in all the samples, according to the method recommended by USP XXIII. On the whole, only two of samples were rejected and all the others approved without restrictions, except four of them, which required a retest. The evaluation of the individual values obtained in the assay of dissolution in each sample was significant, with a variation coefficient of up to 14.2%. The quantitative determination through the turbidimetric microbiological method employing *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, resulted in two samples of tetracycline hydrochloride from the same manufactures with potency of 55.5 % and 68.7 % below the specified limit from 90 % to 125 % the labeled value. A comparative study of this method and the HPLC one was then performed. The USP XXIII method was chosen after a preliminary assay, followed by the determination of its validation parameters and system suitability. The established chromatographic method employed reversed phase column SYMMETRY™ C₈ (octylsilane chemically bounded to totally porous silica particles) and mobile phase consisting of ammonium oxalate 0.09 M, dimethylformamide and dibasic ammonium phosphate 0.18 M (63.9:32:4.7) adjusted to pH 7.6-7.7. The results confirmed the values obtained in the microbiological assay. When this method (HPLC) was used for the determination of 4-epianidrotetracycline, a maximum of 0.5 % was found, below the limit of 3% specified in the USP XXIII. The comparison between both methods revealed constant superior results in the microbiological one, and the difference between the averages of the determinations from the methods was meaningful.