

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
DOXICICLINA EM PLASMA CANINO: DESENVOLVIMENTO,
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO EM ESTUDOS
FARMACOCINÉTICOS**

Isabela de Paula Lima

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
DOXICICLINA EM PLASMA CANINO: DESENVOLVIMENTO,
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO EM ESTUDOS
FARMACOCINÉTICOS**

ISABELA DE PAULA LIMA

Sob a Orientação da Professora
Yara Peluso Cid

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ
Julho, 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732m Lima, Isabela de Paula, 1989-
MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
DOXICICLINA EM PLASMA CANINO: DESENVOLVIMENTO,
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO EM ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS /
Isabela de Paula Lima. - 2018.
105 f.: il.

Orientadora: Yara Peluso Cid.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
2018.

1. Doxíciclina. 2. ELL/PBT. 3. formulação
palatável. 4. farmacocinética. I. Cid, Yara Peluso,
1982-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ISABELA DE PAULA LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em
Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química.

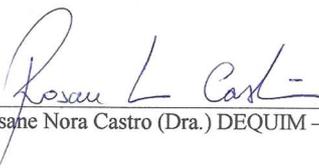
DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 18 / 07 / 2018



Yara Peluso Cid (Dra.) DCFAR-UFRRJ
(Orientadora)



Laís Bastos da Fonseca (Dra.) VPPIS – FIOCRUZ



Rosane Nora Castro (Dra.) DEQUIM – UFRRJ

*Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que
utilizam a educação para transformar vidas.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado força e condições de concluir esse trabalho. Agradeço a Ele, também, por ter colocado pessoas incríveis no meu caminho, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Vicente e Suzana, e meu irmão, Pedro, vocês são os meus maiores incentivadores, minha motivação e meu porto seguro. Obrigada pelo amor incondicional, por me apoiarem e me encorajarem sempre. Amo vocês!

Aos meus tios e tias, primos e primas, principalmente a Camila, Renata e tia Vera. Muito obrigada por acreditarem em mim e sempre me incentivarem

Ao meu namorado, Luciano Nardi, por todo apoio e incentivo. Obrigada pelo carinho, pelo cuidado, companheirismo, por se mostrar disposto a me ajudar, pelas horas dedicadas aos programas estatísticos e pesquisas no google, e principalmente obrigada por cada abraço e cada palavra positiva. Muito obrigada, você foi parte fundamental dessa minha trajetória.

Aos grandes amigos Pedro, Gabi e Esther que estão ao meu lado em todos momentos. Obrigada pela amizade, sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada por tudo!

Aos queridos, Fernanda Ferreira, Carolina Oliveira, Helen Andrade, Jéssica Marques, Ingrid Santarém, Durval Mariano, Flavinha de Oliveira, Aline Dantas, Aline Melo de Souza, Eduardo Lamps.

À equipe da Farmacométrie: Aline, Byanca, Fernanda, Isabela, João, Leandra, Liliane, Thais Moura e Melina pela ajuda e apoio diários.

À Gabriela Martins, pelo apoio nas horas de estudo e durante os experimentos.

À Thais por sua amizade e apoio incondicional. Obrigada pelas conversas, risadas, ajuda científica, profissional e pessoal.

À Viviane pelas sugestões e orientações.

Ao setor experimental do LQEPV, principalmente a Priscila, Débora, Gabriela Almeida, Jaime. Obrigada por toda dedicação, auxílio e ideias para melhoria deste trabalho.

Ao setor de análises clínicas, em especial a Mariana Revoredo pela realização dos ensaios bioquímicos e hematológicos.

Ao setor administrativo, em especial a Jéssica Lobato.

À professora Thais Ribeiro Correia Azevedo, obrigada por todas as dicas e por sua ajuda.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Yara por me acolher desde a graduação, pelos conselhos profissionais e também pessoais, por todo carinho e cuidado. Muito obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava e por toda paciência para minhas dúvidas e até minha teimosia. Te admiro muito! Mais uma vez obrigada!

Ao professor Fábio Barbour Scott pelo incentivo e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que você sabe.”

Aldous Huxley

RESUMO

LIMA, Isabela de Paula. **Método bioanalítico para quantificação de Doxíciclina em plasma canino: desenvolvimento, validação e aplicação em estudos farmacocinéticos.** 2018. 88p Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A doxíciclina é um agente antimicrobiano da família das tetraciclina que atua na inibição da síntese de proteínas bacterianas ligando-se, principalmente, às subunidades 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o acesso do aminoacetil – tRNA ao sítio receptor no complexo mRNA – ribossomo. É utilizada tanto na medicina humana quanto na veterinária. Em cães, frequentemente, é a escolha para o tratamento da Erliquiose canina. Atualmente as formas farmacêuticas existentes para doxíciclina disponíveis no mercado veterinário são comprimidos e suspensões. É uma classe bastante estudada, na literatura são encontrados com facilidade artigos que descrevem os métodos de análise para determinação dos componentes desta classe em plasma humano, entretanto em plasma canino os métodos descritos por CLAE-UV são escassos, sendo mais utilizados os métodos microbiológicos. Neste trabalho, um método foi desenvolvido e validado para a determinação da doxíciclina em plasma canino. As amostras foram submetidas a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT) seguida de separação por cromatografia líquida de fase reversa (CL-FR), usando como fase móvel acetonitrila/água com pH ajustado para 2,5 com ácido oxálico (20:80 v/v), o fluxo em modo isocrático com gradiente de fluxo entre 0,8-1,0 mL/min, com detecção ultravioleta (UV) a 357 nm. A oxitetraciclina foi utilizada como padrão interno (PI). A validação do método comprovou seletividade, sensibilidade, ausência de efeitos matriciais e residuais e, ainda estabilidade. A linearidade do método foi estabelecida na faixa de 0,5-10 µg/mL ($r > 0,99$), com limite inferior de quantificação (LIQ) em 0,5 µg/mL. Precisão intra e inter-dia apresentou valores de CV inferiores a 20 % para o LIQ e 15 % para as demais amostras de controle de qualidade e os valores de exatidão intra e inter-dia, expressos em EPR, apresentaram-se na faixa de ± 20 % para o LIQ e ± 15 % para as demais amostras de controle de qualidade. O método foi totalmente validado, atendendo a todos os parâmetros da legislação da ANVISA. A metodologia foi aplicada para análise de farmacocinética comparativa de doxíciclina administrada pela via oral a partir de duas formas farmacêuticas sólidas: comprimido mastigável e comprimido revestido (Doxifin), na dose de 100 mg. Ambas formulações são de uso veterinário, o comprimido mastigável foi desenvolvido previamente pelo Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) e o comprimido revestido foi adquirido em loja de artigos animais. A administração dessas formulações atingiram, respectivamente, a circulação sanguínea ($C_{max} = 1,11$ e $1,16$ µg/mL), sendo absorvida (t_{max} de 240 e 195 minutos) e eliminada ($t_{1/2} = 1106,24 \pm 130,41$ e $1685,919 \pm 726,44$ minutos) rapidamente. A similaridade nos perfis plasmáticos das duas formulações testadas foi observada e a bioequivalência foi confirmada por testes estatísticos.

Palavras chave: Doxíciclina, ELL/PBT, formulação palatável, farmacocinética.

ABSTRACT

LIMA, Isabela de Paula. **Bioanalytical method for quantification of Doxycycline in canine plasma: development, validation and application in pharmacokinetic studies.** 2018. 88p Dissertation (Master in Chemistry). Institute of Chemistry, Graduate Program in Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Doxycycline is an antimicrobial agent from the tetracycline family that acts inhibiting the synthesis of bacterial proteins by binding, principally, to the 30S subunits of bacterial ribosomes, preventing the access of the aminoacyl-tRNA to the receptor site in the mRNA-ribosome complex. It is often the choice for the treatment of canine Ehrlichiosis. Currently, doxycycline is available in the veterinary market under the pharmaceutical forms: tablet and suspension. It is a class well studied, in the literature are easily found articles describing the methods of analysis for determination of the components of this class in human plasma, however, in canine plasma the methods described by HPLC-UV are scarce, having microbiological methods being more used. In this work, a method was developed and validated for the determination of doxycycline in canine plasma. The samples were submitted to liquid-liquid extraction with low temperature partitioning (LLE/LTP) followed by separation by reverse phase liquid chromatography (RP-LC), using as the mobile phase acetonitrile / water adjusted to 2.5 with oxalic acid (80:20 v/v), the gradient flow between 0.8-1.0 mL/min, with ultraviolet (UV) detection at 357 nm. Oxytetracycline was used as internal standard (IS). The validation of the method showed selectivity, sensitivity, absence of matrix and residual effects, and stability. The linearity of the method was established in the range of 0.5-10 µg/mL ($r > 0.99$), with lower limit of quantification (LLOQ) in 0.5 µg/mL. Intra- and inter-day accuracy presented CV values of less than 20% for LLOQ and 15% for other quality control samples and intra and inter-day accuracy values expressed in RSE, presented in the range of $\pm 20\%$ for LLOQ and $\pm 15\%$ for the other quality control samples. The method was fully validated, taking into account all the parameters of ANVISA's legislation. The methodology was applied for analysis of comparative pharmacokinetics of doxycycline administered orally from two solid dosage forms: chewable tablet and commercial tablet (Doxifin[®]), dose of 100 mg. Both formulations are for veterinary use, the chewable tablet was previously developed by the Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) and the commercial tablet was purchased from an animal store. Administration of these formulations reached, respectively, blood circulation ($C_{max} = 1.11$ and 1.16 µg/mL), being absorbed (t_{max} of 240 and 195 minutes) and eliminated ($t_{1/2} = 1106.24 \pm 130.41$ and 1685.919 ± 726.44 minutes) rapidly. The similarity in the plasma profiles of the two formulations tested was observed and bioequivalence was confirmed by statistical tests.

Keywords: Doxycycline, LLE/LTP, palatable formulation, pharmacokinetics.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – Association of analytical communities
ASC – Área sob a curva
C₁₈ – Sílica modificada com hidrocarboneto octadecil
C_F – Concentração final
CL– Cromatografia líquida
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-FL– Cromatografia Líquida acoplada ao detector de fluorescência
CL-MS – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à massas sequencial
CL-UV – Cromatografia Líquida acoplada ao detector ultravioleta
C_{max}– Pico de concentração máxima
CME – Concentração média experimental
CQA – Controle de qualidade de alta concentração
CQB – Controle de qualidade de baixa concentração
CQD – Controle de qualidade de diluição
CQM – Controle de qualidade de média concentração
DMFS – Dispersão de matriz em fase sólida
DOX – Doxíciclina
DP – Desvio padrão
DPR – Desvio Padrão Relativo
FDA – Food and Drug Administration
EFS – Extração em Fase Sólida
ELL – Extração Líquido-líquido
ELL/PBT – Extração Líquido-líquido com Partição em Baixa Temperatura
FE – Fase Estacionária
FM – Fase Móvel
FMN – Fator matriz normalizada
LIQ – Limite inferior de quantificação
LOG P – Coeficiente de partição
LQEPV – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
LSQ – Limite superior de quantificação
MeOH– Metanol
MLLD – Microextração líquido-líquido dispersiva
OTC – Oxitetraciclina
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PI – Padrão Interno
pKa – Constante de acidez
PP – Precipitação de proteínas
RA – Razão entre a área de doxíciclina e a área do padrão interno (A_{DOX}/A_{pi})
RDC – Resolução de diretoria colegiada
RLP – Regressão linear ponderada
RPM – Rotações por minuto
SE_{DOX}– Solução estoque de doxíciclina
SE_{OTC} – Solução estoque de oxitetraciclina
ST_{DOX} – Solução de trabalho de doxíciclina
ST_{OTC} – Solução de trabalho de oxitetraciclina

$t_{1/2}$ – Meia-vida de eliminação

t_{max} – Tempo correspondente ao pico plasmático

UFRRJ– Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

USP – Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*)

UV-VIS – Radiação Ultravioleta-Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da Doxiciclina.....	2
Figura 2. Estrutura química da Doxiciclina e seus correspondentes pKa's.	3
Figura 3. Espécies da doxiciclina em diferentes pH's: (a) pH do meio abaixo do primeiro pKa (pH < 3,4), grupo dimetilamino protonado; (b) pH do meio entre o primeiro e segundo pKa 3,4 < pH < 7,7), abstração do hidrogênio mais ácido (grupo hidroxila no carbono C3); (c) pH do meio acima do terceiro pKa (pH > 9,7), abstração de todos hidrogênios ácidos.	4
Figura 4. Estrutura das principais tetraciclinas.....	5
Figura 5. Mecanismo de Síntese de Proteínas.	6
Figura 6. Mecanismo de ação das tetraciclinas.	6
Figura 7. Representação das proporções de tempo e erro analítico em análises.....	9
Figura 8. Ilustração de um cartucho usado em Extração em Fase Sólida (EFS).....	11
Figura 9. Principais etapas na extração em fase sólida (EFS).....	12
Figura 10. Formulação oral na forma de comprimido mastigável da Doxiciclina com dosagem de 100 mg/unidade.	30
Figura 11. Perfil de dissolução comprimido mastigável de Doxiciclina e comprimido referência de Doxiciclina (Doxifin®).....	36
Figura 12. Resultados de precisão e exatidão, expressos em EPR% e CV%, respectivamente, para o método de extração: Extração Líquido –Líquido, variando-se o tubo coletor, extração direta e seriada.	38
Figura 13. Resultados de exatidão e precisão, expressos em EPR% e CV%, respectivamente, para o método de extração: Extração Líquido –Líquido, variando-se o pH do meio extrator.	40
Figura 14. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração Líquido –Líquido com precipitação de proteína através da adição de ácidos.	42
Figura 15. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração Líquido –Líquido com partição em baixa temperatura.....	43
Figura 16. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração Líquido –Líquido com partição em baixa temperatura, variando-se a forma de concentração utilizando speedvac.	44
Figura 17. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração em Fase Sólida, cartucho com fase polimérica (OASIS).....	44
Figura 18. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração em Fase Sólida, cartucho com fase C18 (Supelco).....	45
Figura 19. Avaliação das condições cromatográficas iniciais para padrão interno (PI) e doxiciclina (DOX) a partir da injeção de uma amostra de controle de qualidade processada e uma amostra branco.....	47
Figura 20. Avaliação de interferentes no tempo de retenção (TR) do padrão interno (PI) a partir da injeção de uma amostra de controle de qualidade processada e uma amostra branco.....	48
Figura 21. Média das curva de calibração da solução padrão (Doxiciclina e Oxitetraciclina).	49
Figura 22. Seletividade do método para quantificação da Doxiciclina: cromatogramas de injeção (a) solução aquosa de doxiciclina (0,5 µg/mL) e padrão interno 1,0 (µg/mL), (b) amostra (plasma) de menor concentração do analito na curva de calibração (LIQ = 0,5 µg/mL), (c) amostra branco normal, (d) amostra branco hemolisada e (e) amostra branco lipêmica.	50
Figura 23. Efeito residual do método para quantificação de Doxiciclina: cromatogramas de injeção (a) amostra branco normal, (b) amostra de maior concentração do analito na curva de calibração (LSQ = 10 µg/mL) e (a') duas injeções subsequentes da amostra branco.....	51
Figura 24. Curva de concentração plasmática de Doxiciclina a partir de administração oral em dose única de comprimidos e comprimidos mastigáveis de doxiciclina em cães.	59

Figura 25. Curva de concentração plasmática de Doxiciclina a partir de administração oral em dose única de comprimidos e comprimidos mastigáveis de doxiciclina em cães com/sem o uso associado de suplemento vitamínico.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da Doxiciclina	2
Tabela 2. Teste de palatabilidade realizado com três grupos de animais (com seis animais cada) para três formulações distintas: comprimido placebo (F1), comprimido com DOX e mascarante de sabor (F2) e comprimido com DOX (F3) durante quatro dias consecutivos.....	20
Tabela 3. Preparo das amostras para avaliação efeito matriz.	25
Tabela 4. Preparo de amostras para curva analítica, precisão e exatidão.	25
Tabela 5. Preparo das amostras para avaliação da estabilidade.....	25
Tabela 6. Esquema de tratamento dos animais do estudo.	29
Tabela 7. Classificação das formulações de acordo com numeração de 1 a 6 (Score) que define o nível de palatabilidade e as observações estabelecidas para cada numeração.	31
Tabela 8. Avaliação das três formulações propostas no teste de palatabilidade de acordo com numeração de 1 a 6 (Score segundo nível de palatabilidade).....	31
Tabela 9. Número de indivíduos por Score e porcentagem de aceitação e rejeição para cada umas das três formulações.	32
Tabela 10. Determinação de peso de comprimidos mastigáveis de Doxiciclina.....	34
Tabela 11. Uniformidade de doses unitárias de comprimidos mastigáveis de doxiciclina.	35
Tabela 12. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os diferentes tipos de tubo coletor e tipo de extração.	39
Tabela 13. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os diferentes valores de pH da solução tampão acetato.	41
Tabela 14. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os valores de da análise sem alteração de pH e com alteração de pH, para pH 3,0 com solução tampão.	41
Tabela 15. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os diferentes valores obtidos para fase polimérica e C18.	45
Tabela 16. Porcentagem em relação a área da amostra de menor concentração na curva de calibração na matriz (LIQ) para doxiciclina e em relação a área do padrão interno de interferentes no tempo de retenção de cada um dos analitos.....	51
Tabela 17. Coeficientes de Variação dos fatores de matriz normalizados (FMN's) relativos as amostras de controle de qualidade de baixa concentração e alta concentração (CQB e CQA, respectivamente).	52
Tabela 18. Avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos para a curva de calibração dos três dias conforme teste F de Snecodor.....	54
Tabela 19. Resultados de precisão e exatidão intra-dia e inter-dias em três dias de análise...	55
Tabela 20. Estabilidade de doxiciclina em plasma canino – análise inicial, pós-processamento, curta duração, ciclo de congelamento e descongelamento e longa duração.....	56
Tabela 21. Concentração de Doxiciclina encontrada em cada animal na primeira semana do estudo.....	57
Tabela 22. Concentração de Doxiciclina encontrada em cada animal na segunda semana do estudo.....	58
Tabela 23. Parâmetros Farmacocinéticos das formulações orais de doxiciclina, comprimido mastigável e comprimido na dose de 100 mg.....	60
Tabela 24. Teste de variância (ANOVA) para comparação dos parâmetros farmacocinéticos de concentração máxima média e área sob a curva média dos vinte animais para as formulações de comprimido mastigável e comprimido.	60

Tabela 25. Parâmetros Farmacocinéticos das formulações orais de doxiciclina, comprimido mastigável e comprimido na dose de 100 mg com e sem administração conjunta de suplemento vitamínico.	61
Tabela 26. Teste de variância (ANOVA) para comparação dos parâmetros farmacocinéticos de concentração máxima média e área sob a curva média dos animais para as formulações de comprimido mastigável e comprimido de acordo com as semanas de estudo.	62
Tabela 27. Teste de variância (ANOVA) para comparação dos parâmetros farmacocinéticos de concentração máxima média e área sob a curva média dos animais para as formulações administradas com e sem suplemento vitamínico (primeira e segunda de estudo, respectivamente).....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Doxiciclina	2
2.2 Formas farmacêuticas de uso veterinário para animais de companhia	7
2.3 Farmacocinética	7
2.4 Métodos bioanalíticos para matrizes complexas	8
2.5 Métodos de Extração	9
2.5.1 Extração líquido-líquido	10
2.5.2 Precipitação de proteínas	11
2.5.3 Extração em fase sólida.....	11
2.5.4 Extração líquido – líquido com partição em baixa temperatura.....	12
2.5 Técnica Analítica.....	13
2.6 Validação de metodologia bioanalítica	13
2.6.1 Seletividade.....	14
2.6.2 Efeito Residual.....	14
2.6.3 Efeito matriz	14
2.6.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	15
2.6.5 Linearidade e curva analítica	15
2.6.6 Precisão.....	16
2.6.7 Exatidão	16
2.6.8 Estabilidade.....	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Reagentes.....	18
3.1.2 Equipamentos e acessórios.....	18
3.2 Localização da experimentação.....	19
3.3 Preparo do comprimido mastigável de Doxiciclina	19
3.4 Teste de palatabilidade.....	19
3.4.1 Caracterização físico-química do comprimido mastigável de Doxiciclina.....	20
3.4.2 Condições cromatográficas	21
3.5 Desenvolvimento da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV	21
3.5.1 Preparo da solução estoque de Doxiciclina.....	21
3.5.2 Preparo de solução de trabalho de Doxiciclina	21
3.5.3 Preparo da curva analítica	21
3.5.4 Preparo das amostras de controle de qualidade.....	21
3.5.4.1 Preparos da amostra branco.....	22
3.5.5 Extração líquido-líquido	22
3.5.5.1 Escolha do anticoagulante e volume de extração.....	22
3.5.5.2 Escolha do pH para extração.....	22
3.5.6 Precipitação de proteínas	22
3.5.6.1 Precipitação de proteínas com ácidos.....	22
3.5.6.2 Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura	23
3.5.7 Extração em fase sólida (EFS).....	23
3.6 Ajustes da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV	23
3.6.1 Preparo da solução estoque de Oxitetraciclina.....	23
3.6.2 Preparo de solução de trabalho de Oxitetraciclina	23

3.6.3	Preparo da curva de calibração do padrão analítico.....	23
3.6.4	Condições cromatográficas	24
3.7	Validação da metodologia bioanalítica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV	24
3.7.1	Amostras de controle de qualidade	24
3.7.2	Extração das amostras de controle de qualidade.....	26
3.7.3	Seletividade.....	26
3.7.4	Efeito Residual.....	26
3.7.5	Efeito matriz.....	26
3.7.6	Limite de detecção e limite de quantificação.....	26
3.7.7	Linearidade e curva analítica.....	27
3.7.8	Precisão e Exatidão	27
3.7.9	Estudo de estabilidade	27
3.7.9.1	Estabilidade do analito e padrão interno em solução	27
3.7.9.2	Estabilidade do analito e padrão interno em matriz biológica	27
3.8	Estudos de Farmacocinética	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Avaliação do comprimido mastigável de Doxiciclina.....	30
4.1.1	Palatabilidade do comprimido mastigável de Doxiciclina.....	30
4.2	Controle de qualidade do comprimido mastigável de Doxiciclina	33
4.2.1	Determinação de peso médio.....	33
4.2.2	Uniformidade de conteúdo	34
4.1.3	Teste de Dissolução.....	35
4.2	Desenvolvimento da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV	37
4.2.1	Extração Líquido-Líquido	37
4.2.2	Escolha do anti-coagulante e volume de extração.....	37
4.2.3	Escolha do pH para extração	40
4.2.4	Precipitação de proteínas	42
4.2.5	Extração em fase sólida (EFS).....	44
4.3	Ajustes da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV	46
4.3.1	Curva de calibração do padrão analítico	49
4.4	Seletividade	50
4.5	Efeito Residual	51
4.6	Efeito matriz.....	52
4.7	Linearidade e curva de calibração	53
4.8	Precisão e exatidão.....	54
4.9	Estudo de estabilidade.....	56
4.9.1	Estabilidade do analito e padrão interno em solução	56
4.9.2	Estabilidade do analito e padrão interno em matriz biológica.....	56
4.10	Estudo de farmacocinética.....	57
5	CONCLUSÕES	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7	ANEXOS	72
7.1	Questionário para avaliação sobre a forma de prescrição de doxiciclina.....	72
	Avaliação sobre o tratamento contra doença do carrapato	72

7.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg com o uso de suplemento vitamínico (primeira semana de estudo).....	73
7.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina na dosagem de 100 mg com o uso de suplemento vitamínico (primeira semana de estudo).....	76
7.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg sem o uso de suplemento vitamínico (segunda semana de estudo).	79
7.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina na dosagem de 100 mg sem o uso de suplemento vitamínico (segunda semana de estudo).	82
7.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos antes (t = 0h) da administração oral das formulações: comprimido de Doxiciclina e comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg.	85
7.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos após 24 horas da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina e comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg (segunda semana de estudo).....	86
7.8 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos após 48 horas da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina e comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg (segunda semana de estudo).....	87
7.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos após 72 horas da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina e comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg (segunda semana de estudo).....	88

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os animais de estimação, também conhecidos como “pets”, são companheiros inseparáveis de seus tutores. Em consequência disso, o cuidado e a preocupação com o bem-estar dos animais de estimação são responsáveis pelo crescimento e especialização das indústrias veterinárias no setor de saúde animal.

No Brasil, o maior setor do mercado veterinário é destinado ao tratamento e controle de parasitas, uma vez que as condições climáticas do nosso país favorecem o crescimento e desenvolvimento desses parasitas, que são responsáveis por diversas doenças em cães e gatos.

Nos últimos anos, a doença do carrapato (Erliquiose canina) tem sido apontada como a principal causa de morbidade e mortalidade nos animais. Essa enfermidade é transmitida pela picada do carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, e possui ampla virulência. Atualmente acomete aproximadamente 20 % dos cães atendidos em hospitais e clínicas de diferentes estados brasileiros.

O tratamento geralmente escolhido é a doxiciclina. Um fármaco que apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e também Gram-positivas, motivo pelo qual seu uso é bastante difundido, não somente na medicina veterinária, como também na humana.

A concentração plasmática e o efeito farmacodinâmico possuem uma relação, isto ocorre para a maioria dos fármacos. Este fator ainda indica se a quantidade de fármaco absorvido na corrente sanguínea irá proporcionar uma resposta terapêutica ou se níveis tóxicos serão atingidos.

A quantificação de fármacos em matrizes biológicas pode ser feita através de diferentes metodologias devido a sua complexidade, porém a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por ultravioleta, por exemplo, é a técnica mais utilizada. Tal complexidade é encontrada devido à baixas concentrações dos analitos e, ainda interferentes presentes nas matrizes. Essa variabilidade dos constituintes de um fluido biológico dificulta o desenvolvimento de um procedimento de análise.

O esforço e a demanda de tempo que são necessários para a elaboração de uma metodologia para determinação e quantificação de fármaco é trabalhoso pois o método deve ser seletivo e deve proporcionar valores de recuperação adequados. Dentre os procedimentos necessários para o desenvolvimento de um método, o preparo de amostra é a etapa mais desafiadora, quando são utilizados detectores com baixa sensibilidade, como o detector ultravioleta, por exemplo, o empenho nessa fase do estudo é intenso, na tentativa de garantir a recuperação adequada do fármaco.

Para garantir confiabilidade analítica ao método é necessário a validação do mesmo. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio da resolução da diretoria colegiada – RDC N ° 27, de 1 de maio de 2012, dispõe de requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos e foi o guia utilizado para o procedimento de validação neste trabalho.

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta para aplicação em estudo de farmacocinética comparativa de formulações orais de doxiciclina em cães. Dentre os objetivos específicos estão a avaliação físico-química e da palatabilidade do comprimido mastigável de doxiciclina como alternativa para o tratamento da erliquiose canina que foi desenvolvido anteriormente pela equipe do LQEPV, o desenvolvimento da etapa de preparo de amostra a partir da comparação entre as seguintes técnicas de extração: extração líquido-líquido (ELL); extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT); desenvolvimento do método cromatográfico por CLAE-UV; a validação do método bioanalítico; determinação dos parâmetros farmacocinéticos de doxiciclina a partir da administração de formulações orais (comprimidos mastigáveis e comprimidos revestidos).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doxiciclina

A doxiciclina (Figura 1) também conhecida como α -6-deoxi-5-oxitetraciclina, é um agente antimicrobiano da classe das tetraciclinas obtido sinteticamente em laboratório através da oxitetraciclina ou metaciclina (HORBYLON, 2008). Em sua forma sólida, é um pó amarelo, cristalino e higroscópico, de odor ligeiramente alcoólico e sabor amargo (FARMACOPÉIA, 2010). Além disso, é um fármaco de classe I, ou seja, apresenta alta solubilidade e alta permeabilidade. Outras características físico-químicas estão descritas na tabela 1.

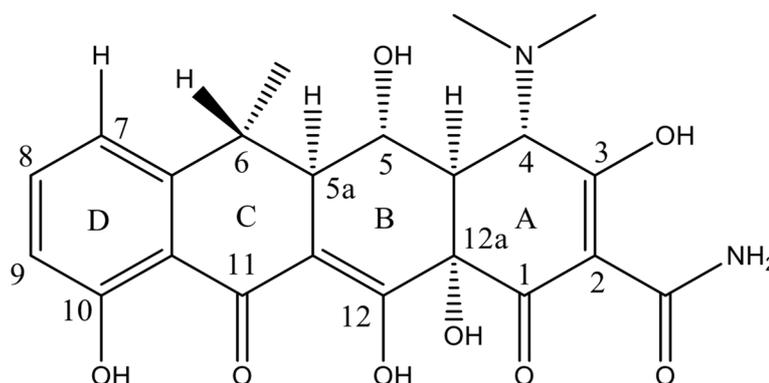


Figura 1. Estrutura química da Doxiciclina.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da Doxiciclina (NCBI, 2017).

Fórmula Molecular	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈
Nomenclatura IUPAC	(4 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,12 <i>aR</i>)-4-(dimetilamino)1,5,10,11,12a-pentahidroxi-6-metil-3,12-dioxo-4 <i>a</i> ,5,5 <i>a</i> ,6-tetrahidro-4 <i>H</i> -tetraceno-2-carboxamida
Massa molar	444,43 g/mol
CAS	564-25-0
Solubilidade em água a 25 °C	630 mg/L
Temperatura de fusão	201 °C
Constantes de dissociação (pKa)	3,4 7,7 9,7

A presença de diferentes grupos ácidos e básicos conferem a molécula propriedades anfóteras, ou seja, propriedades básicas e ácidas. As propriedades básicas são resultantes do grupo dimetilamina no anel A e as propriedades ácidas ocorrem devido a hidroxila fenólica no anel D e também por causa dos grupos enóis (nas posições 12 e 3). De acordo com o pH, podem ocorrer três formas em solução, são as seguintes: catiônica, aniônica e zwitteriônica (UDALOVA et al., 2015). Em sua estrutura existem três sítios com constantes distintas de dissociação (Figura 2) (RUFINO, 2009).

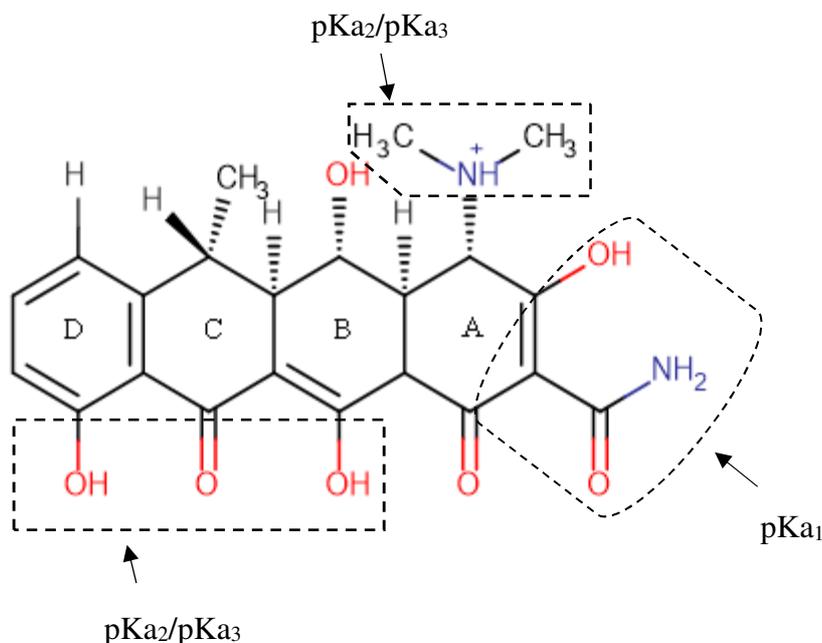


Figura 2. Estrutura química da Doxiciclina e seus correspondentes pKa's.

O pKa₁ (pKa = 3,4) está associado à desprotonação do grupo hidroxila no carbono C3. A atribuição dos valores de pKa₂ e pKa₃ juntamente com suas respectivas porções funcionais são controversas, segundo Stephens (STEPHENS et al., 1956) a perda de próton do grupo dimetilamina refere-se ao pKa₂ e a perda de próton do grupo hidroxila no C12 refere-se ao pKa₃. Entretanto, Leeson (LEESON; KRUEGER; NASH, 1963) atribui para pKa₂ e pKa₃ a perda de próton do grupo hidroxila no C12 e do grupo dimetilamina, respectivamente. A figura 3 demonstra as espécies de doxiciclina de acordo com o pH. A partir da observação dessas espécies é possível inferir as interações do fármaco com outros componentes presentes no meio no qual se encontra, por exemplo, a interação com o solvente utilizado durante a extração da doxiciclina (CRUZ, 2016).

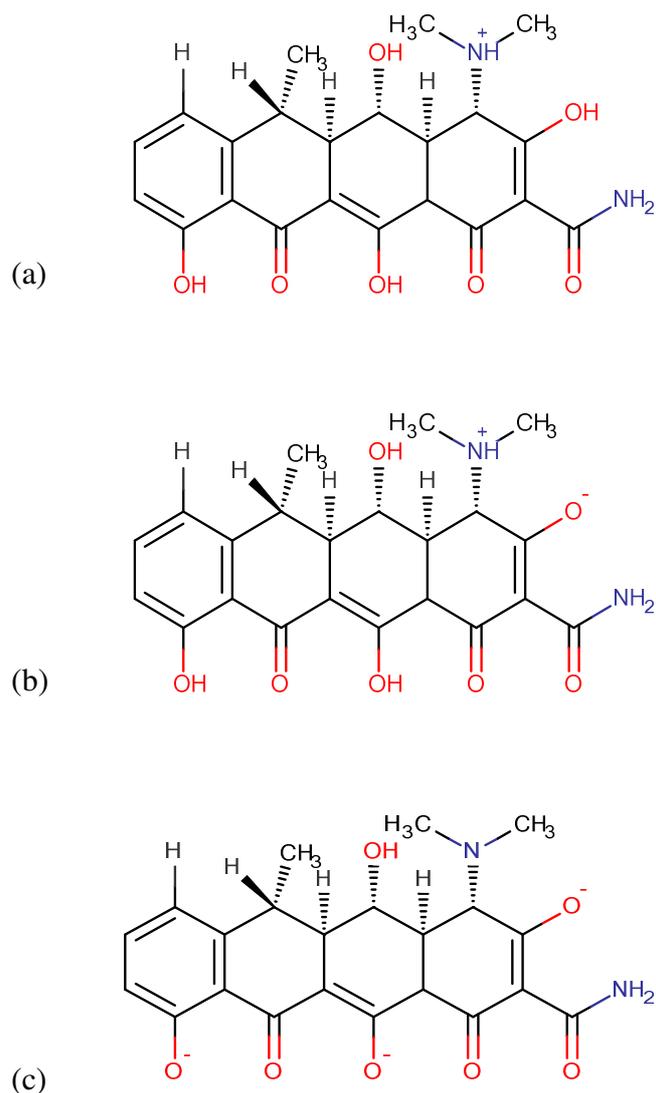
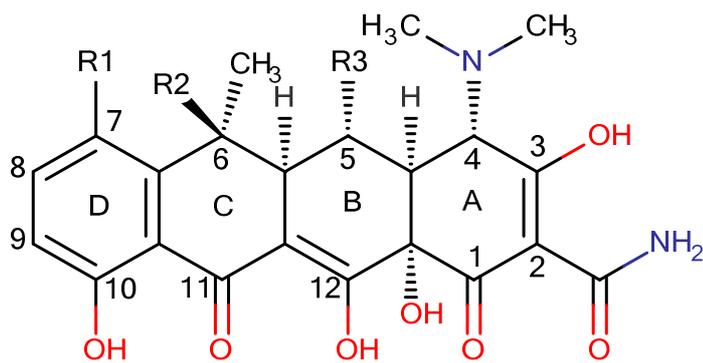


Figura 3. Espécies da doxiciclina em diferentes pH's: (a) pH do meio abaixo do primeiro pKa (pH < 3,4), grupo dimetilamino protonado; (b) pH do meio entre o primeiro e segundo pKa 3,4 < pH < 7,7), abstração do hidrogênio mais ácido (grupo hidroxila no carbono C3); (c) pH do meio acima do terceiro pKa (pH > 9,7), abstração de todos hidrogênios ácidos.

A molécula de doxiciclina é um produto derivado das tetraciclinas, a qual foi produzida no intuito de aumentar a estabilidade e propriedades do fármaco (WITTENAU et al., 1962). As tetraciclinas que possuem hidroxila na posição 6 são inativadas na presença de ácidos e bases fortes. A remoção da hidroxila desta posição protege a molécula deste processo de inativação (CRUZ, 2016). A figura 4 apresenta a estrutura geral das tetraciclinas com os principais fármacos da classe e seus respectivos grupos funcionais.



	R1	R2	R3
Oxitetraciclina	H	OH	OH
Tetraciclina	H	OH	H
Clortetraciclina	Cl	OH	H
Doxiciclina	H	H	OH

Figura 4. Estrutura das principais tetraciclinas.

Logo, a doxiciclina é um isômero estrutural da molécula de tetraciclina que difere quanto à posição da hidroxila no carbono 6 e no carbono 5. Além de sua maior estabilidade, a doxiciclina é mais lipofílica, sua distribuição pelos tecidos é facilitada atingindo concentrações efetivas em grande parte dos tecidos, tornando-a mais eficiente e com melhor perfil farmacocinético. Apresenta também maior tempo de meia vida pela capacidade de ligações com proteínas plasmáticas (CRUZ, 2016).

A doxiciclina apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, além disto, é eficaz contra alguns micro-organismos resistentes a agentes que exercem seus efeitos sobre a parede celular bacteriana, como *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* e *Ureoplasma*, também indicada no tratamento e prevenção seletiva da cólera (*Vibrio cholerae*), possuindo pouca atividade contra fungos (CHAMBERS et al., 2006).

Um agente bacteriostático que representa uma classe farmacológica importante, tanto para medicina humana quanto veterinária. É indicada para tratamento em gatos para as seguintes enfermidades: infecção urinária, anaplasmose, leptospirose, pododermatite, diarreias e gastroenterites, tétano, otite, feridas infectadas e pós-operatórios. Enquanto para cães, além destas enfermidades citadas, geralmente, é o fármaco de escolha no tratamento da erliquiose canina, apresentando melhora de sinais clínicos e anormalidades clínico-patológicas em cães infectados (DAGDONE et al., 2001; MACHADO, 2009).

Seu mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de proteínas bacterianas (Figura 5) (CHAMBERS et al., 2006), ligando-se, principalmente, às subunidades 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o acesso do aminoacetil – tRNA ao sítio receptor no complexo mRNA – ribossomo (Figura 6) (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

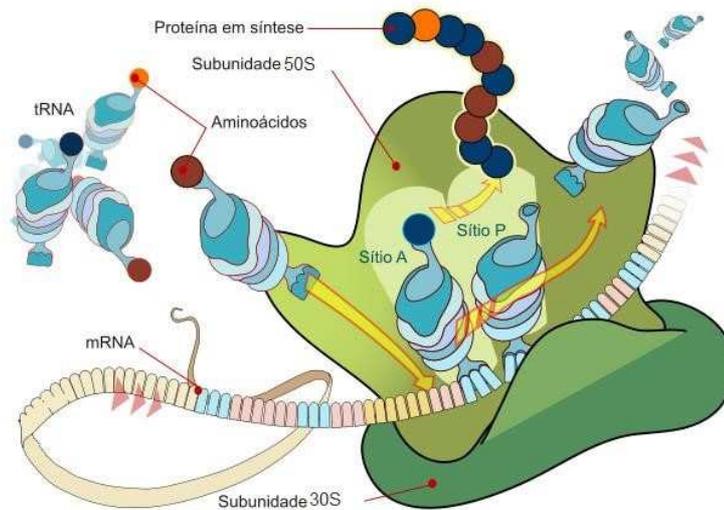


Figura 5. Mecanismo de Síntese de Proteínas.

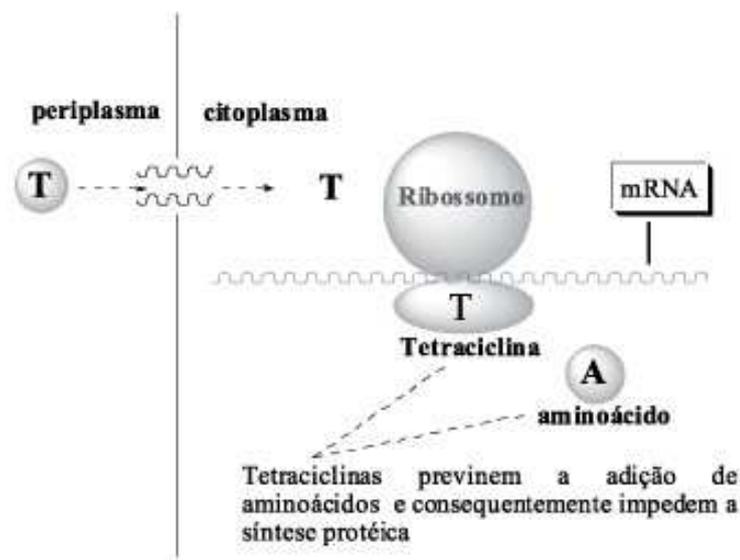


Figura 6. Mecanismo de ação das tetraciclínas.

A maior parte da absorção ocorre no estômago e na parte superior do intestino delgado, sendo maior em jejum. A absorção das tetraciclínas é reduzida pela ingestão concomitante de laticínios, géis de hidróxido de alumínio, sais de cálcio, magnésio e ferro ou zinco e subsalicilato de bismuto. O mecanismo responsável pela redução da absorção parece estar relacionado com a quelação dos cátions divalentes e trivalentes (GOODMAN; GILMAN, 2003).

A doxiciclina é melhor absorvida quando comparada às outras tetraciclínas, pois é um antimicrobiano lipossolúvel e atinge concentrações séricas e intracelulares satisfatórias (NEER et al., 2002). Após administração de comprimido de doxiciclina na dose de 10 mg/kg para cães mestiços, observa-se uma concentração plasmática máxima de 5,58 µg/mL em 3,88 horas e o tempo necessário para atingir a concentração terapêutica mínima varia entre 12 a 24 horas (GUTIÉRREZ et al., 2014).

Com a administração de doses convencionais, a doxiciclina não é eliminada pelas mesmas vias das outras tetraciclinas e não se acumula significativamente em pacientes com insuficiência renal. Por conseguinte, trata-se de uma das tetraciclinas mais seguras no tratamento de infecções extrarrenais nesses indivíduos. O fármaco é excretado nas fezes, em grande parte como conjugado inativo ou, talvez, como quelato, por esse motivo tem impacto menor na flora intestinal (NORD; HEIMMDAHL, 1988).

2.2 Formas farmacêuticas de uso veterinário para animais de companhia

Ao desenvolver uma nova formulação farmacêutica é importante que a mesma apresente custo acessível, melhoria na eficácia terapêutica e na adesão ao tratamento (facilidade de administração) (VILLANOVA et al., 2014).

As formas farmacêuticas podem ser classificadas como: líquidas, semi-sólidas e sólidas ou ainda quanto à sua via de administração: oral, tópica e parenteral. As formas farmacêuticas sólidas geralmente correspondem ao maior número de prescrições médicas, devido à sua maior estabilidade quando comparada a formulações líquidas. Na medicina veterinária destacam-se as cápsulas, comprimidos e biscoitos (AULTON, 2005).

Atualmente as formas farmacêuticas existentes para doxiciclina, no tratamento de cães, disponíveis no mercado são comprimidos e suspensão. No tratamento da erliquiose canina, a medicação é feita com comprimidos ou cápsulas durante 28 dias e isso dificulta o tratamento, uma vez que muitos cães não aceitam comprimidos ou cápsulas facilmente. Uma alternativa para aumentar a adesão ao tratamento é o desenvolvimento de formulações orais palatáveis e mastigáveis, esse tipo de formulação tem ganhado destaque na pesquisa, uma formulação saborosa é ideal para aumentar a absorção voluntária do medicamento pelo animal (SONG et al., 2016).

2.3 Farmacocinética

Após a administração de um medicamento, fatores como: absorção, distribuição, metabolismo e excreção irão influenciar no efeito terapêutico do fármaco, isso porque estes fatores afetam na quantidade necessária do princípio ativo no local de ação (GOODMAN; GILMAN, 2003).

A primeira etapa, posterior a administração da forma farmacêutica, é a absorção, a qual é responsável pela transferência do fármaco pela membrana celular (GOODMAN; GILMAN, 2003). Logo após ser absorvido, o fármaco livre agora presente na corrente sanguínea encontra-se em equilíbrio com a quantidade de substância administrada (SHARGEL et al., 2004).

A farmacocinética divide-se nos quatro fatores citados acima (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (GOODMAN; GILMAN, 2003), isto é, trata-se de estudar o caminho percorrido pelo fármaco no organismo, sua avaliação é feita de forma objetiva a partir da determinação da concentração da droga no sangue, soro ou plasma (SHARGEL et al., 2004).

A avaliação do perfil de concentração do fármaco em função do tempo fornece uma curva que descreve a fração da dose administrada que atinge a circulação sistêmica, sendo calculado a partir da multiplicação da dose administrada pelo fator de biodisponibilidade "F". Este fator avalia a extensão da absorção do fármaco não considerando a velocidade de absorção (WINTER; KODA-KIMBLE; YONG, 1992). O conceito de biodisponibilidade amplamente utilizado é descrito pelo FDA, definido como a quantidade absorvida de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica, esta definição possibilita afirmar que a forma farmacêutica influencia na disponibilidade da droga (BUENO, 2005).

Os parâmetros farmacocinéticos como: pico de concentração plasmática (C_{max}), tempo correspondente ao pico plasmático (t_{max}), área sob a curva (ASC) e meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), são determinados segundo a construção da curva plasmática (SHARGEL et al., 2004).

O C_{max} é o pico da curva plasmática que representa a maior concentração de fármaco alcançada após a administração do medicamento, sua unidade de concentração é expressa pela razão entre uma certa quantidade em massa por volume (mg/mL, ng/mL) (FELTON, 2013). A concentração plasmática e o efeito farmacodinâmico possuem uma relação, isto ocorre para a maioria dos fármacos. Este fator ainda indica se a quantidade de fármaco absorvido na corrente sanguínea irá proporcionar uma resposta terapêutica ou se níveis tóxicos serão atingidos (SHARGEL et al., 2004).

A ASC é a principal medida de extensão da biodisponibilidade do fármaco, retrata a quantidade de medicamento absorvido no corpo, sendo frequentemente usada para avaliar a bioequivalência entre medicamentos. Geralmente é calculada usando a regra do trapezóide de acordo com a concentração plasmática obtida em diferentes tempos de coleta sanguínea, é expressa em unidades de concentração por tempo (mg. h. mL⁻¹) (SHEIN-CHUNG CHOW et al., 2009).

O t_{max} é o segundo parâmetro de maior importância e é a medida do tempo necessário para atingir a concentração máxima após a administração do fármaco. Este parâmetro está intimamente relacionado com a taxa de absorção do fármaco a partir de uma formulação e pode ser usado como uma medida da taxa de absorção (FELTON, 2013). Neste ponto a taxa de absorção é exatamente igual a taxa de eliminação do fármaco. A absorção do fármaco continua após atingir o t_{max} , porém com uma taxa menor. É expresso em unidade de tempo (horas, minutos) (SHARGEL et al., 2004).

O $t_{1/2}$ avalia o tempo necessário para que 50 % do fármaco seja removido do corpo, ou seja, os níveis de concentração plasmática do fármaco são reduzidos à metade (GOODMAN; GILMAN, 2003). É expressa em unidades de tempo (minutos, horas) (SHARGEL et al., 2004).

A avaliação desses parâmetros farmacocinéticos permite verificar a eficiência de uma nova forma farmacêutica, mas para execução do estudo farmacocinético é necessário a utilização de um método bioanalítico robusto, desta forma a análise do analito em uma determinada matriz biológica (plasma ou soro) é feita em diferentes tempos de coleta de maneira confiável.

2.4 Métodos bioanalíticos para matrizes complexas

A análise de matrizes biológicas (soro, plasmas, urina, entre outros) é de grande interesse para áreas diversas como: ambiental, farmacêutica, análises clínicas, medicina legal, entre outras. Porém a complexidade desse tipo de matriz requer etapas, isto é, preparar a amostra para análise. O pré-tratamento de amostras biológicas abrange as etapas de extração, pré-concentração e purificação, essenciais nas análises cromatográficas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Na área farmacêutica, por exemplo, para o estudo de compostos em matrizes biológicas (plasma, urina) e para análises cromatográficas são necessárias as etapas de extração e *clean-up* para minimizar interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados concomitantemente com os analitos) aumentar a sensibilidade e seletividade analítica, além da medida da concentração do fármaco de interesse a fim de analisar substâncias a nível traço (COLLINS, 2006).

Dentre as técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em matrizes biológicas estão: Extração Líquido-Líquido (ELL), precipitação de proteínas de fluídos biológicos (PP) e Extração em Fase Sólida (EFS) (PRETO, 2015).

Devido seu amplo uso para tratamento de diversas enfermidades tanto em humanos quanto em animais um grande número de trabalhos descreve a determinação de doxiciclina em diversas matrizes.

Existem vários métodos descritos na literatura para detecção e quantificação de DOX em plasma e soro humano (AXISA et al., 2000; BÖCKER, 1980; DE LEENHEER; NELIS,

1979; FARIN et al., 1999; KRISHNA et al., 2012; NIEDER; JAEGER, 1988; ROMEU et al., 2007; SELVADURAI; MEYYANATHAN, 2010), em plasma de peru (SANTOS et al., 1996), em soro de camundongos (RUZ et al., 2004), em sangue total de cavalo (DAVIS; SALMON; PAPICH, 2006), em plasma de porco (NOUWS et al., 1998), em plasma de ovelhas (CASTRO et al., 2009), em plasma de galinha (ANTAÓDN et al., 1994). No entanto, encontram-se um número reduzido de trabalhos descrevendo a determinação de DOX em amostras de plasma e soro canino por CLAE, dentre os existentes estão (BIDGOOD; PAPICH, 2003; RIOND; VADEN; RIVIERE, 1990), e alguns métodos são microbiológicos como (ARCINIEGAS RUIZ et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2014).

2.5 Métodos de Extração

Existem diversas estratégias que são sugeridas na literatura para extração de analitos em matrizes biológicas. Em geral, é a etapa mais demorada da análise, pois devido à complexidade da amostra é necessário um cuidado maior visando minimizar interferentes e melhorar a confiabilidade nos resultados da análise (INMETRO, 2007). Trata-se da primeira etapa do ensaio analítico e é responsável por 30 % das fontes de erro da análise (Figura 7).

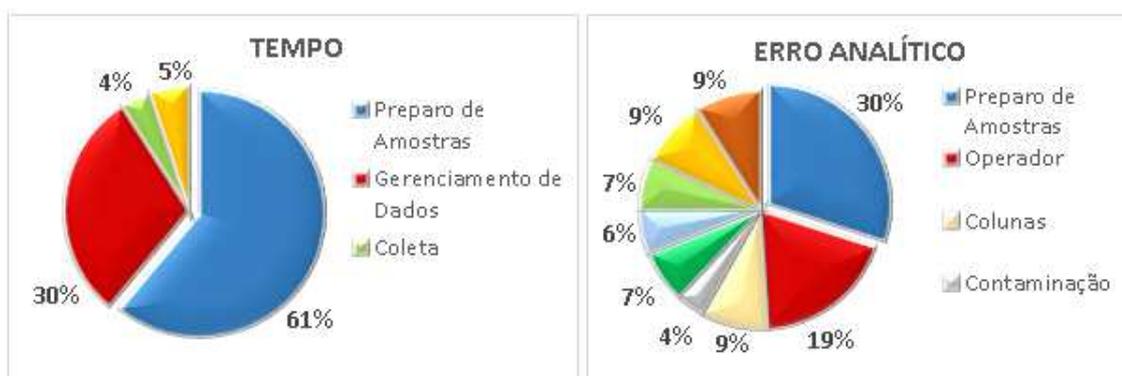


Figura 7. Representação das proporções de tempo e erro analítico em análises.

Normalmente para bioanálises as técnicas mais corriqueiras são: Extração Líquido-Líquido (ELL), precipitação de proteínas (PP) e extração em fase sólida (EFS) (PRETO, 2015) e para amostras líquidas as ELL e EFS são mais utilizadas (MILAZZO, 1982).

Quanto à classificação, estas técnicas podem ser subdivididas de duas maneiras: “off-line” e “on-line”. No preparo de amostras “off-line” a extração e/ou concentração do analito é feita isolada do sistema cromatográfico. A amostra é submetida ao procedimento estabelecido para o preparo de amostra e depois é injetada e analisada no sistema cromatográfico. Enquanto no “on-line”, a etapa de extração e/ou concentração do analito é executada no sistema cromatográfico através de alguns acessórios que são inseridos no sistema e possibilitam este procedimento (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Uma metodologia de preparo de amostras simples com poucas etapas e de fácil execução é o ideal, não somente pelo tempo de análise reduzido mas também pelas fontes de erros que são menores. A escolha adequada do tipo de preparo de amostra que será aplicado é de suma importância, pois esta etapa consiste na transformação de uma matriz real em uma amostra apropriada para análise. Este procedimento altera as interações dos analitos com o ambiente químico em que se encontram. As propriedades físico-químicas dos analitos e suas matrizes determinam o tipo de interação, afetando na aplicação de diferentes técnicas de processamento de amostras e métodos analíticos, assim como influenciam na exatidão e precisão da análise (PAVLOVIĆ et al., 2007).

Atualmente técnicas de extração e concentração estão sendo desenvolvidas a fim de minimizar os problemas que matrizes biológicas oferecem nesta etapa, inovações como ELL com *salting out*, ELL fracionada, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD) com alta ou baixa densidade, Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS), entre outras, sempre com o intuito de tornar a preparação da amostra mais eficaz e rápida. Além destes motivos os estudos para desenvolvimento de métodos de extração tornaram-se uma preocupação para os químicos na tentativa de propor técnicas que reduzam o impacto ambiental prejudicial de solventes orgânicos (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008).

2.5.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (ELL), também denominada como extração por solvente orgânico ou partição, é uma técnica clássica de preparo de amostras e ainda bastante utilizada para análise de amostras líquidas ou solúveis (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). A ELL é empregada em análises de alimentos, pesticidas, produtos naturais, drogas de abuso, biomoléculas, além das inúmeras aplicações na análise de fármacos e seus metabólitos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A partição do analito ocorre a partir da competição entre duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis, geralmente uma fase aquosa e a outra orgânica com solubilidades distintas (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A seleção do solvente extrator é feita de acordo com as características físico-químicas do soluto que é submetido ao procedimento de extração, um analito mais polar ou hidrofílico prefere a fase aquosa enquanto um composto menos polar ou hidrofóbico prefere a fase orgânica (DEAN, 2009). O solvente orgânico escolhido para execução do procedimento é essencial para minimizar o efeito de interferentes da matriz (BYLDA et al., 2014). Além da afinidade do soluto pelo solvente extrator, existem outros fatores que influenciam na eficiência da extração, como a razão entre as fases (volumes de amostra e solvente) e o número de extrações (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A distribuição do soluto de interesse entre os dois solventes imiscíveis é descrita pelo coeficiente de distribuição (k_D), uma constante que explica o equilíbrio do analito entre os solventes de acordo com a Lei de Distribuição de Nernst (Equação 1), onde o numerador é a fração do analito em termos de concentração na fase orgânica e o denominador é a fração do analito na fase aquosa (DEAN, 2009).

$$k_D = \frac{[\text{analito}]_{\text{org}}}{[\text{analito}]_{\text{aq}}} \quad \text{Equação 1}$$

Algumas alternativas podem ser usadas para aumentar o valor de k_D , ou seja, favorecer a transferência do analito para a fase orgânica, conseqüentemente a recuperação melhor. Dentre elas, o ajuste do pH, prevenindo a ionização de espécies ácidas e básicas, analitos não ionizados são extraídos por solventes orgânicos mais facilmente que espécies carregadas (BYLDA et al., 2014).

Uma técnica vantajosa pela simplicidade na execução, baixo investimento quando comparada a outras técnicas de extração. Ainda a ampla faixa de solventes puros e de fácil obtenção que podem ser utilizados garante a melhor solubilidade dos compostos na fase orgânica favorecendo os valores de recuperação (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Entretanto, existem também desvantagens como formação de emulsão, o grande volume de amostra e de solvente extrator e ainda o abundante volume de resíduo gerado que prejudicam

o meio ambiente, além da toxicidade desses solventes. Outra desvantagem da ELL é a não aplicabilidade do método para compostos hidrofílicos (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

2.5.2 Precipitação de proteínas

É uma técnica utilizada como tratamento prévio para tecidos e plasma, podendo ser feita conjuntamente com técnicas tradicionais, como ELL e EFS. Em alguns casos, o sobrenadante resultante da separação de proteínas pode ser diretamente analisado (POLSON et al., 2003). No entanto, na maioria das vezes o sobrenadante é submetido a uma etapa de extração (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Esta técnica ocorre através da desnaturação de proteínas impedindo a interação entre o analito e sua matriz (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). Alguns solventes orgânicos, sais e ácidos podem ser usados para precipitar proteínas contidas nas amostras. Solventes orgânicos miscíveis em água são utilizados e é uma técnica vantajosa pois a condição para precipitação é moderada e diminui as chances de decompor analitos lábeis (SIQUEIRA et al., 2008).

2.5.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) surgiu em 1970, mas somente oito anos após foi comercialmente disponibilizada, sob a forma de cartuchos descartáveis e atualmente é um método de preparo de amostras muito difundido nos ensaios rotineiros. Foi desenvolvida como solução para as desvantagens apresentadas pela ELL, como não formação de emulsões, melhor eficiência na recuperação do analito, redução na quantidade de solvente orgânico utilizado e consequentemente diminuição no volume de resíduo tóxico (JARDIM, 2010).

A EFS é uma técnica de separação sólido-líquido na qual o analito é absorvido pela fase sólida, também chamada de fase estacionária assim como na cromatografia líquida clássica (CLC) (LANÇAS, 2008). Outra similaridade com a CLC são os mecanismos de separação e a diversidade de sorventes existentes, os quais são empregados em pequenas colunas descartáveis na forma de seringas, cartuchos (Figura 8) ou ainda discos, sendo o cartucho o formato de dispositivo mais utilizado (JARDIM, 2010).

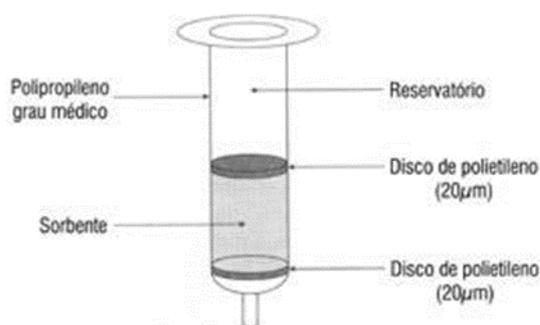


Figura 8. Ilustração de um cartucho usado em Extração em Fase Sólida (EFS) (LANÇAS, 2008).

A EFS é composta por quatro etapas: condicionamento do cartucho, adição da amostra, lavagem (opcional) e eluição, os procedimentos são apresentados de acordo com a Figura 9.

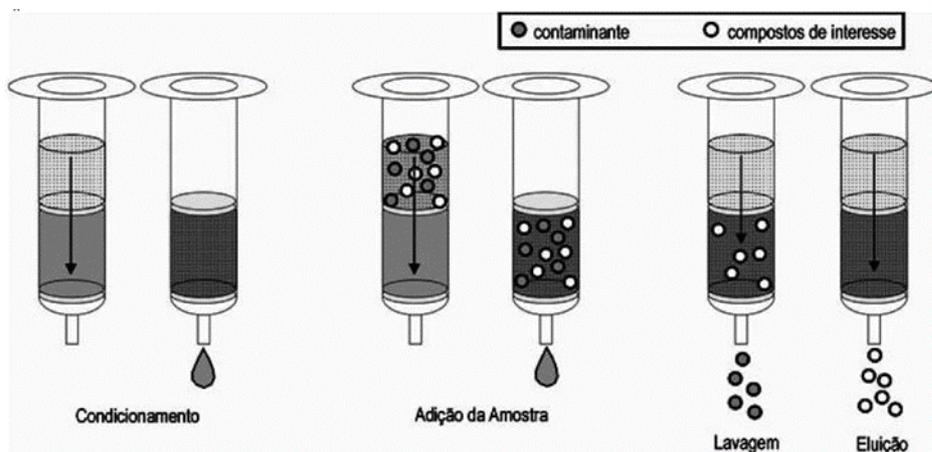


Figura 9. Principais etapas na extração em fase sólida (EFS) (LANÇAS, 2008).

O condicionamento consiste na ativação da fase estacionária, primeiramente com um solvente orgânico, em seguida com água destilada. Nesta etapa ocorre a ativação do adsorvente, geralmente utilizando-se metanol para FE's alquílicas, C₁₈ por exemplo. O solvente orgânico solvata a cadeia ligada a sílica aumentando a superfície de contato, melhorando a interação entre o analito e a fase estacionária. Esse aumento na superfície de contato ocorre porque as cadeias de hidrocarbonetos não solvatada podem estar entrelaçadas o que diminui o contato da amostra de interesse com a fase quimicamente ligada (PEDROSO, 2007). A água destilada usada também nessa 1ª etapa remove o solvente da ativação e ocupa o espaço entre as cadeias de C₁₈, fornecendo um maior contato do analito com a FE durante a percolação (ARAUJO, 2004; PEDROSO, 2007). Essa ativação da sílica por contato faz com que a solubilização do analito pela FE seja maior, melhorando a exatidão da análise, pois a interação da sílica é quase que exclusivamente com o fármaco de interesse e não com os interferentes.

Após a ativação do cartucho, é feita a adição da amostra (2ª etapa), esta é colocada na parte superior do cartucho e percolada através do vácuo gerado no dispositivo multivias ("manifold"), o analito fica retido no cartucho e é eluído com solvente orgânico, coleta-se esta fração onde encontra-se o analito de interesse.

A EFS apresenta algumas desvantagens, a análise é demorada, de alto custo por causa do preço dos dispositivos multivias e dos cartuchos que não podem ser reutilizados.

2.5.4 Extração líquido – líquido com partição em baixa temperatura

Esta técnica é uma adaptação da técnica de ELL, a qual foi desenvolvida para extração de pesticidas em plantas e matrizes animais, onde os compostos lipofílicos eram separados por precipitação em baixa temperatura (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007).

Em 2008, Goulart (GOULART et al., 2008) descreveu um método para determinação de piretróides em leite, onde surgiu o termo Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT). Este método tem sido aprimorado para compostos orgânicos em diferentes matrizes como água (GOULART et al., 2010; ROMEU et al., 2007; RÜBENSAM et al., 2011), alimentos (GOULART et al., 2008; PINHO et al., 2010, 2009; RÜBENSAM et al., 2011) e matrizes biológicas (MAGALHÃES, 2012; ROMEU et al., 2007). A ELL-PBT é preparada a partir da adição em um solvente orgânico miscível com a amostra e apresente temperatura de fusão diferente da água, gerando uma única fase. A mistura é armazenada em

baixa temperatura (-20 °C), assim o solvente orgânico permanecerá na fase líquida e pode ser separado da fase aquosa que é congelada. Através deste método é possível obter extratos orgânicos limpos, sem a necessidade de outro método de separação para limpeza (MAGALHÃES, 2012).

2.5 Técnica Analítica

As técnicas analíticas avançaram assim como as metodologias de preparo de amostra, este desenvolvimento é essencial para detecção e quantificação de fármacos e seus metabólitos em baixas concentrações em matrizes complexas como plasma.

A cromatografia líquida com diferentes tipos de detectores é amplamente utilizada para execução de metodologias analíticas e bioanalíticas. Os detectores comumente acoplados ao cromatógrafo para esses tipos de análise são: espectrômetro de massas (CL-MS), detector ultravioleta (CL-UV) e detector de fluorescência (CL-FL). Entretanto, apesar do uso difundido da cromatografia, a análise de alguns fármacos é realizada com métodos microbiológicos.

O detector MS um dos mais modernos e usado como referência na análise de analitos de interesse, isto deve-se a maior sensibilidade e seletividade deste detector. Entretanto o detector ultravioleta é muito utilizado para análise de DOX, uma vez que possuem características químicas favoráveis para absorção no UV, apresentando máxima absorção em 270 e 350 nm eliminando a interferência de alguns compostos endógenos que não absorvem nestes comprimentos de onda (CHENG; PHILLIPS; NEUE, 1997).

A análise cromatográfica de TCs é dificultada pois são fármacos anfóteros, dependendo das características do meio onde se encontram, polaridade e pH do meio por exemplo (CHENG; PHILLIPS; NEUE, 1997). Outra dificuldade para recuperação do fármaco são as funções, neutras e básicas da DOX. O primeiro pKa no valor de 3,0 associado a desprotonação da DOX ligada ao carbono 3, desta forma a recuperação abaixo ou próximo deste pH é favorecida (ANDERSON; RUPP; WU, 2005).

Quanto a separação, os mecanismos são complexos devido à presença de diferentes grupos funcionais na molécula o que dificulta sua retenção nos sistemas cromatográficos. Além disso, sua elevada polaridade implica em uma grande quantidade de água na composição da fase móvel. Neste tipo de composição para FM, a formação de pares iônicos, a complexação e a forte interação com grupos silanóis residuais, são importantes fatores que dificultam a quantificação das tetraciclinas (PENA *et al.*, 1997).

As tetraciclinas quelam íons metálicos e tendem a ficar adsorvidas nos grupos silanóis residuais presentes na coluna cromatográfica de fase reversa. Este problema pode ser minimizado com a adição de ácido oxálico na FM (OKA *et al.*, 2000; SCHENCK, CALLERY, 1998). O ácido oxálico em concentração adequada age como agente complexante, impedindo a formação de picos com caudas, auxiliando assim, na determinação das tetraciclinas (DENOBILO; NASCIMENTO, 2004).

Diante destes fatores, a composição da FM é de suma importância no perfil cromatográfico das tetraciclinas (DENOBILO; NASCIMENTO, 2004). O controle do pH é fundamental na fase móvel influenciando diretamente no mecanismo de partição entre as fases estacionária e móvel.

2.6 Validação de metodologia bioanalítica

A validação consiste em verificar se o método é adequado para o fim pretendido, ou seja, avaliar a capacidade de um método gerar resultados confiáveis. Este procedimento é necessário no caso de metodologias que não são descritas em formulários oficiais.

Agências reguladoras, nacionais ou internacionais (ANVISA, 2012; EMA, 2011; FDA, 2001) norteiam e definem os parâmetros para validação do método através de guias. Porém

estes documentos são passíveis de interpretações tornando as condições de análise flexíveis e vagas no que diz respeito a sua elaboração (CASSIANO et al., 2009).

Existem diferentes trabalhos que descrevem quais são os parâmetros que de devem ser avaliados na validação bioanalítica, como: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, eficiência de extração, estabilidade e robustez (CASSIANO et al., 2009). Neste trabalho os parâmetros envolvidos foram: seletividade, efeito matriz, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade, limite de detecção e quantificação (ANVISA, 2012, 2017).

2.6.1 Seletividade

O primeiro parâmetro avaliado no desenvolvimento e validação de um método é a seletividade, a qual analisa a capacidade de diferenciar e quantificar o analito e padrão interno (PI) na presença de outros componentes da amostra, interferentes. A seletividade assegura que as respostas dos picos são exclusivamente do analito de interesse e PI, como descrito na farmacopeia americana 37 (USP, 2016)

Segundo a RDC nº 27 (ANVISA, 2012), a seletividade deve ser analisada em no mínimo seis amostras, quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, quando a matriz em questão for plasma. E os resultados dos picos interferentes devem ser comparados com os picos obtidos nas amostras processadas do LIQ, as respostas dos picos interferentes no tempo de retenção do analito e PI devem ser inferiores a 20 e 5 %, respectivamente, da resposta do analito nas amostras do LIQ.

2.6.2 Efeito Residual

O efeito residual é gerado pelo aumento ou aparecimento do sinal do analito ou do PI remanescente de análises anteriores, também chamado de carry over. Os resíduos de amostras anteriores que contaminam a análise seguinte podem estar no injetor, liner, coluna ou detector.

Este efeito é avaliado a partir 3 (três) injeções, no mínimo, da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra de controle de qualidade do limite superior de quantificação (CQ-LSQ).

A ausência do efeito residual é comprovada quando as respostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos são inferiores a 20 % (vinte por cento) das respostas do analito nas amostras processadas do LIQ, para as respostas dos picos interferentes no tempo de retenção dos padrões internos são inferiores a 5 % (cinco por cento) das respostas dos padrões internos.

2.6.3 Efeito matriz

O efeito matriz retrata a influência de um componente da matriz biológica, interferente, na resposta do analito ou PI. Para realização deste ensaio a Anvisa preconiza que devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas (amostras branco), posteriormente adicionadas de concentrações definidas de analitos e PI, e soluções contendo analito e PI nas mesmas concentrações. A matriz biológica sendo plasma, devem ser avaliadas 8 (oito) CQB e 8 (oito) CQA, sendo 4 (quatro) plasmas normais, 2 (dois) plasmas lipêmicos e 2 (dois) plasmas hemolisados para cada concentração.

Este efeito é avaliado a partir do Fator de Matriz Normalizado por Padrão Interno (FMN) de acordo com a equação 2, as respostas do analito e PI em matriz são comparadas com as respostas obtidas em solução.

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}} \quad \text{Equação 2}$$

O critério de aceitação é que o coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras de cada nível de concentração deve ser inferior a 15 % (quinze por cento).

2.6.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os termos limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) demonstram a capacidade do método em detectar e quantificar baixas concentrações de um analito.

O LD é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Pode ser calculado de três maneiras distintas, são elas, método visual, relação sinal/ruído ou de acordo com parâmetros da curva analítica, a partir da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até a menor resposta detectável.

A determinação do LD a partir do método visual é feita a partir da análise de amostras adicionadas com analito com concentrações conhecidas averiguando a resposta obtida e verificando se essa resposta é ruído ou sinal analítico (RIBANI et al., 2004).

A determinação da relação entre sinal/ruído é obtida a partir da comparação entre as respostas para amostras em baixas concentrações e uma amostra branco, estabelecendo-se a concentração mínima que pode ser detectada obedecendo a relação sinal/ruído igual três (ANVISA, 2017).

No método de acordo com parâmetros da curva analítica, o LD é determinado a partir da equação 3.

$$LD = 3,3 * \frac{s}{S} \quad \text{Equação 3}$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta da amostra branco, ou estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e, S é a inclinação da curva (RIBANI et al., 2004).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (ANVISA, 2017). Este critério é estabelecido pela relação sinal/ruído igual a 10, ou a partir da estimativa do desvio padrão da amostra branco ou do coeficiente linear da equação (s) e a inclinação da curva analítica (S) usando a equação 4 (RIBANI et al., 2004).

$$LD = 10 * \frac{s}{S} \quad \text{Equação 4}$$

2.6.5 Linearidade e curva analítica

A linearidade de um método expressa sua habilidade em fornecer resultados que são diretamente proporcionais à concentração da espécie em análise, considerando uma faixa de trabalho. A relação matemática entre o sinal medido e a concentração da espécie, geralmente é linear, e pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. A relação linear é descrita através da equação $y = ax + b$, a partir desta equação os coeficientes de regressão a e b são calculados e também o coeficiente de correlação, r, que permite avaliar a qualidade da curva.

De acordo com a atual norma da Anvisa para validação de métodos bioanalíticos, o modelo matemático deve ser construído através da análise de, no mínimo, 3 (três) curvas

utilizando-se a mesma matriz proposta para o estudo, sendo submetidas ao mesmo procedimento de preparo. Devem ser avaliadas 6 (seis) concentrações distintas do padrão do analito adicionadas de PI, além da análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do analito e do padrão interno) e da amostra zero (matriz biológica adicionada de padrão interno).

Os resultados devem ser estudados pelo método matemático adequado, aceitando-se um coeficiente de variação menor ou igual a 20 % em relação a concentração nominal para o LIQ e menor ou igual a 15 % para as demais concentrações.

2.6.6 Precisão

A precisão de um método garante a confiabilidade em uma análise, este parâmetro retrata a dispersão dos dados obtidos em ensaios independentes (RIBANI et al., 2004). Normalmente, é determinada de duas formas, repetitividade e reprodutibilidade, sendo expressas pelo desvio-padrão (DP) (INMETRO, 2007).

A Anvisa recomenda que a precisão seja verificada em um mesmo ensaio ou corrida (intra-ensaio ou intra-corrída) e em, no mínimo, 3 (três) ensaios diferentes (inter-corrídas). Cada corrida deve ser analisada em 5 (cinco) níveis de concentração que devem abranger a faixa linear do método. Para cada nível de concentração são necessários, no mínimo, 5 (cinco) replicatas, amostras de controle de qualidade são, limite inferior de quantificação (CQ-LIQ), de baixa concentração (CQB), de média concentração (CQM), de alta concentração (CQA) e de diluição (CQD).

A seção V, da RDC 27/2012, dos requisitos para validação de métodos bioanalíticos estabelece que a precisão deve ser expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), valores superiores a 15 % (quinze por cento) não são admitidos, exceto para o LIQ onde se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento), de acordo com a equação 5 a seguir.

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média experimental (CME)}} \times 100 \% \quad \text{Equação 5}$$

2.6.7 Exatidão

A exatidão traduz a concordância dos resultados experimentais com o valor referência aceito como verdadeiro, considerando a probabilidade de que a média dos resultados experimentais esteja localizada em um certo intervalo, nível de confiança (NC) (INMETRO, 2007).

O guia da Anvisa estabelece que a exatidão deve ser determinada em um mesmo ensaio ou corrida e em, no mínimo, 3 (três) ensaios diferentes. Em cada ensaio devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) níveis de concentração (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em 5 (cinco) replicatas cada. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15 \%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20 \%$ (vinte por cento) do valor nominal, segundo a equação 6 abaixo.

$$EPR = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100 \% \quad \text{Equação 6}$$

2.6.8 Estabilidade

Um prazo para uso seguro das soluções e amostras deve ser determinado adequadamente (GREEN, 1996). Caso o tempo de estocagem esteja equivocado as chances de degradação dos compostos de interesse aumentam prejudicando a exatidão do método (RIBANI et al., 2004). Durante todo o procedimento de validação a estabilidade das amostras e de soluções padrões deve ser garantida.

A Anvisa recomenda que a estabilidade do analito seja avaliada em solução padrão, e em matriz biológica por meio de 4 (quatro) condições de análise, estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade pós-processamento e estabilidade de longa duração. A estabilidade do analito em matriz biológica é demonstrada quando não são observados desvios superiores a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal, e para o analito e PI em solução é determinada quando não apresentarem desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas comparadas com valores obtidos para amostras recém-preparadas.

3 METODOLOGIA

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Foram empregados os seguintes reagentes:

- Acetonitrila, grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Metanol, grau HPLC (Sigma Aldrich, St. Louis, USA);
- Acetato de Etila P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Hiclato de doxiciclina (teor 95,59%), Matéria prima (Fragon, São Paulo, Brasil);
- Oxitetraciclina (teor 88,6%), Substância Química de Referência (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA);
- Glicerina ACS, (Labsynth, São Paulo, Brasil);
- Gelatina em pó ACS, (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil)
- Ácido oxálico dihidratado PA (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil)
- Cloreto de sódio (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil)

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos modelo MX-S (Gomixer, Rocky Hill, USA);
- Balança analítica modelo B-TEC-210A (Tecnal, São Paulo, Brasil);
- Bomba à vácuo modelo TE-0581 (Tecnal, São Paulo, Brasil);
- Cartuchos de EFS C18 Discovery® DSC-18LT - 3mL;500 mg (Sigma Aldrich/Supelco, Bellefonte, Pensilvânia);
- Centrífuga modelo CT-6000R (Cientec, Belo Horizonte, Brasil)
- Coluna cromatográfica fase reversa Kromasil C18 100 A 3,5 µm 4,6 x 100 mm (EA) (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil);
- Coluna de guarda de mesma fase estacionária 10x4,6 mm, 5 µm (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de UV/VIS modelo Ultimate 3000 (Dionex, Califórnia, USA) composto por um sistema de bombeamento quaternário, amostrador automático, compartimento de coluna controlado por temperatura. A aquisição de dados foi realizada pelo programa Chromeleon versão 6.8 (Dionex, Califórnia, USA);
- Lavadora ultrassônica modelo USC-2800 (Unique, Indaiatuba, Brasil);
- Manifold à vácuo com capacidade para 12 cartuchos Visiprep (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Ultrapurificador Master P&d acoplado ao sistema de purificação por osmose reversa OS 10 LZ (Gehaka, São Paulo, Brasil);
- Filtro Millex-HV para seringa de 0.45 µm PVDF (Millipore, USA)

- Tubos de coleta de heparina sódica de 10 mL
- Tubos de coleta de EDTA K₃ de 4 mL

3.2 Localização da experimentação

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A elaboração e validação da metodologia bioanalítica para determinação da DOX em plasma canino foi realizada no laboratório de Farmacometria do LQEPV e o estudo da curva de concentração plasmática também foi feito nas dependências do LQEPV com parceria entre o setor Experimental e Farmacometria contando com profissionais da Medicina veterinária, químicos e farmacêuticos.

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 04/04/2017, de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009.

3.3 Preparo do comprimido mastigável de Doxiciclina

Os comprimidos mastigáveis de doxiciclina foram preparados na dose de 100 mg. A elaboração do comprimido mastigável foi a partir da mistura de DOX matéria-prima com ração (para cães filhotes) triturada e seca, na proporção de 6,25 % e 70 %, respectivamente. Além disso, uma gota de flavorizante alimentício (essência alimentícia) de bacon foi adicionada. Esta mistura foi umedecida com uma goma composta de gelatina, glicerina e água. A massa final com textura consistente foi distribuída igualmente em pequenas formas, mantidas sob refrigeração.

3.4 Teste de palatabilidade

Para a realização do ensaio de palatabilidade foram preparadas três formulações: comprimido mastigável placebo, comprimido mastigável de doxiciclina 100 mg/un com adição de um mascarante de sabor e comprimido mastigável de DOX 100 mg/un, denominadas de F1, F2 e F3, respectivamente. O preparo do comprimido mastigável placebo foi realizado da mesma forma que a formulação F3, porém na ausência de DOX. Já o comprimido mastigável F2 também foi preparado da mesma forma que a formulação F3, porém na presença do mascarante de sabor (Chemyunion[®] G.A) na porcentagem de 0,06 %.

A palatabilidade foi avaliada em cada uma das formulações em quatro dias diferentes. Dezoito animais participaram do teste e todos receberam todas as formulações, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Teste de palatabilidade realizado com três grupos de animais (com seis animais cada) para três formulações distintas: comprimido placebo (F1), comprimido com DOX e mascarante de sabor (F2) e comprimido com DOX (F3) durante quatro dias consecutivos.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dia 1	F1	F2	F3
Dia 2	F2	F3	F1
Dia 3	F3	F1	F2
Dia 4	F1	F2	F3

3.4.1 Caracterização físico-química do comprimido mastigável de Doxiciclina

A determinação do peso médio foi realizada de acordo com os métodos gerais descritos na farmacopeia brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010). Vinte comprimidos foram pesados aleatoriamente e a partir dos valores obtidos nesta pesagem calculou-se o peso médio e o desvio de 5 %. Considerou-se que não mais do que duas unidades poderiam estar fora da faixa de variação de 5 %.

A uniformidade de dose, também, foi verificada a partir da farmacopeia brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010). Dez comprimidos, os quais foram fracionados e transferidos para balões volumétricos de 100 mL contendo aproximadamente 20 mL de uma solução de ácido acético a 4,5 % v/v. As soluções foram submetidas ao ultrassom por 30 minutos e, em seguida, avolumadas e mantidas em banho-maria a 45 °C por 30 minutos. Após essas etapas, cada balão foi colocado sob agitação por 1 minuto, e alíquotas de 1 mL foram transferidas para balões de 10,0 mL, sendo avolumadas com solução aquosa de ácido oxálico 4 mM, pH = 2,5. As novas soluções foram então filtradas e submetidas à análise por CLAE-UV.

No ensaio de perfil de dissolução utilizou-se a farmacopeia americana 33 (USP, 2010), onde são descritas as seguintes condições: 900 mL de água ultra purificada como meio dissolução a 37°C, utilizando-se o aparato 2 (pá), a 75 rpm. Seis comprimidos mastigáveis foram selecionados e oito amostras foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, filtradas e posteriormente diluídas em uma proporção de 1:5 em solução aquosa de ácido oxálico 4 mM com pH ajustado no valor de 2,5 para serem submetidas à análise por CLAE-UV (desenvolvimento interno). Foi realizado um ensaio com comprimidos de doxiciclina existentes no mercado para uso veterinário (Doxifin®) nas mesmas condições para fins comparativos de perfil de dissolução.

As condições cromatográficas utilizadas para as análises de controle de qualidade acima (metodologia analítica) estão descritas no item a seguir (item 3.4.2), e foram desenvolvidas internamente pelo laboratório, ou seja, as análises de dissolução do comprimido mastigável e comprimido revestido não seguiram o método proposto pela farmacopeia.

3.4.2 Condições cromatográficas

- Sistema Cromatográfico: Cromatógrafo Líquido Dionex Ultimate 3000
- Coluna cromatográfica: C18 100 A 3,5 μm 4,6 x 100mm (EA) Kromasil
- Comprimento de onda: 270 nm
- Temperatura: 25 °C
- Fase Móvel: Solução de ácido oxálico 4 mM (pH = ajustado entre 2,5 e 3,5) / Acetonitrila (75:25)
- Modo de eluição: isocrático
- Fluxo: 1,20 mL/min.
- Tempo de análise: 10 minutos
- Volume de injeção: 20 μL

3.5 Desenvolvimento da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV

3.5.1 Preparo da solução estoque de Doxiciclina

Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 25 mg ($\pm 0,0001$) de DOX com teor 95,59% e transferidos para um balão volumétrico de 25,00 mL, cujo volume foi completado com solução de ácido oxálico 4mM, com pH entre 2,5 e 3,0, resultando em solução estoque de doxiciclina (SE_{DOX}) com concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.2 Preparo de solução de trabalho de Doxiciclina

A solução de trabalho (ST_{DOX}) foi preparada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, feita pela diluição da solução estoque (1000 $\mu\text{g/mL}$) em solução de ácido oxálico 4 mM, com pH entre 2,5 e 3,0.

3.5.3 Preparo da curva analítica

A partir da SE descrita no item 3.5.1, foram realizadas diluições com solução de ácido oxálico 4 mM e pH ajustado entre 2,5 e 3,5 para obter soluções com concentrações finais de 2,5; 10,0; 25,0; 50,0; 125,0; 250,0 $\mu\text{g/mL}$ que foram analisadas utilizando condições cromatográficas de acordo com o item 3.4.2.

3.5.4 Preparo das amostras de controle de qualidade

Amostras de sangue foram coletadas de cães que não foram submetidos a tratamento com doxiciclina por um período mínimo de 60 dias em dois frascos distintos, tubos heparinizados de 10 mL e tubos de EDTA K_3 de 4 mL. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C para obtenção do plasma, a partir desta mistura heterogênea fez-se um *pool* de plasma, ou seja, o plasma de cada tubo foi separado e recolhido em frasco universal, um recipiente para cada tipo de tubo coletor.

Frações de 500 μL de plasma foram separadas e destinadas ao preparo de amostras branco. Estas frações foram reservadas e armazenadas em freezer (- 20°C) para análise posterior. Outra fração do *pool* foi contaminada a partir de uma solução de DOX obtendo um plasma com concentração igual a 100 $\mu\text{g/mL}$. Após contaminação, as alíquotas de 500 μL do

plasma foram separadas e armazenadas em freezer (- 20°C) até o momento da análise. O procedimento de preparo das amostras (extração) foi feito com o dobro do volume (1 mL) de solvente extrator (diluição 1:2), assim após a extração a concentração final obtida é 50 µg/mL.

3.5.4.1 Preparos da amostra branco

A partir da fração de plasma não contaminada foram preparadas as amostras branco, alíquotas de 500 µL foram adicionadas em microtubos (eppendorf) e acondicionadas em freezer (- 20°C) até o momento da análise.

3.5.5 Extração líquido-líquido

3.5.5.1 Escolha do anticoagulante e volume de extração

O procedimento de extração foi realizado utilizando a técnica de extração líquido-líquido (ELL), sendo feita com os dois tubos de coleta heparina sódica e EDTA. O procedimento utilizou como solvente extrator acetato de etila com volume de 1 mL. A extração foi realizada de forma direta (1mL) e seriada (duas frações de 500µL) para ambos os tubos, avaliando-se qual tipo de tubo coletor e qual extração iria apresentar melhores resultados de precisão e exatidão.

500 µL de amostra (plasma) e 1 mL de acetato de etila foram homogeneizados em agitador tipo vórtex por 1 minuto, em seguida a mistura foi centrifugada a 6000 rpm por 15 minutos. A fase orgânica foi transferida para um frasco (vial) adequado para análise por CLAE-UV.

3.5.5.2 Escolha do pH para extração

Após a escolha do tubo de coleta e do tipo de extração, modificou-se o pH do meio durante o procedimento, através da utilização de uma solução tampão citrato (tampão McIlvaine) 0,1 mM com pH 3,0. Este procedimento também foi realizado com solução tampão acetato/ácido acético 200 mM com pH 3,0 e 6,8.

Foram adicionados 50 µL de solução tampão em 500 µL de plasma homogeneizando-se em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, 1 mL de acetato de etila foi adicionado e a mistura foi colocada em vórtex por mais 1 minuto. Centrifugou-se a mistura a 6000 rpm por 15 minutos separando-se a fase orgânica para quantificação por CLAE-UV.

3.5.6 Precipitação de proteínas

3.5.6.1 Precipitação de proteínas com ácidos

Foram adicionados 200 µL de ácido em 500 µL de plasma homogeneizando-se em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 6000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e 1 mL de acetato de etila foi adicionado ao mesmo, sendo colocado em vórtex por mais 1 minuto. A mistura foi quantificada por CLAE-UV. Esse procedimento foi realizado para cada um dos três ácidos (ascórbico 6 % m/v, fosfórico 0,1 M, trifluoacético 10 % m/v) separadamente.

A precipitação com solvente foi feita com metanol, e devido ao fato deste solvente apresentar miscibilidade com a matriz (plasma) a técnica usada foi extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT) que será descrita no item a seguir (3.5.6.2).

3.5.6.2 Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

Foram adicionados 50 μL de solução tampão acetato/ácido acético 200 mM com pH 6,8 em 500 μL de plasma homogeneizando-se em vórtex por 1 min. Posteriormente, 1 mL de metanol foi adicionado e a mistura foi colocada em vórtex por mais 1 min. Centrifugou-se e a mistura foi colocada em freezer ($- 20^{\circ}\text{C}$) por 24 horas, no mínimo. Após esse período a fase orgânica não congelada foi separada para análise por CLAE-UV.

A fração orgânica foi submetida ao procedimento de concentração utilizando o equipamento speedvac com o intuito de quantificar menores concentrações de analito presente na amostra.

3.5.7 Extração em fase sólida (EFS)

Por último a amostra foi extraída com a técnica de EFS, utilizando cartuchos de extração de fase polimérica, HLB – Oasis (Waters), e cartuchos com fase de sílica quimicamente ligada com grupo octadecil, C18 Discovery® – Sigma Aldrich/Supelco. Estes foram acoplados a “manifold” (Supelco) com capacidade para 12 cartuchos ligados a uma bomba a vácuo (Tecnal) a 10 mm de Hg. Primeiramente os cartuchos foram acondicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de água. Em seguida foram adicionados 500 μL de amostra (plasma) e a eluição foi feita com 1,0 mL de metanol. Este procedimento também foi realizado com precipitação de proteínas anteriormente à extração, somente para o cartucho de fase polimérica.

3.6 Ajustes da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxíciclina em plasma canino por CLAE-UV

Nesta etapa, foi introduzido o padrão interno de oxitetraciclina e então foram necessários ajustes na metodologia descrita no item 3.4.2, como: tempo de corrida, temperatura de análise, comprimento de onda, composição da fase móvel e modo de eluição. Essas alterações foram realizadas para atingir parâmetros cromatográficos do analito e PI adequados.

3.6.1 Preparo da solução estoque de Oxitetraciclina

Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 25 mg ($\pm 0,0001$) de OTC com teor 88,6 % e transferidos para um balão volumétrico de 25,00 mL, cujo volume foi completado com solvente metanol grau HPLC, resultando em solução estoque de oxitetraciclina (SE_{OTC}) com concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.6.2 Preparo de solução de trabalho de Oxitetraciclina

A solução de trabalho (ST_{OTC}) foi preparada na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, feita pela diluição da solução estoque (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em solução de ácido oxálico 4 mM, com pH entre 2,5 e 3,0.

3.6.3 Preparo da curva de calibração do padrão analítico

A partir da solução de trabalho de doxíciclina (preparo descrito no item 3.5.2) foram realizadas diluições para obter concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O PI foi adicionado em todas estas soluções na concentração final de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir da diluição da solução de trabalho de oxitetraciclina (preparo descrito no item 3.6.2).

3.6.4 Condições cromatográficas

- A análise foi feita no Cromatógrafo líquido DIONEX – Ultimate 3000;
- Coluna cromatográfica: C18 100 A 3,5 μm 4,6 x 100 mm (EA) Kromasil
- Pré-coluna: C18 100 A 3,5 μm 3 mm Kromasil
- Comprimento de onda: 357 nm
- Temperatura: 30 °C
- Fase móvel: Solução de ácido oxálico 4 mM (pH = ajustado para 2,5) / Acetonitrila (80:20)
- Modo de eluição: isocrático com gradiente de fluxo
- Fluxo: 0,8 – 1,0 mL/min (0,8 mL/min no intervalo de 0-3,02 min, 1,0 mL/min no intervalo de 3,02 a 9,52 min e 0,8 mL/min no intervalo de 9,52 a 12 min)
- Tempo de análise: 12 min
- Volume de injeção: 20 μL

3.7 Validação da metodologia bioanalítica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV

A metodologia bioanalítica foi desenvolvida e validada avaliando-se parâmetros de seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade baseados nos critérios de aceitação descritos no guia para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2012).

3.7.1 Amostras de controle de qualidade

O plasma foi obtido a partir de cachorros da raça beagle, machos e fêmeas, adultos e sadios e então fortificado com solução contendo DOX para obtenção de concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$. A oxitetraciclina (PI) foi adicionada ao plasma na concentração final de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Após contaminação, o plasma foi fracionado em volumes de 500 μL em microtubos e acondicionado em freezer (-20 °C) até o momento da análise. Nas tabelas 3, 4 e 5 contém a preparação das amostras de controle de qualidade utilizadas na validação da metodologia.

Tabela 3. Preparo das amostras para avaliação efeito matriz.

Ponto µg/mL	Amostra branco	Conc. DOX µg/mL	Alíquota µL	Conc. OTC µg/mL	Alíquota µL	Vol. Final mL	C _F DOX µg/mL	C _F OTC µg/mL
1,0 (CQB)	Normal	40,0	25,0	40,0	25,0	4x(1,0)	1,0	1,0
	Lipêmico					2x(1,0)		
	Hemolisado					4x(1,0)		
7,5 (CQA)	Normal	300,0	25,0	40,0	25,0	4x(1,0)	7,5	1,0
	Lipêmico					2x(1,0)		
	Hemolisado					2x(1,0)		

Tabela 4. Preparo de amostras para curva analítica, precisão e exatidão.

Ponto µg/mL	Número de amostras	Conc. DOX µg/mL	Volume adicionado µL	Conc. OTC µg/mL	Volume adicionado µL	Volume Final mL	C _F DOX µg/mL	C _F OTC µg/mL
0,5 (LIQ)	15	100 (ST _{DOX})	80	100 (ST _{OTC})	160	8,0	1,0	
1,0 (CQB)	15	100 (ST _{DOX})	160	100 (ST _{OTC})	160	8,0	2,0	
2,5 (CQBM)	3	100 (ST _{DOX})	25	40	25	3*(0,5)	5,0	
5,0 (CQM)	15	1000 (SE _{DOX})	80	100 (ST _{OTC})	160	8,0	10,0	2,0
7,5 (CQA)	15	1000 (SE _{DOX})	120	100 (ST _{OTC})	160	8,0	15,0	
10,0 (CQAD)	3	400	25	40	25	3*(0,5)	20,0	
Zero	3	-	-	40	25	3*(0,5)	-	
50,0 (CQD)	15	1000 (SE _{DOX})	800	100 (ST _{OTC})	160	8,0	100,0	

Tabela 5. Preparo das amostras para avaliação da estabilidade.

Ponto µg/mL	Estabilidade	Conc. DOX µg/mL	Alíquota µL	Conc. OTC µg/mL	Alíquota µL	Vol. Final mL	C _F DOX µg/mL	C _F OTC µg/mL
1,0 (CQB)	Após ciclos de congelamento/des congelamento	100 (ST _{DOX})	120,0	100 (ST _{OTC})	120,0	6,0	2,0	2,0
	Longa duração							
7,5 (CQA)	Curta duração	1000 (SE _{DOX})	90,0	100 (ST _{OTC})	120,0	6,0	15,0	2,0
	Após ciclos de congelamento/des congelamento							
	Longa duração							
	Curta duração							

3.7.2 Extração das amostras de controle de qualidade

O procedimento de extração da amostra foi realizado utilizando a técnica de ELL/PBT. Foram adicionados 50 µL de solução tampão acetato/ácido acético 200 mM com pH 6,8 em 500 µL de amostra homogeneizando-se em vórtex por 1 min. Posteriormente, 1 mL de metanol foi adicionado e a mistura foi colocada em vórtex por mais 1 min. Centrifugou-se e a mistura foi colocada em freezer (- 20 °C) por 24 horas, no mínimo. Após esse período a fase orgânica não congelada foi separada para análise por CLAE-UV de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.6.4.

3.7.3 Seletividade

As amostras de plasma, sendo quatro amostras normais, uma amostra lipêmica e uma terceira amostra que foi submetida ao processo apropriado para promover a hemólise do sangue (ou seja, após a coleta o tubo coletor foi agitado para que houvesse a ruptura das hemácias) foram analisadas de acordo com o procedimento e condições cromatográficas determinados anteriormente.

3.7.4 Efeito Residual

Este parâmetro foi avaliado a partir da injeção no cromatógrafo líquido de uma amostra branco que foi extraída previamente, seguida da injeção de uma amostra contendo padrão interno e analito na maior concentração da curva linear de calibração (LSQ, 10 µg/mL), que também foi submetida ao procedimento de extração. Em seguida, a mesma amostra branco foi injetada mais duas vezes.

Os três cromatogramas das amostras branco foram avaliados e comparados com um cromatograma de uma amostra processada do LIQ (0,5 µg/mL), devendo obter respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito inferior a 20 % e em relação ao PI inferior a 5 %.

3.7.5 Efeito matriz

Este ensaio de validação foi realizado com a utilização de amostras de plasma, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Cada amostra inicialmente sem adição de analito e padrão interno foi extraída de acordo com o método escolhido para preparo das amostras e, posteriormente fez-se a adição do analito e PI de tal modo que a concentração final obtida fosse referente as amostras de controle de qualidade CQB (1,0 µg/mL) e CQA (7,5 µg/mL), isoladamente. Ou seja, dois grupos de amostras foram obtidos, sendo quatro amostras para o CQB e quatro para CQA.

3.7.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e de quantificação (LD e LQ, respectivamente) do método bioanalítico para doxiciclina em plasma foram definidos a partir da determinação exposta no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003), isto é, foram estipulados com base na relação sinal ruído, sendo 0,15 µg/mL o limite de detecção e 0,5 µg/mL o limite de quantificação.

3.7.7 Linearidade e curva analítica

Foram extraídas e analisadas uma amostra branco, uma amostra zero e amostras de CQ nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 µg/mL (6 pontos da curva), utilizando o procedimento para preparo de amostras proposto. Quatro dessas amostras foram analisadas em quintuplicata verdadeira (n = 5), são elas amostras de LIQ (0,5 µg/mL), CQB (1,0 µg/mL), CQM (5,0 µg/mL), CQA (7,5 µg/mL).

Esse procedimento foi repetido 3 vezes e, através da concentração e da razão entre a área do analito e a área do PI (A_{DOX}/A_{PI}), obteve-se os gráficos de dispersão para cada uma delas que resultou nas curvas analíticas.

Para cada uma das curvas foi ajustado um modelo de regressão linear, e foram calculados os desvios dos pontos em relação à concentração nominal.

3.7.8 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas em três dias a partir da análise em quintuplicata das amostras de CQ do limite inferior de quantificação (LIQ), de baixa concentração (CQB), de média concentração (CQB), de alta concentração (CQA) e de diluição (CQD). Esses parâmetros foram avaliados em uma mesma corrida (precisão e exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (precisão e exatidão intercorridas).

3.7.9 Estudo de estabilidade

3.7.9.1 Estabilidade do analito e padrão interno em solução

Foram preparadas soluções padrão do analito e PI em água com pH ajustado com ácido oxálico entre 2,5 e 3,5, sendo analisadas imediatamente após o preparo. Essas soluções foram armazenadas em geladeira a temperatura de 10°C, por 15 dias e analisadas novamente. Os resultados obtidos foram comparados a partir do desvio padrão relativo (DPR%) entre os resultados obtidos

3.7.9.2 Estabilidade do analito e padrão interno em matriz biológica

As amostras de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) (1,0 µg/mL) e alta concentração (CQA) (7,5 µg/mL) foram utilizadas para determinar a estabilidade dos analitos em matriz a partir dos estudos demonstrados abaixo:

- **Análise inicial:** as amostras de CQB e CQA, em triplicata cada, foram extraídas e analisadas logo após o preparo utilizando-se as condições cromatográficas propostas.
- **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento:** as amostras de CQB e CQA, em triplicata cada, foram congeladas por 24h, descongeladas totalmente e congeladas novamente por mais duas vezes completando três ciclos de congelamento/descongelamento. Ao final dos três ciclos as amostras foram extraídas e analisadas utilizando as condições cromatográficas propostas.
- **Estabilidade de curta duração:** as amostras de CQB e CQA, em triplicata cada, foram estocadas a temperatura ambiente por 24h e após este período, extraídas e analisadas utilizando-se as condições cromatográficas propostas.
- **Estabilidade de longa duração:** as amostras de CQB e CQA, em triplicata cada, foram congeladas durante dois meses, a cada mês foram extraídas e analisadas utilizando-se as condições cromatográficas propostas.

- **Estabilidade pós-processamento:** as amostras de CQB e CQA, em triplicata cada, foram extraídas e estocadas a temperatura ambiente por 24h no interior do amostrador do cromatógrafo e após este período analisadas utilizando as condições cromatográficas propostas.

As concentrações das amostras foram determinadas mediante a curva de calibração obtida anteriormente e o desvio padrão relativo obtido de acordo com a médias das concentrações foi comparado com relação ao valor nominal.

3.8 Estudos de Farmacocinética

Os animais empregados no estudo foram selecionados do plantel do canil do LQEPV constituído de 130 cães da raça Beagle, 20 cães participaram do estudo, dentre eles machos e fêmeas, adultos com idade entre 1 e 6 anos e peso corpóreo entre 8 e 12 kg. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais com 10 animais cada: grupo referência (R1 e R2) e grupo teste (T1 e T2), a seleção para esta divisão foi baseada no peso, sexo e funcionamento hepático e renal.

Eles apresentavam bom estado sanitário e nutricional e foram submetidos ao pré-tratamento com vermífugo e vitaminas. Foram incluídos machos e fêmeas com histórico conhecido visando a inclusão de animais que não tenham recebido nenhum medicamento antibacteriano tetracíclico, por pelo menos, um mês antes do início do ensaio. Seis dias antes do tratamento (dia -6) avaliou-se os parâmetros bioquímicos (aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), albumina, creatinina) e hematológicos (hemoglobina, hematócrito e plaquetas) e, somente os cães que apresentaram valores dentro da normalidade foram incluídos no estudo. E um dia antes do tratamento (dia -1) todos os animais tiveram as patas dianteiras tricotomizadas.

Os cães foram mantidos separados durante todo o período experimental em baias totalmente cobertas com parte delas tem telhas transparentes de forma a permitir a entrada de raios solares. O canil foi limpo todos os dias efetuando-se a retirada das fezes, e limpeza com jato de água da superfície do chão.

O tratamento foi feito em dose única para ambos os grupos experimentais (grupo referência e grupo teste). No total foram 20 animais tratados divididos em quatro sub-grupos (R1, R2, T1 e T2) descritos na tabela 6. O tratamento e as coletas de sangue para estudo de farmacocinética foi realizado ao longo de duas semanas. Na primeira, metade dos animais de cada grupo (5 animais) foram medicados com suplemento vitamínico e a formulação contendo doxiciclina (dose única): um grupo foi medicado com comprimido mastigável de doxiciclina e suplemento vitamínico, e o outro, com comprimido de Doxiciclina (Doxifin[®]) e suplemento vitamínico. Na segunda semana procedimento realizado foi semelhante, mas nesta semana os animais não foram medicados com associação do suplemento vitamínico.

Tabela 6. Esquema de tratamento dos animais do estudo.

	Grupos experimentais			
	Referência		Teste	
	R1	R2	T1	T2
Princípio Ativo	Doxiciclina		Doxiciclina	
Apresentação	Doxifin comprimido 100 mg		Comprimido mastigável 100 mg	
Dose	10 mg/Kg		10 mg/Kg	
Administração	Oral		Oral	
Posologia	Dose única		Dose única	
Suplemento vitamínico	Administrado concomitantemente	Não administrado	Administrado concomitantemente	Não administrado
Período tratamento	1ª semana	2ª semana	1ª semana	2ª semana

Para a determinação do perfil plasmático das formulações foram coletadas amostras de sangue de cada animal nos seguintes tempos: 0, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 600, 1440, 2160, 2880, 3600, 4320, 5040 e 5760 minutos.

Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos bioquímico com coagulante EDTA de 4mL e um dispositivo asepto scalp 23G acoplado a uma seringa de 5 mL. Trinta minutos antes de cada tempo de coleta uma formulação anestésica tópica foi administrada nas patas dianteiras de cada animal, com o intuito de diminuir a dor da picada e garantir o bem-estar dos animais durante todo o procedimento de coleta. Após coletadas as amostras foram centrifugadas. O plasma foi separado em microtubos com duas alíquotas de 500 µL que foram armazenados em freezer (-20 °C) até o momento da análise.

Os valores de concentração plasmática encontrados foram analisados individualmente para cada animal. A construção da curva de concentração plasmática versus tempo foi realizada em Excel, através do pKSolver, um programa de suplemento disponível gratuitamente no Microsoft Excel para análise de dados farmacocinéticos. Os parâmetros farmacocinéticos determinados foram: concentração máxima absorvida (C_{max}), tempo onde ocorre o C_{max} (t_{max}), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), área sobre a curva de zero até a última concentração possível de ser quantificada (ASC 0-t) e área sobre a curva de zero a infinito (ASC 0- ∞). Os resultados foram expressos em relação à média \pm CV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do comprimido mastigável de Doxiciclina

A formulação mastigável, desenvolvida pelo grupo do laboratório (setor de Farmacométrie; LQEPV-UFRJ), apresentou-se como um comprimido macio e com boa integridade (Figura 10). Esta formulação possui a vantagem de ser desintegrada mecanicamente pela boca do animal durante a mastigação, além disso uma formulação oral apreciada pelo animal favorece a aceitação voluntária dos cães pelos medicamentos, diminuindo o estresse do animal no momento da administração (SONG et al., 2016).

A aparência macia do comprimido, assim como, sua boa integridade é atingida com o uso de goma gel base como agente aglutinante. A simplicidade de obtenção e custo dos ingredientes, além da fácil execução do preparo da formulação, a tornam uma boa proposta para cães que rejeitam as formas sólidas convencionais, como comprimidos (VILLANOVA; GUEDES; SEVERI, 2014).



Figura 10. Formulação oral na forma de comprimido mastigável da Doxiciclina com dosagem de 100 mg/unidade.

4.1.1 Palatabilidade do comprimido mastigável de Doxiciclina

Uma formulação mastigável para cães necessita apresentar atrativos suficientes para ser aceita pelo animal, cheiro, sabor, aparência, estes são fatores que influenciam na aceitação do medicamento.

Dentre os ingredientes utilizados na formulação desenvolvida, dois afetam o sabor e odor, são eles: ração (excipiente) e doxiciclina (princípio ativo). A ração, componente de maior percentual do comprimido mastigável oferece um atrativo para o animal tanto pelo odor quanto pelo sabor, ainda para aumentar o efeito atrativo foi adicionado o flavorizante de bacon que também auxilia no caráter palatável. Enquanto a doxiciclina, mesmo não possuindo odor característico, apresenta sabor amargo (BARROS, 2015), um ponto negativo para a palatabilidade da formulação.

A avaliação da palatabilidade é demonstrada a seguir, a partir da tabela 7 que mostra a legenda explicativa da numeração (Score) referente a cada classificação com seu respectivo detalhamento e tabela 8 onde está discriminado a classificação de cada animal para cada formulação.

Tabela 7. Classificação das formulações de acordo com numeração de 1 a 6 (Score) que define o nível de palatabilidade e as observações estabelecidas para cada numeração.

Score	Classificação	Detalhe
1	Excelente	Lamber, engolir
2	Bom	Engolir, cara feia
3	Médio	Pegar, largar
4	Ruim	Cheirar, não pegar
5	Péssimo	Babar, tossir, vomitar
6	N.A.	Recusar

N.A. – não aplicável

Tabela 8. Avaliação das três formulações propostas no teste de palatabilidade de acordo com numeração de 1 a 6 (Score segundo nível de palatabilidade).

		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
ID		Score			
		F1	F2	F3	F4
Grupo 1	416929	1	1	1	1
	280610	3	1	1	1
	458721	4	2	1	1
	8601	2	1	1	1
	503621	1	1	1	1
	503420	3	1	1	1
		F2	F3	F1	F2
Grupo 2	35813	2	3	2	3
	489034	1	3	2	1
	44118	4	1	1	1
	596148	4	2	1	3
	503411	3	3	1	3
	503395	3	3	3	3
		F3	F1	F2	F3
Grupo 3	288786	1	3	2	1
	28106	1	1	1	2
	288429	2	2	1	1
	288373	1	1	1	1
	503622	1	1	1	1
	503400	3	1	1	3

A avaliação da palatabilidade demonstrou que, no primeiro dia metade dos animais rejeitaram o comprimido mastigável (Scores 3 e 4) independente de sua composição. A rejeição no dia 1 pode ser presumida pela modificação da rotina do animal, a inserção de um alimento no qual ele não está acostumado. No intuito de diminuir o comportamento de estranheza do animal ao receber a medicação, no dia 4 os animais receberam a mesma formulação do dia 1.

A possibilidade dos animais não serem habituados a receber formulações mastigáveis foi observada principalmente na análise do Grupo 1 onde 3 dos 6 animais do grupo recusaram (Score 3 ou 4) a formulação F1, fato contraditório uma vez que esta é a formulação placebo, ou seja, só possui ração e goma gel base, ingredientes bastante apreciados pelos animais. Em contrapartida, todos os animais desse grupo aceitaram prontamente (Score 1) a formulação F1 no Dia 4.

A intenção de todos os animais receberem todas as formulações é possibilitar a realização da comparação intra-animal, isto é, características como sexo e idade são eliminados como variáveis que poderiam influenciar na aceitação do medicamento, possibilitando uma avaliação mais cuidadosa da formulação proposta. Através da tabela 9 podemos verificar a aceitação e rejeição de acordo com o Score estabelecido para análise de palatabilidade para as 3 formulações testadas.

Tabela 9. Número de indivíduos por Score e porcentagem de aceitação e rejeição para cada umas das três formulações.

		Nº de animais/score			Faixa de porcentagem	
		F1	F2	F3	% de animais/score	% de aceitação ou % de rejeição
Aceitação	Excelente	15	13	15	54,2 – 62,5	66,7 - 79,2
	Bom	4	3	3	12,5 – 16,7	
Rejeição	Médio	4	6	6	16,7 – 25,0	20,8 – 33,3
	Ruim	1	2	0	4,20 – 8,30	
Total de animais		24	24	24		

Dentre os animais que participaram do teste de palatabilidade, a aceitação foi maior que a rejeição para todas as formulações, independentemente de sua composição. A aceitação e rejeição das 3 formulações separadamente foi muito similar, indicando que os animais que não aceitaram, qualquer um dos comprimidos mastigáveis, não foi devido ao sabor amargo da doxiciclina, mas sim, por características individuais de cada cão. Além disso, também é possível verificar que nenhuma das formulações tiveram pontuação péssima, ruim (Score 5 e 6) ou não aplicável (N.A).

Ou seja, mesmo sendo relatado na literatura o sabor amargo da DOX, isto não foi determinante para que o animal rejeitasse a medicação. A confirmação da palatabilidade das duas formulações que contêm doxiciclina é extremamente importante, uma vez que a palatabilidade é uma característica determinante na adesão ao tratamento e conseqüentemente melhora a eficácia terapêutica (PAYNE-JOHNSON et al., 2006).

Pizzato e Domingues consideram que a palatabilidade entre as formulações é confirmada quando a quantidade consumida de uma formulação não difere em duas vezes mais que a quantidade consumida da outra formulação (PIZZATO; D. A.; DOMINGUES; J. L., 2008). Portanto, é possível confirmar que a palatabilidade entre as formulações não difere, pois a quantidade consumida para as três formulações bastante semelhante (62,5 %, 54,2 % e 62,5 %), ou seja, tanto o comprimido mastigável com doxiciclina (F3) e o comprimido mastigável com doxiciclina e mascarante de sabor (F2) mostraram-se palatáveis, a quantidade consumida dessas formulações com doxiciclina não foram duas vezes inferior a quantidade consumida de placebo.

A escolha da formulação foi feita a partir da simplicidade na sua elaboração e custo, portanto, a formulação escolhida para o tratamento dos animais na avaliação do estudo farmacocinético foi F3.

4.2 Controle de qualidade do comprimido mastigável de Doxiciclina

4.2.1 Determinação de peso médio

No ensaio de determinação de peso (tabela 10) nenhuma das 20 unidades, pesadas individualmente, se apresentou fora da faixa de variação especificada pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA, 2010), que determina um limite de variação de $\pm 5\%$ em relação ao peso médio (PM) para formulações sólidas de 250mg ou mais.

Tabela 10. Determinação de peso de comprimidos mastigáveis de Doxiciclina.

Comprimido mastigável	Massa (g)
1	1,7552
2	1,7535
3	1,7577
4	1,7419
5	1,7419
6	1,7442
7	1,7518
8	1,7469
9	1,7522
10	1,7554
11	1,7523
12	1,7597
13	1,7570
14	1,7529
15	1,7482
16	1,7557
17	1,7539
18	1,7553
19	1,7512
20	1,7537
Média	1,7527
Faixa de variação $\pm 5\%$ do PM	1,6651 – 1,8403

4.2.2 Uniformidade de conteúdo

Os comprimidos mastigáveis de Doxiciclina, ao serem analisados individualmente, demonstraram que a distribuição do fármaco na formulação é homogênea, ou seja, os comprimidos mastigáveis apresentaram uniformidade entre si cumprindo os critérios de aceitação estabelecidos nos métodos gerais descritos na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (FARMACOPÉIA, 2010) para uniformidade de doses unitárias. A partir da tabela 11 é possível verificar o valor de aceitação inferior a 15 % (valor máximo aceito pela legislação).

Tabela 11. Uniformidade de doses unitárias de comprimidos mastigáveis de doxiciclina.

Comprimido mastigável	(%)
1	94,160
2	101,59
3	90,920
4	99,360
5	92,800
6	94,520
7	94,750
8	96,010
9	94,980
10	96,920
Média	95,600
DP	3,0900
VA	11,820

4.1.3 Teste de Dissolução

Como descrito na metodologia (item 3.4.1) as duas formulações orais foram submetidas ao ensaio de dissolução descrito pela farmacopeia americana 33 (USP, 2010), no qual a monografia existente é destinada a comprimidos orais de doxiciclina de uso humano, mas, como não há monografia que descreva o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas de uso veterinário para doxiciclina, este método de dissolução foi escolhido para realização desse ensaio.

As comparações dos ensaios de perfil de dissolução do comprimido mastigável de doxiciclina e comprimido (Doxifin[®]) estão demonstradas na figura 11.

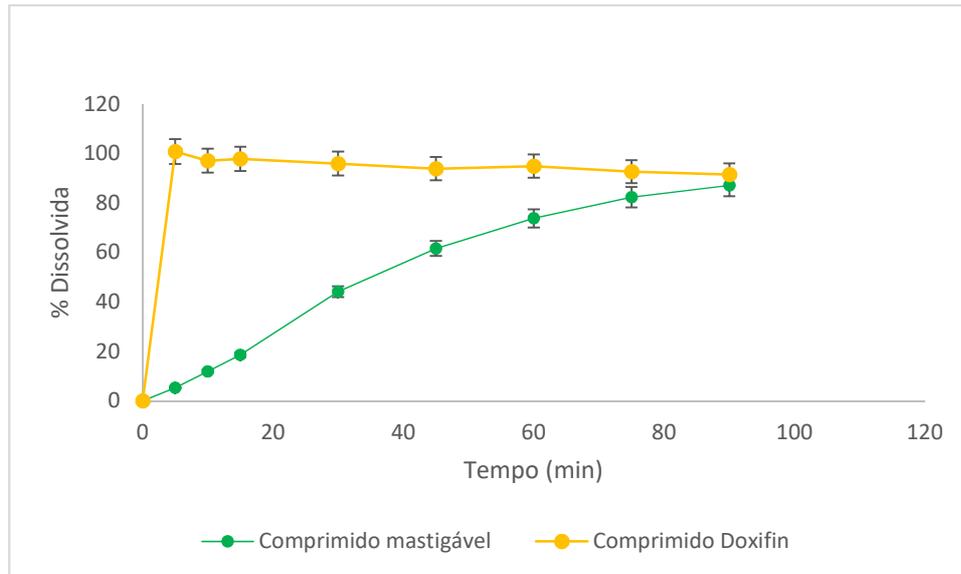


Figura 11. Perfil de dissolução comprimido mastigável de Doxiciclina e comprimido referência de Doxiciclina (Doxifin[®]).

O método farmacopeico existente para dissolução de comprimido revestido de doxiciclina de uso humano (USP, 2010) quando utilizado para comprimidos de uso veterinário apresentou uma rápida dissolução, em 5 minutos, o comprimido Doxifin encontra-se completamente dissolvido (100 % de dissolução). Entretanto, essa velocidade de dissolução não é percebida no comprimido mastigável, que apresenta um perfil de dissolução bem mais lento, 80 % de dissolução foi obtido em 60 minutos. A diferença nos perfis de dissoluções das duas formulações de uso veterinário se dá porque as formulações são diferentes, uma contém gelatina em sua composição (comprimido mastigável) fazendo com que a dissolução seja mais lenta, a gelatina em contato com o meio de dissolução hidrata-se (incha) até começar a ser dissolvida. Porém, mesmo sendo esperado que o comprimido mastigável apresentasse uma dissolução mais lenta, era esperado que o perfil de dissolução do comprimido revestido fosse semelhante ao comprimido revestido de uso humano, mas como não são descritos os excipientes o que é possível inferir que esse resultado indica que elas não possuem perfis de dissolução equivalentes, ou seja, fraca correlação entre as curvas. Portanto, provavelmente o método da farmacopeia americana para doxiciclina de uso humano não se aplica para formulações de uso veterinário

A escassez de métodos de dissolução para medicamentos veterinários é um ponto importante, devendo ser suprida através do desenvolvimento de métodos para produtos veterinários. A criação dessas metodologias deve atender as especificações descritas no guia da Anvisa para desenvolvimento de métodos de dissolução (ANVISA, 2018).

4.2 Desenvolvimento da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV

4.2.1 Extração Líquido-Líquido

A ELL se baseia na mistura de duas fases imiscíveis, onde cada fase compete pelo analito que deve apresentar uma solubilidade apreciável no solvente extrator para que assim ocorra o processo de separação por partição, ou seja, os analitos são transferidos da matriz para o solvente extrator.

Esta técnica torna-se difícil para extração de moléculas de elevada polaridade, como é o caso da doxiciclina. A transferência de uma substância polar da fase aquosa para fase orgânica é penosa pois as características da fase aquosa e de uma substância polar são similares o que dificulta a partição. A escolha de um solvente extrator que seja imiscível em fase aquosa e ainda apresente certa afinidade com o soluto polar também é árdua, mas essa escolha pode garantir que a eficiência da extração seja adequada.

Apesar disso, é um método clássico, pouco dispendioso, e também bastante reportado em artigos, em diferentes matrizes (BÖCKER, 1980; FARIN et al., 1999; GASTEARENA et al., 1993; RUZ et al., 2004; SANTOS et al., 1996; SELVADURAI; MEYYANATHAN, 2010; SUNARIĆ; ET.AL, 2013). A utilização dessa técnica para extração de doxiciclina foi utilizada.

4.2.2 Escolha do anti-coagulante e volume de extração

Os valores obtidos são apresentados abaixo, figura 12, para ambos os tubos os valores de exatidão foram acima do valor estipulado pela norma. A precisão apresentou resultados superiores a 15 % para extração seriada em pelo menos um dos dias de ensaio (dia 1 e/ou dia 2), tanto para o tubo de heparina quanto para o tubo de EDTA. Enquanto a extração direta apresentou valores abaixo de 15 % para ambos os tubos. Também foi avaliada a precisão intermediária (inter-dia) e esta foi superior a 15 % para todos os dois tubos, assim como para os dois tipos de extração (seriada e direta).

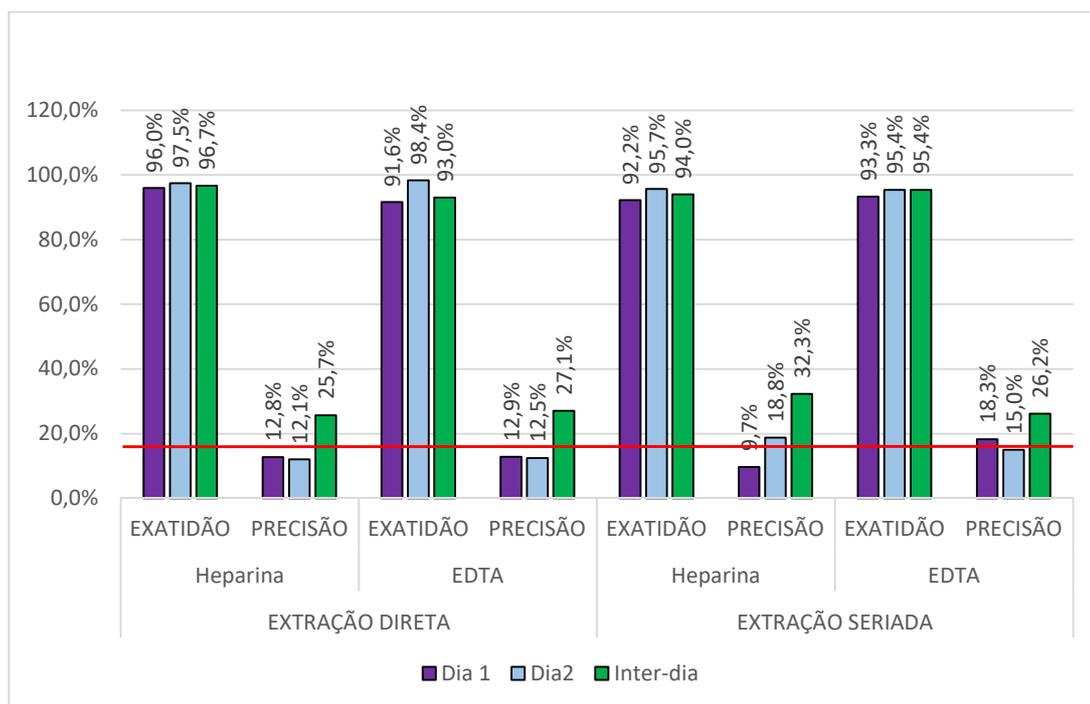


Figura 12. Resultados de precisão e exatidão, expressos em EPR% e CV%, respectivamente, para o método de extração: Extração Líquido –Líquido, variando-se o tubo coletor, extração direta e seriada.

No entanto, mesmo as técnicas não apresentando precisão e exatidão adequadas, visando facilitar a escolha de um tipo de tubo e ainda a escolha entre extração direta ou seriada e, assim dar início a elaboração de uma metodologia, foi verificado se o tipo de tudo e tipo de extração impactavam significativamente a resposta do ensaio, realizando-se testes estatísticos, teste de F-Snedecor e teste t-Student.

Os testes estatísticos foram feitos com as quatro combinações possíveis como mostram a tabela 12.

Tabela 12. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os diferentes tipos de tubo coletor e tipo de extração.

Teste de F-Snedecor				
Comparações entre tubos				
Tubo Heparina	Tubo EDTA	F calculado	F tabelado	p-value
Extração Direta ^a	Extração Direta ^b	4,718	3,179	0,0152
Extração Seriada ^a	Extração Seriada ^a	1,743	3,179	0,210
Comparações entre extrações				
Extração Direta	Extração Seriada	F calculado	F tabelado	p-value
Tubo heparina ^a	Tubo heparina ^a	2,172	3,179	0,132
Tubo EDTA ^a	Tubo EDTA ^b	3,787	3,179	0,0301
Teste t-Student				
Comparações entre tubos				
Tubo Heparina	Tubo EDTA	F calculado	F tabelado	p-value
Extração Direta ^a	Extração Direta ^b	3,371	1,771	0,00251
Extração Seriada ^a	Extração Seriada ^a	0,519	1,734	0,305
Comparações entre extrações				
Extração Direta	Extração Seriada	F calculado	F tabelado	p-value
Tubo heparina ^a	Tubo heparina ^b	4,095	1,734	0,000340
Tubo EDTA ^a	Tubo EDTA ^b	4,227	1,734	0,000254

Através dos resultados estatísticos obtidos a partir da comparação entre as variâncias (teste de F-Snedecor) verificou-se que a utilização de tubos diferentes na extração direta apresentava diferença significativa na precisão do método, enquanto na extração seriada a utilização de tubos diferentes não mostrou efeito importante sobre a precisão do método. Avaliando-se o tipo de extração (direta ou seriada) no tubo de heparina e EDTA separadamente, verificou-se que para o tubo de heparina não há impacto sobre a precisão do método, ao passo que para o tubo de EDTA este impacto na precisão do método é comprovado.

A partir da análise do teste de F-Snedecor foi feito o teste t-Student para verificar se as médias são estatisticamente iguais ou diferentes, consequência que tem efeito sobre o resultado do ensaio. O teste t-Student mostrou que a utilização de tubos diferentes na extração seriada não tem um efeito significativo sobre o resultado do ensaio, enquanto na extração direta há efeito significativo. A comparação entre extração direta e seriada para o tubo de heparina, e EDTA, também mostrou influência sobre o ensaio. Apesar dos valores de exatidão e precisão estarem fora da faixa permitida para todas as extrações, essas comparações forneceram informações importantes.

Teoricamente, a extração seriada deveria apresentar um erro menor que a extração direta, observação não confirmada para o tubo de EDTA. Além disso, na extração seriada, a precisão obtida para ambos os tubos, assim como a realização da extração foi de difícil execução pois o pequeno volume de solvente extrator e a formação de emulsão prejudicou a

separação entre as fases, fazendo com que a extração seriada perdesse em exatidão e precisão. Dessa forma, a escolha feita foi pela extração direta.

Entre os tubos de heparina e EDTA utilizados na ELL direta, diferentes estatisticamente, o tubo de EDTA apresentou valores de exatidão melhores. Ademais, uma vez que as tetraciclina são quelantes de cátions divalentes, presentes no sangue, como cálcio e magnésio, este frasco foi indicado em detrimento do outro, visando minimizar o problema de complexação, e também seu custo/benefício é menor quando comparado ao tubo de heparina.

4.2.3 Escolha do pH para extração

Devido à alta polaridade da doxiciclina o mecanismo de partição através da extração líquido-líquido é prejudicado. Diante disso, este problema pode ser amenizado pelo emprego de pares iônicos. Monitorar o pH durante a extração também é interessante uma vez que ele define, por exemplo, se a molécula está protonada ou não, dessa forma é possível verificar que a solubilidade da doxiciclina na fase orgânica aumenta de acordo com o pH.

Visando favorecer a extração da doxiciclina, a mudança do pH do meio foi realizada. As extrações foram feitas abaixo do primeiro pKa, pH = 3,0, utilizando-se solução tampão citrato, o qual foi reportado ter sido usado na determinação de tetraciclina em leite e tecido bovino (CINQUINA *et al.*, 2003), além disso optar por este tampão foi uma tentativa de mimetizar alguns fenômenos tamponantes existentes no corpo humano. Porém, o erro padrão relativo(exatidão) foi superior a 95 %, pior inclusive que a extração feita sem alteração do pH e por isso a extração foi feita em um único dia. Assim, a outra solução tampão foi avaliada. O tampão acetato foi usado também com pH 3,0 e entre o primeiro e segundo pKa, pH 6,8, utilizando-se solução tampão de acetato de sódio/ácido acético.

A figura 13 apresenta os valores obtidos para exatidão e precisão com a alteração do pH.

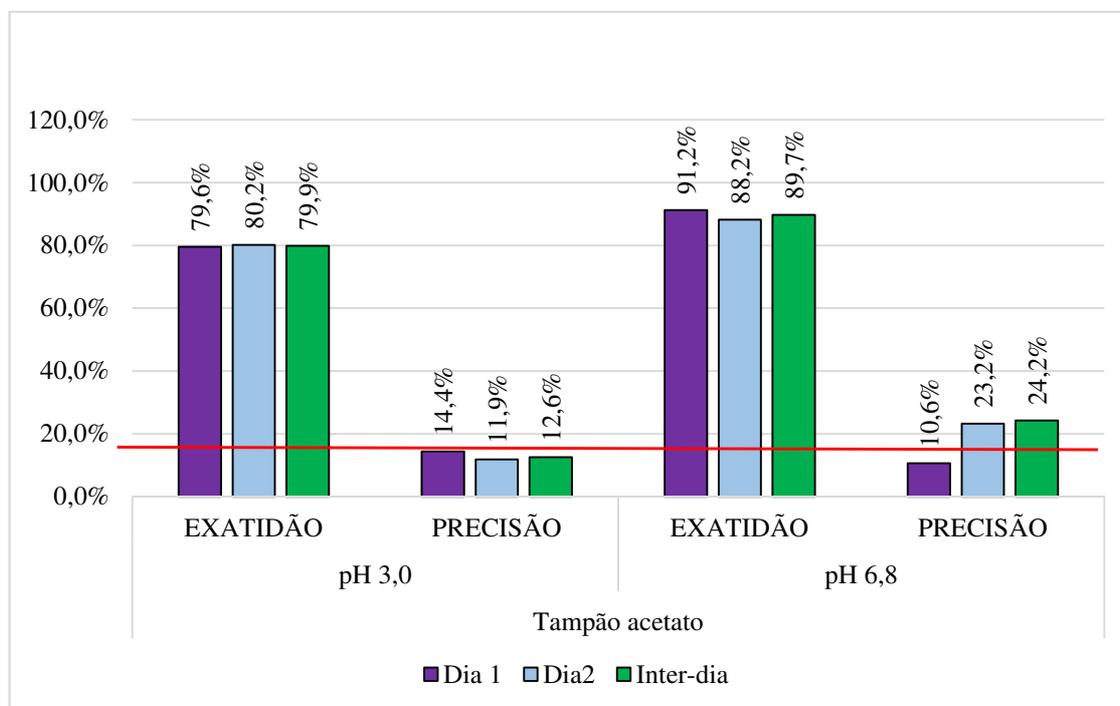


Figura 13. Resultados de exatidão e precisão, expressos em EPR% e CV%, respectivamente, para o método de extração: Extração Líquido-Líquido, variando-se o pH do meio extrator.

O controle do pH com solução tampão proporcionou valores melhores de exatidão somente para o tampão acetato, principalmente para o pH 3,0. A exatidão do tampão acetato com pH 6,8 foi melhor comparada à extração sem alteração do pH, mas inferior comparada ao pH 3,0. Os testes estatísticos, tabela 13, foram realizados somente para comparação entre o tampão acetato pH 3,0 e pH 6,8 para confirmar se a alteração é significativa estatisticamente ou não, mesmo com respostas das extrações fora da faixa permitida pela ANVISA.

Tabela 13. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os diferentes valores de pH da solução tampão acetato.

Teste de F-Snedecor				
Comparações entre valores de pH				
Tampão acetato	Tampão acetato	F calculado	F tabelado	p-Value
pH = 3,0 ^a	pH = 6,8 ^a	1,018	3,179	0,489
Teste t-Student				
Comparações entre valores de pH				
Tubo Heparina	Tubo EDTA	F calculado	F tabelado	p-Value
pH = 3,0 ^a	pH = 6,8 ^b	8,691	1,735	3,69E-08

Mediante esses resultados é possível verificar que a utilização da solução tampão acetato com pH 3,0 favorece a exatidão do método, mas a fim de demonstrar que a alteração de pH influencia significativamente ou não na metodologia os testes de F-Snedecor e t-Student foram realizados, tabela 14, a comparação foi feita entre os dados com alteração de pH usando solução tampão acetato pH 3,0 e os dados da extração direta com tubo de EDTA.

Tabela 14. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os valores de da análise sem alteração de pH e com alteração de pH, para pH 3,0 com solução tampão.

Teste de F-Snedecor				
Comparações entre extrações ELL com e sem adição de tampão				
ELL	ELL	F calculado	F tabelado	p-Value
Com tampão acetato ^a	Sem tampão acetato ^a	0,604	0,314	0,354
Teste t-Student				
Comparações entre extrações ELL com e sem adição de tampão				
ELL	ELL	F calculado	F tabelado	p-Value
Com tampão acetato ^a	Sem tampão acetato ^b	13,142	1,740	5,94E-10

Os melhores valores obtidos na exatidão da extração com mudança no pH do meio têm efeito significativo sobre o resultado do ensaio.

4.2.4 Precipitação de proteínas

Trata-se de uma ferramenta mencionada na literatura, onde a utilização de ácidos proporciona a precipitação de proteínas o que na teoria melhora a eficiência da extração. A figura 14 apresentam os valores obtidos para exatidão e precisão com precipitação de proteínas.

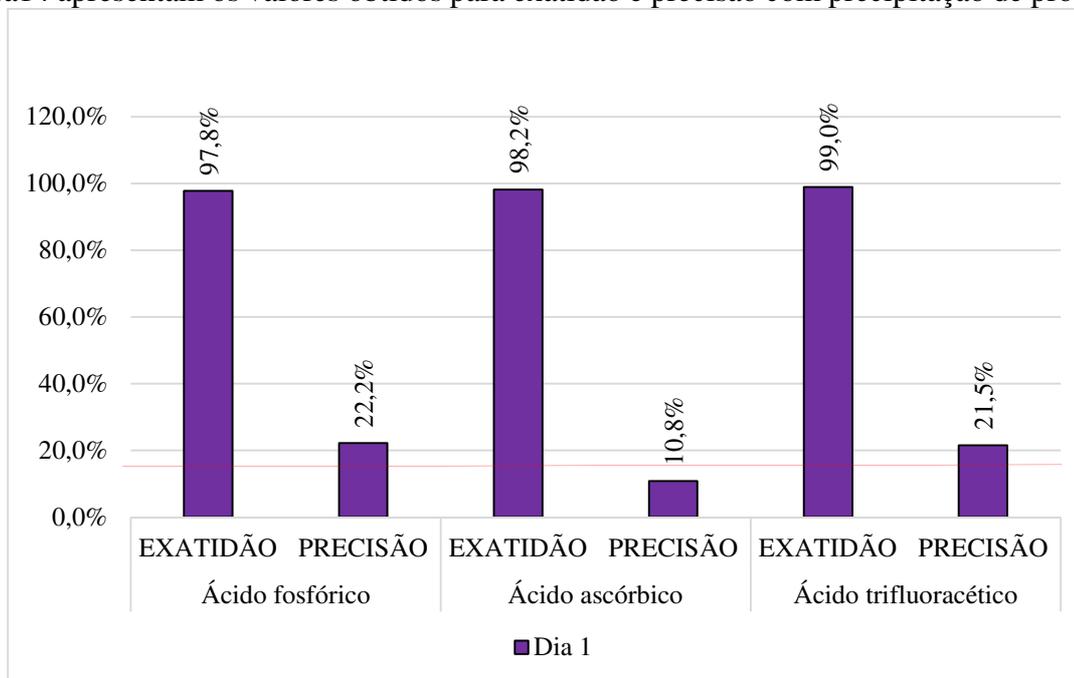


Figura 14. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração Líquido –Líquido com precipitação de proteína através da adição de ácidos.

Mas os resultados foram desfavoráveis, a exatidão foi abaixo de 3 % e por isso a análise foi feita em um único dia. É provável que ao precipitar proteínas, o fármaco tenha sido carregado juntamente com o precipitado e com isso o resultado da extração tenha sido tão insatisfatório.

Outra maneira de precipitar proteínas é com adição do solvente extrator, como por exemplo o metanol e a acetonitrila. Estes solventes podem ser utilizados como solvente extrator para ELL/PBT, como são solventes miscíveis em fase aquosa a separação ocorre através da diferença de temperatura de fusão. A temperatura de fusão do metanol é $-98\text{ }^{\circ}\text{C}$, assim além do solvente precipitar as proteínas presentes no plasma que ajuda na limpeza da amostra, a mistura é congelada e a fase orgânica fica ainda no estado líquido e pode ser separada para análise cromatográfica. O gráfico abaixo (Figura 15) mostra os valores obtidos para precisão e exatidão desta extração.

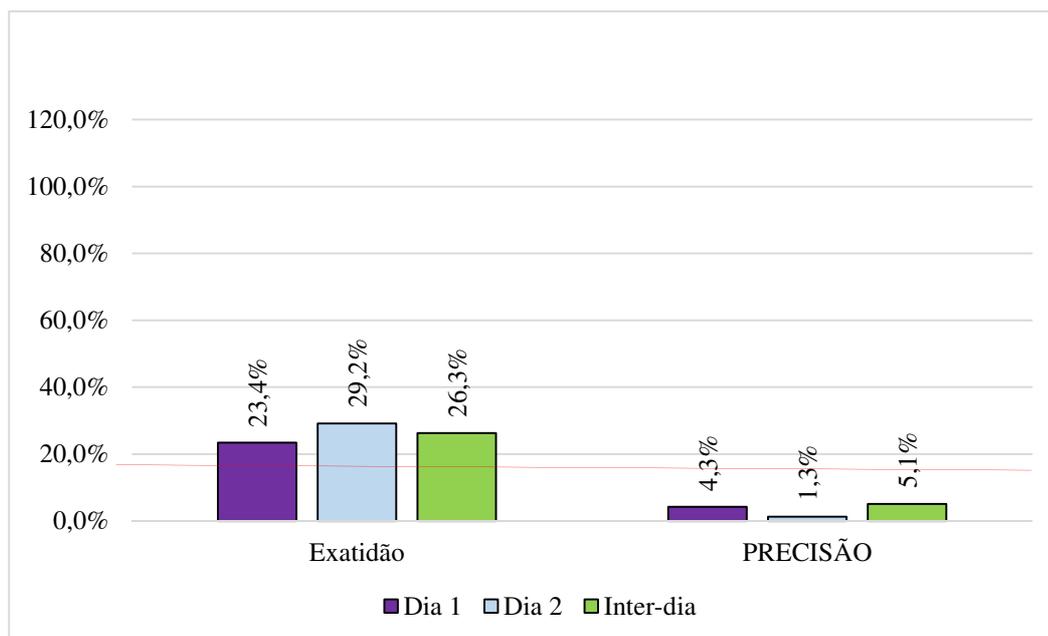


Figura 15. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração Líquido –Líquido com partição em baixa temperatura.

Os valores de exatidão foram acima do valor adequado de $\pm 15\%$, mas ainda assim os erros obtidos através dessa técnica foram muito inferiores a técnica de extração líquido-líquido com e sem mudança de pH (valores médios de EPR iguais a 93 % e 80 %, respectivamente) e a técnica de precipitação de proteínas com ácidos (valor médio de EPR igual a 98 %). Além dos valores de exatidão não serem tão discrepantes do valor regulamentado, os valores de precisão apresentaram-se abaixo de 15 %. Espera-se que com a adição da OTC a relação entre as áreas (área doxíciclina/área padrão interno) minimize possíveis erros durante a extração e assim, os valores de exatidão irão se enquadrar na faixa estabelecida pela Anvisa.

Com este resultado promissor, a tentativa de concentrar a amostra e assim possibilitar a quantificação de níveis mais baixos do analito foi realizada. A concentração da amostra foi feita através de um concentrador a vácuo, sem aquecimento pois a DOX é extremamente sensível ao calor sofrendo oxidação.

Durante este procedimento de concentração, foi verificado que a primeira tentativa de concentração (Concentração – Tipo 1) apresentou valores de exatidão menores que os obtidos sem esta etapa, suspeitou-se que a perda poderia ser proveniente da degradação da DOX pela luz. Então, a segunda tentativa (Concentração – Tipo 2) foi realizada, a tampa do equipamento foi coberta externamente a fim de impedir que alguma fonte de luz oxidasse o analito, os valores de EPR aumentaram (Concentração – Tipo 1 cerca de 43 % e Concentração – Tipo 2 cerca de 39 %), inferiores aos valores obtidos sem a etapa de concentração (Figura 16), isto indica que a etapa de concentração gera perda na exatidão provavelmente ocasionado pela oxidação do analito mesmo com os cuidados prévios para impedir que isto ocorresse. É possível realizar esta afirmação pela coloração do analito após a concentração, uma coloração marrom escura.

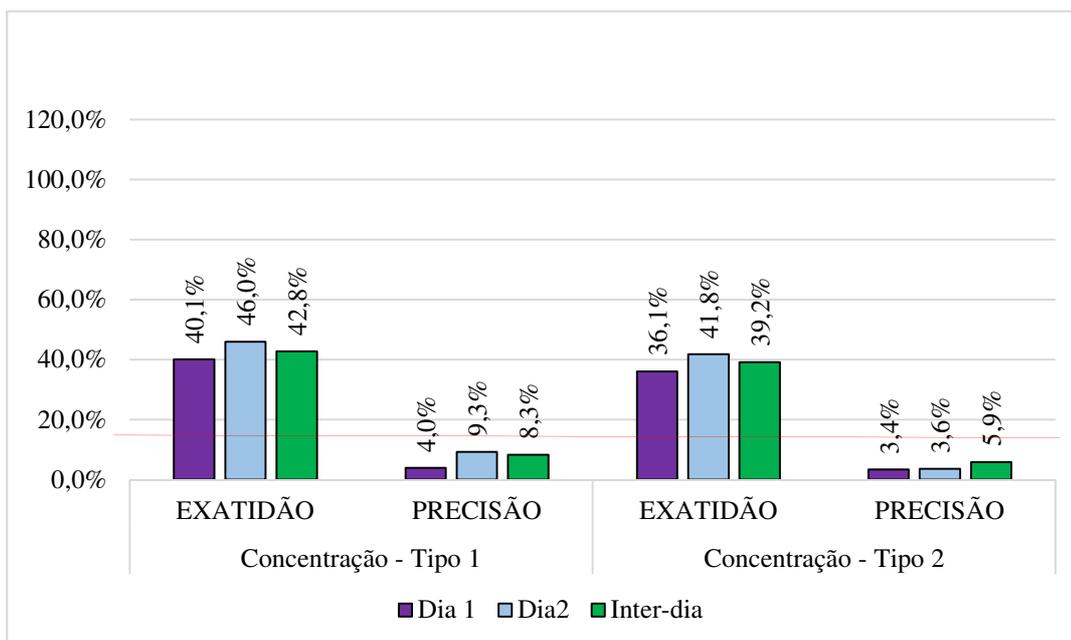


Figura 16. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração Líquido –Líquido com partição em baixa temperatura, variando-se a forma de concentração utilizando speedvac.

4.2.5 Extração em fase sólida (EFS)

A EFS foi feita com dois tipos de fase estacionária, uma fase polimérica e outra fase reversa (C18), ambas utilizadas para extração de analitos em matrizes biológicas como o plasma. Como na ELL a precipitação de proteínas foi eficaz para aumentar os valores obtidos para exatidão, este procedimento também foi realizado para extração em fase sólida como mostra a figura 17.

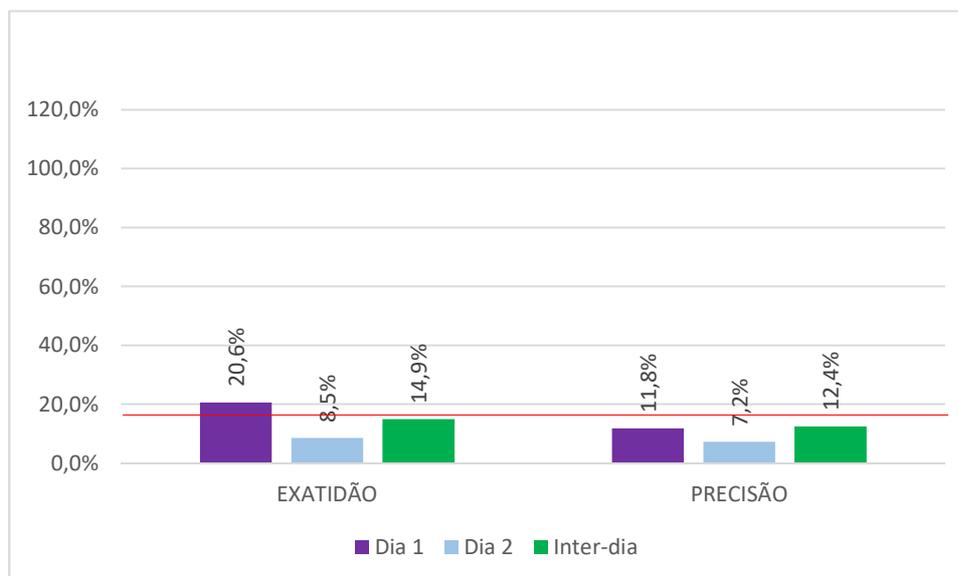


Figura 17. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração em Fase Sólida, cartucho com fase polimérica (OASIS).

Neste caso a PP associada a EFS fez com que a exatidão diminuísse, o valor médio ficou acima de 15 % e os valores de precisão ficaram acima de 15%, desta forma para este tipo de extração a PP não foi satisfatória para melhorar o preparo das amostras.

A fase reversa (C18) não é descrita na literatura como fase de cartucho no preparo de amostras contendo doxiciclina, porém como trata-se da mesma FE da coluna cromatográfica utilizada na separação esta fase também foi avaliada. A partir da observação da figura 16 é possível inferir que os valores obtidos tanto para exatidão quanto para precisão foram semelhantes a fase polimérica.

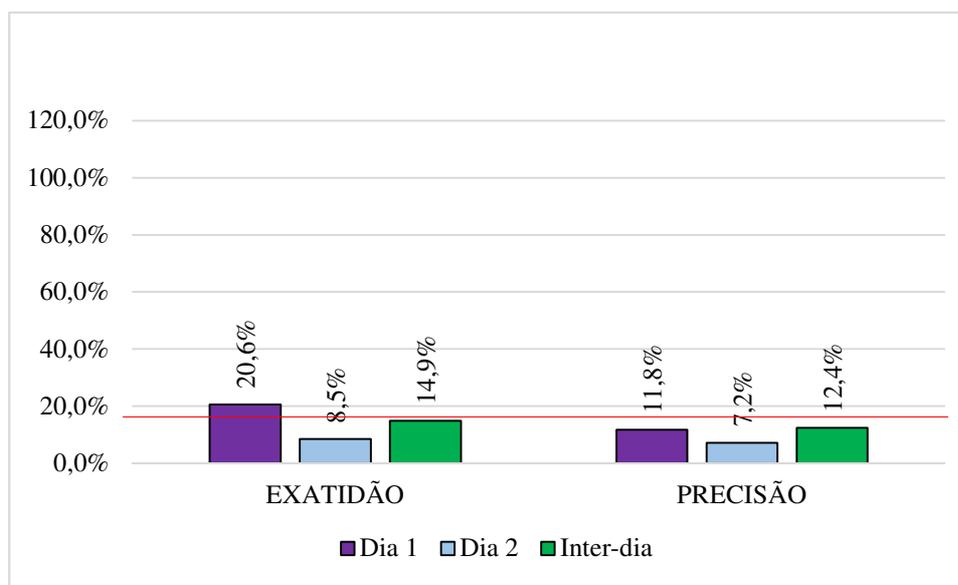


Figura 18. Resultados de exatidão para o método de extração: Extração em Fase Sólida, cartucho com fase C18 (Supelco).

A dedução feita somente pode ser confirmada a partir de testes estatísticos, uma vez que o gráfico acima (Figura 18) não serve como ferramenta para confirmar que as duas FE apresentam resultados iguais estatisticamente. A tabela 15 mostra os resultados obtidos nos testes realizados e comprova a semelhança estatística entre as fases estacionárias.

Tabela 15. Resultados do Teste de F-Snedecor para avaliação da homogeneidade entre as variâncias e teste t-Student para comparação entre as médias +/- desvios entre os diferentes valores obtidos para fase polimérica e C18.

Teste de F-Snedecor				
Comparações entre extrações				
EFS	EFS	F calculado	F tabelado	p-Value
Fase polimérica ^a	Fase octadecil (C18) ^a	2,352	2,317	0,0471
Teste t-Student				
Comparações entre extrações				
EFS	EFS	F calculado	F tabelado	p-Value
Fase polimérica ^a	Fase octadecil (C18) ^a	5,421	1,699	3,936E-06

A partir dos resultados obtidos nessa etapa de desenvolvimento da metodologia bioanalítica é possível afirmar que mesmo a ELL não atendendo aos parâmetros de exatidão e precisão, através dessa técnica foi possível avaliar a influência: do tubo de coleta, da extração seriada ou direta e ainda do pH. Enquanto, a ELL/PBT e a EFS utilizando fase polimérica e fase reversa (C18) apresentaram valores próximos ou dentro da faixa estabelecida pela legislação para os dois parâmetros aqui avaliados. Porém, a tentativa de concentração do analito após a extração, causou um maior EPR (perda na exatidão), isso provavelmente é consequência dos problemas de estabilidade da DOX frente a oxidação. Vale ressaltar que todos estes resultados foram realizados com base, somente, na resposta do analito (recuperação absoluta), ou seja, até este momento o PI não foi adicionado. O próximo passo foi a adição do PI e avaliação da resposta relativa a razão do analito e padrão interno (recuperação relativa), verificando que a OTC melhorou os resultados para ELL/PBT e EFS (faixa de 85 – 115 %). Desse modo, a ELL/PBT foi escolhida por sua simplicidade durante a execução da extração, menor custo, menor gasto de solventes orgânicos diferentemente da EFS.

4.3 Ajustes da metodologia bioanalítica para quantificação de Doxiciclina em plasma canino por CLAE-UV

Visto que a ELL/PBT foi eficaz para determinação de DOX em plasma e de acordo com os resultados obtidos no preparo de amostras para esta técnica, a mesma foi escolhida como procedimento para o desenvolvimento do método bioanalítico. Nesta etapa, as amostras foram preparadas com DOX e padrão interno (oxitetraciclina) em uma faixa de trabalho de menor concentração, sendo extraídas para avaliação da precisão, exatidão e seletividade.

As condições cromatográficas iniciais usadas nessa etapa foram as mesmas utilizadas na análise de produto acabado (análises referentes ao controle físico-químico do comprimido mastigável, item 3.4.2), e outros dois comprimentos de onda foram monitorados: 350 (SUNARIĆ et al., 2013) e 357 nm (BÖCKER, 1980; FARIN et al., 1999; ROMEU et al., 2007).

Porém, verificou-se que nessas condições o método não era seletivo para OTC, isto é, encontrou-se resposta de pico interferente maior que 5 % da resposta do PI. Além disso, a linha de base no comprimento de onda de 270 nm é instável (Figura 19).

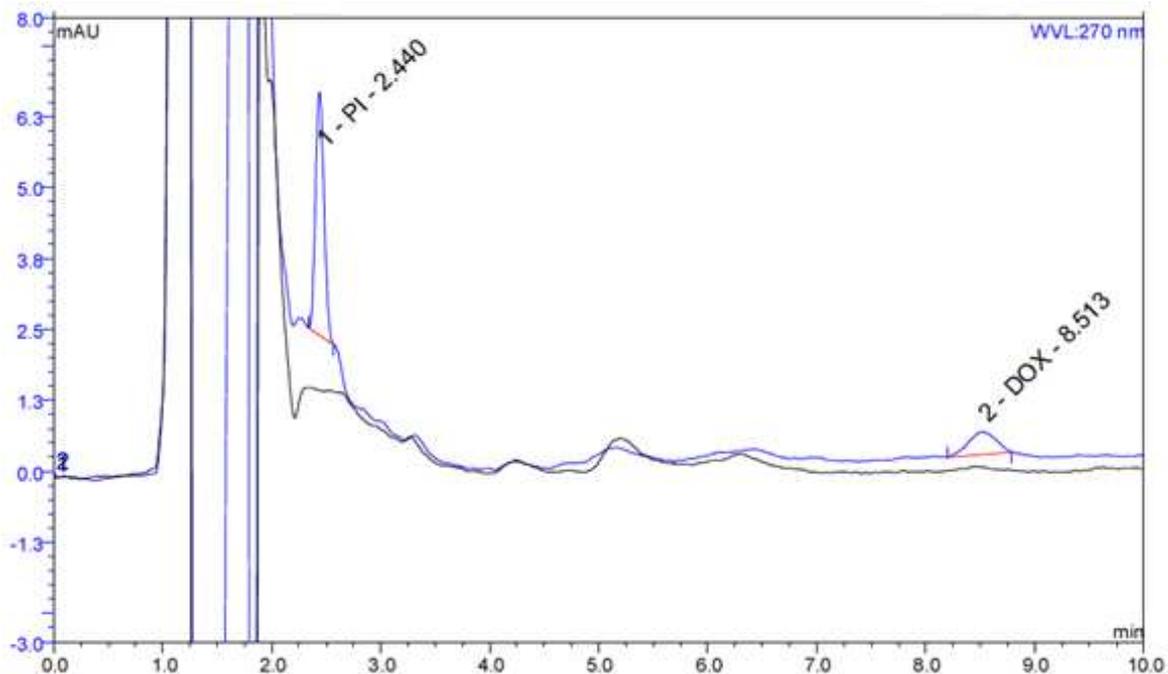


Figura 19. Avaliação das condições cromatográficas iniciais para padrão interno (PI) e doxiciclina (DOX) a partir da injeção de uma amostra de controle de qualidade processada e uma amostra branco.

Com o intuito de atrasar o TR do PI, a proporção da FM foi alterada para 15:85 (% v/v) ACN/água acidificada, ou seja, a força de eluição foi diminuída aumentando-se a fração aquosa para atrasar o TR da OTC que situou-se entre 3,5-3,9 minutos, mas o TR da DOX nestas condições foi muito longo inviabilizando esta condição cromatográfica.

Uma alternativa para manter a OTC com TR entre 3,5-3,9 minutos e adiantar a eluição da DOX foi utilizar o modo gradiente durante a eluição, um gradiente de fase. Inicialmente a corrida começaria com uma força de eluição menor para OTC sair da região onde encontram-se interferentes e posteriormente aumentar a força de eluição para adiantar o TR da DOX, porém o tempo necessário para que a linha de base estabilizasse durante a análise tornou a corrida impraticável.

Devido a impossibilidade de um método com FM na proporção de 15:85 (% v/v) ACN/água acidificada e fluxo de 1,0 mL/min e também da inviabilidade do método com gradiente de fase, elaborou-se um método com gradiente de fluxo (1,0 – 1,2 mL/min) o qual também foi impraticável uma vez que a pressão do sistema excedia o limite superior estabelecido de 3500 psi.

Então, a opção foi diminuir a proporção de fase aquosa, estabelecendo a condição de acetonitrila/água acidificada 20:80 (% v/v), nesta condição a pressão do sistema é inferior ao limite máximo, e um gradiente de fluxo em uma faixa menor, de 0,8 – 1,0 ml/min foi utilizado, nestas condições o TR da OTC foi entre 2,4 – 2,6 minutos e o TR da DOX 8,6 – 8,9 minutos. Ainda assim, no comprimento de onda 270 e 350 nm as respostas de interferentes ainda apresentavam-se acima de 5 %. Com isso, baseando-se em ROMEU et al., 2007 o comprimento de onda (357 nm) foi escolhido e a temperatura da análise foi alterada para 30 ± 2 °C (Figura 20).

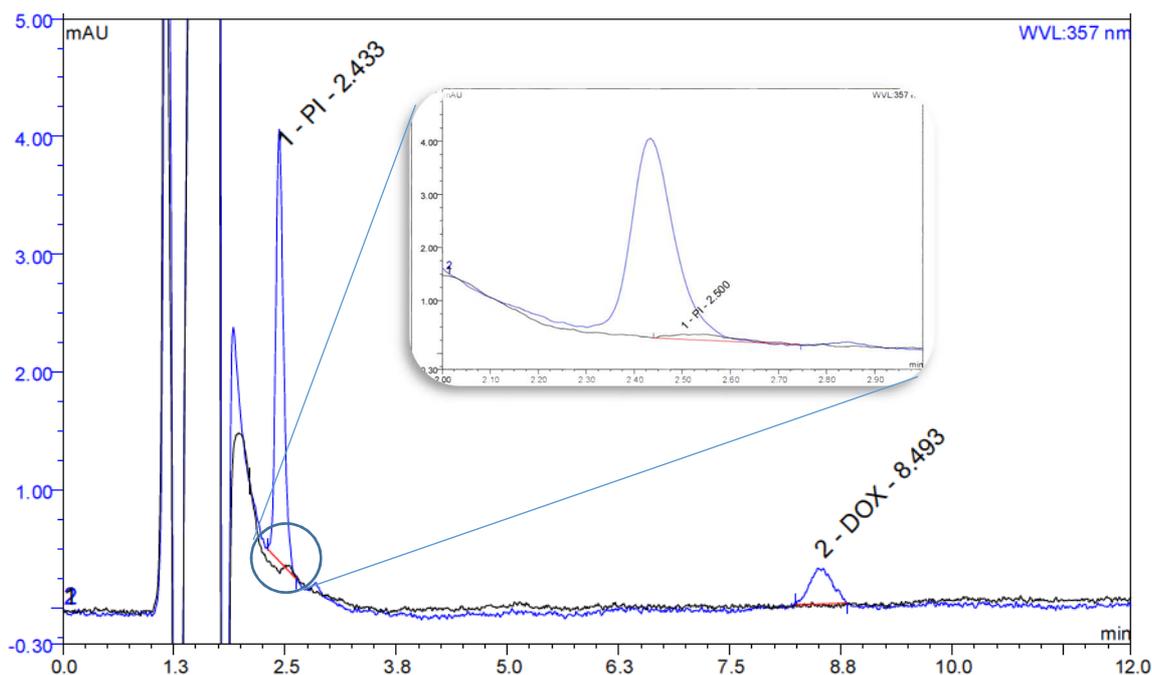


Figura 20. Avaliação de interferentes no tempo de retenção (TR) do padrão interno (PI) a partir da injeção de uma amostra de controle de qualidade processada e uma amostra branco.

A figura 20 mostra a resposta do pico interferente na faixa de tempo de retenção 2,448 – 2,762 minutos com valor igual a 0,0220 de área, valor inferior a 5 % da resposta do PI. E a partir desse resultado, é possível definir o comprimento de onda adequado, assim como a proporção de fase móvel de modo de eluição, garantindo a seletividade para o PI.

Para avaliação da exatidão e precisão, uma curva de calibração em plasma foi feita. Os seis pontos da curva demonstraram exatidão e precisão, reproduzindo assim, o resultado obtido para concentrações maiores (concentração de trabalho durante o desenvolvimento da metodologia). Dessa forma foi possível iniciar os ensaios para validação do método.

4.3.1 Curva de calibração do padrão analítico

A Figura 21 representa a curva de calibração obtida a partir do padrão secundário de DOX e padrão de referência de OTC em água acidificada, pH igual 2,5. A equação da reta é $y = 0,5515x - 0,1656$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9982$.

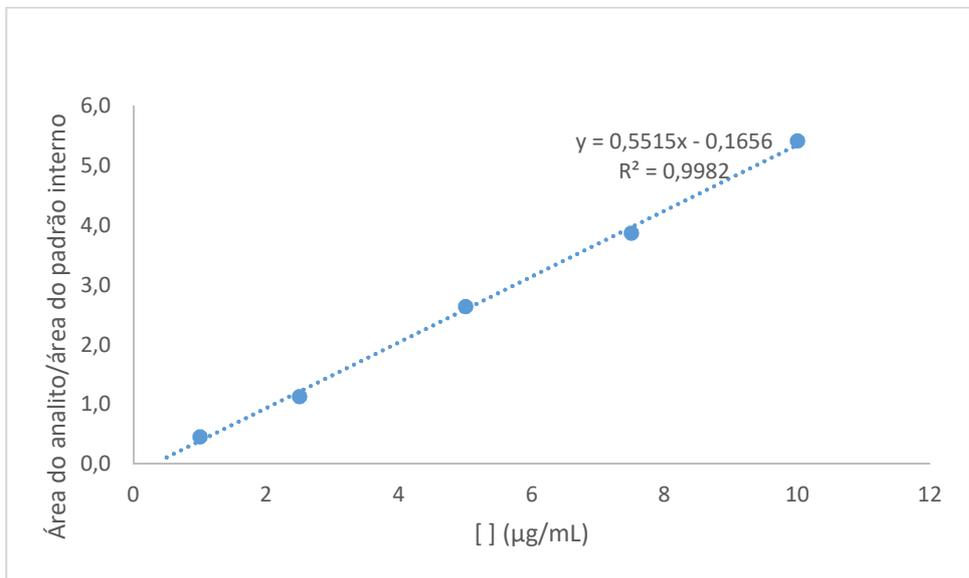


Figura 21. Média das curva de calibração da solução padrão (Doxiciclina e Oxitetraciclina).

4.4 Seletividade

A seletividade foi comprovada a partir dos resultados das análises das amostras analisadas, comparando-as com amostras processadas do LIQ afim de garantir a ausência de interferentes próximo ao tempo de retenção do analito e PI, os cromatogramas da figura 22 abaixo demonstram a seletividade do método.

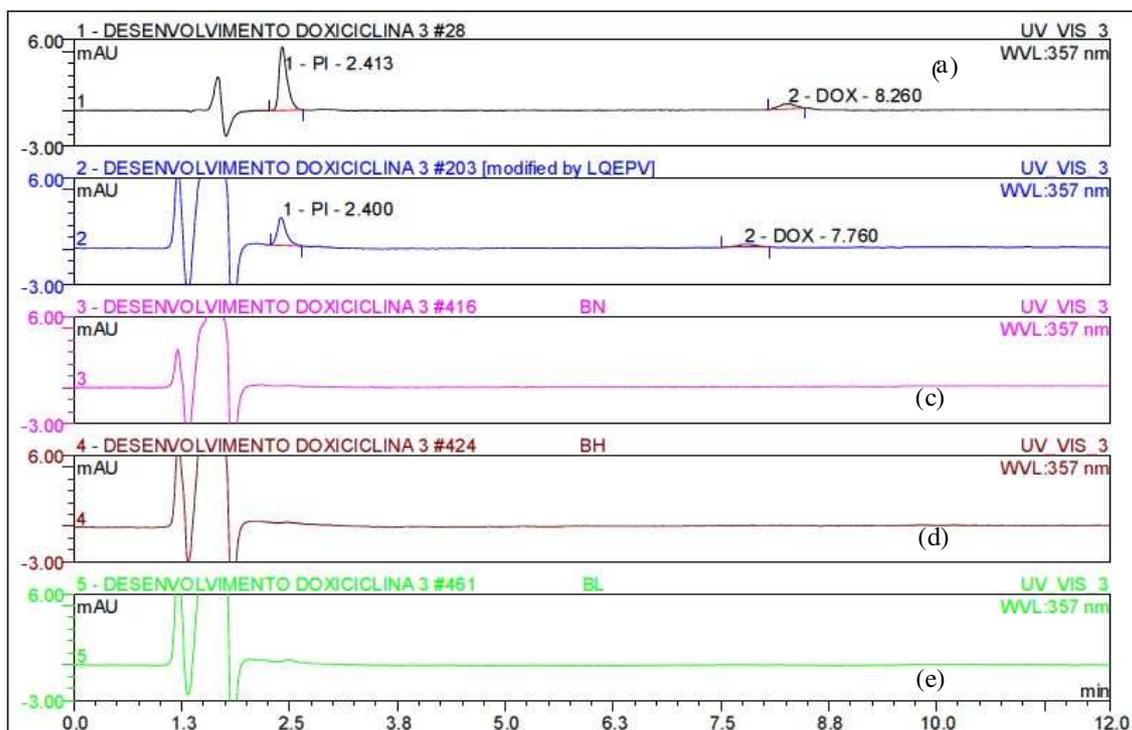


Figura 22. Seletividade do método para quantificação da Doxiciclina: cromatogramas de injeção (a) solução aquosa de doxiciclina (0,5 µg/mL) e padrão interno 1,0 (µg/mL), (b) amostra (plasma) de menor concentração do analito na curva de calibração (LIQ = 0,5 µg/mL), (c) amostra branco normal, (d) amostra branco hemolisada e (e) amostra branco lipêmica.

A figura acima mostra os cromatogramas de injeção das amostras, matrizes biológicas, isentas do analito e PI, isto é, amostra branco normal, lipêmica e hemolisada em comparação com a injeção da amostra processada de menor concentração do analito (matriz contendo DOX e PI) e com a injeção de solução padrão contendo DOX e PI na ausência da matriz biológica. Esta análise indica a capacidade do método de diferenciar e quantificar exatamente o analito e o PI em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz biológica. Uma vez que não foram observados picos interferentes no tempo de retenção do analito (DOX) e as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI foi de 3,10 % para o branco normal, 2,71 % para o branco hemolisado e 0,00 % para o branco lipêmico (< 5 % resposta do PI) (tabela 16).

Tabela 16. Porcentagem em relação a área da amostra de menor concentração na curva de calibração na matriz (LIQ) para doxiciclina e em relação a área do padrão interno de interferentes no tempo de retenção de cada um dos analitos.

Amostra	Tipo	% de interferente no tempo de retenção do analito	% de interferente no tempo de retenção do Padrão Interno
1	Branco Normal	0,00%	3,10%
2	Branco Normal	0,00%	3,10%
3	Branco Normal	0,00%	3,10%
4	Branco Normal	0,00%	3,10%
5	Branco Hemolisado	0,00%	2,71%
6	Branco Lipêmico	0,00%	0,00%

4.5 Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado a partir da observação dos cromatogramas apresentados na figura 23. As duas injeções de amostra branco injetadas imediatamente após a injeção da amostra LSQ não apresentaram respostas de picos interferentes no mesmo tempo de retenção da DOX e do PI, confirmando que no método não possui efeito residual.

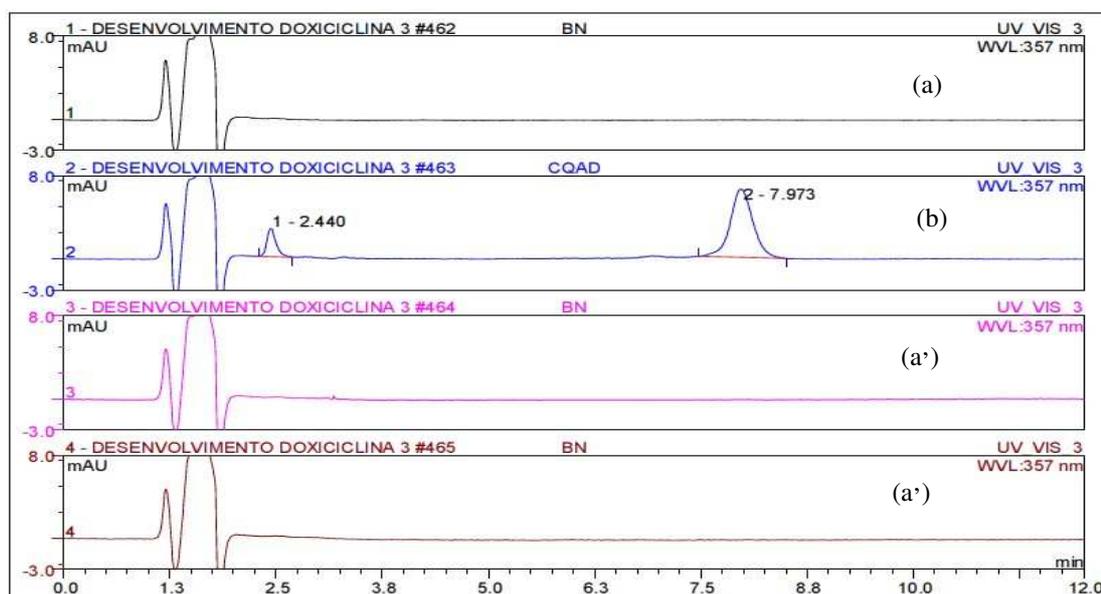


Figura 23. Efeito residual do método para quantificação de Doxiciclina: cromatogramas de injeção (a) amostra branco normal, (b) amostra de maior concentração do analito na curva de calibração (LSQ = 10 µg/mL) e (a') duas injeções subsequentes da amostra branco.

4.6 Efeito matriz

Segundo a resolução nº 27 da Anvisa, os coeficientes de variação dos fatores de matriz normalizados (FMN's) relativos a todas as amostras de plasma, tanto CQB quanto CQA, foram inferiores a 15 % como é possível verificar na tabela 17, isto é, não há influência de um componente da matriz na resposta do analito ou PI o que confirma a inexistência do efeito matriz.

Tabela 17. Coeficientes de Variação dos fatores de matriz normalizados (FMN's) relativos as amostras de controle de qualidade de baixa concentração e alta concentração (CQB e CQA, respectivamente).

	Amostra	Tipo	RA em matriz	RA em solução	FMN
CQB	1	Branco normal	0,42	0,45	0,94
	2	Branco normal	0,43		0,95
	3	Branco normal	0,42		0,94
	4	Branco normal	0,41		0,92
	5	Branco lipêmico	0,39		0,87
	6	Branco lipêmico	0,43		0,96
	7	Branco hemolisado	0,45		1,00
	8	Branco hemolisado	0,44		0,99
		Média			0,43
	CV (%)		4,2 %		
CQA	1	Branco normal	3,7	3,9	0,95
	2	Branco normal	3,7		0,94
	3	Branco normal	4,0		1,0
	4	Branco normal	3,9		0,98
	5	Branco lipêmico	4,3		1,0
	6	Branco lipêmico	3,9		0,98
	7	Branco hemolisado	4,6		1,2
	8	Branco hemolisado	4,6		1,2
		Média			4,1
	CV (%)		8,8 %		

4.7 Linearidade e curva de calibração

A linearidade do método foi avaliada a partir de três (3) curvas analíticas, analisadas em dias distintos. A faixa de concentração estipulada neste trabalho foi de 0,5 a 10 µg/mL. Esta faixa de linearidade foi baseada em (GUTIÉRREZ et al., 2014) e definida para determinar os parâmetros farmacocinéticos através da administração da formulação oral de DOX na dose de 10 mg/Kg.

Os dados obtidos para cada uma das três curvas analíticas analisadas, referentes aos dias 1, 2 e 3 respectivamente foram avaliados e os valores considerados discrepantes foram avaliados a partir de uma faixa estabelecida pela média ± o desvio padrão e então retirados, obtendo-se um novo grupo de dados. Quatro dos seis pontos das curvas foram analisados em quintuplicata como descrito no item 3.7.7.

A equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações nominais do analito deve ser expressa pelo modelo matemático mais simples, neste caso o modelo de regressão linear o qual relaciona as variáveis descrevendo uma linha reta que matematicamente é escrita por: $y = ax + b$.

Onde:

x = variável independente

y = variável dependente

a = coeficiente linear da reta

b = coeficiente angular da reta

Após a análise dos dados obtidos foi possível observar que as variâncias entre os pontos da curva analítica não eram constantes, ou seja, os dados não são homocedásticos, como mostra a tabela 18.

Tabela 18. Avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos para a curva de calibração dos três dias conforme teste F de Snecodor.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Variância (RA)	F _{calculado}	F _{crítico} ($\alpha = 0,05$)	Condição
0,5	0,001			
1,0	0,001			
2,5	0,023	19,1	5,12	Heterocedástica
5,0	0,011			
7,5	0,297			
10,0	0,015			

Optou-se pelo modelo de regressão linear ponderada (RLP) com o intuito de homogeneizar as variâncias entre os valores de concentração da curva analítica, utilizando como fator de ponderação o parâmetro $1/x$ que apresentou menor EPR (%) e valor de p maior que 0,05. Os parâmetros da regressão linear ponderada (a e b) foram obtidos pelo programa Minitab, gerando a equação de reta ponderada $y = 0,525x - 0,048$.

4.8 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas pela análise de amostras nas concentrações do limite inferior de quantificação (LIQ) e dos controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA, respectivamente). Para a precisão, avaliou-se o coeficiente de variação (CV %) nos três dias de análise, verificando-se a precisão intra-dia e inter-dias. Os valores de CV % devem ser menores que 20 % para o LIQ e menores que 15 % para as demais amostras de controle de qualidade. A exatidão foi avaliada calculando-se o erro padrão relativo (EPR %) intra-dia e inter-dias. São aceitáveis valores de EPR % na faixa de ± 20 % para o LIQ e ± 15 % para as demais amostras de controle de qualidade. Os resultados obtidos para a avaliação da precisão e exatidão do método são apresentados na tabela 19. Pode-se observar que o método apresentou precisão e exatidão aceitáveis em todos os níveis de concentração avaliados.

Tabela 19. Resultados de precisão e exatidão intra-dia e inter-dias em três dias de análise.

	LIQ			CQB			CQM			CQA		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Intra-corrida												
Média(µg/mL)	0,50	0,53	0,50	1,00	0,92	0,97	5,24	5,04	5,16	7,63	6,81	8,25
Precisão(CV %)	8,91	7,20	10,79	4,90	7,71	10,16	6,18	2,48	5,04	8,23	13,68	12,44
Exatidão(EPR %)	0,76	5,99	0,95	-0,30	-8,08	-2,57	4,76	0,89	3,22	1,75	-9,24	9,94
Inter-corrida												
Média(µg/mL)	0,518			0,981			5,089			7,406		
Precisão (CV %)	5,54			3,73			2,08			9,00		
Exatidão(EPR %)	3,52			-1,90			1,77			-1,26		

4.9 Estudo de estabilidade

4.9.1 Estabilidade do analito e padrão interno em solução

A estabilidade da solução padrão de DOX foi avaliada a partir da análise de DPR (%) entre as respostas dos picos do DOX analisados regularmente no período de 15 dias. As amostras analisadas foram acondicionadas em frascos âmbar em geladeira a temperatura de 10 °C. O DPR % apresentado foi inferior a 10 %. Foi então estabelecido uma estabilidade da solução padrão do DOX por um período de 15 dias.

4.9.2 Estabilidade do analito e padrão interno em matriz biológica

A Tabela 20 demonstra os resultados do estudo de estabilidade das amostras de plasma contaminado (amostras CQB e CQA). Todos os estudos de estabilidade apresentaram desvios inferiores a 15 % da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal os quais garantem a estabilidade.

Tabela 20. Estabilidade de doxiciclina em plasma canino – análise inicial, pós-processamento, curta duração, ciclo de congelamento e descongelamento e longa duração.

Concentração (µg/mL)	Inicial ^a	Pós-processamento ^b	Curta duração ^c	Ciclo congelamento descongelamento ^d	Longa duração ^e
1,0	9,53 %	6,02 %	4,38 %	1,48 %	11,32 %
7,5	9,92 %	11,32 %	2,09 %	7,99 %	0,71 %

^aamostras foram submetidas ao procedimento de extração e analisadas imediatamente

^bamostras foram submetidas ao procedimento de extração e estocadas a temperatura ambiente por 24h dentro do amostrador do cromatógrafo.

^camostras foram estocadas a temperatura ambiente por 24h

^damostras foram congeladas por 24h, descongeladas completamente e congeladas novamente (total de 3 ciclos)

^eamostras mantidas em estoque (congelamento) por dois meses

4.10 Estudo de farmacocinética

As análises do estudo da curva de concentração plasmática de DOX foram realizadas, após a análise por CLAE usando ultravioleta. Os dados obtidos a partir da análise para cada animal forneceu as médias de concentrações do fármaco demonstrados na tabela 21 e 22.

Tabela 21. Concentração de Doxiciclina encontrada em cada animal na primeira semana do estudo.

Tempo (min)	Concentração Plasmática de Doxiciclina ($\mu\text{g/mL}$) por animal										Média \pm dp	
	T1 - 1 ^a semana					R1 - 1 ^a semana						
	Com suplemento vitamínico					Sem suplemento vitamínico						
	1	2	3	4	5	11	12	13	14	15		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 \pm 0,000
30	0,391	0,535	0,000	0,000	0,147	0,000	0,000	0,000	0,269	0,558	0,190 \pm 0,232	
60	1,028	1,970	0,470	0,470	0,512	0,000	0,291	0,215	0,754	0,701	0,655 \pm 0,547	
120	1,064	1,585	0,452	0,452	0,531	1,282	0,623	0,491	0,933	1,078	0,861 \pm 0,387	
180	0,841	1,503	0,376	0,376	0,632	1,360	0,501	0,590	1,032	2,166	0,955 \pm 0,567	
240	0,884	1,301	0,326	0,326	0,510	1,425	0,413	0,670	0,770	1,690	0,846 \pm 0,471	
360	0,610	1,186	0,168	0,168	0,309	1,074	0,947	0,632	0,522	0,728	0,658 \pm 0,331	
480	0,538	1,031	0,416	0,416	0,358	1,333	0,762	0,648	0,678	1,743	0,784 \pm 0,458	
600	0,625	0,920	0,211	0,211	0,530	1,543	0,629	0,686	0,701	0,623	0,673 \pm 0,369	
1440	0,500	0,376	0,400	0,400	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,478 \pm 0,047	
2160	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300 \pm 0,000	
2880	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200 \pm 0,000	

Tabela 22. Concentração de Doxiciclina encontrada em cada animal na segunda semana do estudo.

Tempo (min)	Concentração Plasmática de Doxiciclina ($\mu\text{g/mL}$) por animal										Média \pm dp	
	T2 - 1ª semana					R2 - 2ª semana						
	Com suplemento vitamínico					Sem suplemento vitamínico						
	6	7	8	9	10	16	17	18	19	20		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 \pm 0,000
30	0,642	0,432	0,459	0,714	0,573	0,000	0,000	0,000	0,678	0,390	0,389 \pm 0,288	
60	0,909	0,465	0,453	0,526	0,794	0,539	0,000	0,983	0,756	1,461	0,689 \pm 0,391	
120	0,950	0,398	0,322	0,768	0,916	0,737	0,646	2,360	1,004	1,194	0,930 \pm 0,569	
180	0,941	0,356	0,457	0,691	0,954	0,844	0,653	3,164	1,152	0,278	0,949 \pm 0,827	
240	0,796	0,282	0,156	0,549	0,994	0,571	0,909	1,998	1,032	1,232	0,852 \pm 0,527	
360	0,781	0,221	0,171	0,657	0,832	0,627	0,655	1,116	1,069	0,817	0,695 \pm 0,310	
480	0,853	0,360	0,183	0,389	0,358	0,535	0,985	2,615	1,509	1,109	0,890 \pm 0,735	
600	0,568	0,310	0,269	0,417	0,754	0,335	0,596	2,084	0,931	0,288	0,655 \pm 0,548	
1440	0,500	0,300	0,250	0,400	0,500	0,310	0,500	0,500	0,500	0,300	0,406 \pm 0,106	
2160	0,300	0,200	0,200	0,300	0,300	0,290	0,300	0,300	0,300	0,200	0,269 \pm 0,048	
2880	0,200	0,180	0,180	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,180	0,194 \pm 0,010	

A Figura 24 demonstra a curva de concentração plasmática de DOX a partir da administração oral em dose única de comprimidos e comprimidos mastigáveis de DOX na dose de 100 mg em cães.

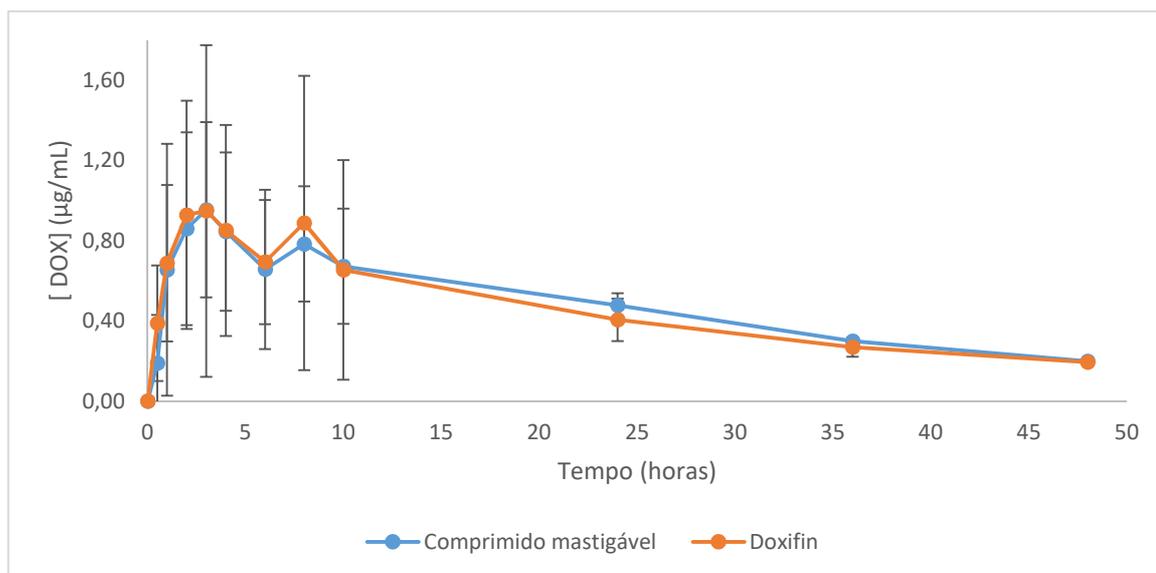


Figura 24. Curva de concentração plasmática de Doxíciclina a partir de administração oral em dose única de comprimidos e comprimidos mastigáveis de doxiciclina em cães.

A partir da curva de concentração plasmática de ambas formulações é possível inferir que as duas são bioequivalentes, isto porque suas curvas estão praticamente sobrepostas. Entretanto, apesar da semelhança gráfica ser notável, é preciso a avaliação estatística para comprovar esta hipótese.

A avaliação da bioequivalência é feita a partir de alguns parâmetros farmacocinéticos. Estes parâmetros foram encontrados com a utilização do macro PKSolver utilizando técnica de análise não compartimental de administração extravascular, demonstrados na Tabela 23. E, assim como as curvas plasmáticas, os parâmetros farmacocinéticos também mostraram-se similares para as duas formulações. No entanto, somente a partir de cálculos matemáticos é possível afirmar a equivalência biológica esperada *in vivo* para o medicamento referência e o teste.

Tabela 23. Parâmetros Farmacocinéticos das formulações orais de doxiciclina, comprimido mastigável e comprimido na dose de 100 mg.

Parâmetros Farmacocinéticos	Comprimido mastigável	Doxifin
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	1,11 \pm 0,59	1,16 \pm 0,78
t_{max} (min)	240 \pm 209,76	195 \pm 163,25
ASC ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	1383,24 \pm 339,70	1385,00 \pm 542,98
$t_{1/2}$ (min)	1106,24 \pm 130,41	1685,919 \pm 726,44

Primeiramente, a normalidade dos dados individuais foi examinada e confirmada, usando o programa estatístico Minitab. A relação $ASC_{0-t}/ASC_{0-\infty}$ foi 81,25 e 84,26 % para comprimido Doxifin[®] e comprimido mastigável, respectivamente, esta relação é importante para garantir a ideal atribuição aos parâmetros farmacocinéticos (EMEA, 2010).

Em seguida, a análise estatística realizada para avaliar a bioequivalência foi usando ANOVA (análise de variância). Através da análise e interpretação fornecida pela ANOVA verificou-se a relação entre a formulação teste e a referência para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} , demonstrados na tabela 24.

Tabela 24. Teste de variância (ANOVA) para comparação dos parâmetros farmacocinéticos de concentração máxima média e área sob a curva média dos vinte animais para as formulações de comprimido mastigável e comprimido.

C_{max}		ASC_{0-t}	
Comprimido mastigável	Comprimido	Comprimido mastigável	Comprimido
1,06	0,95	1367,43	1391,86
1,97	0,46	1696,23	1405,16
0,61	0,46	1040,35	670,20
0,47	0,77	878,47	1107,71
0,63	0,99	1155,40	1437,57
1,54	0,84	2032,69	1001,57
0,95	0,98	1306,86	1340,06
0,68	3,16	1298,91	2696,23
1,03	1,51	1387,66	1711,00
2,16	1,46	1668,40	1088,66
p-Value > 0,005		p-Value > 0,005	
Interpretação estatística:	Há bioequivalência	Interpretação estatística:	Há bioequivalência

O teste estatístico não demonstrou diferença significativa na extensão e na taxa de absorção entre as duas formulações para razões de ASC_{0-t} e C_{max} na extensão de bioequivalência de 80-125 % (EMEA, 2010). Dessa forma, como ambas formulações atingem os mesmos níveis plasmáticos é possível supor que o efeito farmacológico também é o mesmo.

Após as análises das amostras coletadas, os dados obtidos foram analisados sendo possível observar uma rápida absorção das formulações de doxiciclina de 100 mg, uma vez que os valores de C_{max} foram 1,11 e 1,16 $\mu\text{g/mL}$ e t_{max} de 240 e 195 minutos para comprimido mastigável e comprimido comercial (Doxifin[®]) respectivamente.

A absorção da DOX é favorecida quando o tratamento é administrado em jejum, pois a presença de cátions divalentes ou trivalentes em alimentos poderia quelar o fármaco e diminuir

a absorção da droga. Uma vez que o tratamento foi feito em duas semanas corridas para ambas as formulações, na primeira semana juntamente com o tratamento com Doxiciclina também foi administrado um suplemento vitamínico rico em cátions divalentes. Enquanto na segunda semana de tratamento não houve a administração do suplemento. A Figura 25 mostra os perfis das curvas plasmáticas para comprimido mastigável e comprimido na primeira e segunda semana separadamente.

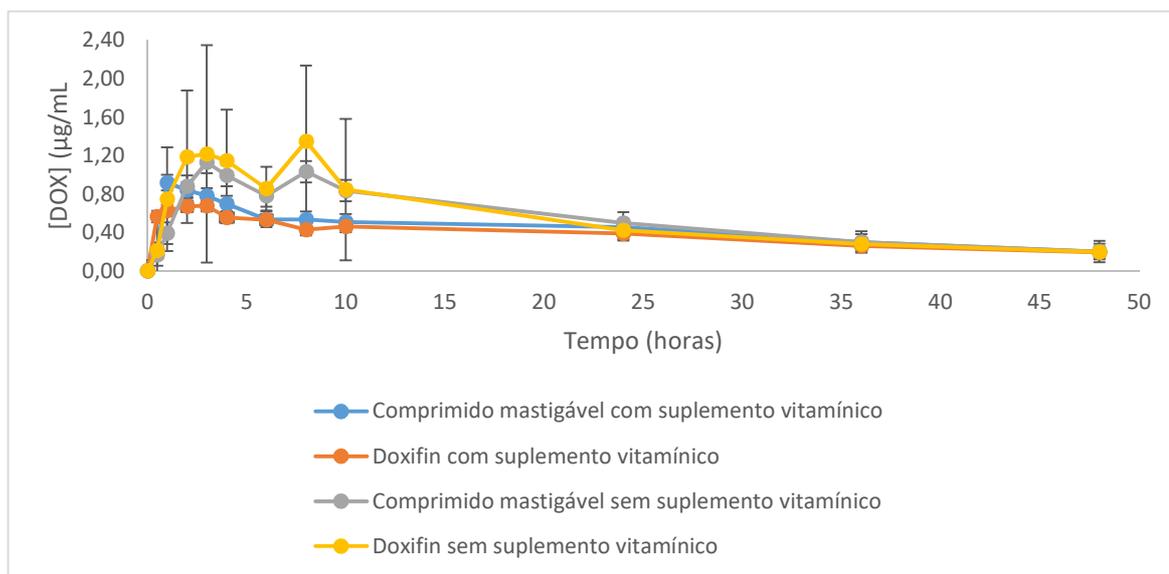


Figura 25. Curva de concentração plasmática de Doxiciclina a partir de administração oral em dose única de comprimidos e comprimidos mastigáveis de doxiciclina em cães com/sem o uso associado de suplemento vitamínico.

A partir da observação da figura acima é notório a diminuição da concentração de doxiciclina na circulação sistêmica, demonstrando efeito do suplemento vitamínico sobre os parâmetros farmacocinéticos (Tabela 25).

Tabela 25. Parâmetros Farmacocinéticos das formulações orais de doxiciclina, comprimido mastigável e comprimido na dose de 100 mg com e sem administração conjunta de suplemento vitamínico.

Parâmetros Farmacocinéticos	Com suplemento vitamínico	Sem suplemento vitamínico
C_{max} (µg/mL)	0,84 ± 0,46	1,434 ± 0,75
t_{max} (min)	105 ± 65,19	330 ± 198,49
ASC (µg/mL*min)	1215,04 ± 303,21	1553,20 ± 504,74
$t_{1/2}$ (min)	1547,94 ± 875,78	1244,21 ± 346,38

No Brasil é comum a prescrição conjunta desses dois medicamentos, porém não existe na literatura nenhum documento que indique a associação de doxiciclina com suplemento vitamínico.

Internacionalmente, existe uma diretriz europeia para veterinários sobre erliquiose e anaplasmose canina e seus respectivos tratamentos (SAINZ et al., 2015), também há uma declaração sobre a erliquiose canina relatando seu tratamento (NEER et al., 2002). E ambos descrevem que não é aconselhável a administração conjunta de suplemento vitamínico com

doxiciclina. Além disso, a própria bula do comprimido veterinário comercial contra-indica a utilização de suplementos devido a interação medicamentosa e diminuição da absorção da doxiciclina.

Visto que em nosso país essa prática é comum e rotineiramente médicos veterinários prescrevem doxiciclina associada a um suplemento vitamínico, foi feito um questionário onde os médicos veterinários residentes do hospital veterinário da UFRRJ respondiam como era sua prescrição para o tratamento de erliquiose canina (Anexo 7.1). O resultado dos questionários mostrou que 86,7 % dos veterinários que participaram da pesquisa prescrevem suplemento vitamínico para o tratamento dessa doença.

A observação dos perfis das curvas plasmáticas do comprimido mastigável e comprimido Doxifin nas diferentes semanas foram bastante distintas visualmente, motivo pelo qual a preocupação em investigar e confirmar que os medicamentos: teste e referência são bioequivalentes, quando administrados sozinhos ou quando administrados em conjunto com suplemento vitamínico. Com os novos perfis plasmáticos (primeira e segunda semana separadamente) a avaliação da bioequivalência entre as formulações teste e referência foram refeitas (Tabela 26).

Tabela 26. Teste de variância (ANOVA) para comparação dos parâmetros farmacocinéticos de concentração máxima média e área sob a curva média dos animais para as formulações de comprimido mastigável e comprimido de acordo com as semanas de estudo.

C_{max}		ASC_{0-t}	
Comprimido mastigável	Comprimido	Comprimido mastigável	Comprimido
Primeira semana (presença de suplemento vitamínico)		Primeira semana (presença de suplemento vitamínico)	
1,06	0,95	1367,43	1391,86
1,97	0,46	1696,23	1405,16
0,61	0,46	1040,35	670,20
0,47	0,77	878,47	1107,71
0,63	0,99	1155,40	1437,57
p-Value > 0,005		p-Value > 0,005	
Interpretação estatística:	Há bioequivalência	Interpretação estatística:	Há bioequivalência
Segunda semana (ausência de suplemento vitamínico)		Segunda semana (ausência de suplemento vitamínico)	
1,54	0,84	2032,69	1001,57
0,95	0,98	1306,86	1340,06
0,68	3,16	1298,91	2696,23
1,03	1,51	1387,66	1711,00
2,16	1,46	1668,40	1088,66
p-Value > 0,005		p-Value > 0,005	
Interpretação estatística:	Há bioequivalência	Interpretação estatística:	Há bioequivalência

O teste estatístico feito para avaliar as semanas separadamente mostrou que também não há diferença significativa na extensão e na taxa de absorção entre as duas formulações para primeira e segunda semana. As razões de ASC_{0-t} e C_{max} na extensão de bioequivalência também se enquadraram na faixa estipulada pela legislação (EMEA, 2010).

Diante destes resultados, caso a comparação seja feita entre primeira e segunda semana de estudo não há bioequivalência (Tabela 27)¹.

Tabela 27. Teste de variância (ANOVA) para comparação dos parâmetros farmacocinéticos de concentração máxima média e área sob a curva média dos animais para as formulações administradas com e sem suplemento vitamínico (primeira e segunda de estudo, respectivamente).

C_{max}		ASC_{0-t}	
Primeira semana*	Segunda semana**	Primeira semana*	Segunda semana**
1,06	1,54	1367,42	2032,68
1,97	0,95	1696,23	1306,86
0,61	0,68	1040,35	1298,91
0,47	1,03	878,47	1387,66
0,63	2,16	1155,40	1668,40
0,95	0,84	1391,86	1001,57
0,46	0,98	1405,16	1340,06
0,46	3,16	670,20	2696,23
0,77	1,51	1107,71	1711,00
0,99	1,46	1437,57	1088,66
p-Value < 0,005		p-Value < 0,005	
Interpretação o estatística:	Não há bioequivalência	Interpretação estatística:	Não há bioequivalência

*Presença de suplemento vitamínico

**Ausência de suplemento vitamínico

A partir da análise desses resultados é possível afirmar que no ensaio de dissolução para as duas formulações o método existente para comprimidos de DOX de uso humano não foi biorrelevante, pois o método não foi eficiente para prever o comportamento *in vivo*, ou seja, não foi estabelecido uma correlação *in vivo* – *in vitro*.

Além das comparações acima, o efeito dos dois medicamentos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos cães foram avaliados para o grupo tratado com comprimido mastigável e para o tratado com comprimido nos tempos: T = 0, 24, 48 e 72h (Anexos 7.2 – 7.9). Antes e durante o tratamento para ambos medicamentos o nível de globulina manteve-se acima do padrão de referência, enquanto os níveis de aspartato aminotransferase (AST) permaneceram abaixo do padrão. Alguns eventos adversos ocorreram como: uma leve queda na quantidade de plaquetas no grupo tratado com comprimido mastigável, provavelmente devido a um agredado plaquetário; e no tempo de 48 e 72h houve uma pequena diminuição dos níveis de hematócrito e albumina também para o grupo tratado com o medicamento teste

As modificações foram insignificantes, provavelmente efeitos individuais de cada animal e a quantidade excessiva de coletas nas primeiras 24 horas.

¹ Grupos tratados (R1 e T1) com comprimido mastigável e comprimido sem suplemento vitamínico (primeira semana de estudo) e grupos (R2 e T2) tratados com comprimido mastigável e comprimido, e suplemento vitamínico.

5 CONCLUSÕES

- Foi possível selecionar a melhor técnica de extração a partir da comparação entre ELL, ELL/PBT e EFS. O procedimento de ELL/PBT apresenta vantagens, como: menor custo, menor uso de solventes orgânicos quando comparada a EFS e foi de fácil execução;
- A extração ELL/PBT foi empregada no desenvolvimento do método bioanalítico, para essa etapa foi desenvolvido um método cromatográfico por CLAE-UV;
- O método foi validado segundo as normas prevista na legislação (ANVISA, 2012) foi aplicado em estudos de farmacocinética, obtendo-se as curvas de concentração plasmática para comparação das duas formulações orais (comprimidos mastigáveis e comprimidos) de doxiciclina em cães;
- A formulação (comprimido mastigável) proposta como alternativa para tratamento da Erliquiose canina mostrou-se bioequivalente a formulação existente no mercado;
- O comprimido mastigável diminui possíveis transtornos gastrointestinais, pois em sua composição há ração como excipiente
- Ainda foi possível obter uma: formulação palatável e mastigável, ou seja, facilidade na administração e favorecimento na adesão ao tratamento, principalmente para o tratamento de Erliquiose canina que é longo (28 dias);
- O comprimido mastigável é uma formulação que pode ser manipulada e com isso a dose pode ser ajustada para cada animal; o custo para sua produção é menor; e o mais importante é a manutenção da eficácia terapêutica, pois trata-se de uma nova formulação bioequivalente, não tendo prejuízo nenhum na biodisponibilidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, C. R.; RUPP, H. S.; WU, W. H. Complexities in tetracycline analysis - Chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, n. 1–2, p. 23–32, 2005.
- ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M. R.; DIAZ, M. J.; BRINGAS, P.; FERNANDEZ, M. C.; FERNANDEZ-CRUZ, M. L.; ITURBE, J.; MARTINEZ, M. A. Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 23, n. 1, p. 79–90, 1994.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010^a
- ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova guia para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** 22 de maio de 2012.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº 14, de 09 de maio de 2018. Aprova guia para dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** 16 de maio de 2018.
- ARAUJO, M. B. C. **ESTUDO DE UM METODO MULTICLASSE/MULTIRRESÍDUO PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS AQUOSAS.** p.148. Tese de doutorado, Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
- ARCINIEGAS RUIZ, S. M.; OLVERA, L. G.; BERNAD, M. J.; CHACÓN, S. C. B.; ESTRADA, D. V. et al. Comparative pharmacokinetics of a new oral long-acting formulation of doxycycline hyclate: A canine clinical trial. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 9–15, 2015.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** Editora Artmed, 2ª edição, Porto Alegre, RS, p.504, 2005.
- AXISA, B.; NAYLOR, A. R.; BELL, P. R. F.; THOMPSON, M. M. Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 744, n. 2, p. 359–365, 2000.
- BARROS, J. O. D. E. **Estudo acelerado de estabilidade de hiclato de doxiciclina em comprimidos.** p. 65. Trabalho de conclusão de curso, Farmácia-Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2015.

BIDGOOD, T. L.; PAPICH, M. G. Comparison of plasma and interstitial fluid concentrations of doxycycline and meropenem following constant rate intravenous infusion in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 8, p. 1040–1046, 2003.

BÖCKER, R. Rapid analysis of doxycycline liquid. **Journal of Chromatography** v. 187, p. 439–441, 1980.

BUENO, M. M. **Implantação , evolução , aspectos técnicos e perspectivas da regulamentação técnica de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de medicamentos genéricos e similares no Brasil**.p. 193. Dissertação de mestrado, Produção e controle farmacêutico. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BYLDA, C.; THIELE, R.; KOBOLD, U.; VOLMER, D. A. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from bio fluids using LC-MS / MS. **The Analyst**, v. 139, p. 2265–2276, 2014.

CASSIANO, N. M. BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; BEZERRA, Q. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CASTRO, L. J. SAHAGU, A. M.; DIEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, N.; SIERRA, M.; GARCÍA, J. J. Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration. **Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 389–395, 2009.

CHAMBERS, HF.; Cloranfenil, Tetraciclinas, Macrolídeos, Clindamicina e Estreptograminas. In: Katzung BG. **Farmacologia básica & clínica**. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 8.

CHENG, Y. F.; PHILLIPS, D. J.; NEUE, U. Simple and rugged SPE method for the determination of tetracycline antibiotics in serum by HPLC using a volatile mobile phase. **Chromatographia**, v. 44, n. 3–4, p. 187–190, 1997.

CINQUINA, A. L. LONGO, F.; ANASTASI, G.; GIANNETTI, L.; COZZANI, R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 227–233, 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**, Ed. da Unicamp, São Paulo, 2006.

CRUZ, M. S. **Degradação da doxiciclina por processos oxidativos avançados**. p. 82. Dissertação de mestrado, Engenharia Civil. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

DAGDONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191–201, 2001.

DAVIS, J. L.; SALMON, J. H.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics and tissue distribution of doxycycline after oral administration of single and multiple doses in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 310–316, 2006.

DE LEENHEER, A. P.; NELIS, H. J. Doxycycline determination in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. **J Pharm Sci**, v. 68, n. 8, p. 999–1002, 1979.

DEAN, J. R. **Extraction Techniques in Analytical Sciences**, Wiley, Chichester. 1ª Edição, 2009.

DENOBILO, M. .; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, chortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.2, 2004.

EMA. Guideline on bioanalytical method validation. **EMEA, Committee for Medicinal Products for Human Use**, v. 44, n. July 2011, p. 1–23, 2011.

EMEA. Guideline on the investigation of bioequivalence. **European Medicines Agency**, v. 1, n. January, p. 1–27, Londres, 2010.

FARIN, D. et al. High performance liquid chromatography method for the determination of meropenem in human plasma. **Chromatographia**, v. 49, n. 5–6, p. 253–255, 1999.

FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry **Bioanalytical Method Validation**. May, 2001.

FELTON, L. A. **Essentials of Pharmaceutics**. 1. ed. Londres. Editora: Pharmaceutical Press, 2013.

GASTEARENA, I. DIOS, M. C.; SEGURA, E.; GOFIL, M.; RENEDO, M. J.; FOS, D. Determination of doxycycline in small serum samples by liquid chromatography. Application to Pharmacokinetic Studies on Small Laboratory Animals. **Chromatographia**, v. 19, n. November, p. 726–735, 1993.

GOODMAN & GILMAN, **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10ª edição, Editora Mc Graw-Hill, São Paulo, SP, Março 2003.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1–2, p. 41–47, 2010.

GOURLART, S. M. et al. Effect of garlic along with lead acetate administration on lead burden of some tissues in mice. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 16, p. 2772–2774, 2008.

GREEN, J. M. Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry News and Features**, n. 2, 1996.

GUTIÉRREZ, L.; VELASCO, Z. VÁZQUEZ, C.; VARGAS, D.; SUMANO, H. Pharmacokinetics of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 83–89, 2014.

HORBYLON, B. Z. Estudo *in vitro* da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local. p. 44. Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 25, 2007.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, 2(1), p. 13–25, 2010.

KRISHNA, AC. et al. A novel and rapid method to determine doxycycline in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 6, p. 541, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 1. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2004.

LANÇAS, F. M. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação : uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica** p. 17–44, 2008.

LEESON, L. J.; KRUEGER, J. E.; NASH, R. A. Concerning the structural assignment of the second and third acidity constants of the tetracycline antibiotics. **New York**, v. 4155, n. 18, p. 1155–1160, 1963.

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

MAGALHÃES, E. J. **Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse Forense**. p. 152. Tese de doutorado, Química. Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2012.

MILAZZO, G. Trends in Analytical Chemistry (TrAC). **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 9, n. 3, p. 389, 1982.

NCBI. **PubChem Compound Database**. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>>. Acesso em: 02 jun 2017.

NEER, T. M. et al. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 309–15, 2002.

NIEDER, M.; JAEGER, H. Selective Quantification of Doxycycline in Human Plasma and Urine with Optimised Chromatography. **Chromatographia**. v.25, n. 6, 1988.

NORD, C.E.; HEIMDAHL, A. Impact of different antimicrobial agents on the colonization resistance in the intestinal tract with special reference to doxycycline. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, v. 53, p. 50-58, 1988.

NOUWS, J. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in pigs following oral administration in feed. *Veterinary Research*, BioMed Central. 29 (5), pp.475-485, 1998.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, 2009.

OKA, H., ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.882, p. 109-133, 2000.

PAVLOVIĆ, D. M. et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 11, p. 1062-1075, 2007.

PAYNE-JOHNSON, M. et al. Comparative palatability of three commercial formulations of carprofen and one commercial formulation of firocoxib in dogs. *Revue Med Vet*, v. 157, n. 8-9, p. 431-440, 2006.

PEDROSO, R.C.R. **Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV sulfametoxazol e trimetoprima utilizando sistemas de pré-concentração.** [s.l.] Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclina: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. *Rev. Port. de Farm.*, Lisboa, v.XLVII, n.4, p.149-154, 1997.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: Uma visão geral. *Quimica Nova*, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PINHO, G. P. et al. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1307-1311, 2010.

PINHO, G. P. D et al. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. *Food Chemistry*, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2009.

PIZZATO; D. A.; DOMINGUES; J. L. *Revista Eletrônica Nutritime* 504. p. 504-511, 2008.

POLSON, C. et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 785, n. 2, p. 263-275, 2003.

PRETO, R. Extração em ponteiros descartáveis : fundamentos teóricos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, v. 7, n. 2, p. 101-108, 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIOND, J. -L; VADEN, S. L.; RIVIERE, J. E. Comparative pharmacokinetics of doxycycline in cats and dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 415–424, 1990.

ROMEU, G. A. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para doxiciclina em plasma humano. **Brazilian Journal of Health Research** p. 193–198, 2007.

RÜBENSAM, G. et al. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1–2, p. 24–29, 2011.

RUFINO, J. L. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de Tetraciclina, Doxiciclina, Azitromicina, Norfloxacin e Ciprofloxacina em formulações farmacêuticas**. p.146. Tese de doutorado, Química. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

RUZ, N. et al. Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography: Application to particulate drug delivery systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1031, n. 1–2, p. 295–301, 2004.

SAINZ, Á. et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2015.

SANTOS, M. D. F. et al. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 682, n. 2, p. 301–308, 1996.

SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.812, p.99-109, 1998.

SELVADURAI, M.; MEYYANATHAN, S. N. Determination of deflazacort in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry after liquid-liquid extraction and its application in human pharmacokinetics studies. **Pharmaceutical methods**, v. 2, n. 2, p. 106–11, 2010.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B.C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, 5ª Edição, Editora McGraw-Hill, São Paulo, SP, 2004.

SHEIN-CHUNG, C.; JEN-PEI, L. **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies** 3. ed. Chapman & Hall/CRC, 2009.

SIQUEIRA, M.E.P.B. Fundamentos do preparo de amostras. Toxicologia analítica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.135-141, 2008.

SONG, Y. et al. Key Considerations in Designing Oral Drug Delivery Systems for Dogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1576–1585, 2016.

STEPHENS, C. R. et al. Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 16, p. 4155–4158, 1956.

SUNARIĆ, S. M.; et.al. HPLC method development for determination of doxycycline in human seminal fluid. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 939, p. 17–22, 2013.

UDALOVA, A. Y. et al. Methods for the Separation, Preconcentration, and Determination of Tetracycline Antibiotics. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 661–676, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. Validation of compendial methods. **2016 USP 37 The United States Pharmacopeia / NF 34 The National Formulary**, p. 1445, 2016.

USP 33 THE UNITED STATE PHARMACOPEIA. 33. ED. Rockville: UNITED STATES CONVENTION INC, 2010.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de Extração Líquido - Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT) para Piretróides em água e análise por CG. v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

VILLANOVA, J. C. O., GUEDES, R. A., SEVERI, J. A. Desafios farmacêuticos no desenvolvimento de produtos veterinários. **Tópicos especiais em ciência animal III**. Editora: CAUFES, 1ª Edição, 2014.

WINTER, M. E.; KODA-KIMBLE, M. A.; YOUNG, L. Y., eds. **Basic clinical pharmacokinetics** 2.ed. Washington: Applied Therapeutics, 1992. p.7-55.

WITTENAU, M. S. VON et al. 6-Deoxytetracyclines. III. Stereochemistry at C.6. v. 84, n. 13, p. 2645–2647, 1962.

7 ANEXOS

7.1 Questionário para avaliação sobre a forma de prescrição de doxiciclina

Avaliação sobre o tratamento contra doença do carrapato

Este questionário é composto de 5 perguntas sobre doença do carrapato, sua virulência e tratamento.

1 - Quais são os microorganismos que causam a doença do carrapato?

- Ehrlichia* spp. *Anaplasma* spp. *Rangelia* spp.
 Babesia spp. *Borrelia* spp. Nenhum dos anteriores

2 - Em um mês quantos animais você atende com doença do carrapato? Assinale apenas uma alternativa.

- Até 5 10 – 15 Nenhum
 5 – 10 15 – 20

3 - De acordo com o quadro clínico abaixo, qual tratamento você indicaria para este animal?

Um cão macho com dois anos de idade acometido por pulgas e carrapatos apresentando epistaxe, inapetência, vômito e anorexia. O exame de sangue revelou trombocitopenia (23.000), anemia normocítica e normocrômica (Hematócrito: 14); sem alterações significativas na série branca. O patologista ressaltou que foram observadas inclusões leucocitárias compatíveis com *Ehrlichia canis*. Foi realizada sorologia 4dX (Idexx), que confirmou a infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma* spp. PCR negativo para *Babesia* spp.

- Omeprazol Hemolitan Amoxicilina com Clavulanato
 Doxiciclina Glicopan
 Imidocarb Ondansetrona
 Ganaseg Ranitidina
 Prednisona ou prednisolona

4 - Quais dificuldade são relatadas pelo proprietário do animal na administração do medicamento?

- Cuspir o comprimido Engasgar
 Esconder o comprimido embaixo da língua Se esconder na hora da medicação
 Forçar vômito

4.1–Quais os efeitos adversos observados durante o tratamento?

- Vômito Diarreia Salivação Nenhum

7.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg com o uso de suplemento vitamínico (primeira semana de estudo).

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Marilu
 Sexo F
 ID 8601
 Peso 9,80

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	11,3*	33,3*	14400	250000	2,6	5,4**	21,0	16,0*	37,0	0,4*	21,0
24h	12,6	36,1*	13200	224000	2,9	6,4**	42,0	15,0*	36,0	0,6	36,0
48h	11,1*	31,4*	13500	241000	2,6	5,6**	21,0	17,0*	38,0	0,4	19,0*
72h	11,7*	34,1*	13500	220000	2,6	5,6**	41,0	21,0*	32,0	0,7	33,0

Nome Margot
 Sexo F
 ID 503630
 Peso 11,70

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	14,3	40,7	12900	296000	2,7	4,4	59,0	16,0*	24,0	0,6	38,0
24h	9,6*	29,7*	4600*	56000	2,5*	4,7**	170,0**	23,0	21,0	0,8	50,0
48h	9,9*	26,2*	6200	80000	2,5*	4,4	162,0**	19,0*	20,0*	0,7	40,0
72h	10,0*	28,3*	11400	130000	2,5*	4,9**	139,0	16,0*	19,0*	0,8	55,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
 **Valores acima do valor superior da faixa

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Benjamin
Sexo M
ID 596143
Peso 12,30

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	14,8	42,9	10300	190000	2,9	5,2**	17,0*	19,0*	31,0	0,4*	21,0
24h	15,3	41,8	12000	151000*	3,0	5,7**	14,0*	25,0	29,0	0,8	27,0
48h	14,3	41,3	14000	148000*	3,0	5,2**	25,0	30,0	32,0	0,7	24,0
72h	14,9	42,3	14900	179000	2,9	5,2**	16,0*	25,0	30,0	0,7	24,0

Nome Freud
Sexo M
ID 604885
Peso 10,85

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	9,9*	29,1*	10700	214000	2,1*	6,6**	41,0	17,0*	33,0	0,5	27,0
24h	13,9	41,4	8000	213000	2,3*	7,6**	34,0	20,0	30,0	0,8	34,0
48h	11,9*	32,6*	11200	269000	2,1*	7,0**	44,0	20,0	28,0	0,7	20,0*
72h	11,0*	30,7*	11200	280000	2,2*	7,2**	33,0	18,0*	27,0	0,8	33,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
**Valores acima do valor superior da faixa

	Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
	12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
	18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9
Nome	Joarez										
Sexo	M										
ID	458721										
Peso	12,35										
Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	13,9	41,0	12000	315000	2,6	6,5**	33,0	19,0*	30,0	0,5	29,0
24h	14,0	39,9	8800	211000	2,8	5,6**	20,0	20,0*	32,0	0,7	31,0
48h	13,3	39,1	10400	290000	2,7	4,6**	29,0	25,0	31,0	0,8	26,0
72h	13,9	39,0	11900	295000	3,1	5,3**	25,0	20,0*	33,0	0,8	32,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa

**Valores acima do valor superior da faixa

7.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina na dosagem de 100 mg com o uso de suplemento vitamínico (primeira semana de estudo).

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Bobi
 Sexo M
 ID 44118
 Peso 12,05

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	11,4*	33,6*	9700	542000**	2,9	3,6	22,0	27,0	65,0	0,5	28,0
24h	15,8	41,4	7800	439000	2,9	3,9	26,0	27,0	38,0	0,8	34,0
48h	11,8*	34,1*	10400	510000**	2,9	3,9	37,0	20,0*	38,0	0,7	26,0
72h	11,5*	34,1*	12700	511000**	2,7	4,1	31,0	19,0*	36,0	0,7	27,0

Nome Florência
 Sexo F
 ID 288376
 Peso 9,30

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	11,3*	33,6*	12200	293000	2,4*	7,4**	37,0	19,0*	27,0	0,5	23,0
24h	13,7	38,4	7000	161000*	2,4*	7,2**	54,0	23,0	24,0	0,8	34,0
48h	10,2*	28,3*	12000	213000	2,3*	6,8**	70,0	16,0*	20,0*	0,6	23,0
72h	10,5*	31,6*	12400	152000*	2,3*	7,0**	59,0	16,0*	17,0*	0,6	25,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
 **Valores acima do valor superior da faixa

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Matilda
Sexo F
ID 503558
Peso 13,40

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	14,8	44,7	8200	184000	2,7	5,7**	79,0	19,0*	21,0	0,4*	30,0
24h	15,7	42,3	8500	216000	3,1	5,5**	73,0	18,0*	23,0	0,6	40,0
48h	14,9	41,9	9500	235000	3,1	4,9**	87,0	17,0*	24,0	0,6	21,0
72h	14,8	43,2	8400	251000	3,2	5,0**	82,0	13,0*	22,0	0,6	39,0

Nome Carlos Daniel
Sexo M
ID 288417
Peso 10,40

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	11,0*	32,8*	10200	359000	3,0	3,6	13,0*	23,0	32,0	0,5	27,0
24h	9,7*	29,0*	9600	379000	3,3	3,6	27,0	29,0	30,0	0,7	37,0
48h	10,2*	30,4*	10500	394000	2,9	3,3	37,0	27,0	29,0	0,7	21,0
72h	10,2*	29,3*	9300	358000	2,9	3,8	32,0	30,0	29,0	0,8	34,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
**Valores acima do valor superior da faixa

	Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
	12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
	18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9
Nome	Galileu										
Sexo	M										
ID	595340										
Peso	12,05										
Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	11,9*	35,9*	4800*	164000*	2,0*	7,8**	36,0	16,0*	37,0	0,7	41,0
24h	18,0	53,7	3400*	183000	2,3*	7,9**	22,0	20,0*	33,0	0,9	48,0
48h	13,1	39,7	6000	219000	2,2*	7,9**	30,0	26,0	34,0	0,9	28,0
72h	12,5	36,7*	6500	299000	2,1*	7,7**	21,0	18,0*	33,0	0,8	41,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa

**Valores acima do valor superior da faixa

7.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido mastigável de Doxiciclina na dosagem de 100 mg sem o uso de suplemento vitamínico (segunda semana de estudo).

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Cacau
 Sexo F
 ID 458573
 Peso 10,30

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	14,2	41,4	5700*	104000**	2,5*	6,4**	43,0	14,0*	24,0	0,6	24,0
24h	13,7	42,1	5900*	144000**	2,9	6,3**	61,0	16,0*	23,0	0,7	32,0
48h	14,1	41,8	6700	128000**	2,6	6,0**	45,0	15,0*	22,0	0,7	30,0
72h	12,6	40,3	5200*	106000**	2,4*	5,7**	43,0	16,0*	20,0*	0,7	21,0

Nome Sultão
 Sexo M
 ID 594686
 Peso 12,30

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	14,5	41,2	10800	246000	2,8	4,6**	27,0	15,0*	36,0	0,8	26,0
24h	14,9	45,1	10800	248000	3,3	4,7**	40,0	22,0*	36,0	0,9	37,0
48h	14,5	42,2	10500	195000	2,7	4,3	20,0	22,0*	33,0	0,8	33,0
72h	13,1	40,8	9600	199000	2,7	4,3	23,0	20,0*	30,0	0,9	32,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
 **Valores acima do valor superior da faixa

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Chuchuzinha
Sexo F
ID 503648
Peso 9,80

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	11,4*	34,8*	62000	140000*	1,9*	7,0**	28,0	24,0	22,0	0,5	26,0
24h	11,1*	35,7*	7100	156000*	2,2*	7,4**	51,0	21,0*	25,0	0,8	32,0
48h	11,1*	33,5*	8200	212000	1,8*	6,7**	35,0	22,0*	23,0	0,7	40,0
72h	10,3*	33,6*	8000	171000*	1,8*	7,1**	31,0	25,0	23,0	0,7	35,0

Nome Mary Jane
Sexo F
ID 458734
Peso 10,60

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	17,8	49,1	16600	274000	3,4**	4,2	73,0	19,0*	27,0	0,6	31,0
24h	14,9	46,4	13100	280000	3,2	3,5	61,0	19,0*	25,0	0,7	30,0
48h	16,5	49,3	15400	180000	3,1	4,1	63,0	24,0	25,0	0,7	29,0
72h	13,7	42,5	14900	144000*	2,9	3,6	53,0	23,0	24,0	0,7	19,0*

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
**Valores acima do valor superior da faixa

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Fred
Sexo M
ID 459368
Peso 12,50

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	13,7	40,6	8100	308000	2,4*	5,4**	36,0	14,0*	73,0	0,5	22,0
24h	12,8	40,0	7700	280000	2,6	5,6**	47,0	16,0*	43,0	0,8	28,0
48h	13,4	39,6	8800	330000	2,3*	5,4**	35,0	14,0*	37,0	0,7	27,0
72h	12,4	39,4	9200	301000	2,3*	5,4**	37,0	17,0*	35,0	0,7	26,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
**Valores acima do valor superior da faixa

7.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos a partir da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxiciclina na dosagem de 100 mg sem o uso de suplemento vitamínico (segunda semana de estudo).

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leocócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Kiara
Sexo F
ID 288372
Peso 10,80

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leocócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	10,3*	30,2*	6400	160000*	2,2*	6,6**	64,0	19,0	26,0	0,5	21,0
24h	11,7*	36,8*	3600*	92000*	2,3*	6,7**	126,0	17,0	24,0	0,7	28,0
48h	12,4	36,9*	4800*	208000	2,1*	7,0**	110,0	17,0	21,0	0,6	27,0
72h	12,0	37,0	4300*	209000	2,2*	6,3**	105,0	24,0	23,0	0,7	28,0

Nome Tequila
Sexo F
ID 458743
Peso 10,80

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leocócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	15,5	44,9	9300	313000	3,1	3,4	39,0	26,0	31,0	0,6	32,0
24h	15,9	48,5	7000	78000*	3,3	4,3	65,0	20,0*	29,0	0,9	42,0
48h	14,9	43,1	9600	232000	2,7	4,4	54,0	22,0*	30,0	0,8	40,0
72h	13,9	42,9	10200	258000	2,7	4,3	50,0	24,0	32,0	0,8	52,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
**Valores acima do valor superior da faixa

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Eurico
Sexo M
ID 288437
Peso 12,10

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	13,7	40,3	5200*	191000	3,0	5,7	55,0	21,0*	25,0	0,6	25,0
24h	12,8	40,6	6600	205000	2,8	5,7	61,0	23,0	22,0	0,9	36,0
48h	13,1	38,4	8000	247000	2,7	5,2	64,0	18,0*	19,0*	0,8	41,0
72h	12,6	40,0	7000	241000	2,5*	5,5	63,0	19,0*	20,0*	0,8	34,0

Nome Dilan
Sexo M
ID 293700
Peso 12,25

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	13,4	38,9	9300	319000	2,2*	4,9**	66,0	14,0*	29,0	0,5	38,0
24h	13,0	40,4	8800	253000	2,7	4,7**	180,0**	18,0*	29,0	0,7	32,0
48h	13,6	39,5	7900	194000	2,5*	4,5**	171,0**	19,0*	28,0	0,6	37,0
72h	12,1	37,5	7100	248000	2,3*	4,5**	158,0**	25,0	28,0	0,6	31,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
**Valores acima do valor superior da faixa

Faixa Hemoglobina	Faixa Hematócrito	Faixa Leucócitos	Faixa Plaquetas	Faixa Albumina	Faixa Globulinas	Faixa Fosfatase	Faixa AST	Faixa ALT	Faixa Creatinina	Faixa Uréia
12,0	37,0	6000	175000	2,6	2,7	20,0	23,0	21,0	0,5	21,0
18,0	55,0	17000	500000	3,3	4,4	156,0	66,0	102,0	1,5	59,9

Nome Maria Aparecida
Sexo F
ID 595950
Peso 9,70

Tempo (horas)	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
0h	10,8*	32,6*	7400	160000*	2,3*	5,9**	49,0	19,0*	29,0	0,5	28,0
24h	12,0	37,4	8300	131000*	2,3*	6,9**	68,0	23,0	24,0	0,7	29,0
48h	11,1*	34,6*	8300	168000*	2,0*	6,4**	61,0	17,0*	19,0*	0,7	29,0
72h	11,0*	35,9*	8200	175000	2,3*	6,7**	61,0	23,0	19,0*	0,7	30,0

Legenda: * Valores abaixo do valor inferior da faixa
 **Valores acima do valor superior da faixa

7.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos antes (t = 0h) da administração oral das formulações: comprimido de Doxíclicina e comprimido mastigável de Doxíclicina na dosagem de 100 mg.

Comprimido de Doxíclicina 100 mg														
Peso	Animal	Sexo	Nome	Hemoglobina	Hematócrito	Leocócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
9,80	503648	F	Chuchuzinha	11,4	34,8	62000	140000	1,9	7,0	28,0	24,0	22,0	0,5	26,0
9,30	288376	F	Florência	11,3	33,6	12200	293000	2,4	7,4	37,0	19,0	27,0	0,5	23,0
10,30	458673	F	Cacau	14,2	41,4	5700	104000	2,5	6,4	43,0	14,0	24,0	0,6	24,0
10,60	458734	F	Mary Jane	17,8	49,1	16600	274000	3,4	4,2	73,0	19,0	27,0	0,6	31,0
12,05	595340	M	Galileu	11,9	35,9	4800	164000	2,0	7,8	36,0	16,0	37,0	0,7	41,0
12,05	44118	M	Bobí	11,4	33,6	9700	542000	2,9	3,6	22,0	27,0	65,0	0,5	28,0
12,30	594686	M	Sultão	14,5	41,2	10800	246000	2,8	4,6	27,0	15,0	36,0	0,8	26,0
10,40	288417	M	Carlos Daniel	11,0	32,8	10200	359000	3,0	3,6	13,0	23,0	32,0	0,5	27,0
12,50	459368	M	Fred	13,7	40,6	8100	308000	2,4	5,4	36,0	14,0	73,0	0,5	22,0
13,40	503558	F	Matilda	14,8	44,7	8200	184000	2,7	5,7	79,0	19,0	21,0	0,4	30,0
Média				13,2	38,8	14830	261400	2,6	5,6	39,4	19,0	36,4	0,6	27,8
Comprimido mastigável de Doxíclicina 100 mg														
9,80	8601	F	Marilu	11,3	33,3	14400	250000	2,6	5,4	21,0	16,0	37,0	0,4	21,0
10,80	288372	F	Kiara	10,3	30,2	6400	160000	2,2	6,6	64,0	19,0	26,0	0,5	21,0
11,70	503630	F	Margot	14,3	40,7	12900	296000	2,7	4,4	59,0	16,0	24,0	0,6	38,0
10,80	458743	F	Tequila	15,5	44,9	9300	313000	3,1	3,4	39,0	26,0	31,0	0,6	32,0
12,10	288437	M	Eurico	13,7	40,3	5200	191000	3,0	5,7	55,0	21,0	25,0	0,6	25,0
12,25	293700	M	Dilan	13,4	38,9	9300	319000	2,2	4,9	66,0	14,0	29,0	0,5	38,0
12,30	596143	M	Benjamin	14,8	42,9	10300	190000	2,9	5,2	17,0	19,0	31,0	0,4	21,0
10,85	604885	M	Freud	9,9	29,1	10700	214000	2,1	6,6	41,0	17,0	33,0	0,5	27,0
12,35	458721	M	Joarez	13,9	41,0	12000	315000	2,6	6,5	33,0	19,0	30,0	0,5	29,0
9,70	595950	F	Maria Aparecida	10,8	32,6	7400	160000	2,3	5,9	49,0	19,0	29,0	0,5	28,0
Média				12,8	37,4	9790	240800	2,6	5,5	44,4	18,6	29,5	0,5	28,0

7.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos após 24 horas da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxíciclina e comprimido mastigável de Doxíciclina na dosagem de 100 mg (segunda semana de estudo).

Comprimido de Doxíciclina 100 mg														
Peso	Animal	Sexo	Nome	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
9,80	503648	F	Chuchuzinha	11,1	35,7	7100	156000	2,2	7,4	51,0	21,0	25,0	0,8	32,0
9,30	288376	F	Florência	13,7	38,4	7000	161000	2,4	7,2	54,0	23,0	24,0	0,8	34,0
10,30	458673	F	Cacau	13,7	42,1	5900	144000	2,9	6,3	61,0	16,0	23,0	0,7	32,0
10,60	458734	F	Mary Jane	14,9	46,4	13100	280000	3,2	3,5	61,0	19,0	25,0	0,7	30,0
12,05	595340	M	Galileu	18,0	53,7	3400	183000	2,3	7,9	22,0	20,0	33,0	0,9	48,0
12,05	44118	M	Bobí	15,8	41,4	7800	439000	2,9	3,9	26,0	27,0	38,0	0,8	34,0
12,30	594686	M	Sultão	14,9	45,1	10800	248000	3,3	4,7	40,0	22,0	36,0	0,9	37,0
10,40	288417	M	Carlos Daniel	9,7	29,0	9600	379000	3,3	3,6	27,0	29,0	30,0	0,7	37,0
12,50	459368	M	Fred	12,8	40,0	7700	280000	2,6	5,6	47,0	16,0	43,0	0,8	28,0
13,40	503558	F	Matilda	15,7	42,3	8500	216000	3,1	5,5	73,0	18,0	23,0	0,6	40,0
Média				14,03	41,4	8090	248600	2,8	5,6	46,2	21,1	30	0,8	35,2
Comprimido mastigável de Doxíciclina 100 mg														
9,80	8601	F	Marilu	12,6	36,1	13200	224000	2,9	6,4	42,0	15,0	36,0	0,6	36,0
10,80	288372	F	Kiara	11,7	36,8	3600	92000	2,3	6,7	126,0	17,0	24,0	0,7	28,0
11,70	503630	F	Margot	9,6	29,7	4600	56000	2,5	4,7	170,0	23,0	21,0	0,8	50,0
10,80	458743	F	Tequila	15,9	48,5	7000	78000	3,3	4,3	65,0	20,0	29,0	0,9	42,0
12,10	288437	M	Eurico	12,8	40,6	6600	205000	2,8	5,7	61,0	23,0	22,0	0,9	36,0
12,25	293700	M	Dilan	13,0	40,4	8800	253000	2,7	4,7	180,0	18,0	29,0	0,7	32,0
12,30	596143	M	Benjamin	15,3	41,8	12000	151000	3,0	5,7	14,0	25,0	29,0	0,8	27,0
10,85	604885	M	Freud	13,9	41,4	8000	213000	2,3	7,6	34,0	20,0	30,0	0,8	34,0
12,35	458721	M	Joarez	14,0	39,9	8800	211000	2,8	5,6	20,0	20,0	32,0	0,7	31,0
9,70	595950	F	Maria Aparecida	12,0	37,4	8300	131000	2,3	6,9	68,0	23,0	24,0	0,7	29,0
Média				13,1	39,3	8090	161400	2,7	5,8	78	20,4	27,6	0,8	34,5

7.8 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos após 48 horas da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxíciclina e comprimido mastigável de Doxíciclina na dosagem de 100 mg (segunda semana de estudo).

Comprimido de Doxíciclina 100 mg														
Peso	Animal	Sexo	Nome	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
9,80	503648	F	Chuchuzinha	11,1	33,5	8200	212000	1,8	6,7	35,0	22,0	23,0	0,7	40,0
9,30	288376	F	Florência	10,2	28,3	12000	213000	2,3	6,8	70,0	16,0	20,0	0,6	23,0
10,30	458673	F	Cacau	14,1	41,8	6700	128000	2,6	6	45,0	15,0	22,0	0,7	30,0
10,60	458734	F	Mary Jane	16,5	49,3	15400	180000	3,1	4,1	63,0	24,0	25,0	0,7	29,0
12,05	595340	M	Galileu	13,1	39,7	6000	219000	2,2	7,9	30,0	26,0	34,0	0,9	28,0
12,05	44118	M	Bobí	11,8	34,1	10400	510000	2,9	3,9	37,0	20,0	38,0	0,7	26,0
12,30	594686	M	Sultão	14,5	42,2	10500	195000	2,7	4,3	20,0	22,0	33,0	0,8	33,0
10,40	288417	M	Carlos Daniel	10,2	30,4	10500	394000	2,9	3,3	37,0	27,0	29,0	0,7	21,0
12,50	459368	M	Fred	13,4	39,6	8800	330000	2,3	5,4	35,0	14,0	37,0	0,7	27,0
13,40	503558	F	Matilda	14,9	41,9	9500	235000	3,1	4,9	87,0	17,0	24,0	0,6	21,0
Média				13,0	38,1	9800	261600	2,6	5,3	45,9	20,3	28,5	0,7	27,8
Comprimido mastigável de Doxíciclina 100 mg														
9,80	8601	F	Marilu	11,1	31,4	13500	241000	2,6	5,6	21,0	17,0	38,0	0,4	19,0
10,80	288372	F	Kiara	12,4	36,9	4800	208000	2,1	7	110,0	17,0	21,0	0,6	27,0
11,70	503630	F	Margot	9,9	26,2	6200	80000	2,5	4,4	162,0	19,0	20,0	0,7	40,0
10,80	458743	F	Tequila	14,9	43,1	9600	232000	2,7	4,4	54,0	22,0	30,0	0,8	40,0
12,10	288437	M	Eurico	13,1	38,4	8000	247000	2,7	5,2	64,0	18,0	19,0	0,8	41,0
12,25	293700	M	Dilan	13,6	39,5	7900	194000	2,5	4,5	171,0	19,0	28,0	0,6	37,0
12,30	596143	M	Benjamin	14,3	41,3	14000	148000	3,0	5,2	25,0	30,0	32,0	0,7	24,0
10,85	604885	M	Freud	11,9	32,6	11200	269000	2,1	7,0	44,0	20,0	28,0	0,7	20,0
12,35	458721	M	Joarez	13,3	39,1	10400	290000	2,7	4,6	29,0	25,0	31,0	0,8	26,0
9,70	595950	F	Maria Aparecida	11,1	34,6	8300	168000	2	6,4	61,0	17,0	19,0	0,7	29,0
Média				12,6	36,3	9390	207700	2,5	5,4	74,1	20,4	26,6	0,7	30,3

7.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos após 72 horas da administração oral em dose única do comprimido (Doxifin) de Doxíciclina e comprimido mastigável de Doxíciclina na dosagem de 100 mg (segunda semana de estudo).

Comprimido de Doxíciclina 100 mg														
Peso	Animal	Sexo	Nome	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas	Albumina	Globulinas	Fosfatase Alcalina	AST	ALT	Creatinina	Uréia
9,80	503648	F	Chuchuzinha	10,3	33,6	8000	171000	1,8	7,1	31,0	25,0	23,0	0,7	35,0
9,30	288376	F	Florência	10,5	31,6	12400	152000	2,3	7,0	59,0	16,0	17,0	0,6	25,0
10,30	458673	F	Cacau	12,6	40,3	5200	106000	2,4	5,7	43,0	16,0	20,0	0,7	21,0
10,60	458734	F	Mary Jane	13,7	42,5	14900	144000	2,9	3,6	53,0	23,0	24,0	0,7	19,0
12,05	595340	M	Galileu	12,5	36,7	6500	299000	2,1	7,7	21,0	18,0	33,0	0,8	41,0
12,05	44118	M	Bobí	11,5	34,1	12700	511000	2,7	4,1	31,0	19,0	36,0	0,7	27,0
12,30	594686	M	Sultão	13,1	40,8	9600	199000	2,7	4,3	23,0	20,0	30,0	0,9	32,0
10,40	288417	M	Carlos Daniel	10,2	29,3	9300	358000	2,9	3,8	32,0	30,0	29,0	0,8	34,0
12,50	459368	M	Fred	12,4	39,4	9200	301000	2,3	5,4	37,0	17,0	35,0	0,7	26,0
13,40	503558	F	Matilda	14,8	43,2	8400	251000	3,2	5,0	82,0	13,0	22,0	0,6	39,0
Média				12,16	37,2	9620	249200	2,5	5,4	41,2	19,7	26,9	0,7	29,9
Comprimido mastigável de Doxíciclina 100 mg														
9,80	8601	F	Marilu	11,7	34,1	13500	220000	2,6	5,6	41,0	21,0	32,0	0,7	33,0
10,80	288372	F	Kiara	12,0	37	4300	209000	2,2	6,3	105,0	24,0	23,0	0,7	28,0
11,70	503630	F	Margot	10,0	28,3	11400	130000	2,5	4,9	139,0	16,0	19,0	0,8	55,0
10,80	458743	F	Tequila	13,9	42,9	10200	258000	2,7	4,3	50,0	24,0	32,0	0,8	52,0
12,10	288437	M	Eurico	12,6	40,0	7000	241000	2,5	5,5	63,0	19,0	20,0	0,8	34,0
12,25	293700	M	Dilan	12,1	37,5	7100	248000	2,3	4,5	158,0	25,0	28,0	0,6	31,0
12,30	596143	M	Benjamin	14,9	42,3	14900	179000	2,9	5,2	16,0	25,0	30,0	0,7	24,0
10,85	604885	M	Freud	11,0	30,7	11200	280000	2,2	7,2	33,0	18,0	27,0	0,8	33,0
12,35	458721	M	Joarez	13,9	39,0	11900	295000	3,1	5,3	25,0	20,0	33,0	0,8	32,0
9,70	595950	F	Maria Aparecida	11,0	35,9	8200	175000	2,3	6,7	61,0	23,0	19,0	0,7	30,0
Média				12,3	36,8	9970	223500	2,5	5,6	69,1	21,5	26,3	0,7	35,2