

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Aperfeiçoamento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de minociclina na análise da matéria prima.

Joanna Wittckind Manoel

Porto Alegre, novembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Aperfeiçoamento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de minociclina na análise da matéria prima.

Joanna Wittckind Manoel

Trabalho final da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em
Farmácia

Orientador: Prof Dr^a Nádia Maria Volpato

Coorientador: M. Sc Jaison Carlosso Machado

Porto Alegre, novembro de 2013.

“O sucesso é uma consequência, e não um objetivo”

Gustave Flaubert

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Nádia Maria Volpato pela oportunidade de orientação, apoio, confiança e revisão crítica.

Ao meu coorientador Jaison Carlosso Machado pelo apoio e transferência de conhecimento.

Ao professor Dr. Tércio Paschke Oppe pela oportunidade de participar do projeto Revisão de Monografias de Insumos e Especialidades Farmacêuticas da Farmacopeia Brasileira.

Às minhas colegas de laboratório pela amizade e companheirismo, pois sempre estiveram ao meu lado para compartilhar dúvidas, apoiar e me ensinar.

À Lorena e à Letícia pelo apoio e ajuda na rotina do laboratório.

Ao Fabiano que esteve sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

Aos meus pais que sempre me deram amor, apoio e dedicação ao longo dos anos, por acreditar e investir na minha formação. Ao meu irmão e cunhada pelo incentivo e amizade sempre.

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos

BP – British Pharmacopoeia

USP – United States Pharmacopeia

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ACN – Acetonitrila

THF – Tetrahidrofurano

TEA – Trietilamina

DMF - Dimetilformamida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Substância Química de Referência e Amostra.....	14
Reagentes.....	15
Equipamentos.....	15
Validação da metodologia analítica.....	15
Especificidade.....	15
Linearidade.....	17
Precisão.....	17
Exatidão.....	17
Robustez.....	18
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	19
AGRADECIMENTOS	22
REFERÊNCIAS	22
ANEXO I – Tabelas	24
ANEXO II - Figuras	28
ANEXO III – Regras para publicação	33

**Este artigo foi elaborado segundo as normas da
Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada apresentadas em anexo.**

Aperfeiçoamento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de minociclina na análise da matéria prima.

Joanna Wittckind Manoel^{a*}, Jaison Carlosso Machado^b, Nádia Maria Volpato^c

Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752 Lab. 403, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

^a Acadêmica da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

^b Aluno de Doutorado no PPGCF – UFRGS.

^c Professora Associada do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos – UFRGS.

*joannamanoel@terra.com.br

RESUMO

A Minociclina é um antibiótico semi-sintético de segunda geração de administração oral. Usado no tratamento de infecções genitourinárias, infecções na pele e tecidos moles, pneumonia atípica, entre outros. As farmacopeias americana (USP) e britânica (BP) preconizam o doseamento da matéria-prima minociclina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando solventes como tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) e oxalato de amônio. O objetivo deste trabalho foi propor alterações cromatográficas nos métodos propostos visando substituir modificador orgânico e otimizar o tempo de retenção do fármaco, de modo que o método possua especificidade para emprego em estudos de estabilidade do fármaco. Para isso diversas condições foram testadas e a condição a qual utilizou-se coluna Bridge C8 (250x4,6 mm, 5,0 μ m), à temperatura de 40 °C, com fase móvel composta de tampão fosfato de potássio pH 7,0, acetonitrila e trietilamina (TEA) (75:25:0,5; v/v), a uma vazão de 1,0 mL/min foi a que se mostrou mais simples e reprodutível. As amostras foram preparadas na concentração de 200 μ g/mL em fase móvel. O método desenvolvido foi validado e apresentou ser preciso (DPR= 1,79); específico frente às condições de estresse a que a amostra foi submetida; linear na faixa de concentração de 25,0 a 500,0 μ g/mL, com coeficiente de correlação igual a 0,9999; exato e robusto, indicando ser adequado para o controle de qualidade da matéria prima de minociclina.

Palavras-chave: Validação. Minociclina. Controle de qualidade.

ABSTRACT

Minocycline is a second-generation semisynthetic antibiotic of oral administration. It is used in the treatment of genitourinary infections, skin and soft tissue atypical pneumonia and others. The American (USP) and British (BP) pharmacopoeia recommend the determination of minocycline raw material by high performance liquid chromatography (HPLC) using solvents such as tetrahydrofuran (THF), dimethylformamide (DMF) and ammonium oxalate. The aim of this study was propose changes in the chromatographic method intended to replace the organic modifier and optimize the drug retention time, so that the method has specificity for use in stability studies. For that different conditions were tested and the one that uses Bridge C8 (250x4, 6 mm, 5.0 mM) column at 40 ° C with a mobile phase consisting of potassium phosphate buffer pH 7.0 acetonitrile and triethylamine (TEA) (75:25:0.5, v/v) at a flow rate of 1.0 ml/min, proved to be the simpler and more reproducible condition. The samples were prepared in a concentration of 200 µg/ml in mobile phase. The method was validated and showed to be precise (RSD = 1.79); specific due to the conditions of stress which the sample was subjected; linear in the concentration range from 25.0 to 500.0 mg/mL, with a coefficient of correlation coefficient of 0.9999, exact and robust, indicating that it is suitable for quality control of minocycline raw material.

Keywords : Validation . Minocycline . Quality control

INTRODUÇÃO

Tetraciclina é uma classe de antibiótico bacteriostático de amplo espectro de ação, a qual inclui a maioria dos microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, micoplasma, clamídias, rickettsias e protozoários (RANGE e DALE, 2007). As tetraciclina possuem características particulares como baixa toxicidade, baixo custo e são, na maioria das apresentações, administradas por via oral. Além de seu espectro de ação antibiótica, também estão sendo utilizadas no tratamento de doenças não infecciosas, tais como artrite reumatoide e câncer. O mecanismo de ação é bem elucidado (Figura 1), ocorrendo por inibição reversível da síntese proteica das bactérias, através da ligação das tetraciclina em um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Assim, não ocorre a ligação do aminoácido aminoacil-t-RNA no sítio A, o que, conseqüentemente, impede a adição de aminoácidos (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

A minociclina, antibiótico pertencente à classe das tetraciclina, é um fármaco semi-sintético de segunda geração. Possui maior caráter lipofílico, por isso, em comparação com outras tetraciclina, se mostra mais ativa. Tem como indicação terapêutica o tratamento de infecções genitourinárias (uretrite, cistite, vaginite), infecções na pele e tecidos moles (acne, furunculose, erisipela, impetigo), pneumonia atípica, entre outros. A dose usual é de 200 mg no início do tratamento, seguido de 100 mg administradas a cada 12 horas (200 mg/dia), possui tempo de meia-vida superior a 15 h, sendo que sua absorção gastrointestinal é quase total. A excreção é principalmente biliar e renal. Este medicamento consta na relação Nacional de Medicamentos (RENAME) e sua estrutura química está representada na Figura 2 (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010; RENAME 2012).

As Farmacopeias Britânica (BP) e Americana (USP) apresentam análises referentes à matéria-prima deste fármaco. Os doseamentos são realizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando os materiais citados na Tabela 1.

CLAE é uma técnica separativa bastante utilizada na análise farmacêutica. Este é um dos métodos selecionados pela indústria farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos. É o procedimento mais preconizado pelos Códigos Oficiais, pois fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos fabricados (WATSON, 2005). Outras vantagens que podem ser citadas são: possibilidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos, pequeno tempo de análise, boa eficiência, resolução e detectabilidade. Suas vantagens e limitações estão resumidas na Tabela 2 (COLLINS, 2006).

A amostra costuma ser dissolvida na fase móvel - composta por um solvente ou por uma mistura destes – e introduzida em uma coluna cromatográfica preenchida com fase estacionária. A fase móvel é bombeada com vazão constante deslocando os componentes da mistura através da coluna, os quais se distribuem de acordo com suas afinidades. As substâncias com maior afinidade pela fase estacionária movem-se mais lentamente, enquanto que as com menor afinidade movem-se mais rapidamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, formando o cromatograma (Farmacopeia Brasileira, 2010).

As condições cromatográficas descritas na Tabela 1 indicam a utilização de THF, DMF e oxalato de amônio na composição da fase móvel. Uma das propostas deste trabalho é a modificação dos solventes utilizados na fase móvel nos códigos consultados. As características de solventes empregados em CLAE estão apresentadas

na Tabela 3. Comparado à ACN, o THF possui como desvantagem uma maior viscosidade, o que pode ocasionar resultados indesejados como aumento da pressão na coluna e diminuição no número de pratos teóricos (LINDSAY, 1992).

Na Figura 3 podemos observar o comportamento de viscosidade quando solventes orgânicos são misturados com água. O gráfico apresenta a informação de que esta propriedade física não varia linearmente com o aumento da proporção de um dos solventes. À medida que aumenta a proporção de água na mistura com o THF observamos o aumento da viscosidade. Quando a proporção de água superior a 60% verifica-se um acentuado decaimento. Já, quando utilizamos a acetonitrila observamos que a porcentagem aumenta até próximo da adição de 70% de água e a mesma não decai muito após esta porcentagem (WATERS, 2013).

A polaridade dos solventes também é um quesito a ser analisado. Uma coluna C8 possui características apolares, por isso o analito mais polar elui primeiro, seguido pelos outros em ordem decrescente de polaridade. Devido a esta característica, deve-se analisar o solvente orgânico assim como a proporção da mistura da fase móvel, a fim de buscar a relação ideal. Também, o ponto de corte na análise por UV da ACN é menor que do THF, diminuindo assim os problemas de detecção (SNYDER, 1997). A adição da trietilamina (TEA) tem como objetivo a diminuição da cauda do pico. Na coluna C8 a função da TEA é suprimir as interações entre os grupos silanóis fortemente ionizados (-Si-OH) presentes na superfície da sílica com analitos alcalinos. Os silanóis ionizados (Si-O) serão embebidos pelo excesso de TEA na fase móvel e não vão interagir com os compostos alcalinos e, conseqüentemente,, não causarão o efeito cauda. Picos com cauda podem causar inúmeros problemas, incluindo baixa resolução, sensibilidade reduzida, precisão e quantificação inadequada (LINDSAY, 1992).

ZAWILLA e colaboradores (2005) apresentam uma otimização da técnica de cromatografia líquida na análise da matéria-prima minociclina apresentadas pela USP e BP. A coluna utilizada foi XTerra LP-18 (25 cm x 4,6 mm, 5µm), modo isocrático, com fase móvel composta por ACN; hidrogenossulfato de tetrabutylamônio 0,2M pH 6,5; EDTA 0,2M pH 6,5 e água (20:20:20:40). A vazão foi de 1 mL/min e a detecção foi a 280 nm, tendo todos os componentes eluidos no tempo de 20 minutos.

JAIN e colaboradores (2007) desenvolveram e validaram um método por cromatografia em camada delgada de alta eficiência para análise de minociclina. A fase móvel utilizada era composta de metanol, ACN, água e álcool isopropílico (5:4:0,5:0,5). A detecção foi realizada a 345 nm. O método se mostrou rápido, sensível, específico, exato e reprodutível, analisando também a matéria-prima em condições de estresse.

Considerando as características mencionadas para os sistemas cromatográficos oficiais de análise da minociclina e tendo em vista a importância do controle de qualidade na análise de insumos farmacêuticos e medicamentos, pretende-se, através deste trabalho, propor alterações nas condições de análise de minociclina, visando substituir modificador orgânico e otimizar a retenção do fármaco, de modo que o método seja indicativo de estabilidade para a matéria-prima.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substância Química de Referência e Amostra

Cloridrato de Minociclina – The United States Pharmacopeia (Lote: JOJ275) com teor de 908 µg/mg, como substância anidra.

Cloridrato de minociclina. Matéria-prima comercializada pela empresa Fagron (Lote 100501#6). Fórmula molecular $C_{23}H_{27}N_3O_7 \cdot HCl \cdot 2H_2O$.

Reagentes

Água Milli-Q; acetonitrila grau CLAE (Tedia); fosfato de potássio (Sigma Aldrich) e trietilamina (Sigma Aldrich).

Equipamentos

Empregou-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu 20A, equipado com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20 AC, forno CTO-20AC e detector PDA SPD-M20A. O software utilizado para controle e aquisição dos dados foi o LC-Solution. Utilizou-se também medidor de pH Hanna Instruments pH21, estufa a vácuo, balança analítica e vidraria calibrada.

Validação da metodologia analítica

O novo método proposto foi validado conforme Resolução RE 899 (2003) e o guia International Conference on Harmonization (ICH) (Brasil, 2003; ICH, 2005). Os parâmetros de validação avaliados foram: precisão, linearidade, especificidade, exatidão e robustez. As condições experimentais utilizadas estão descritas na Tabela 4.

Especificidade

A especificidade foi assegurada por meio da degradação forçada da matéria-prima de cloridrato de minociclina, com o objetivo de avaliar se o método era passível de ser empregado em estudos de estabilidade do fármaco, onde é necessária a separação cromatográfica dos produtos de degradação do composto principal. A amostra foi submetida a condições de hidrólise ácida e básica, oxidação, fotólise (luz UVA e UVC) e temperatura elevada. Uma amostra controle foi preparada em fase móvel, não sendo submetida às degradações. Complementarmente, a pureza do pico foi analisada, através

do software do equipamento, em todas as condições de degradação. O preparo das soluções está descrito abaixo. Todas as soluções foram preparadas ao abrigo da luz e, antes de cada avaliação, filtradas em membrana de 0,45 µm.

Hidrólise ácida e básica: 10 mg do fármaco foram solubilizados em uma solução de ácido clorídrico 2M e hidróxido de sódio 2M, respectivamente, em balão volumétrico de 100 mL. O tempo de avaliação foi de 48h.

Degradação oxidativa: 10 mg do fármaco foram solubilizados em uma solução de peróxido de hidrogênio a 10% (v/v) em balão volumétrico de 100 mL avaliada em um tempo igual a 9h.

Fotólise (luz UVA): 10 mg de fármaco foram solubilizadas em fase móvel em balão volumétrico de 100 mL. A solução foi transferida para cubetas de quartzo e submetidas a câmara de radiação UV (100 x 18 x 17 cm) revestida com espelhos e equipada com lâmpada UV-A emitindo radiação a 352nm. O tempo de avaliação foi de 72 h.

Fotólise (luz UVC): o preparo das amostras foi realizado conforme a degradação fotolítica UV-A. A câmara possuía as mesmas características de dimensões e espelhamento interno, porém as cubetas foram submetidas a emissão de 254 nm. O tempo de avaliação foi de 72h.

Temperatura: 10 mg de fármaco foram solubilizados em fase móvel em balão volumétrico de 100 mL, transferidas para tubos de ensaio, os quais foram submetidos a temperatura de 60 °C em estufa por um período de 9h.

Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão do cloridrato de minociclina SQR em fase móvel contendo sete níveis de concentração. Para a avaliação deste parâmetro, foi preparada, inicialmente, uma solução estoque em fase móvel na concentração de 2500 µg/mL. A partir dessa solução foram retiradas alíquotas para obtenção de sete níveis de concentração: 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500,0 µg/mL. A linearidade foi avaliada em três dias e os dados obtidos foram submetidos à regressão linear e à análise de variância (ANOVA).

Precisão

A precisão foi realizada para avaliar a repetibilidade (precisão intradia) e a precisão intermediária (precisão interdia) da quantificação de cloridrato de minociclina nas soluções amostra. No preparo das soluções a fase móvel foi utilizada como solvente, obtendo-se concentração de 200 µg/mL de cloridrato de minociclina. Para avaliar a repetibilidade, foram preparadas 6 soluções amostra independentes e 2 soluções do padrão no mesmo dia. Na precisão intermediária, foram analisadas as amostras em três dias diferentes, sendo que no terceiro dia um segundo analista colaborou preparando todas as soluções. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

Exatidão

A exatidão foi analisada a partir da recuperação de uma concentração conhecida de padrão adicionada à solução amostra. Foi preparada, em fase móvel, uma solução estoque de amostra na concentração de 400 µg/mL e, uma solução de padrão na concentração de 500 µg/mL. O preparo das amostras foi realizado em balão volumétrico de 10 mL conforme apresentado na Tabela 5.

Robustez

Este quesito foi avaliado através de pequenas modificações nas condições nominais estabelecidas, tais como pH da fase móvel (6,8 e 7,2), vazão (0,9 e 1,1 mL/min), porcentagem de fase orgânica (23 e 27%) e coluna (Shim-pack; C8; 250x4,6 mm; 5,0 µm). Para avaliar a influência desses fatores realizou-se análise do tempo de retenção do fármaco, simetria do pico, pratos teóricos e teor nas diferentes condições.

Resultados

Validação da metodologia analítica

Especificidade e Cinética de Degradação

Na Figura 5 estão demonstrados os cromatogramas obtidos nas degradações.

Os dados de concentração do fármaco em função do tempo de exposição das amostras nas condições de estresse foram utilizados para determinar a ordem de reação de decaimento do fármaco. Para isso, foram plotados os gráficos de concentração *versus* tempo; *log* da concentração *versus* tempo e *1/concentração versus* tempo. Os gráficos obtidos estão apresentados na Figura 6.

Linearidade

Para avaliar a linearidade foram construídas três curvas no intervalo de 25,0 a 500,0 µg/mL, através das quais foi obtida a equação da reta para análise de dados (Figura 4). Na Tabela 6 estão demonstrados os valores obtidos na análise estatística realizada através da ANOVA, com inserção de desvio da linearidade nos pontos de variação.

Precisão

Na Tabela 7 são apresentados os resultados experimentais obtidos pelas determinações realizadas para a análise da precisão.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo método de adição de padrão. As análises foram realizadas em triplicata para cada nível avaliado. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Robustez

Os resultados obtidos para os parâmetros analisados estão apresentados na Tabela 9.

Discussão

A validação de um método analítico é realizada para garantir, por meio de avaliações experimentais, que o método atenda exigências a fim de assegurar resultados confiáveis. Para isso, foram realizados estudos para confirmar se o novo método proposto era específico, linear, preciso, exato e robusto.

A validação do método para análise da matéria-prima cloridrato de minociclina apresentou resultados satisfatórios. Foi demonstrada a possibilidade de se obter um método com fase móvel mais simples do que as descritas na BP e USP. Com a alteração do solvente orgânico esperou-se, baseado na literatura, uma alteração na viscosidade. A viscosidade influencia na eficiência, pois afeta o coeficiente de difusão acarretando em perdas de números de pratos teóricos da coluna. A menor viscosidade da ACN propicia maior número de pratos teóricos, elevando a eficiência da coluna. A modificação da viscosidade é vantajosa para a análise, porque com valores menores observa-se diminuição da pressão da coluna. A pressão no sistema também depende de outros fatores como comprimento da coluna, tamanho de partícula da fase estacionária, vazão e temperatura. O controle da temperatura é importante na medida correta do tempo de

retenção, a sua alteração pode aumentar a velocidade de separação. Devido a isso é importante o controle da temperatura durante todo o tempo de análise.

No desenvolvimento do método de doseamento de matéria-prima cloridrato de minociclina foram testadas alterações na composição da fase móvel, proporção de solvente orgânico e comprimentos de onda. A condição que apresentou melhor reprodutibilidade está apresentada na Tabela 9. Na composição da fase móvel foi utilizada 75 partes de solução tampão fosfato de potássio 0,05 M e trietilamina 0,5% e 25 partes de ACN. Neste novo planejamento o THF, componente orgânico da fase móvel, foi substituído por ACN. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 7.

Os parâmetros analisados durante a validação do método são discutidos abaixo.

A especificidade é a capacidade que o método possui de identificar exatamente o composto de interesse sem que a presença de outros componentes, como os produtos de degradação, interfiram na análise (ANVISA - RE 899, 2003). As amostras foram submetidas às degradações ácida e alcalina, oxidativa, luz UVA e UVC e temperatura elevada. Os produtos de degradação não interferiram na análise do fármaco de interesse, pois obteve-se uma boa resolução entre os picos conforme observamos nos cromatogramas observados na Figura 5. Os picos analisados apresentaram valor de pureza de 0,9999, calculado pelo software LC Solution.

Para avaliar a linearidade, foram construídas três curvas, as quais demonstraram que o método apresentou correlação linear entre a área e as concentrações, no intervalo de 25,0 a 500,0 µg/mL. A equação da reta obtida foi $y = 36519x - 91833$ com um coeficiente de correlação próximo da unidade (0,9999). Os dados demonstraram que não houve desvio de linearidade, visto que o valor de F calculado (0,75) foi inferior ao tabelado (2,57). Também foi observado que o intercepto difere estatisticamente da

origem ($P = 0,02$), pois foi inferior a 0,05. Entretanto o valor da área correspondente à origem foi inferior a 2% da área obtida para 200 $\mu\text{g/mL}$, portanto, não houve interferência na validação (Carr e Wahlich, 1990).

A precisão intradia foi avaliada através da repetibilidade de seis soluções amostra a 200 $\mu\text{g/mL}$ realizadas no mesmo dia e por três dias, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR obtidos foram de 0,57%, 0,81% e 1,16%. A precisão interdia foi avaliada pelo cálculo do DPR entre as amostras dos três dias tendo como valor 1,79. Os valores de desvios padrões relativos encontrados foram inferiores a 2%, indicando que o método é preciso.

Os percentuais de recuperação na análise da exatidão ficaram dentro dos limites especificados de 95 a 105%. Dessa forma o método foi capaz de medir exatamente o teor de cloridrato de minociclina em relação ao valor considerado verdadeiro.

A robustez é a medida da capacidade do método de resistir a pequenas alterações nos parâmetros analíticos e indica confiança na utilização do mesmo. Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram a resposta a pequenas variações realizadas no método. O número de pratos teóricos apresentou-se inferior aos demais quando realizou-se a troca da coluna. As pequenas alterações não afetaram consideravelmente a quantificação do fármaco. O parâmetro em que se observou mais alteração foi no tempo de retenção (6,24 a 9,47 min.), porém esse quesito não influenciou significativamente na determinação do teor do fármaco.

A cinética das degradações foram realizadas a fim de obter a ordem das reações. As degradações em solução básica, luz UVC e temperatura elevada resultaram em decaimento de ordem zero, ou seja, a reação de degradação obedece a uma velocidade constante independente da concentração do fármaco. A degradação oxidativa

demonstrou um decaimento de segunda ordem, o que significa que a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes ou ainda, da concentração de um reagente na segunda potência. Os tempos de meia vida das degradações básica, oxidativa, luz UVC e temperatura foram respectivamente de 37,1 h; 3,9 h; 49,6 h e 6,6 h. Quando a amostra foi submetida ao meio ácido obteve-se um pico no mesmo tempo de retenção da minociclina, conforme observado na Figura 8 e, na exposição à luz UVA, não foi observada degradação significativa, sendo assim estas condições foram descartadas a fim de avaliação da cinética de degradação. A luz UVA tem maior comprimento de onda e menor quantidade de energia que a luz UVC. Por isso as radiações UVC contribuem mais facilmente para o início de reações químicas que geram os compostos de degradação.

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que o método de CLAE proposto para o doseamento de matéria-prima cloridrato de minociclina mostrou ser simples, específico, linear, preciso, exato e robusto. Portanto, o seu uso é adequado no controle de qualidade deste fármaco.

Agradecimentos

À Farmacopeia Brasileira pela aquisição da substância química de referência (SQR) e amostra de minociclina e pela bolsa de iniciação científica recebida no Projeto Revisão de Monografias de Insumos e Especialidades Farmacêuticas da Farmacopeia.

Referências

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA. The Stationary Office: Pharmacopoeia Commission British, 2011, p. 1508 - 1509.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, 1ª ed., Editora Unicamp: Campinas, 2006.

Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; 2010.

G.P. Carr and J.C.Wahlich. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J. Pharm.Biomed.Anal.* **8**: 613–618 (1990)

[HTTP://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), acessada em outubro de 2013

ICH; *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.

Jain N., Jain G., Ahmad F., Khar R. Validated stability-indicating densitometric thin-layer chromatography: Application to stress degradation studies of minocycline. *Analytica Chimica Acta* 599 (2007) 302–309

Lindsay, Sandie; *High Performance Liquid Chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons: England 1992

Pereira -Maia, Elene Cristina et al . Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 33, n. 3, 2010 .

Rang & Dale - *Farmacologia* - 6ª Ed - 2007 - Ed. Elsevier

RENAME - Portaria N° 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

Snyder, Lloyd R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, Joseph L. *Practical HPLC method development*. 2nd ed. New York: J. Wiley, c1997. xxvi, 765

USP 34. *The United States Pharmacopeia*. 34 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011, p. 4373 - 4374.

Waters. *HPLC Columns Applications Notebook*. Disponível em: www.waters.com. Acesso: novembro de 2013.

Watson, G. D.; *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 2ª ed., Churchill Livingstone: London, 2005.

Zawilla NH, Diana J, Hogmartens J, Adams E. Improved LC of minocycline drug substance. National Organization for Drug Control and Research, Cairo, Egypt. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [2006, 40(4):815-821]

ANEXO I - Tabelas

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas no doseamento de cloridrato de minociclina nas Farmacopeias Britânica e Americana.

	Farmacopeia Britânica	Farmacopeia Americana
Coluna	C8, 4,6 mm x 20 cm, 5 µm	C18, 4,6mm x 25 cm, 5µm
Vazão	1 mL/min	1,5 mL/min
Detecção	280 nm	280 nm
Temperatura	---	40 °C
pH fase móvel	7,0	7,2
Fase móvel	EDTA 4 g/L (0,01M) : dimetilformamida : oxalato de amônio 28 g/L (0,2M) (25:27:50)	Dimetilformamida : tetrahydrofurano : oxalato de amônio 0,2 M : EDTA 0,01 M (120:80:600:180)

Tabela 2: Vantagens e limitações da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Vantagens	Desvantagens
Pequeno tempo de análise	Alto custo da instrumentação
Alta resolução	Alto custo da operação
Resultados quantitativos	Experiência do operador
Boa sensibilidade	
Versatilidade	
Automação	

Tabela 3: Características dos solventes orgânicos ACN e THF.

	Miscibilidade em água	Ponto de corte (UV)	Viscosidade	Polaridade
ACN	Sim	190 nm	0,37 cP	5,8
THF	Sim	215 nm	0,55 cP	4,0

Tabela 4: Condições cromatográficas desenvolvidas para análise da matéria prima cloridrato de minociclina.

Parâmetro	Descrição
Coluna	coluna Bridge C8 (250x4,6mm; 5,0 µm)
Temperatura	40 °C
Fase móvel	acetonitrila:fosfato de potássio:triethylamina (25:75:0,5 v/v/v), pH 7,0
Vazão	1,0 mL/min
Detecção	245nm
Volume de Injeção	20 µl

Tabela 5: Procedimento realizado na análise da exatidão.

		Amostra (0,4 mg/mL)		Padrão (0,5 mg/mL)		
		Concentração		Concentração		
Nível de adição de padrão		Volume (mL)	final de minociclina nativa (mg/mL)	Volume adicionado (mL)	final de minociclina adicionada (mg/mL)	Concentração teórica total (mg/mL)
N1	25%	5	0,2	1	0,05	0,25
N2	50%	5	0,2	2	0,10	0,30
N3	75%	5	0,2	3	0,15	0,35
Nativo	0%	5	0,2	0	0,00	0,20

Tabela 6: Análise estatística da linearidade pelo método proposto.

Fontes de Variação	gl ^a	SQ ^b	Variância	F calculado	F crítico
Entre doses	6	7,9628E+14	1,327E+14	10723	2,45
Regressão linear	1	7,9623E+14	7,962E+14	64332	12,7
Desvio linearidade	5	4,6466E+10	9,293E+09	0,75	2,57
Dentro	14	1,7328E+11	1,238E+10		
Total	20	7,9645E+14			

a. gl: graus de liberdade

b. SQ: soma de quadrados

Tabela 7: Precisão do método analítico por cromatografia líquida para determinação de minociclina matéria prima em base anidra e como cloridrato de minociclina (p/p).

	Teor minociclina intra-dia (% TQ ¹)	Teor em base anidra intra-dia (µg/mg)	DPR (%)
Dia 1	96,65	877,6	0,57
Dia 2	99,00	898,9	0,81
Dia 3	100,4	912,0	1,16
	Teor minociclina inter-dia (%)	Teor minociclina inter-dia (%)	DPR (%)
	98,81	897,2	1,79

1. TQ: pureza na amostra "tal qual"

Tabela 8: Exatidão do método analítico por cromatografia líquida para determinação de minociclina matéria prima.

Nível de adição de padrão	Concentração adicionada	Concentração Recuperada	% Recuperação	Recuperação Média
25%	0,05	0,052	104,00	104,00
		0,053	106,00	
		0,051	102,00	
50%	0,10	0,106	106,00	104,33
		0,103	103,00	
		0,104	104,00	
75%	0,15	0,157	104,67	104,22
		0,159	106,00	
		0,154	102,00	

Tabela 9: Robustez do método analítico por cromatografia líquida para determinação de minociclina matéria prima em base anidra.

Variação	Variação investigada	Tempo de Retenção	Simetria	Pratos teóricos	Doseamento (% p/p)	Doseamento Substância anidra (µg/mg)
pH	6,8	7,456	0,993	5796	99,92	907,3
	7,2	7,474	0,983	6794	99,11	899,9
Vazão (mL/min)	0,9	8,281	0,980	6959	98,60	895,3
	1,1	6,767	0,958	6125	98,70	896,2
% Fase orgânica	23	9,131	0,968	5939	100,09	908,8
	27	6,245	0,975	6958	98,59	895,2
Coluna		9,475	1,783	4856	99,43	902,8
Condições normais		7,458	0,974	6468	98,26	892,2

ANEXO II - Figuras

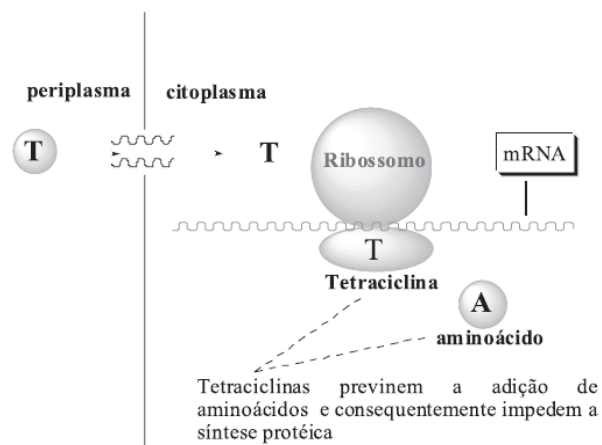


Figura 1: Mecanismo de ação da classe de antibióticos tetraciclina.

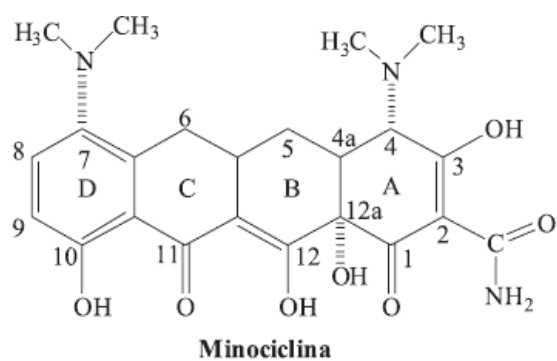


Figura 2: Estrutura química do fármaco minociclina.

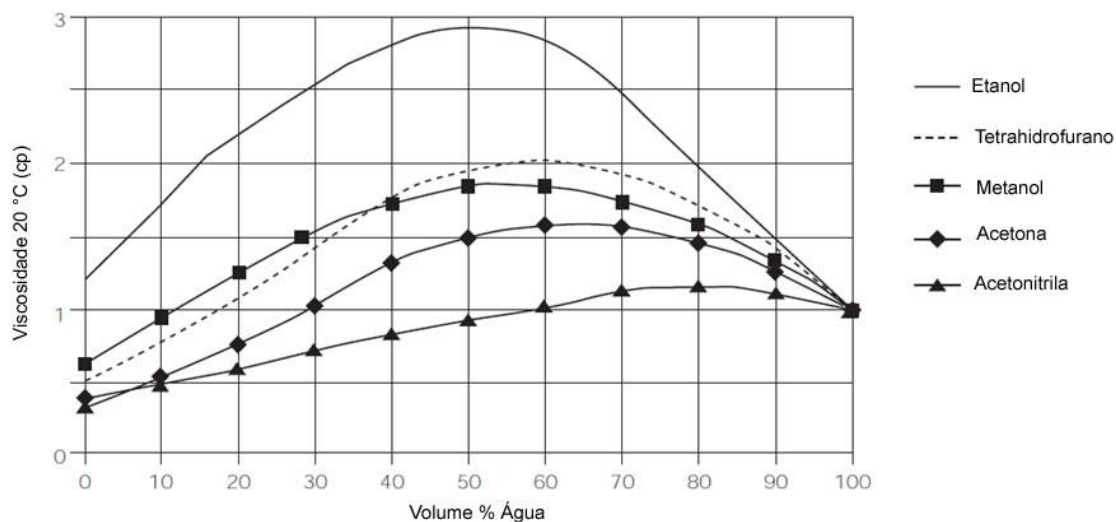


Figura 3: Gráfico de viscosidade de misturas aquosas de solventes orgânicos *versus* % de água.

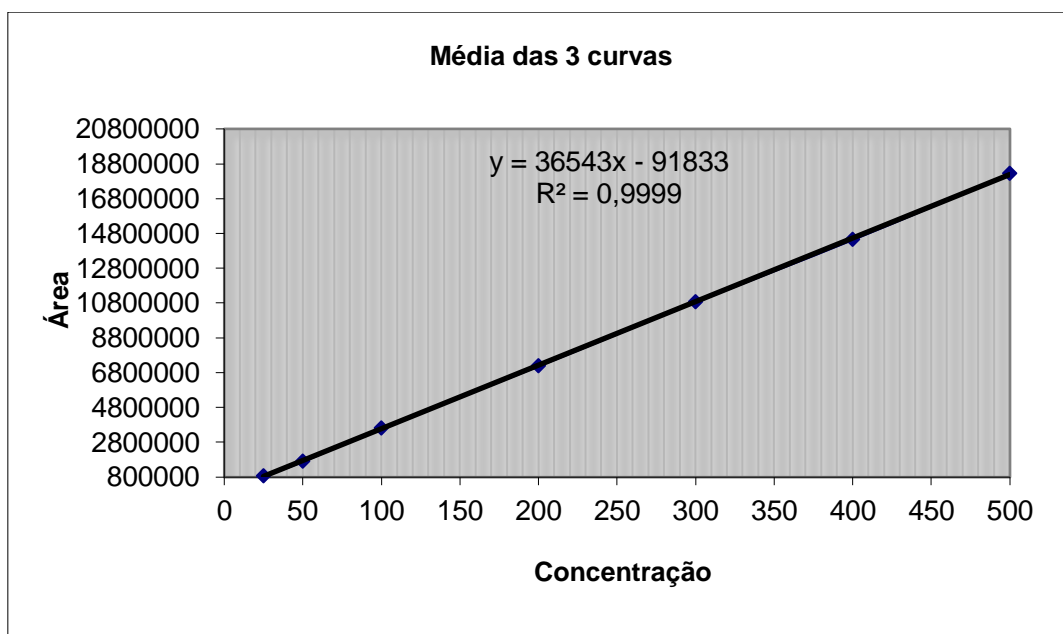


Figura 4: Representação gráfica da curva padrão de minociclina obtida por CLAE.

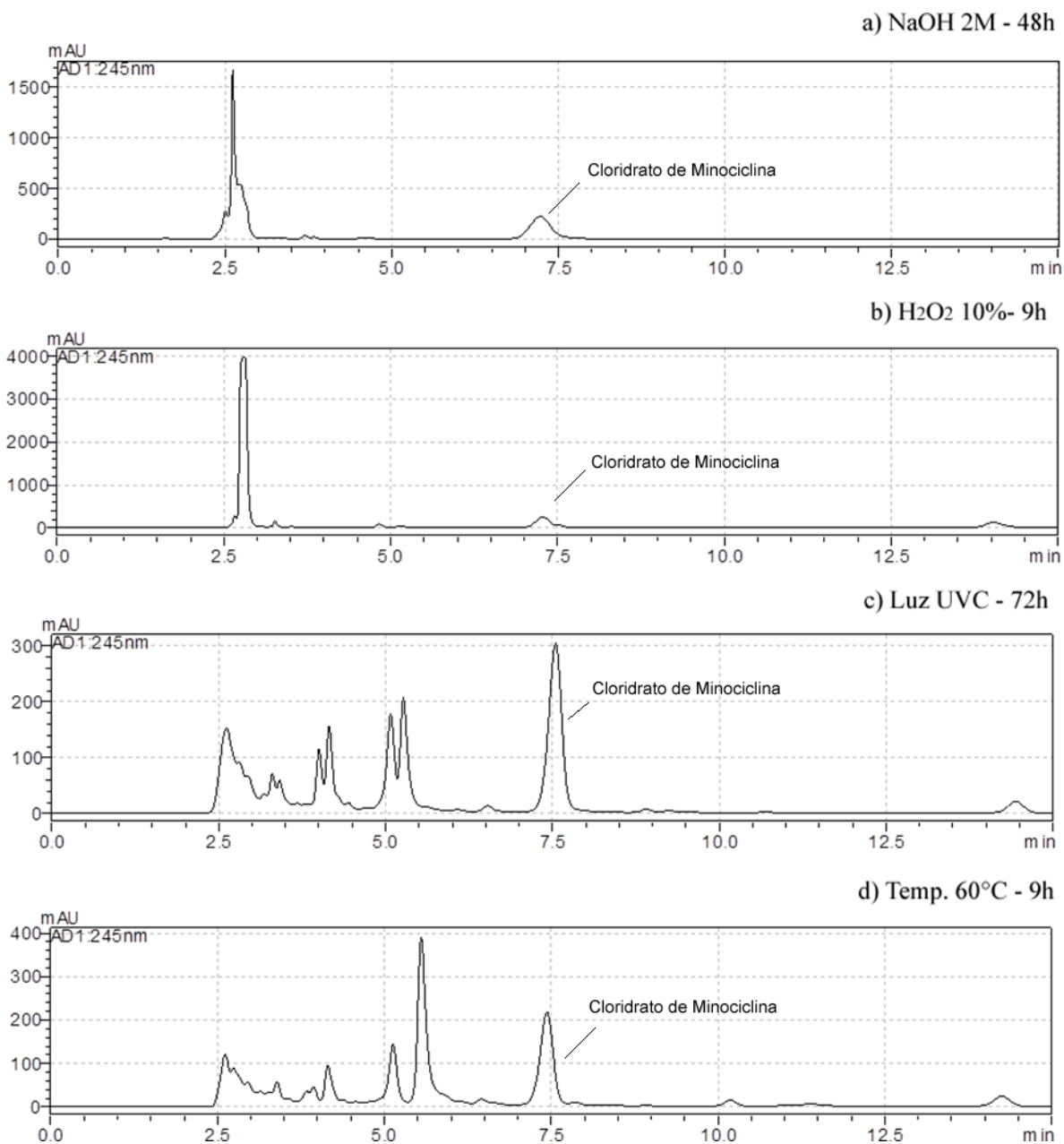


Figura 5: Cromatogramas obtidos frente às condições de estresse nas quais as amostras de minociclina foram submetidas: a) NaOH 2M (48h); b) H₂O₂ 10% (9h); c) Luz UVC (72h) e d) Temperatura 60°C (9h).

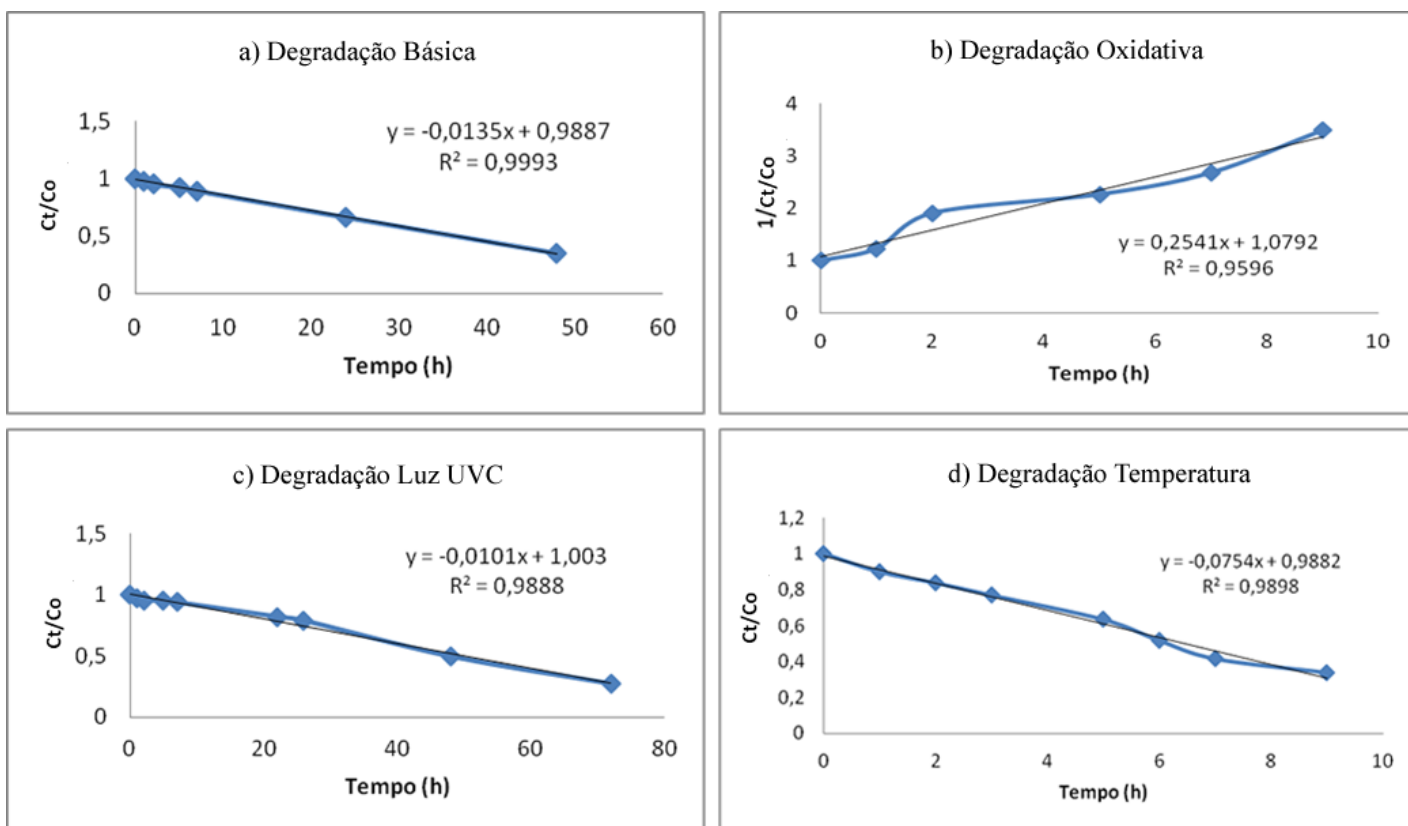


Figura 6: Gráficos obtidos na avaliação da cinética das reações de degradação de minociclina nas condições: a) degradação básica; b) degradação oxidativa; c) degradação Luz UVC e d) degradação temperatura.

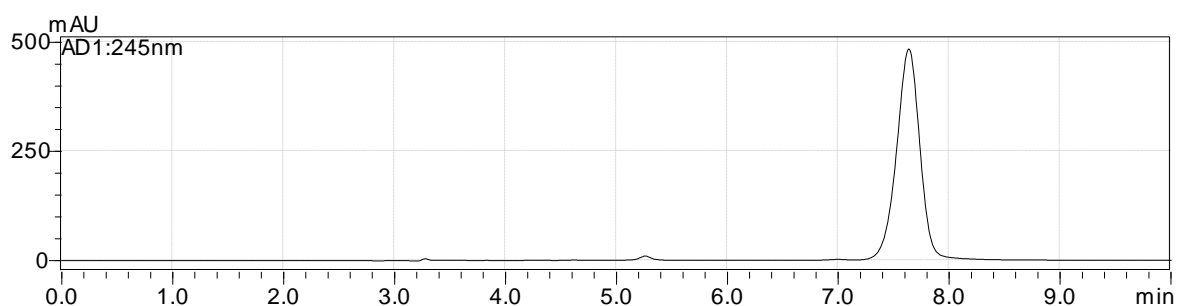


Figura 7: Cromatograma obtido com as condições desenvolvidas para o doseamento de matéria-prima minociclina por CLAE.

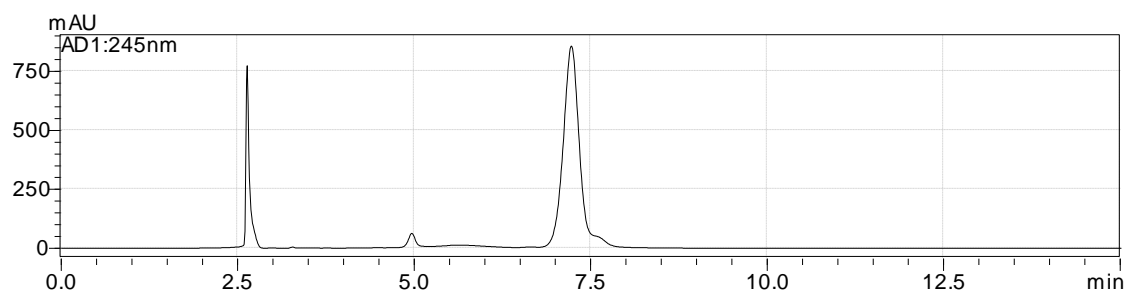


Figura 8: Cromatograma obtido na degradação ácida da amostra de minociclina matéria-prima.

ANEXO III

Regras para publicação na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - C.P. 502 - CEP 14801-902 - Fone (16) 3301-6887 - Araraquara SP - Brasil E-mail: rcfba@fcfar.unesp.br - www.fcfar.unesp.br

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. ESCOPO E POLÍTICA

A **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** / *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* é um periódico especializado de conteúdo multidisciplinar, aberto à comunidade científica nacional e internacional, arbitrada e distribuída aos leitores do Brasil e de vários outros países.

Esta Revista é editada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Publica pesquisas originais nos diferentes campos das Ciências Farmacêuticas, sobre temas relevantes envolvendo pesquisas básicas e aplicadas, na forma de artigos originais, comunicações breves e trabalhos de revisão. Os manuscritos poderão ser encaminhados em português, inglês ou espanhol. Publica um volume por ano, constituído por quatro fascículos ou números.

É vedada a submissão integral ou parcial do manuscrito a qualquer outro periódico. A responsabilidade do conteúdo dos artigos é exclusiva dos autores.

2. SUBMISSÃO DE TRABALHO

Os manuscritos deverão ser submetidos em formato eletrônico no site da revista em **SUBMISSÃO** ou clicando neste link http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/cien_farm/about/submissions#onlinesubmissions

Cada manuscrito deve vir acompanhado do **TERMO DE SUBMISSÃO E AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO** em formato PDF, assinado por todos os autores, e do **FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO** preenchido em formato .doc, disponíveis nos links acima. Estes documentos devem ser preenchidos e enviados pelo sistema de submissão como documentos suplementares.

3. PREPARAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL

Os manuscritos devem ser digitados no editor de texto MS Word versão 97 ou superior, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, formato A4 (210x297mm), margens laterais de 3 cm, superior e inferior de 2,5 cm, com espaço duplo em todo o texto. A numeração das páginas deverá ser inserida do lado direito no canto inferior.

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: identificação, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, figuras, legendas de figuras, tabelas e legendas de tabelas.

3.1 Página de Identificação

Os autores devem preencher o **FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO**, citado no item 2 deste documento, de acordo com as diretrizes a seguir e enviá-lo como documento suplementar no instante da submissão pelo site da revista:

a) Título do artigo: deve ser conciso, informativo e completo, evitando palavras supérfluas. Os autores devem apresentar versão para o inglês, quando o idioma do texto for português ou espanhol e para o português, quando redigido em inglês ou espanhol.

- b) Autores: nome completo de cada autor, sem abreviações.
- c) Afiliação: indicar a afiliação institucional de cada um dos autores.
- d) Autor correspondente: indicar o autor para o qual a correspondência deve ser enviada, com endereço completo, incluindo e-mail, telefone e fax.
- e) Título resumido: o título resumido será usado como cabeçalho em todas as páginas impressas e não deve exceder 40 caracteres.

3.2 Resumo e Abstract

Os artigos, obrigatoriamente, deverão vir acompanhados de um resumo na língua em que o texto for redigido do *abstract* em inglês. Os trabalhos redigidos em inglês deverão apresentar um resumo em português. Os resumos devem ser indicativos e formulados de acordo com a NBR (ABNT) 6028: *Informação e Documentação*. Devem ser redigidos em um único parágrafo e sem subdivisões contendo no máximo 250 palavras. Neles devem ser apresentados os objetivos do estudo, as abordagens metodológicas, os resultados e as conclusões.

3.2.1 Palavras-chave e Keywords

Deve ser apresentada, obrigatoriamente, uma lista de 3 a 6 termos, separados por ponto final, que represente de modo preciso o tema abordado no manuscrito em português e inglês. Tais termos devem, preferencialmente, estar indexados no **Tesouro MeSH da Medline** ou serem descritores da área da Saúde do **DeCS Bireme**.

3.3 Introdução

Deve determinar o propósito do estudo e oferecer uma breve revisão da literatura, justificando a realização do estudo e destacando os avanços alcançados através da pesquisa.

3.4 Material e Métodos

Devem oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo possa ser repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas podem ser apenas referenciadas.

3.5 Resultados

Devem oferecer uma descrição clara e concisa dos resultados encontrados, evitando-se comentários e comparações. Não repetir no texto todos os dados contidos nas figuras e tabelas.

3.6 Discussão

Deve explorar o máximo possível os resultados obtidos, relacionado-os com os dados já registrados na literatura. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

3.7 Agradecimentos

Devem se restringir ao necessário. O suporte financeiro deve ser incluído nesse item.

3.8 Referências

Todas as obras citadas no desenvolvimento do trabalho devem aparecer mencionadas nas referências bibliográficas. As referências devem ser ordenadas alfabeticamente e elaboradas de acordo com o **Estilo de Vancouver** conforme o manual: Patrias K. **Citing medicine: the NLM style guide for authors, editors, and publishers** [Internet]. 2nd ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007.

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no **INDEX MEDICUS**. Pode-se também ser usado para esta finalidade o **CATÁLOGO COLETIVO NACIONAL**. Ou ainda o documento **APPENDIX B: ADDITIONAL SOURCES FOR JOURNAL TITLE ABBREVIATIONS**.

As abreviações dos títulos de periódicos não devem aparecer em itálico e nem seguidas por ponto final. Exemplo: Physical Review Letters (Phys Rev Lett), International Journal of Clinical Pharmacy (Int J Clin Pharm), Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada (Rev Cienc Farm Basica Apl). Nas referências de artigos de periódicos devem aparecer, sempre que houver, o volume, o número e a paginação do trabalho.

4. PREPARAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO

Deve conter uma revisão crítica de assunto atual e relevante baseando-se em artigos publicados e em resultados dos autores. O Artigo de Revisão não deve ultrapassar 24 páginas no manuscrito. Deve apresentar resumo na língua em que estiver redigido e um *Abstract* quando redigido em português ou espanhol. Neste tipo de trabalho os autores, obrigatoriamente, deverão citar no desenvolvimento do texto trabalhos de sua autoria sobre o tema discutido, publicados em outros veículos de comunicação científica.

5. PREPARAÇÃO DE COMUNICAÇÃO BREVE

Deve ser breve e direta, sendo seu objetivo comunicar resultados ou técnicas particulares. No entanto recebe a mesma revisão e não é publicada mais rapidamente que um artigo original. Deve ser redigida de acordo com as instruções dadas ao Artigo Original, mas sem subdivisão em capítulos. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato utilizado para o Artigo Original. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentadas. O autor deve informar, no momento da submissão, que o manuscrito é uma Comunicação Breve de modo a ser avaliado adequadamente durante o processo de revisão.

6. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Citações bibliográficas no texto: Devem ser apresentadas no texto pelo(s) sobrenome(s) dos autores seguida do ano da publicação, conforme os exemplos:

- Um autor: Croft (1999) ou (Croft, 1999)
- Dois autores: Sogin & Bacci (1998) ou (Sogin & Bacci, 1998)
- Mais que dois autores: Kreiger et al. (1990) ou (Kreiger et al., 1990).
- Citação de citação: A RCFBA não recomenda fazer o uso de citação de citação no desenvolvimento do texto. No caso da citação ser imprescindível para o estudo, ela deverá aparecer em nota de rodapé fazendo-se o uso da expressão latina *apud* ou da expressão citado por. Exemplo : Croft (1980) citado por Souza et al. (2011, p. 54) ; Croft (2009 apud Klein et al. 1973, p.54).

7. DIREITOS AUTORAIS

Os autores devem encaminhar, como documento complementar pelo sistema de submissão, o documento que ateste a cessão de direitos autorais do trabalho à RCFBA. Para tanto, deverão preencher o **TERMO DE SUBMISSÃO E AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO** também disponível no item 2 deste documento. Este documento deve vir assinado por todos os autores do manuscrito.

8. ILUSTRAÇÕES

8.1 Figuras

Fotografias, gráficos, mapas ou ilustrações devem ser apresentadas ao final do trabalho, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem que aparecem no texto. As legendas correspondentes deverão ser claras e concisas e devem aparecer logo após cada figura. Os locais aproximados das figuras deverão ser indicados no texto. A elaboração das figuras deverá ser feita em colorido, no entanto, na publicação

impressa elas aparecerão em preto e branco ou tons de cinza. As fotografias deverão ser encaminhadas, também em arquivos separados, fora do Word, no formato .tif ou .jpg com no mínimo 300 dpi de resolução.

8.2 Tabelas

Devem complementar e não duplicar o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos arábicos na ordem que aparecerão no texto. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela. Se necessário, utilizar notas de rodapé identificadas. Elas deverão aparecer ao final do trabalho e no desenvolvimento do texto deve-se indicar somente o local no qual as mesmas serão inseridas.

8.3 Ética

Os pesquisadores que utilizam em seus trabalhos experimentos com seres humanos, ou material biológico humano, devem observar as normas vigentes editadas pelos órgãos oficiais. Os trabalhos que envolvem experimentos que necessitam de avaliação do Comitê de Ética deverão ser acompanhados de cópia do parecer favorável.

OS MANUSCRITOS QUE NÃO ESTIVEREM DE ACORDO COM AS INSTRUÇÕES AOS AUTORES NÃO SERÃO ANALISADOS.

Endereço:

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - Caixa Postal 502

14801-902 Araraquara, SP- Brasil.

Fone/ Phone: 55-16-33016887

E-mail: rcfba@fcfar.unesp.br

Website : http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm