



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

**Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas**



Antônio Mauricio Tannure Fonseca

**Desenvolvimento e validação de método analítico por
espectrometria de massas para quantificação de
Cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino.**

Ouro Preto, Fevereiro de 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrometria de massas para quantificação de Cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino.

Dissertação de Mestrado apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão
Coorientador: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Ouro Preto, Fevereiro de 2018

F676d Fonseca, Antonio Maurício Tannure .
Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrometria de massas para quantificação de Cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino [manuscrito] / Antonio Maurício Tannure Fonseca. - 2018.
89f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão.
Coorientador: Profª. Drª. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Ceratoconjuntivite . 2. Cloxacilina. 3. Nanopartículas. I. Brandão, Humberto de Mello. II. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 543.51

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 140ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Antônio Maurício Tannure Fonseca**, com a defesa da dissertação intitulada: “Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 28 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa
UFLA

Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
UFOP

Dr. Humberto de Mello Brandão
EMBRAPA

Dedico este trabalho aos meus pais : Antônio Maurício Leite Fonseca e Ana Lúcia Tannure Fonseca (*in memoriam*) e para toda minha família e amigos que me apoiaram durante processo de elaboração do trabalho.

Agradecimentos:

Agradeço ao professor Dr. Humberto de Mello Brandão pela orientação, por acreditar na minha capacidade e por estar sempre disposto e paciente no esclarecimento das minhas dúvidas. Obrigado pela confiança e amizade.

À professora Vanessa Carla Furtado Mosqueira, pela coorientação e auxílio na realização dos experimentos e à todos os membros do laboratório de nanotecnologia da CIPHARMA pelos aconselhamentos e amizade.

Agradeço ao professor Dr. Orlando Henrique David pela orientação no estágio em docência, pelas dicas de como tornar minha aula mais dinâmica, pelos aconselhamentos técnicos e amizade.

À Escola de Farmácia de Ouro Preto pelo ensino de qualidade e à todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela contribuição em minha formação e disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES e à Rede Agronano.

À toda a equipe do laboratório de nanotecnologia e aos funcionários da EMBRAPA Gado de Leite, em particular para a Michelle Loures e Guilherme Nunes, pelos conselhos, auxílio técnico na resolução de problemas, suporte, amizade e conversas descontraídas e para meus colegas de laboratório Isis de Freitas Reigosa, Renisson Teles Vargas, Hideraldo Brasiel de Filippo, Camila Almeida Guimarães, Danielle Cinelli, Geovana Onorato, Cynthia Penoni, Leonara Fayer, Rafaella Zanette e Judith Guimarães pelas mesmas razões.

À equipe do laboratório de cromatografia da EMBRAPA Gado de Leite por disponibilizar os equipamentos necessários na etapa de extração, em especial ao Hernani Guilherme Barbosa Filho, Ernando Ferreira Motta e Marco Pinto, pelo auxílio e ensinamentos.

À empresa Waters do Brasil por disponibilizar um serviço de atendimento ao cliente excepcional em relação as dúvidas de operação do equipamento e convites para seus simpósios, em especial para os técnicos Gustavo Calil Almeida e Danilo Pereira, pelos acessos remotos constantes, esclarecimento de dúvidas e disponibilidade.

Agradeço também ao colega de laboratório Saulo Ribeiro da Silva pelo auxílio na compreensão dos experimentos realizados no processo de validação do método analítico.

Aos colegas de pós-graduação do Cipharma pelo suporte, amizade e conversas descontraídas.

A toda a minha família pelo apoio e incentivo durante o meu caminho até aqui, mas em especial ao meu pai Antonio Mauricio Leite Fonseca e minha madrastra Leila Márcia Alves Barbosa, pela atenção, carinho, longas conversas quando eu duvidava de minha capacidade e muita amizade.

Também agradeço especialmente para minha namorada Camila Eduarda Félix pelo carinho, amor, companheirismo e longas conversas para me manter tranquilo e sereno.

Acima de tudo agradeço à Deus, por ter me dado saúde, física e mental, e muita força ao longo deste trabalho, apenas Ele sabe o quanto os últimos anos foram difíceis, mas não me deixou desistir.

“Seja um estudante, não um seguidor. Não vá simplesmente fazer o que alguém diz. Tenha interesse pelo que alguém diz, então debata, pondere e considere de todos os ângulos.”

Jim Rohn

Resumo:

A ceratoconjuntivite bovina é uma doença contagiosa, e causadora de grandes prejuízos à bovicultura, sendo seu principal agente etiológico a bactéria *Moraxella bovis*. Esta bactéria se aloja na mucosa ocular e ductos nasolacrimais de bovinos, causando ulcerações que podem evoluir para cegueira do animal. Existem diversas formas de tratamento da conjuntivite bovina, sendo a antibioticoterapia eletiva em função de sua eficácia. Atualmente, estão disponíveis formulações farmacêuticas de uso tópico e parenteral, cada qual com sua desvantagem. No que tange a via tópica, apesar de gerar menor resíduo de fármaco no leite ou na carne, apresenta como limitação a necessidade de múltiplas aplicações. Para contornar esta limitação foi desenvolvida pela parceria UFOP/EMBRAPA uma formulação farmacêutica de cloxacilina benzatina nanoencapsulada em partículas mucoadesivas de uso tópico, que até o momento não apresentou estudo de resíduos em função da falta de métodos analíticos para este fim. Neste contexto, a presente proposta tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para quantificação da cloxacilina benzatina na matriz plasma bovino, seguida de sua aplicação em plasma coletado de bovinos submetidos a infecção experimental com *M. bovis*. Para isso, desenvolveu-se um método analítico por UPLC-MS/MS e validou-se seguindo as recomendações do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento segundo critérios de seletividade, linearidade ($R^2=0,999$), precisão (intradia: 1,0 ng/mL= CV 21,75%; 50 ng/mL= CV 3,77%; 100 ng/mL= CV 3,13% e interdia: 1,0 ng/mL= CV 28,6%; 50 ng/mL= CV 5,38%; 100 ng/mL= CV 5,49%), exatidão(1,0 ng/mL= 81,28%; 50 ng/mL= 83,38% ; 100 ng/mL= 86,59%), robustez, limite de quantificação (0,5 ng/mL) e detecção (0,05 ng/mL). Testes *in vivo*, demonstraram que o método tem aplicação em estudos clínicos, estudos de farmacocinética e para dar suporte ao registro da formulação farmacêutica junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PALAVRAS CHAVE: Ceratoconjuntivite bovina, cloxacilina, nanopartícula mucoadesiva.

Abstract:

Bovine keratoconjunctivitis is a contagious disease, causing great damage to cattle farming, and its main etiological agent is the *Moraxella bovis* bacterium. This bacterium is lodged in the ocular mucosa and nasolacrimal ducts of bovines, causing ulcerations that can evolve to blindness of the animal. There are several ways of treating bovine conjunctivitis, and antibiotic therapy is elective in function of its effectiveness. Pharmaceutical formulations for topical and parenteral use are currently available, each with its disadvantage. Regarding the topical route, in spite of generating less drug residue in milk or meat, it presents as a limitation the need for multiple applications. In order to overcome this limitation, a pharmaceutical formulation of cloxacillin benzathine nanoencapsulated in mucoadhesive particles of topical use was developed by the UFOP / EMBRAPA partnership, which until the present has not presented a residue study due to the lack of analytical methods for this purpose. In this context, the present proposal aims to develop and validate an analytical method for the quantification of benzathine cloxacillin in the bovine plasma matrix, followed by its application in plasma collected from bovine animals submitted to experimental infection with *M. bovis*. For this, an analytical method was developed by UPLC-MS / MS and validated following the recommendations of the Ministry of Livestock and Food Supply according to criteria of selectivity, linearity ($R^2 = 0.999$), precision (intraday: 1.0 ng / mL = CV 21,75%, 50 ng / mL = CV 3.77%, 100 ng / mL = CV 3.13% and between-day: 1.0 ng / mL = CV 28.6%, 50 ng / mL = 100 ng / mL = CV 5.49%), accuracy (1.0 ng / mL = 81.28%, 50 ng / mL = 83.38%, 100 ng / mL = 86.59 %), robustness, limit of quantification (0.5 ng / mL) and limit of detection (0.05 ng / mL). *In vivo* assay have shown that the method has application in clinical studies, pharmacokinetic studies and to support the registration of the pharmaceutical formulation with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

KEYWORDS: Bovine Keratoconjunctivitis, cloxacillin, mucoadhesive nanoparticle.

Sumário

Agradecimentos:	6
Resumo:	9
Abstract:	10
Lista de Figuras:	12
Lista de Tabelas:	14
1. Introdução.....	16
2. Revisão da Literatura	18
2.1. Ceratoconjuntivite infecciosa bovina.....	18
2.2. Antibioticoterapia	20
2.3. Nanopartículas mucoadesivas para vetorização de fármacos.....	22
2.4. Caracterização de nanopartículas	24
2.4.1. Espalhamento dinâmico de luz	24
2.4.2. Microscopia de força atômica (AFM).....	26
2.5. Extração de analitos.....	27
2.6. Cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas.....	29
2.6.1. Espectrometria de massas.....	30
2.6.2. Fonte de ionização	31
2.6.3. Analisador de massas	33
2.7. Validação de métodos analíticos	36
2.7.1. Seletividade e Especificidade.....	38
2.7.2. Linearidade.....	39
2.7.3. Precisão.....	39
2.7.4. Limite de Detecção e Quantificação.....	39
2.7.5. Exatidão.....	40
2.7.6. Robustez	41
3. Objetivo geral	42
3.1. Objetivos específicos.....	42
4. Materiais e métodos	43
4.1. Reagentes	43
4.2. Preparo da formulação de Cloxacilina Benzatina Nanoencapsulada.....	43
4.3. Caracterização físico-química da nanopartícula.....	44
4.4. Identificação e quantificação da cloxacilina benzatina e de dicloxacilina.....	44
4.4.1. Identificação do íon precursor da cloxacilina e do íon precursor de dicloxacilina	44
4.4.2. Parâmetros cromatográficos	45
4.5. Extração da Cloxacilina Benzatina.....	45
4.6. Validação do método analítico de cloxacilina benzatina.....	46
4.6.1. Seletividade	47
4.6.2. Linearidade.....	47
4.6.3. Precisão e Exatidão.....	47
4.6.4. Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ).....	48
4.6.5. Robustez	49
4.7. Análise Estatística	49
4.8. Plasma bovino	49
5. Resultados e Discussão.....	50
5.1. Caracterização da nanopartícula mucoadesiva de cloxacilina benzatina.....	50
5.2. Definição dos parâmetros do método para identificação da cloxacilina benzatina e dicloxacilina.....	51
5.3. Parâmetros cromatográficos	54
5.4. Extração da Cloxacilina de plasma bovino	56
5.5. Validação do método analítico	60
5.5.1. Seletividade	60
5.5.2. Linearidade.....	62
5.5.3. Precisão e exatidão.....	65
5.5.4. Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ).....	66
5.5.5. Robustez	67
5.6. Aplicação do método analítico em amostras de campo	69
6. Conclusão.....	71

7. Referências	73
8. Anexos:.....	84
8.1. Anexo 1:	84
8.2. Anexo 2	85

Lista de Figuras:

Figura 1: Ulceração ocular de bovino experimentalmente induzida por <i>Moraxella bovis</i> . Área de ulceração evidenciada por fluoresceína sódica (cor amarelo esverdeado).....	19
Figura 2: Estrutura molecular da cloxacilina (PubCHEM).....	21
Figura 3: Ilustração esquemática da interação eletrostática entre a camada superficial de células da mucosa ocular e as nanopartículas catiônicas.	23
Figura 4: Esquema representativo do processo de espalhamento dinâmico de luz (LEGRAND et al., 1999).....	25
Figura 5: Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente (FERREIRA e YAMANKA, 2006).....	27
Figura 6: Principais tipos de fontes de ionização e suas especificidades em espectrometria de massas (SLOBODNFK E BRICKMAN, 1999; REBELO, 2014).	32
Figura 7: Fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle de um procedimento de analítico (MAPA, 2011).	38
Figura 8: Imagens topográfica representativa de nanocápsulas mucoadesivas contendo Cloxacilina Benzatina.	50
Figura 9: Resultados obtidos pelo monitoramento de reação múltiplas (MRM), da cloxacilina e dicloxacilina. (A) Ion precursor da cloxacilina; (B) Ion quantificador (293,1 m/z) e ion qualificador (390,1 m/z) da cloxacilina; (C) Ion precursor da dicloxacilina; (D) Ions fragmentos da dicloxacilina ion quantificador (327,0 m/z.) e ion qualificador (291,0 m/z).....	53
Figura 10: Perfil cromatográfico da Cloxacilina e cada um dos fragmentos monitorados por MRM.	55
Figura 11: Perfil cromatográfico da dicloxacilina e cada um dos fragmentos monitorados por MRM.	55
Figura 12: Cromatograma do teste de supressão iônica de extrato de plasma bovino realizado com metanol (A), e acetonitrila (B), ambos com cloxacilina e dicloxacilina. Espaço entre setas vermelhas representam a áreas de supressão.....	59
Figura 13: Comparação dos cromatogramas na matriz plasma bovino (A) e na solução de cloxacilina (B) na concentração de 100 ng/mL.	60
Figura 14: Comparação das intensidades de sinal dos cromatogramas de plasma branco, quando comparados ao menor nível de concentração de plasma com cloxacilina. (A) Cromatograma do plasma branco, (B) Cromatograma de cloxacilina na concentração de 1 ng/mL, e (C) os cromatogramas de cloxacilina e plasma branco sobrepostos.	61

Figura 15: Coeficiente de colinearidade obtidos a partir da curva de calibração referente ao dia 1.....	63
Figura 16: Coeficiente de colinearidade obtidos a partir da curva de calibração referente ao dia 2.....	64
Figura 17: Coeficiente de colinearidade obtidos a partir da curva de calibração referente ao dia 3.....	64
Figura 18: Gráfico de sobreposição dos cromatogramas para avaliação de robustez do método analítico	68
Figura 19: Foto representativa da administração tópica de cloxacilina nanoestruturada mucoadesiva na dosagem de 4,86 mg/mL em cada globo ocular.....	69
Figura 20: Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados de regressão linear do dia 1.....	85
Figura 21: Teste de Levene para homogeneidade de variâncias dos dados de regressão linear do dia 1.....	85
Figura 22: Teste de D-Cook para presença de valores discrepantes dos dados de regressão linear do dia 1.....	86
Figura 23: Coeficiente de colinearidade para os dados de regressão linear do dia 1.....	86
Figura 24: Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados de regressão linear do dia 2.....	87
Figura 25: Teste de Levene para homogeneidade de variâncias dos dados de regressão linear do dia 2.....	87
Figura 26: Teste de D-Cook para presença de valores discrepantes dos dados de regressão linear do dia 2.....	88
Figura 27: Coeficiente de colinearidade para os dados de regressão linear do dia 2.....	88
Figura 28: Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados de regressão linear do dia 3.....	89
Figura 29: Teste de Levene para homogeneidade de variâncias dos dados de regressão linear do dia 3.....	89
Figura 30: Teste de D-Cook para presença de valores discrepantes dos dados de regressão linear do dia 3.....	90
Figura 31: Coeficiente de colinearidade para os dados de regressão linear do dia 3.....	90
Figura 32: Teste F para avaliação de robustez entre valores de área no parâmetro fluxo de injeção com 5% de significância.	91
Figura 33: Teste F para avaliação de robustez entre valores de área no parâmetro temperatura com 5% de significância.....	91

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Valores de referência aceitos para determinação da precisão (MAPA, 2011).	48
Tabela 2: Valores de referência para determinar a exatidão do método analítico para cada faixa concentração (MAPA 2011).	48
Tabela 3: Parâmetros espectrométrico identificados como mais adequados para fragmentação da cloxacilina e da dicloxacilina.	51
Tabela 4: Parâmetros cromatográficos utilizados para eluição da cloxacilina.	54
Tabela 5: Massa de extratos secos de quatro processos de extração de plasma bovino fortificado com cloxacilina (1:2 plasma:solvente).....	57
Tabela 6: Valores de área e sinal/ruído obtidos durante a comparação dos solventes de extração (1:2 plasma:solvente).	58
Tabela 7: Valores de área e sinal/ruído obtidos durante a comparação dos solventes de extração (1:9 plasma:solvente)	58
Tabela 8: Valores de área abaixo da curva para cloxacilina em plasma bovino nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/ml, utilizados para construir a curva de calibração em três dias consecutivos.	62
Tabela 9: Estudo de robustez: áreas abaixo da curva de cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino as concentrações 1 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL , seguindo distintos volumes de injeção de análise (2,9; 3; e 3,1 µL).	68
Tabela 10: Estudo de robustez: áreas abaixo da curva de cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino as concentrações 1 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL , seguindo distintas temperaturas da coluna (49; 50; e 51° C).	68
Tabela 11: Concentração plasmática de cloxacilina em bovinos tratados com 9,72 mg/mL de cloxacilina nanoestruturada mucoadesivas pela via ocular.	70

Lista de abreviaturas e símbolos

%AF: Porcentagem de ácido fórmico

AFM: *Atomic Force Microscopy*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*

CIB: Ceratoconjuntivite infecciosa bovina

DAD: Detector de Arranjo de fotodiodos

DLS: Espalhamento de luz dinâmico

EFS: Extração em Fase Sólida

EFSO: Extração em Fase Sólida Dispersiva

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ELL: Extração Líquido-Líquido

ESI: *Electrospray Ionization*

FDA: *Food and Drug Administration*

ICH: *International Conference Harmonization*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial

ISO: *International Organization for Standardization*

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massa

LMR: Limite Máximo de Resíduo

M/Z: *Mass to charge ratio*

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MIC: Concentração inibitória mínima

PCL: Poli- ϵ -Caprolactona

pH: Potencial Hidrogeniônico

ppB: Partes por bilhão

QqQ: Triple Quadrupole Mass Spectrometer System

qTOF: *Quantum time of flight Mass Spectrometer*

TOF: *Time of flight*

UPLC-MS/MS: Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

UV: Ultra-violeta

VICH: *International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*

1. Introdução

A elevada capacidade de produção de alimentos de origem animal pelo Brasil sustentou a geração de um grande número de indústrias farmacêuticas veterinárias nacionais (marcadamente seguidoras) e a instalação de indústrias multinacionais do ramo farmacêutico, as quais produzem tecnologias em seus países sede, e as trazem para serem adaptadas ao mercado nacional, o tornando altamente fragmentado (NOBRE et al., 2012). A estratégia da indústria farmacêutica no mercado brasileiro para manutenção da lucratividade, até recentemente, se pautava na produção de medicamentos muito similares aos mais comercializados, o que resultou em um setor com pouco incremento em pesquisa, desenvolvimento e inovação instalado no território nacional (GAVA et al., 2010), sendo este fato mais forte no setor veterinário por possuir produtos com menor valor agregado que o humano. Além da dependência tecnológica internacional, o setor pecuário nacional fica “refém” de medicamentos que são desenvolvidos para sistemas de produção animal de clima tipicamente temperado, os quais apresentam casuísticas de doenças, perfil genético de animais distintos (*Bos taurus* x *Bos indicus*) e práticas de manejo distintos adotadas às condições tropicais. Neste cenário, frente a importância da pecuária, o desenvolvimento de formulações farmacêuticas veterinárias e métodos analíticos que atendam as demandas locais são estratégicos para o país.

Dentre as enfermidades mais comuns à bovinocultura, ceratoconjuntivite, patologia ocular altamente infecciosa, possui sua morbidade intimamente relacionada às práticas de manejo e condições edafoclimáticas, uma vez que o principal vetor do patógeno é a mosca doméstica. O agente etiológico da doença, a *Moraxella bovis*, pode causar úlceras oculares, descarte prematuro do animal e grandes perdas econômicas associados ao período de carência do antibiótico ou à maior necessidade de mão de obra para o tratamento do animal (BROWN et al., 1998; FUNK et al., 2009).

Atualmente, estão disponíveis no mercado formulações farmacêuticas de uso parenteral, subconjuntival e tópica, cada qual com sua particularidade terapêutica. A via de administração parenteral é de baixa complexidade de aplicação e, dependendo do veículo, consegue-se obter a cura clínica do

animal com apenas uma aplicação. Contudo, via de regra, as concentrações plasmáticas do fármaco são sempre elevadas, o que normalmente implica em períodos de carência maiores, quando comparados com outras vias de aplicação.

A utilização da via subconjuntival apresenta relação custo benefício favorável para o tratamento, pois necessita de apenas uma aplicação do fármaco, em pequena dosagem, para se obter o efeito terapêutico desejável. Entretanto, a demanda de mão de obra especializada para aplicação da formulação limita seu uso em grande escala nas propriedades rurais (ALEXANDER, 2010).

No que tange ao uso da via tópica, sua vantagem se deve ao fato do fármaco ser pouco absorvido pela mucosa ocular, resultando em período de carência pequeno e em melhora clínica rápida (DAIGNEAULT, GEORGE, e BAGGOT, 1990). Entretanto, a manutenção da concentração terapêutica do fármaco na conjuntiva ocular por períodos prolongados é dependente do número de aplicações e da intensidade de lacrimejamento, demandando, assim, a necessidade de múltiplas aplicações.

Para contornar as limitações supracitadas, a equipe UFOP/Embrapa vem trabalhando no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas de nanopartículas mucoadesivas contendo cloxacilina benzatina para reduzir o número de aplicações tópicas do fármaco, bem como, promover melhorias terapêuticas durante o tratamento da ceratoconjuntivite bovina (CASTANHEIRA, 2012; DA SILVA, 2016; MAIA, 2015).

Dando continuidade ao desenvolvimento desta formulação, para a etapa de estudos de segurança para o consumidor e de farmacocinética, faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de um método analítico sensível, robusto, seletivo e reprodutível para a quantificação do fármaco no plasma bovino.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva desenvolver e validar um método analítico, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) para quantificar em plasma bovino a cloxacilina benzatina nanoencapsulada e, aplicá-lo em estudos *in vivo*, seguindo a normatização contida no Manual de Garantia da Qualidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2. Revisão da Literatura

2.1. Ceratoconjuntivite infecciosa bovina

A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é uma patologia ocular altamente contagiosa que afeta a bovinocultura em todo mundo (O'CONNOR et al., 2007). A CIB, cujo agente etiológico é a *Moraxella bovis*, está associada a úlceras oculares e perdas econômicas significativas devido à redução de peso do animal, queda da produção de leite, além de prejuízos associados ao descarte de leite com resíduo de antibiótico, despesas com medicamentos, aumento de manejo, assistência veterinária não planejada e, eventualmente, perda de visão e descarte prematuro de animal (THRIFT e OVERFIELD, 1974; BROWN et al., 1998; FUNK et al., 2009).

O grupo das moraxellas é caracterizado por apresentar a morfologia de cocos Gram negativos curtos, roliços ou cocobacilos dispostos em pares, eventualmente unidos pelas extremidades (BROWN et al., 1998). São pleomórficas devido a formação de filamentos, possuem fímbrias e são imóveis ou apresentam pouca motilidade. O grupo também é caracterizado por não formar cápsulas e esporos (BAPTISTA, 1979). O ambiente ideal de crescimento do grupo das moraxellas deve apresentar temperatura variando entre 30 a 37 °C e pH 7,0 (neutro), porém suportam ambientes levemente ácidos ou alcalinos, com variação de pH entre 6,8 a 7,4 (BAPTISTA, 1979; BROWN et al., 1998). Quando cultivadas em ágar-sangue formam colônias lisas ou rugosas, entre 1 a 3 mm de diâmetro, circulares, levemente esbranquiçadas e com um estreito halo de β hemólise (WEBBER e SELBY, 1981).

Várias espécies apresentam características específicas para a diferenciação das estirpes patogênicas e não patogênicas. No caso da *M. bovis*, nas estirpes mais virulentas, observa-se a presença de fímbrias de aderência, que promovem autoaglutinação quando suspensas em solução salina contendo hemoaglutinantes (WILCOX, 1970; RUEHL et al., 1988).

A CIB ocorre principalmente nas estações quentes e úmidas do ano, quando a população dos vetores (*i. e. Musca autumnalis* e *M. domestica*) aumenta consideravelmente (MCCONELL, SHUM e HOUSE, 2007). Além dos

vetores, a transmissão da doença pode ocorrer pelo contato direto do animal saudável com secreções nasais ou oculares de indivíduos doentes, contudo esta é uma forma de transmissão do patógeno menos relevante durante os surtos da doença (BROWN et al., 1998; MCCONELL, SHUM e HOUSE, 2007).

A incidência da CIB é maior em animais jovens, contudo, a enfermidade pode acometer animais de todas as idades independente do sexo e raça (WEBBER e SELBY, 1981).

Após a infecção, as primeiras manifestações clínicas são mais facilmente detectadas a partir de 48 e 72 horas. Nessa condição, o animal acometido pode apresentar lacrimejamento profuso, fotofobia e hiperemia da esclera e de mucosa. Cerca de 24 horas após os primeiros sinais clínicos, pode-se notar a lesão corneal caracterizada por uma mancha esbranquiçada superior a 1 mm de diâmetro, normalmente na parte central da córnea (CHANDLER, BAPTISTA e TURFREY, 1983; ROGERS, CHEMILLE e PUGH, 1987). Nos casos clínicos mais severos, a ceratoconjuntivite se alarga gradualmente formando uma úlcera (figura 1), que, se não tratada, pode evoluir para perfuração da córnea e consequente cegueira (ROGERS, CHEMILLE e PUGH, 1987).



Autoria: Julia Maia, Humberto de Mello Brandão e Alessandro de Sá Guimarães.

Figura 1: Ulceração ocular de bovino experimentalmente induzida por *Moraxella bovis*. Área de ulceração evidenciada por fluoresceína sódica (cor amarelo esverdeado).

A profilaxia da doença pode ser realizada com o uso de vacinas, contudo, sua eficácia é limitada, uma vez que há grande variabilidade

antigênica entre as estirpes bacterianas, resultando imunidade irregular e pouco duradoura (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003).

Neste cenário, mediante a limitação imposta pela vacinação no controle da disseminação da *M. bovis*, a antibioticoterapia se apresenta como uma importante ferramenta para o tratamento e controle da doença.

2.2. Antibioticoterapia

A antibioticoterapia é o tratamento de escolha para o controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Vários antimicrobianos são eficazes *in vitro* contra a *M. bovis*, tais como à: ampicilina, cefalosporina, nitrofuranos, penicilina, cloxacilina, eritromicina, gentamicina, oxitetraciclina e estreptomicina (MCCONNEL, SHUM E HOUSE, 2007; MABONI et al, 2015). Sabe-se também que o uso *in vivo* de vários desses antimicrobianos mesmo apresentando eficácia semelhante, possuem diferenças terapêuticas influenciadas pela via de aplicação (ANGELOS, 2015; O'CONNOR et al., 2007). Via de regra, estes antimicrobianos são aplicados pelas vias tópicas, subconjuntival ou sistêmica.

O uso da via subconjuntival, apresenta boa relação custo benefício, pois necessita de apenas uma aplicação. Contudo, necessita de mão de obra especializada para a aplicação do fármaco, além de apresentar risco do medicamento depositar-se na subconjuntiva bulbar do animal, desencadeando dor, desconforto e irritação local. Seus principais representantes são a penicilina G e a oxitetraciclina (ALEXANDER, 2010). Segundo o mesmo autor, no caso da via sistêmica, quando comparada às demais vias de aplicação, consegue-se períodos de faixa terapêutica mais duradouros. Por sua vez, para se obter esta condição, são necessárias maiores quantidades de fármaco e o período de carência tende a ser mais elevado. Nesse caso, destaca-se o uso da oxitetraciclina, florfenicol, tilmicosina e ceftiofur.

Já pela via tópica são mais frequentemente utilizados a cloxacilina e clortetraciclina. As vantagens de uso desta via se devem à sua rápida atuação no estágio agudo da doença (ALEXANDER, 2010) e ao fato do fármaco ser pouco absorvido pela mucosa, o que reduz bastante a concentração de fármacos nos tecidos consumidos pelo ser humano, ou mesmo, excretados pelo leite (DAIGNEAULT, GEORGE, e BAGGOT, 1990).

Especificamente, a cloxacilina é um antibiótico do grupo dos β -lactâmicos de segunda geração, resistentes a β -lactamases. Sua estrutura molecular $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$, e apresenta massa monoisotópica de 435,066 g/mol. (WILFRIED, 2017)

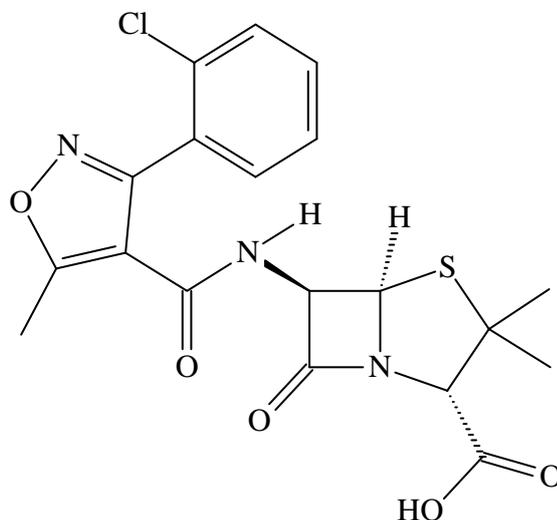


Figura 2: Estrutura química da cloxacilina.

Esse fármaco é amplamente utilizado na clínica veterinária, principalmente para o tratamento e controle da mastite bovina causada por *S. aureus* resistentes à meticilina e de infecções por *S. agalactiae* (BARKEMA et al., 2015) e da ceratoconjuntivite causada por *M. bovis* (DAIGNEAULT, GEORGE, e BAGGOT, 1990). Nestes casos, os sais mais comumente disponíveis estão nas formas sódica e benzatínica. Na forma sódica, a elevada solubilidade do sal favorece seu uso em condições clínicas que necessitem de rápida distribuição do fármaco no compartimento biológico desejado. Em contrapartida o sal benzatínico, apresenta baixa solubilidade, o que favorece seu uso em condições que necessitem a manutenção do limiar terapêutico do fármaco por um período maior. Isso ocorre pelo fato da estrutura química do sal auxiliar na retenção do fármaco no compartimento biológico e por minimizar a velocidade de degradação da cloxacilina pela abertura do anel β -lactâmico provocado pelo hidrogênio livre, *i.e.* H^+ (PAULSEN et al., 2004; MESTORINO E ERRECALDE, 2012; COSTA et al., 2015).

De maneira geral, nos casos da ceratoconjuntivite bovina, suspensões antimicrobianas de uso tópico apresentam baixa retenção ocular devido às

alterações fisiopatológicas da doença (COSTA et al., 2015). Nesses casos, ao ser instilado no olho o medicamento pode ter sua eficácia diminuída, devido ao lacrimejamento profuso induzido pela irritação local. Isso acontece em decorrência da diminuição da concentração do fármaco nas superfícies da mucosa, demandando, assim, maior número de administrações para manter a concentração inibitória mínima (MIC) do princípio ativo ao longo do tratamento (PAULSEN et al., 2004; COSTA et al., 2015).

Em face deste inconveniente, a nanotecnologia se apresenta como uma alternativa promissora para contornar esta limitação, uma vez que nanocarreadores mucoadesivos possuem a capacidade de promover a liberação sustentada de fármaco no globo ocular (LALLEMAND et al., 2012).

2.3. Nanopartículas mucoadesivas para vetorização de fármacos.

A estratégia farmacológica de se utilizar nanopartículas mucoadesivas pode promover a liberação sustentada do fármaco, resultando em: menor número de aplicações do medicamento tópico (LALLEMAND et al., 2012; LIU et al, 2015); involução clínica mais rápida e maior chance de cura microbiológica em bovinos (MAIA, 2015) e redução de dosagem (LIU et al, 2016).

Existem diversos tipos de nanopartículas mucoadesivas utilizadas para vetorização de medicamentos, como por exemplo, as lipídicas sólidas, os lipossomas, as poliméricas e outras. O método mais comum de conferir mucoadesividade à camada celular superficial do globo ocular é pela interação eletrostática da carga superficial da nanopartícula catiônica com radicais negativos da mucina presentes no glicocalix da superfície córnea, figura 2 (LALLEMAND et al., 2012; LIU et al., 2015).



Adaptado: LALLEMAND et al., 2012

Figura 3: Ilustração esquemática da interação eletrostática entre a camada superficial de células da mucosa ocular e as nanopartículas catiônicas.

Policátions são compostos de elevada massa molecular que quando solubilizados em solvente polar, nas condições específicas, adquirem cargas positivas espontaneamente em mais de um grupamento químico (HESS *et al.*, 2006). Estes compostos são frequentemente utilizados tanto para síntese direta de nanoparículas, quanto para o revestimento de nanopartículas aniônicas, tornando-as então mucoadesivas (RAMÍREZ-MELA e HERÁNDEZ-MENDO, 2010; CHATURVERDI *et al.*, 2011; CASTANHEIRA, 2012).

O mecanismo pelo qual os policátions conferem mucoadesividade à nanopartícula ocorre pela interação entre pelo menos um grupo funcional carregado positivamente do policátion e um grupo funcional negativamente carregado do ácido siálico ou do sulfônico que compõe a mucina (COSTA *et al.*, 2016). Em situações de ulceração corneal o tecido conjuntivo fica exposto, favorecendo, também, a interação entre cargas positivas do policátion e os resíduos negativos do ácido hialurônico que compõe a matriz extracelular (KIRSCHNING *et al.*, 2017).

Costa e colaboradores (2015) sintetizaram polieletrólitos de quitosana/alginato, onde encapsularam a daptomicina para tratar endoftalmite causada por *S. aureus* resistente à meticilina. Comparando-se o fármaco encapsulado frente ao livre, conseguiu-se liberação gradual da substância e aumento do princípio ativo tanto na superfície da córnea quanto no humor

aquoso. Duxfield e colaboradores (2015), utilizaram variações de Eudragit® RL e RS para produção de nanopartículas catiônicas e encapsulação da gatifloxacina para o tratamento de infecções oculares causadas por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*. Neste trabalho, os autores conseguiram maior biodisponibilidade e taxa de retenção do antibiótico, além de prevenir a recristalização da droga.

Outro importante benefício atribuído à vetorização de fármacos oculares é a redução de dose. Liu e colaboradores (2016) conseguiram significativa redução na dosagem da ciclosporina no tratamento tópico da síndrome do olho seco, com valores na ordem de 50 a 100 vezes.

Especificamente no tratamento da CIB, Maia (2015), com o uso de cloxacilina nanoencapsulada em partículas de PCL revestida de quitosana para uso tópico, quando comparado com o grupo controle, conseguiu uma chance 9,64 vezes maior de cura microbiológica.

2.4. Caracterização de nanopartículas

Existem diversas técnicas de caracterização utilizadas para caracterizar nanopartículas, tais como espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de varredura ou transmissão, microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de infravermelho ou Raman, dentre outras. Contudo, nesse trabalho foram utilizadas apenas as técnicas de caracterização por AFM e DLS para assegurar o caráter nanométrico da formulação, uma vez que esta já foi caracterizada durante seu desenvolvimento (Castanheira, 2012).

2.4.1. Espalhamento dinâmico de luz

A realização de medida de tamanho de partícula em suspensão pode ser dada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (do inglês *DLS-Dynamic Light Scattering*), cuja obtenção de dados ocorre a partir da medida do Movimento Browniano de uma partícula em um meio aquoso. Considerando que a medida do tamanho de uma partícula é inversamente proporcional a sua movimentação, a determinação do raio hidrodinâmico ocorre pela correlação do tempo das flutuações de intensidade de luz espalhada quando as

nanopartículas são iluminadas por um feixe de luz monocromático (LEGRAND et al., 1999), (figura 4). Essas flutuações na intensidade de luz espalhada são relacionadas à velocidade de difusão das partículas, fornecendo coeficientes de difusão. Estes coeficientes são utilizados para fornecer a distribuição de raio hidrodinâmico do material particulado em suspensão (LEGRAND et al., 1999)

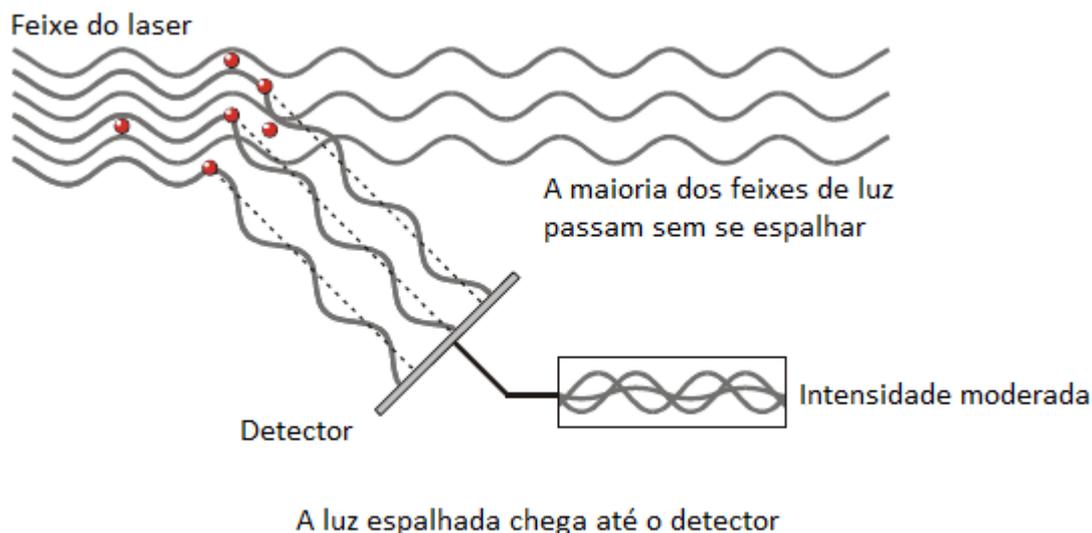


Figura 4: Esquema representativo do processo de espalhamento dinâmico de luz (LEGRAND et al., 1999).

No caso de formulações farmacêuticas, a determinação da distribuição de tamanho do material particulado é de grande importância na predição de sua estabilidade, uma vez que partículas com mais de 500 nm de diâmetro, sofrem maior interferência da força da gravidade, sedimentando ou cremando. Adicionalmente, o tamanho da partícula influenciar a biodisponibilidade de um fármaco vetorizado (SCHAFFAZICK et al., 2003; CHO et al., 2013).

O potencial Zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento e é dependente da superfície da partícula, do dispersante, sendo afetado pelo pH ou força iônica do meio (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Sua obtenção é dada a partir da técnica de mobilidade eletroforética das partículas quando submetidas a um campo elétrico.

A velocidade de deslocamento é dependente da carga superficial, raio hidrodinâmico e viscosidade do meio, assim, em um meio contínuo, a relação carga/tamanho é que determinará a velocidade e a direção de deslocamento entre os polos (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Valores de módulo

superiores à 30 mV sugerem estabilidade coloidal por repulsão eletrostática, enquanto valores de módulo inferiores à 30 mV, sugerem baixa estabilidade da formulação (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; CHO et al., 2013). No que tange uma formulação mucoadesiva catiônica, a intensidade da força da interação eletrostática está relacionada a potenciais Zeta positivos elevados, os quais tendem a interagir mais facilmente com os grupos funcionais negativamente carregados dos ácidos siálico ou sulfônico presentes no glicocálix da superfície mucosa (COSTA *et al.*, 2016).

2.4.2. Microscopia de força atômica (AFM)

O princípio da técnica de AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta de prova com alguns micras de comprimento, com constante elástica conhecida e ponto de contato com alguns poucos nanômetros de diâmetro. A obtenção da imagem é conseguida pela geração de “pixels” (pontos), produzidos pela deflexão de um feixe de laser que incide na face posterior da ponta de prova, quando em contato com a superfície da amostra tem sua posição no detector alterado. Isso proporciona alta resolução atômica, tanto lateral quanto vertical, na exploração de superfícies de diferentes naturezas (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes) (FERREIRA e YAMANAKA, 2006). A técnica de AFM, é realizada por três modos de operação distintos (figura 5): contato, não-contato e contato intermitente (“*tapping*”), levando-se em conta a forma de interação da ponta com a amostra (FERREIRA e YAMANAKA, 2006).

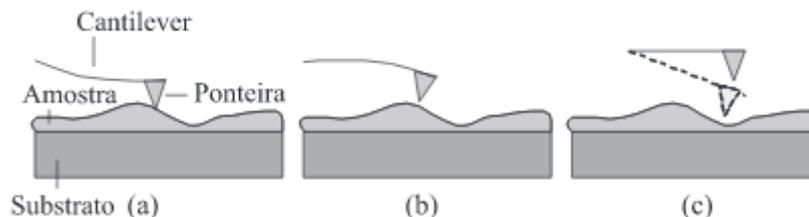


Figura 5: Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente (FERREIRA e YAMANKA, 2006).

No modo de contato, o cantilever é mantido a poucos ângstrons de distância da superfície da amostra, quando as forças interatômicas são repulsivas. No modo não contato, o cantilever é mantido a uma certa distância da amostra, quando as forças interatômicas são atrativas. E, o modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta, em ressonância, fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente. Este método de trabalho é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo de contato, uma vez que este minimiza possíveis deformações que esta opção de modo de trabalho pode gerar na amostra (FERREIRA E YAMANAKA, 2006).

2.5. Extração de analitos

O preparo da amostra e sua conseqüente extração da matriz biológica compreende etapa crítica para o desenvolvimento e validação de um método analítico, pois minimiza interferentes da matriz durante a análise, proporciona uma maior reprodutibilidade do método analítico e assegura uma vida útil maior para o equipamento (PRESTES et al., 2011).

O processo de extração de um analito para análises cromatográficas é realizado por diversas técnicas, como por exemplo: I) Extração em fase sólida, na qual a amostra é colocada em contato com diferentes sorventes em cartuchos, onde, por diferença de afinidade, o analito é separado; II) Extração em fase sólida dispersiva, que possui princípio semelhante ao da extração em fase sólida. Contudo, neste caso, o sorvente que é adicionado à amostra, seguido de homogeneização para permitir uma interação mais uniforme com

seus componentes; III) Na extração líquido-líquido é realizada a partição dos componentes da amostra em dois líquidos com polaridades distintas (normalmente, uma fase aquosa e uma orgânica). Por afinidade, o analito é separado em uma das fases ou para a nova mistura (quando as fases são miscíveis). IV) Outros métodos, como por exemplo, a extração com fluido supercrítico e a extração com membranas sólidas, que são utilizadas para o isolamento de analitos, porém possuem a desvantagem de serem poucos versáteis para diferentes matrizes biológicas (QUEIROZ et al., 2001).

A extração em fase sólida é feita em quatro etapas: I) ativação do sorvente; II) condição do sorvente de eluição com o solvente da amostra; III) percolação da amostra; IV) eluição do analito com o solvente adequado (LANÇAS, 2004; CALDAS et al., 2011). Por ser um ponto crítico, atenção especial é dada na escolha do sorvente utilizado, sendo os mais comuns os C18, C8, carbono grafitizado, dentre outros (DA SILVA, 2016). Esse tipo de extração apresenta praticidade e versatilidade para uma série de amostras biológicas, por isso é usado comumente em rotinas laboratoriais. Todavia, os cartuchos apresentam elevados custos (QUEIROZ et al., 2001). A extração em fase sólida dispersiva possui muitas semelhanças com a extração em fase sólida tradicional, como por exemplo o tipo de sorvente utilizado em ambas e sua eficiência (CABRERA et al., 2012), porém, apesar de ser mais barata também é mais laboriosa.

Dentre as técnicas supracitadas a extração líquido-líquido se destaca por ser uma técnica simples e de ampla aplicabilidade, visto que são utilizados diversos solventes com polaridades bem distintas, permitindo dessa forma um amplo espectro de possibilidades de extrações. Sua eficiência é determinada pela afinidade do analito por algumas dessas fases, pelas razões de concentração dos solventes utilizados na extração e pelo número de extrações realizadas (QUEIROZ et al., 2001). Esta técnica apresenta algumas desvantagens tais como: possível solubilidade do analito em ambas as fases, necessidade de solventes com elevado grau de pureza, redução da vida útil da coluna cromatográfica e necessidade de grandes volumes de solvente para a realização das extrações (YOSHIDA et al., 1999; DA SILVA, 2016). Contudo, esses problemas são contornados quando esta técnica é combinada com etapas de limpeza da matriz biológica, para prover uma amostra livre de

impurezas e são utilizados equipamentos que não necessitam de grandes volumes de amostra para análise, como no caso do UPLC (PRESTES et al., 2009, KINSELLA et al., 2009). Estes autores ressaltam que etapas de limpeza bem realizadas aumentam a vida útil do equipamento e de seus consumíveis.

Em relação ao processo de purificação das matrizes biológicas, o processo mais frequentemente utilizado é a precipitação de proteínas pela adição de solventes orgânicos, seguido de sua remoção por centrifugação (PRESTES et al, 2013; JANK et al, 2015). A etapa de clareamento de matriz é tão importante, que muitas vezes é empregada em diferentes etapas do processo de extração (DE OLIVEIRA et al., 2014; GARCIA et al., 2015; DA SILVA, 2016).

2.6. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida é uma técnica de separação de componentes presentes em uma amostra. A separação acontece em decorrência de diferenças nas propriedades físico-químicas dos componentes da amostra, os quais interagem distintamente com as fases estacionária e móvel, promovendo a eluição do analito em função de seu tempo de retenção (HARVEY, 2000). Essa técnica, além de ser ideal para a separação, também é utilizada para identificar e quantificar uma substância em uma mistura complexa (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). Os parâmetros cromatográficos mais relevantes a serem considerados são: preparo da amostra; volume de injeção; composição e gradiente da fase móvel; fluxo da fase móvel; tipo de fase estacionária; temperatura da coluna; e tipo de detector (HARVEY, 2000; SNYDER e KIRKLAND, 2010).

Existem vários tipos de detectores disponíveis para análises químicas, como por exemplo Ultravioleta (UV), Arranjo de fotodiodos (DAD), Fluorescência, espectrômetro de massas, entre outros. O critério de escolha do detector a ser utilizado depende das características químicas do analito, da finalidade da análise e do limite de quantificação que se objetiva alcançar (SNYDER e KIRKLAND, 2010; LIU, Z.Y, 2012). Para atender os limites de detecção e quantificação dos resíduos em matrizes biológicas preconizados na

legislação brasileira pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, é necessário a utilização de um detector de alta seletividade, sensibilidade e robustez (LIU, Z.Y, 2012, POZO et al., 2006; MAPA, 2011). Neste contexto, a espectrometria de massas é a melhor opção para atender estes pré-requisitos, identificando e quantificando o analito de interesse em concentrações na faixa de nanogramas por mililitro (RATH et al., 2015).

2.6.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental para identificar e quantificar compostos pela determinação direta da massa molecular. Quando o espectrômetro de massas está acoplado em um sistema cromatográfico possui elevada capacidade quantitativa. Por sua vez, na ausência de um cromatógrafo, apresenta apenas capacidade de identificação qualitativa (HOFFMAN e STROOBANT, 2007). Dentro do espectrômetro, os compostos são ionizados e separados por meio de um campo eletromagnético, de acordo com sua relação massa/carga (m/z), provocando excitação do detector e formação de um espectro (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Em termos de análises quantitativas, a espectrometria de massas é uma das ferramentas mais versáteis e robustas, principalmente na conformação *tandem* (*i.e.* analisadores de massas em sequência) (GENTILLI, 2005; HAN et al., 2015). Nessa configuração é gerado um íon típico do analito, denominado íon precursor, o qual é fragmentado, em íons com relação massa/carga menores denominados íons fragmentos, para então, confirmar a molécula e quantificá-la (SKOOG et al., 2006). É possível separar substâncias que apresentem a mesma massa molar nominal e diferenciá-las em mais de um analito (THURMAN et al., 2013). Esse tipo de análise ocorre devido ao tipo de analisador de massas que o espectrômetro possui e ao seu princípio de funcionamento (SKOOG et al., 2006; HOFFMAN e STROOBANT, 2007). Todo espectrômetro de massa é composto por: I) Fonte de ionização (FI), câmara de ionização das amostras; II) Analisadores de massa: individual ou em sequência (*tandem*); III) Cella de colisão (apenas no *tandem*), local no qual ocorre a fragmentação dos íons através de sua colisão com gases inertes (Ar,

He ou N₂); IV) Detector e amplificador de sinal, local onde os íons e seus fragmentos são detectados e seus sinais são amplificados para a formação dos espectros (SKOOG et al., 2006; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

De forma geral, existem diversos tipos de espectrômetros de massas, com variados tipos de fonte e de analisadores de massa, cujo o princípio de funcionamento são distintos. Os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e *time of flight* (TOF) são os mais frequentemente utilizados. Quando comparados, entre si, enquanto o primeiro apresenta elevada sensibilidade e baixa resolução, o segundo apresenta alta resolução e baixa sensibilidade (LIU, 2012). Por essa razão o QqQ é mais utilizado para ensaios de quantificação, enquanto o TOF é mais utilizado para identificação de moléculas (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008; LI et al., 2016; THOREN et al., 2016). Dentro deste contexto, os UPLC-MS/MS em sistema QqQ apresentam o melhor desempenho para análises quantitativas e confirmatórias de resíduos de fármaco veterinário em tecidos animais (GENTILLI, PERRET e MARCHESI, 2005; HIRD et al., 2014).

2.6.2. Fonte de ionização

Existem diversos tipos de fontes de ionização (figura 6), cada qual com uma particularidade, pois estas apresentam mecanismos de ionização e intensidade de ionização distintos, com especificidades para analitos que possuem propriedades físico-químicas diferentes. (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

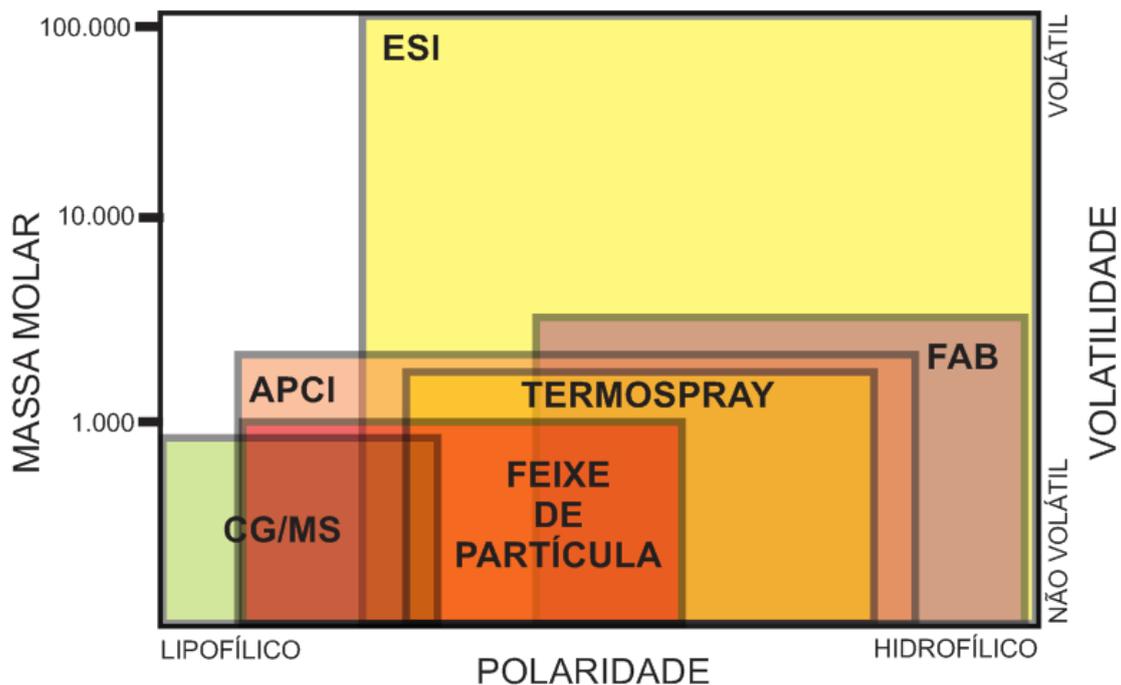


Figura 6: Principais tipos de fontes de ionização e suas especificidades em espectrometria de massas (SLOBODNFK E BRICKMAN, 1999; REBELO, 2014).

As duas fontes mais utilizadas em espectrometria de massas acopladas à cromatografia líquida são a ESI (*“Electron Spray Ionization”*) e APCI (*“Atmospheric Pressure Chemical Ionization”*). Estas duas fontes trabalham de forma complementar, sendo a ESI, de caráter mais universal e como maior eficiência para ionizar compostos mais hidrofílicos, enquanto que a APCI é mais eficiente na ionização de compostos com maior hidrofobicidade (HOFFMAN e STROOBANT, 2007; LIU, 2012).

O princípio de funcionamento da fonte ESI se baseia na ionização do analito, que passa por um capilar metálico mantido sob alta voltagem antes de atingir a câmara de ionização. Nesta, um campo elétrico induz a formação de um *spray* a partir de uma gota em formato cônico na ponta do capilar. As gotículas carregadas, sob atmosfera de gás inerte (usualmente N₂) e temperaturas elevadas, perdem solventes, produzindo o íon *quasi*-molecular que é direcionado para o analisador de massas (HO et al, 2003; HOFFMAN e STROOBANT, 2007). Outro detalhe importante desse tipo de fonte, é sua branda intensidade de ionização, gerando menor número de quebras durante a ionização dos íons precursores (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Para tentar explicar o princípio de ionização da fonte ESI existem dois modelos teóricos. O primeiro é o de Carga Residual, cujo princípio se dá pela

evaporação das gotículas após a formação do *spray*, desencadeando a perda de volume e conseqüente aumento da carga superficial, com subseqüente instabilidade do sistema devido as forças de repulsão das cargas. Isso faz com que as gotículas se fragmentem até atingirem o tamanho de cerca de 1 nm, contendo o íon *quasi*-molecular. Este fenômeno é denominado de Explosão Coulômbica. Por sua vez, o outro modelo teórico, denominado de Volatilização do Íon, tem como princípio básico a formação do íon *quasi*-molecular a partir da carga das gotas da nebulização eletrostática geradas na ponta do capilar da ESI, quando as gotas atingem um diâmetro de 20 nm (HO et al, 2003; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

A fonte APCI promove a ionização do analito sob pressão atmosférica quando este colide com uma fonte íons de primários (e.g. N₂, NH₃, CO, ...) presentes na fonte. Esse tipo de fonte apresenta a vantagem de gerar menos fragmentos no espectro, facilitando a detecção de alguns íons moleculares por promover uma fragmentação mais branda do analito, servindo como técnica complementar a outros tipos de fragmentação. Majoritariamente, os mecanismos de ionização ocorrem de três formas: transferência de prótons ($A + GH^+ \rightarrow AH^+ + G$), formação de adutos (solvatação do analito pelos gases) e transferência de carga ($Ge + e^- \rightarrow Ge^{*+} + 2e^- / Ge^{*+} + A \rightarrow A^{*+} + Ge$), onde A é o analito, G é o gás, "e⁻" é um elétron e "*" representa um fragmento (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

2.6.3. Analisador de massas

Após a ionização, os analitos são conduzidos para o interior do analisador de massas sob alto vácuo, onde podem ser selecionados, focalizados e/ou fragmentados de acordo com o seu valor de *m/z* (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005; SKOOG et al., 2006).

Existe uma variedade de analisadores de massa, tais como o *Quadrupolo*, *Íon trap* e de *Time of flight* cada qual com uma especificidade para um tipo de análise, em função da dinâmica de funcionamento e de separação de íons (HOFFMAN e STROOBANT, 2007). Os analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e time of flyght (TOF) são os mais frequentemente utilizados, devido ao fato de apresentarem características singulares para análises de

identificação e quantificação em matrizes biológicas (EL-ANEED et al., 2009), tais como elevada sensibilidade para o triplo quadrupolo e elevada seletividade para o TOF. Comparativamente, enquanto o primeiro apresenta elevada sensibilidade e baixa resolução o segundo é de alta resolução e baixa sensibilidade (LIU, 2012). Por essa razão o QqQ é mais utilizado para ensaios de quantificação, enquanto que o TOF é adotado para identificação de fármacos (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008; LI et al., 2016; THOREN et al., 2016). Atualmente, os UPLC-MS/MS em sistema QqQ apresentam o melhor desempenho para análises quantitativas e confirmatórias de substâncias em matrizes biológicas, enquanto os analisadores do tipo QTOF proporcionam o melhor desempenho para análises qualitativas e de identificação destas substâncias (GENTILLI, PERRET e MARCHESE, 2005; HIRD et al., 2014, BOESL, 2017).

O analisador de massas do tipo quadrupolo é um dispositivo que usa a estabilidade das trajetórias entre dois pontos de íons expostos à campos elétricos oscilantes para separá-los em função de suas relações massa/carga (m/z) (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

A composição de um quadrupolo é constituída por dois pares de barras cilíndricas (eletrodos) dispostos paralelamente ao eixo X e eixo Y, nos quais um campo elétrico é aplicado alternadamente entre os pares de eletrodos. Os campos elétricos gerados induzem os íons a realizarem uma trajetória helicoidal durante a passagem pelos eletrodos. Por radiofrequência, as intensidades dos campos elétricos são controladas, o que permite a separação dos íons *quasi*-moleculares por sua relação m/z , para posterior fragmentação (quando for o caso) e detecção (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005; SKOOG et al., 2006; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, é constituído por três quadrupolos dispostos em séries, cada um responsável por executar uma função. O primeiro quadrupolo (Q1) é responsável pela seleção do íon de interesse, ou o íon precursor (íon pai), o segundo quadrupolo (Q2), denominado também de cela de colisão, possui a função de fragmentar o íon precursor, fazendo com que o íon precursor se choque com um gás inerte (geralmente, Ar, He ou N₂) presente na cela, desencadeando a formação de íons provenientes dessa quebra (íons filhos), dada uma energia de colisão

específica e por fim, o terceiro quadrupolo (Q3) é responsável pela seleção e focalização dos íons tanto precursores quanto os íons gerados na cela de colisão para o detector do espectrômetro de massas. (SKOOG et al., 2006; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Em condição de trabalho de quantificação, os analisadores do tipo triplo quadrupolo, após seleção do íon precursor (Q1), quando fragmentado na cela de colisão (Q2), gera um grupo de fragmentos filhos, dependentes das condições de fragmentação. Pela seleção de um par desses fragmentos no terceiro quadrupolo (Q3), define-se um íon de quantificação e outro para ser o íon qualificação (HOFFMAN e STROOBANT, 2007). Esse critério é definido pela intensidade de sinal e pela relação sinal/ruído da análise, fazendo com que esta etapa seja crucial para alta sensibilidade do método quantitativo (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Esse tipo de equipamento possibilita a adoção de modos de análise distintos de acordo com o objetivo analítico, tais como: a) *Fullscan*, onde consegue-se visualizar os íons presentes dentro de faixa de relação m/z pré determinada; b) *MRM* (Multiple Reaction Monitoring), na qual o equipamento monitora as transições de m/z presentes no ensaio a partir da seleção de um íon precursor pré-estipulado; c) *Parent scan*, análise que permite identificar o íon precursor a partir de um íon fragmento; e, d) *Daughter scan*, ação semelhante ao modo *Parent Scan*, porém identifica-se o íon a partir de um íon precursor (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

A sensibilidade dos QqQ é tão elevada que esta técnica é considerada como padrão ouro para detecção de resíduos em alimentos, estudos de farmacocinética (MAPA, 2011; King et al., 1999) e exames “*anti-dopping*” em atletas (REDDY et al., 2009). Para exemplificar a capacidade quantitativa de uma análise realizada em um UPLC-MS/MS QqQ, Da Silva (2016) conseguiu limite de quantificação (LOQ) da cloxacilina na matriz leite de 1 ppb. Por sua vez, García et al. (2015) também validaram um método para quantificação de β -lactâmicos em leite e obteve-se um limite de quantificação de 2 ppb para este grupo de fármacos. Reddy e colaboradores (2009) encontraram valores para LOQ de 0,5 ppb para exames antidoping de carboxifenesterida e valores de 1-5 ng/mL para outros fármacos. Já o Danafar validou um estudo de

farmacocinética para o hidrocloreto de clonidina que obteve um LOQ de 0,01 ppb.

O analisador de massas do tipo *Time of flight* mede o tempo que os íons levam para serem deslocados entre a fonte e o detector. Detalhadamente, os íons são expelidos da fonte por uma lente de focalização, passando por uma região de aceleração provocada por uma diferença de potencial entre o eletrodo e o gride de extração. Nessa etapa são formados campos elétricos até que os íons atinjam a mesma energia cinética, para então chegarem em uma região livre de campos elétricos chamada de tubo de voo. Neste, os íons são separados em função de diferenças em sua relação m/z , e conseqüente tempo de inércia diferente, para então chegar ao detector (HOFFMAN e STROOBANT, 2007). A resolução do TOF é determinada pelo tamanho do tubo de voo, sensibilidade do detector e capacidade de processamento de dados (BOESL, 2017). Segundo o autor, em equipamentos do tipo TOF consegue-se resolução m/z de 10^{-4} , enquanto o sistema QqQ consegue resolução de 10^{-2} , contudo a ausência de separação de ions imputa menor sensibilidade ao sistema TOF, quando comparado ao QqQ.

2.7. Validação de métodos analíticos

A validação é um estudo experimental utilizado para demonstrar que o procedimento analítico é adequado à finalidade proposta, assegurando confiabilidade dos resultados obtidos. Portanto, constitui o primeiro nível e a melhor ferramenta para garantir a qualidade de uma análise quantitativa.

Segundo a *International Conference Harmonization* (1996), modificações nas formulações farmacêuticas interferem no desempenho dos métodos analíticos de matrizes complexas. Visando a segurança alimentar do consumidor final e do próprio animal, em estudos de resíduos de medicamentos veterinários e de farmacocinética, para toda nova formulação farmacêutica, sempre é necessário validar os métodos analíticos nas diferentes matrizes biológicas (MAPA, 2011).

Internacionalmente, a principal regulamentação dos procedimentos analíticos para validação de um método é normatizada pelo ICH, por meio do

qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação de métodos analíticos. De forma geral, o ICH está em concordância com *Food and Drug Administration* (FDA), a *International Organization for Standardization* (ISO) e a *International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products* (VICH, 2015).

No âmbito nacional, existem três agências que regulamentam os procedimentos a serem adotados durante a validação do método analítico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Apesar de existir intercomunicação entre estas agências, apenas o MAPA regulamenta os procedimentos de validação a serem adotados para medicamentos de uso veterinário.

Para validar um método analítico, é preconizado a realização das etapas: seletividade, especificidade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ICH, 1996; MAPA, 2011), seguindo um mapa decisório pré-definido (Figura 7). Os parâmetros e os critérios de validação aplicáveis às determinações dos analitos devem levar em consideração o nível de concentração de interesse, ou o limite máximo permitido por legislação, limite máximo de resíduo (LMR), teor máximo de contaminante/analito (TMC), para que alguma decisão seja tomada (MAPA, 2011).

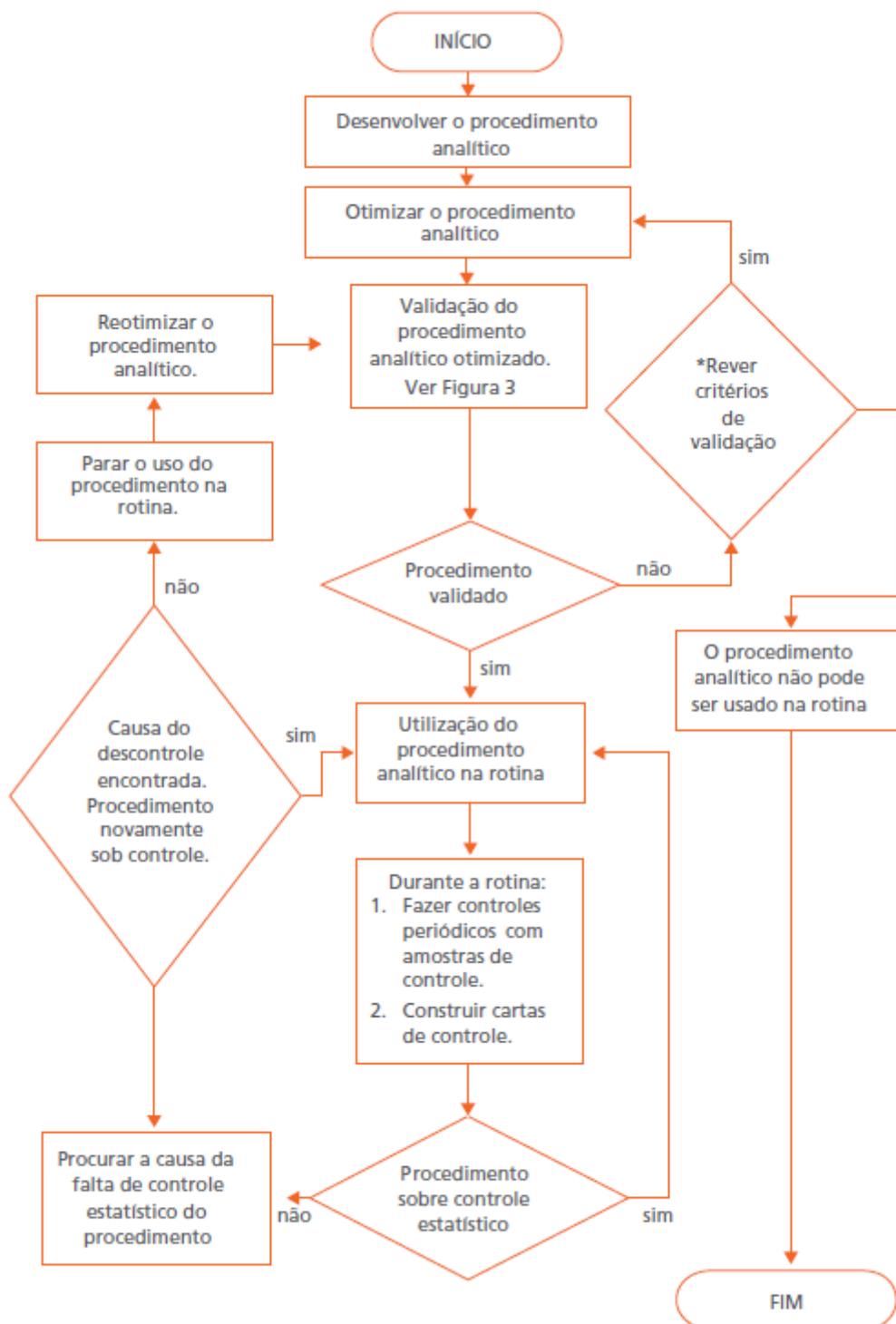


Figura 7: Fluxograma das etapas básicas de desenvolvimento, validação e controle de um procedimento de analítico (MAPA, 2011).

2.7.1. Seletividade e Especificidade

Seletividade e especificidade são os primeiros critérios para serem avaliados em um método analítico. Consiste na capacidade do método em

fornecer sinais ou respostas que estão livres de interferências, garantindo resultados verdadeiros. Ou seja, é verificado se a medição realizada pelo sistema é capaz de fornecer valores para um ou mais analitos mensurados, tal que os valores de cada analito seja independente um do outro (ICH, 1996; MAPA, 2011).

2.7.2. Linearidade

Linearidade é a capacidade do procedimento analítico, dentro de um intervalo de concentração especificado, expressar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Para tanto, constrói-se uma curva de calibração com pelo menos cinco níveis de concentração, todos em triplicata (ICH, 1996; MAPA, 2011).

Para assegurar que a curva de calibração está aceitável, também é necessário avaliar o coeficiente de colinearidade, a cedasticidade dos dados e a presença de valores discrepantes (MAPA, 2011; RATH, MARTÍNEZ-MEIJA e SCHODER, 2015).

2.7.3. Precisão

A precisão é uma estimativa da dispersão de resultados entre vários ensaios independentes, feitos com uma mesma amostra ou com padrões em condições definidas. Essa estimativa expressa o grau de concordância entre uma série de análises de uma mesma amostra, em um mesmo método analítico. Este procedimento é realizado em duas etapas: repetitividade (intradia e interdia) e reprodutibilidade, quando necessário (ICH, 1996). Os resultados obtidos são expressos em termos de desvio padrão e coeficiente de variação.

2.7.4. Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção do método é definido como a concentração na qual é possível detectar a presença do analito dentro de um intervalo estatístico. O LD pode ser obtido pela equação:

LD = 3 σ /S

Onde σ é o erro padrão da curva de calibração e S é coeficiente angular da curva de calibração.

A determinação do LD também pode ser realizada pela relação sinal/ruído, define-se o LD como sendo 3 vezes o valor da razão do sinal/ruído do equipamento (MAPA, 2014).

O limite de quantificação, é considerado como sendo a propriedade do método de mensurar quantitativamente a menor concentração do analito na amostra (FDA, 2011). Essa determinação é calculada por meio de dados da curva de calibração utilizando a equação:

LQ = 10 σ /S

Onde σ é o erro padrão da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

A determinação do limite de quantificação também é realizada com base na relação sinal/ruído do equipamento, nesse caso o LQ é definido por um sinal dez vezes superior ao ruído da análise (FDA, 2011; MAPA, 2011). Outra forma de determinar o LQ é pelo último nível da curva de calibração. Esses valores devem exceder menos que 5% em relação ao sinal do branco e apresentar coeficiente de variação menor que 20% (FDA, 2011).

2.7.5. Exatidão

A exatidão, também denominada de acurácia, verifica a recuperação quantitativa do analito após o processamento da amostra, ou seja, a exatidão mensura o grau de concordância entre o valor determinado pelo equipamento e o valor real do analito na amostra (ICH, 1996; MAPA, 2011). O cálculo da exatidão é feito pela relação entre a concentração mensurada pelo equipamento e a concentração teórica, com valor final expresso em porcentagem (MAPA, 2011).

2.7.6. Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico tem o objetivo de avaliar a capacidade do método de se manter preciso e exato mediante pequenas variações durante o procedimento analítico (MAPA, 2011). Para isso, são identificados pelo menos três parâmetros críticos no procedimento de análise e, empregar variações controladas nesses parâmetros de modo a definir o quão robusto é o método analítico. Usualmente, definem-se variações dos parâmetros analíticos e os resultados são submetidos à análise estatística pelo teste Fisher (ICH, 1996; MAPA, 2011).

3. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico para quantificar a Cloxacilina Benzatina de formulação farmacêutica (nanoparticulada) em plasma bovino por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em sistema *tandem*, testando-o *in vivo*.

3.1. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar por AFM e DLS uma formulação de cloxacilina benzatina nanoparticulada e mucoadesiva.
- Desenvolver e validar um método analítico para quantificar a Cloxacilina Benzatina de formulação farmacêutica (nanoparticulada) em plasma bovino.
- Identificar e quantificar cloxacilina benzatina no plasma de bovinos experimentalmente tratados com formulação farmacêutica de cloxacilina nanoencapsulada em partículas mucoadesivas.

4. Materiais e métodos

4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados para o experimento foram adquiridos na sigma metanol grau analítico (Sigma); metanol grau LC-MS (Sigma); acetona grau analítico (Sigma); acetonitrila grau LC-MS (Sigma); água MilliQ®; span 80® (Sigma); miglyol ® 812N (Sasol); poloxamer 188® (Sigma); poli-ε-caprolactona - PCL (CAPA 6500, M.Kassab), quitosana (Sigma), cloxacilina sódica ≥97% (Sigma); cloxacilina benzatínica (Hebei Huari Pharmaceuticals CO. LTD, China); dicloxacilina monohidratada ≥98,5% (Sigma).

4.2. Preparo da formulação de Cloxacilina Benzatina Nanoencapsulada

O preparo da formulação farmacêutica contendo nanocápsulas mucoadesivas de Cloxacilina benzatina foi realizado utilizando a técnica de precipitação interfacial, seguindo metodologia descrita por Mosqueira e colaboradores (2011). Inicialmente, foi produzida uma solução de PCL na concentração (0,6% (p/v)) em acetona e metanol (7:3). Após a solubilização da PCL, foi adicionado à solução o Mygliol na concentração de 2% (v/v), surfactante monooleato de sorbano (Span® 80) e finalmente a Cloxacilina benzatina na concentração de (1 mg/mL). A fase orgânica (FO) preparada correspondeu a 30% da formulação final. Paralelamente, foi solubilizado a quitosana 1mg/mL em água Milli-Q ® acidificada com ácido acético (pH final de 5,8), seguida da adição de poloxamer 188, sob agitação magnética na concentração de 0,6% (p/v), para formar a fase aquosa (FAq). Após o preparo das duas fases verteu-se lentamente a FO na FAq, e a suspensão formada foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos a 550 rpm. Posteriormente, o solvente foi removido à pressão reduzida em evaporador rotativo (Tecnal, Brasil), sob temperatura de 40 °C.

4.3. Caracterização físico-química da nanopartícula.

O tamanho e o potencial Zeta das nanocápsulas em suspensão foram determinados por *Dynamic light scattering* (DLS) e Microeletroforese associada à anemometria de Laser Doppler, para tanto foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZN (Malvern Instruments, Inglaterra).

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada por Microscopia de Força atômica, em temperatura ambiente, utilizando-se o equipamento de EasyScan 2 (NanoSurf, Suíça). Uma amostra de nanopartículas foi depositada sobre a mica e seca em dessecador à temperatura ambiente. As análises foram realizadas com um cantilever Tap 190Al-G (BudgetSensor), no modo de operação contato intermitente.

4.4. Identificação e quantificação da cloxacilina benzatina e de dicloxacilina

Os ensaios foram realizados no laboratório de nanotecnologia da EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora - Minas Gerais, em um cromatógrafo de modelo UPLC Acquity (Waters Inc., EUA) equipado com pré-coluna Vanguard C18 e coluna BEH-C18 1,7 μ m e 100mm de comprimento (Waters Inc., EUA), acoplado ao espectrômetro de massas modelo MS XEVO-TQS micro (Waters Inc., EUA) equipado com fonte *Electron spray* (ESI) e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.

4.4.1. Identificação do íon precursor da cloxacilina e do íon precursor de dicloxacilina

As condições espectrométricas utilizadas para identificar o íon precursor da cloxacilina foram definidas por infusão contínua de uma solução de 10 ng/mL de cloxacilina sódica e 100 ng/mL de dicloxacilina em metanol. Utilizando o software MassLynx, foram definidas as seguintes condições analíticas: modo de ionização negativo; voltagem do capilar 3,0 kV; potencial cone 20 V; temperatura de dessolvatação 450°C; fluxo do gás de dessolvatação 810 L/min; fluxo de gás no cone 150 L/hr; energia de colisão

para formação do íon fragmento (390m/z) 8V, o qual representa o íon qualificador devido a presença de uma relação sinal ruído e intensidade de sinal menor ; e energia de colisão para formação do íon fragmento (293m/z) 14V, sendo este o íon quantificador por apresentar uma relação sinal/ruído e intensidade de sinal mais elevados.

Já em relação as condições espectrométricas para identificação do íon precursor da dicloxacilina foram determinados as mesmas condições à da cloxacilina, porém para se identificar o íon precursor e seus fragmentos foram utilizados energias de colisão diferentes, encontrando (468 m/z) o íon precursor, e seus fragmentos com as respectivas energias de colisão, (327,0 m/z) 8V, sendo este o íon quantificador e (291,0 m/z) 16V o íon qualificador.

4.4.2. Parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas utilizadas para identificar e quantificar a Cloxacilina foram: fluxo da fase móvel 0,3 mL/min; temperatura da coluna 50 °C; fases móveis A: H₂O a 0,1 % de ácido fórmico e B: metanol; corrida em modo gradiente sendo do tempo de 0 a 3min 50% de A e 50% de B, de 3,01 min a 4min 1% de A e 99% de B; 4.01 min a 5,00 min 50% de A 50% de B; e volume de injeção de 3,0 µL.

4.5. Extração da Cloxacilina Benzatina

Para avaliar o melhor método de extração da cloxacilina benzatina do plasma bovino foi realizada uma extração líquido-líquido comparando diferentes composições de solventes, visando sobretudo aumentar a eficiência de extração do analito. Nesta condição, foram avaliados, solventes, matéria seca, relação solvente/amostra, e supressão iônica. Todas as amostras de plasma utilizadas no teste continham 10 ng/mL de cloxacilina benzatínica nanoencapsulada e foram testadas em triplicata.

Solventes:

- Acetonitrila pura
- Acetonitrila-água 9:1 v/v

- Metanol-acetonitrila 1:1 v/v
- Metanol puro

Todos os extratos foram obtidos após a remoção dos precipitados proteicos por centrifugação (Thermo, EUA) a 22.000 G durante 8 minutos sob refrigeração de 5°C. As análises foram realizadas no sobrenadante.

Matéria seca: determinação da matéria seca dos extratos foi realizada por diferença de peso do extrato após remoção do solvente 50°C em concentrador de amostras (Tecnal, Brasil) sob atmosfera de nitrogênio por duas horas. Para completar a secagem, as amostras ficaram 14h em estufa de secagem à 60°C.

Relação solvente/amostra:

- Plasma/solvente 1:2 (v/v)
- Plasma/solvente 1:9 (v/v)

Para o ensaio de supressão iônica da matriz plasma bovino injetou-se, via UPLC, o extrato de plasma branco paralelamente a infusão de um padrão cloxacilina em concentração conhecida via espectrômetro, obtendo-se, assim, um cromatograma de supressão, no qual pode-se identificar as zonas de supressão.

4.6. Validação do método analítico de cloxacilina benzatina.

Findado o estágio de desenvolvimento do método analítico, realizou-se os procedimentos de validação seguindo as recomendações do *Ministério da Agricultura e Abastecimento* (MAPA, 2011).

Os procedimentos preconizados para a validação dos métodos analíticos consistem em definir: a seletividade, a linearidade, precisão, os limites de detecção e quantificação, a exatidão e a robustez do método analítico.

4.6.1. Seletividade

A avaliação da seletividade do método analítico foi realizada a partir dos extratos obtidos de seis amostras de plasma fortificadas na concentração 10 µg/L de cloxacilina benzatina nanoencapsulada.

4.6.2. Linearidade

Foi preparada uma suspensão de nanocápsulas contendo Cloxacilina na concentração de 0,1 mg/mL que foi adicionada ao plasma para obter uma suspensão estoque na concentração de 1000 ng/mL. A partir da suspensão estoque foi feita diluição seriada em extrato metanólico de plasma bovino para a preparação da curva de calibração nas concentrações 1; 10; 25; 50, 75 e 100 ng/mL em triplicata, durante 3 dias consecutivos.

A normalidade da distribuição dos resultados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A avaliação da cedasticidade dos resultados em cada nível de concentração foi realizada com o auxílio do teste de Levene. A verificação da presença de possíveis valores discrepantes foi feita pelo teste de D-Cook. O índice de colinearidade foi obtido junto com curva de regressão da curva de calibração (área do analito *versus* concentração) pelo método dos mínimos quadrados padronizados (ICH, 1996; MAPA, 2011; VICH, 2015).

4.6.3. Precisão e Exatidão

A precisão intradia, foi realizada avaliando a média, desvio padrão e o coeficiente de variação das leituras dos níveis 1; 50; 100 µg/L em sextuplicata após o processo de extração do cloxacilina nanoencapsulada do plasma bovino. Para determinação da precisão interdía, o mesmo procedimento foi realizado nos 2 dias consecutivos e com analistas diferentes (ICH, 1996). Os resultados foram expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada nível de concentração avaliado. Os valores de referência para determinar a precisão do método estão descritos tabela 01.

Tabela 1: Valores de referência aceitos para determinação da precisão (MAPA, 2011).

Concentração do analito (ng/mL)	Valores aceitos de precisão intradia (%CV)	Valores aceitos precisão interdia (%CV)
< 1	30	45
≥ 1 < 10	25	32
≥ 10 < 100	15	23
≥ 100	10	16

Para o quesito exatidão foi considerado a porcentagem de recuperação do analito, avaliando em nas concentrações 1; 50 e 100 ng/mL, em triplicata. Os resultados foram expressos de acordo com a equação: (ICH, 1996; MAPA, 2011; VICH, 2015):

$$f_{rec} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100$$

Frec= Recuperação do analito após extração

Cf= Concentração medida após fortificação da matriz branca;

Cnf= Concentração medida na matriz não fortificada

Cad=Concentração do analito puro medido na matriz branca

Os valores aceitos para definir a exatidão do método estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Valores de referência para determinar a exatidão do método analítico para cada faixa concentração (MAPA 2011).

Concentração do analito (ng/mL)	Valores aceitos para exatidão (%)
< 1	50 a 120
≥ 1 < 10	60 a 120
≥ 10 < 100	70 a 110
≥ 100	80 a 110

4.6.4. Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

A determinação do limite de quantificação foi realizada a partir da análise de 6 extratos de plasma fortificados na concentração de 1 ng/mL de formulação de cloxacilina, executando diluições seriadas, até atingir as concentrações de 1; 0,5; 0,1; 0,05; e 0,01 ng/mL. Considerou-se o LOQ quando a relação sinal/ruído foi superior a 10 e o LOD, superior a 3 (ICH, 1996).

4.6.5. Robustez

A robustez foi determinada nas concentrações 1, 50 e 100 ng/mL, alterando duas variáveis do método, em três níveis e em duplicata. A primeira variável avaliada foi o volume de injeção do analito (2,9 µL; 3,0 µL; 3,1 µL) e a segunda foi a temperatura da coluna (49°C; 50°C; 51°C). Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente seguindo o teste F. (ICH, 1996; MAPA, 2011).

4.7. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* IBM SPSS/PC versão 17.0.

4.8. Plasma bovino

Amostras de plasma bovino foram obtidas na Fazenda Experimental da EMBRAPA Gado de Leite localizada no município de Coronel Pacheco – Minas Gerais, protocolo CEUA-EGL N°: 02/2012 (anexo I). O plasma bovino branco (sem a presença de cloxacilina) foi obtido de um animal previamente controlado, sem receber qualquer tipo de medicamento durante 90 dias.

O plasma de animais tratados com a formulação nanoestruturada foi obtido a partir de ensaio realizado previamente com 6 bovinos hípidos. Para tanto, cada animal recebeu, pela via tópica, 4,86 mg de cloxacilina por globo ocular. Amostras de plasma foram coletadas em tubo tipo vácuo contendo heparina sódica nos tempos (em horas): 0; 0,5; 1; 1,5; 2;4; 6; 12; 18; 24;36; 48; 72; e 96h, baseados em estudos prévios conduzidos por Daigneault e colaboradores, 1990. Após a coleta, o plasma foi separado por centrifugação e estocado à -80°C, durante todo o processo de coleta.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da nanopartícula mucoadesiva de cloxacilina benzatina

A determinação do tamanho médio das nanocápsulas de cloxacilina, potencial Zeta e análise topográfica por AFM foram utilizadas como parâmetros para assegurar as características da formulação utilizadas no experimento.

Por DLS, identificou-se que as nanocápsulas apresentaram distribuição de tamanho variando entre 342 nm a 450 nm e potencial Zeta de +21,53 mV em pH 5,8.

Quando avaliadas por AFM (Figura 8), verificou-se que, as nanopartículas apresentaram morfologia esférica e com tamanho variando entre 280 e 600 nm, corroborando com os resultados de DLS. Estes parâmetros estão em conformidade com os apresentados por Castanheira (2012) e Mosqueira e colaboradores (2011) que desenvolveram a formulação mucoadesiva.

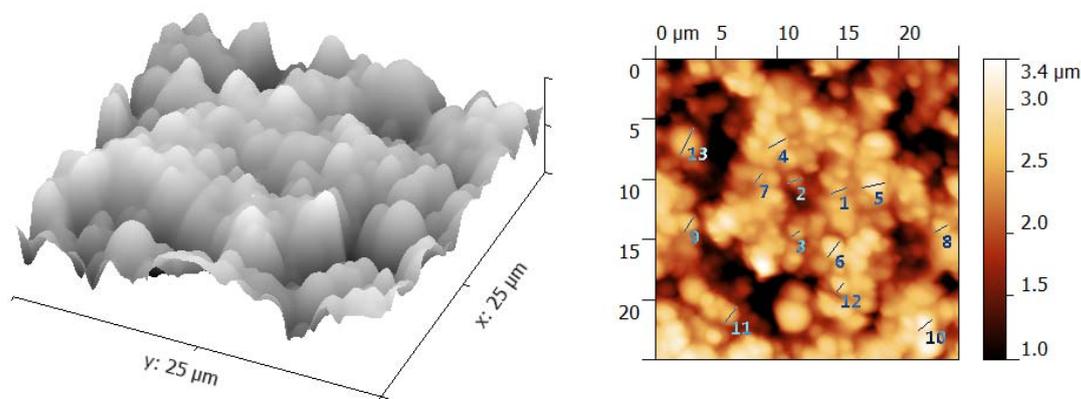


Figura 8: Imagens topográfica representativa de nanocápsulas mucoadesivas contendo Cloxacilina Benzatina.

5.2. Definição dos parâmetros do método para identificação da cloxacilina benzatina e dicloxacilina.

Objetivando definir quais os melhores parâmetros espectrométricos para a análise de cloxacilina e da dicloxacilina (padrão interno), foi realizada uma infusão direta com uma solução padrão de cloxacilina sódica (10 ng/mL) e de dicloxacilina (100 ng/mL) em metanol, promovendo alterações e ajustes em cada um dos parâmetros espectrométricos do equipamento.

Foram comparados os modos de ionização da fonte, buscando averiguar qual destes apresentou uma relação sinal/ruído mais adequada, variação nos parâmetros de potencial capilar (2,00 – 4,00 kV), potencial cone (20-50 eV), temperatura do capilar (range), potencial cone (0 - 100 V) temperatura de dessolvatação (350 – 600 °C), fluxo do gás de dessolvatação (500 – 1000 L/hr), fluxo de gás no cone (0 - 300 L/hr) e energia de colisão (1 – 30 V).

Após realização dos testes, identificou-se os parâmetros que proporcionaram maior intensidade de sinal e melhor relação sinal/ruído para serem utilizados no processo de validação e experimento *in vivo* (tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros espectrométricos identificados como mais adequados para fragmentação da cloxacilina e da dicloxacilina.

Parâmetros	Cloxacilina	Dicloxacilina
Modo de ionização	Negativo	Negativo
Capilar	3,0 kV	3,0 kV
Potencial cone	20 V	20 V
Temperatura de dessolvatação	450°C	450°C
Fluxo do gás de dessolvatação	810 L/min	810 L/min
Fluxo do gás de cone	150 L/hr	150 L/hr
Energia de colisão 1 (390 m/z)	8 V	-
Energia de colisão 2 (293 m/z)	12 V	-
Energia de colisão 1 (327 m/z)	-	8 V
Energia de colisão 2 (291 m/z)	-	16 V

Com estes parâmetros, para a cloxacilina, o íon precursor apresentou sinal em 434,15 m/z. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Da Silva (2016) e Ito (2001), que encontraram a massa molecular

monoisotópica da cloxacilina de 435,8 m/z . A diferença entre os valores se deve a perda de um próton (H^+) durante o processo de ionização de Ito (2001). Essa diferença de variação na casa decimal se deve à resolução do equipamento, a qual possui valor de 1 Dalton.

Quando a fragmentação foi monitorada por *Multiple Reaction Monitoring*, identificou-se a formação elevada de íons com 390,1 m/z quando aplicada uma energia de colisão de 8,0 V, decorrente da perda de CO_2 da molécula principal. O sinal em 293,1 m/z foi obtido quando utilizou-se uma energia de colisão de 12,0 V, em função da perda do radical C_5H_7NO (figura 9) (WILFRIED *et al.*, 2017). Estes mesmos íons também foram detectados por Da Silva (2016) e Ito (2001), quando fragmentaram cloxacilina.

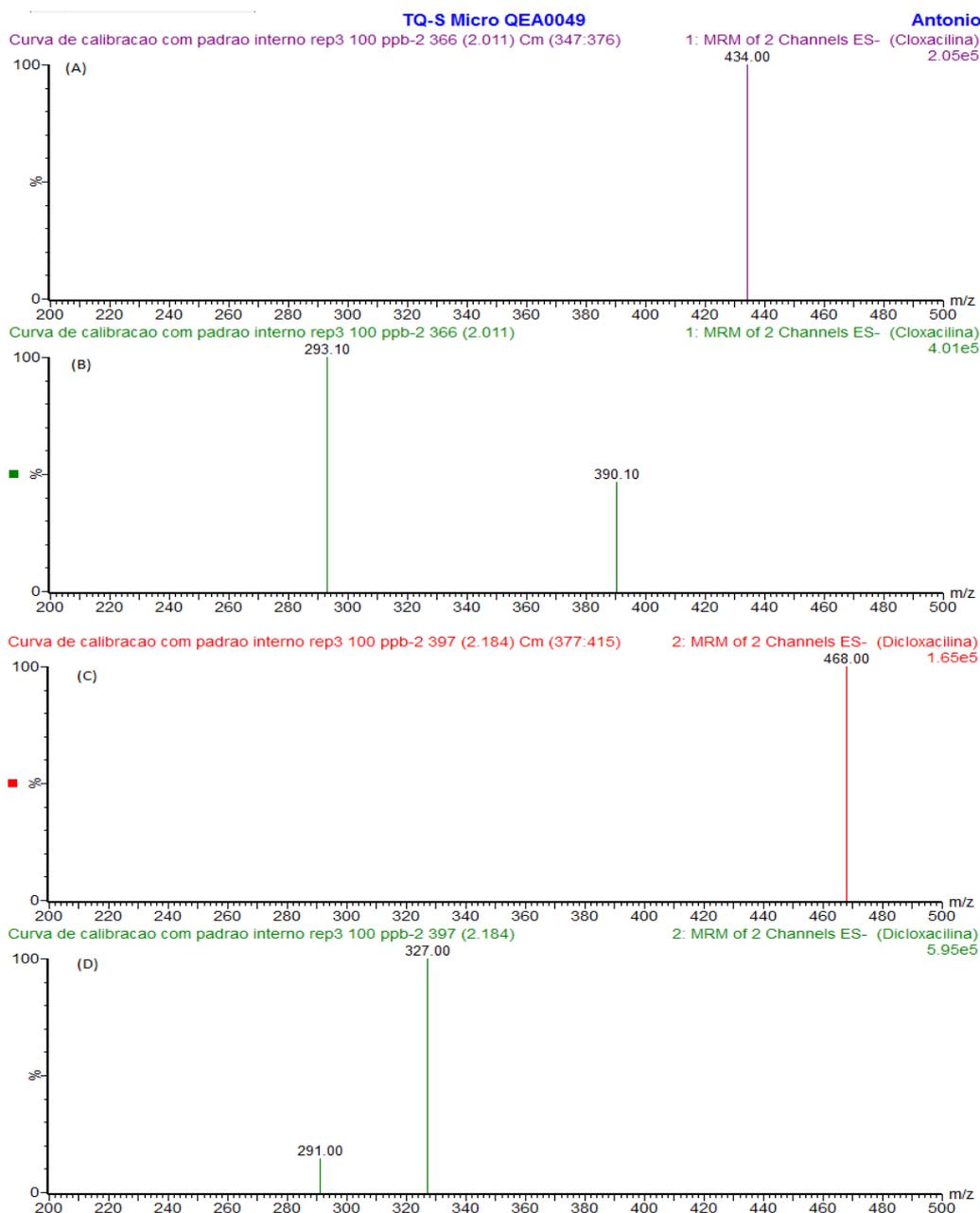


Figura 9: Resultados obtidos pelo monitoramento de reação múltiplas (MRM), da cloxacilina e dicloxacilina. (A) Íon precursor da cloxacilina; (B) Íon quantificador (293,1 m/z) e íon qualificador (390,1 m/z) da cloxacilina; (C) Íon precursor da dicloxacilina; (D) Íons fragmentos da dicloxacilina íon quantificador (327,0 m/z.) e íon qualificador (291,0 m/z).

Para a identificação da dicloxacilina, o íon precursor foi determinado em 468 m/z, o qual é compatível com a massa monoisotópica de 469 m/z da molécula, associado à perda de um próton. Quando a fragmentação foi monitorada por MRM, com uma energia de colisão de 8,0 V, identificou-se a produção do fragmento 327,0 m/z, representando a molécula original subtraída a perda do radical CO_2 e de um $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$. Na energia de colisão de 16,0 V,

houve a formação de fragmentos com 291,0 m/z , representando a saída do radical de HCl, de um CO_2 e de C_5H_7NO (WILFRIED *et al.*, 2017).

5.3. Parâmetros cromatográficos

Uma vez definidos os parâmetros espectrométricos, foram realizados os ajustes cromatográficos, partindo inicialmente da comparação de diferentes fases móveis, visando obter o menor tempo possível para a retenção da Cloxacilina, porém atentando para que este tempo não entrasse na faixa de volume morto.

As fases móveis que melhor se adequaram foram H_2O com 0,1% de ácido fórmico e metanol. Em seguida, iniciou-se a realização de um gradiente exploratório das fases móveis, para encontrar a melhor condição de para eluição da cloxacilina, para garantir tempo de retenção baixo e perfil cromatográfico adequado. Neste processo foram realizadas variações de fluxo da fase móvel (0,1-0,5 mL/min); de temperatura da coluna (30-60°C); de gradiente da fase móvel (100% H_2O 0,1% AF/ 0% MeOH – 0% H_2O 0,1% AF/ 100% MeOH); e de volume de injeção (1-5 μL). A melhor condição cromatográfica identificada está representada na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos utilizados para eluição da cloxacilina.

Parâmetros	Valores
Fluxo	0,3 mL/min
Temperatura da coluna	50 °C
Fase móvel (gradiente)	0,00 - 3,00 min: 50% H_2O 0,1% AF/ 50% MeOH 3,01 - 4,00 min: 1% H_2O 0,1% AF/ 99% MeOH 4,01 - 5,00 min: 50% H_2O 0,1% AF/ 50% MeOH
Volume de injeção	3,0 μL
Tempo de corrida	5,0 min

Nestas condições a cloxacilina apresentou um tempo de retenção de 2,01 minuto e o tempo total de intereluição de 5 minutos. Na figura 10, observa-se no cromatograma o tempo de retenção do íon precursor (434 m/z) no mesmo momento de retenção dos íons fragmentos (*i.e.* 293,1 m/z e 390,1 m/z), confirmando ser a cloxacilina.

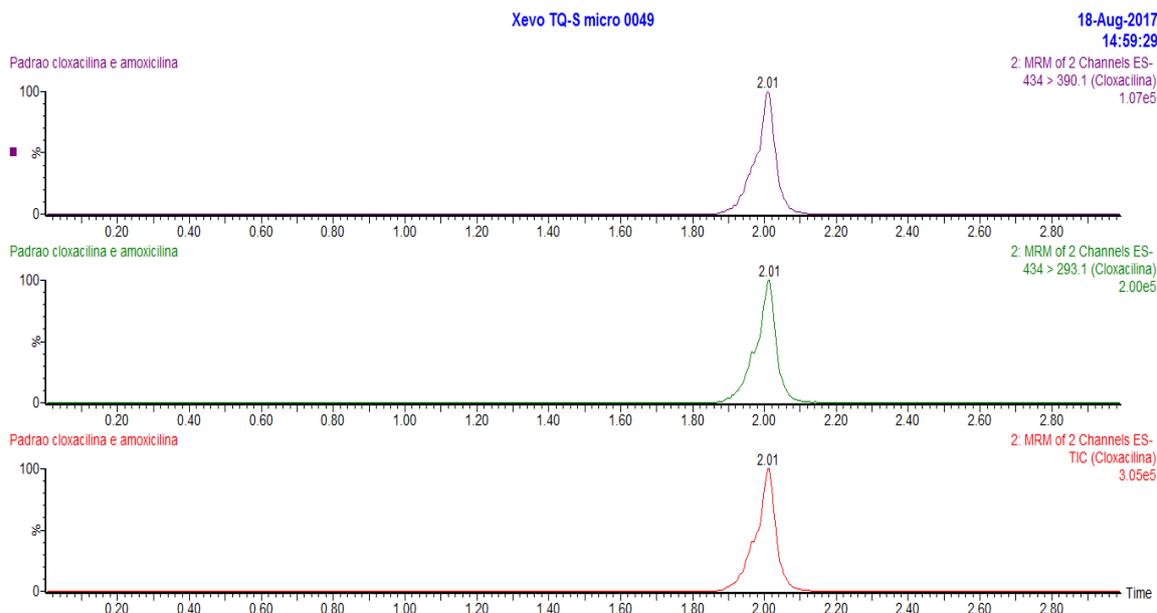


Figura 10: Perfil cromatográfico da Cloxacilina e cada um dos fragmentos monitorados por MRM.

Como a dicloxacilina foi utilizada como padrão interno para controle de qualidade analítica, os parâmetros cromatográficos empregados para sua identificação foram os mesmos da cloxacilina. Nestas condições, a dicloxacilina apresentou tempo de retenção de 2,18 minutos, evidenciado na figura 11 pelo cromatograma de seu ion precursor e fragmentos.

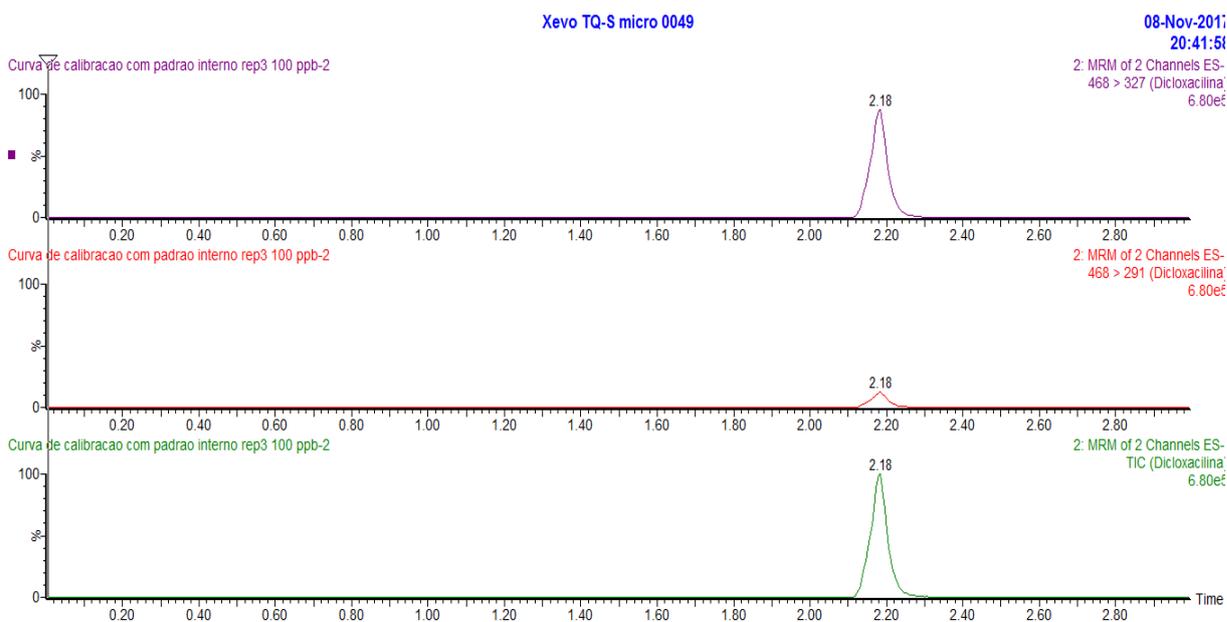


Figura 11: Perfil cromatográfico da dicloxacilina e cada um dos fragmentos monitorados por MRM.

Comparativamente, os tempos de retenção e de eluição obtidos neste trabalho foram maiores que os resultados prévios descritos por Da Silva (2016), cujo tempo de retenção da cloxacilina foi de 1,12 minutos enquanto que a eluição total foi de 3 minutos. Apesar do tempo de retenção obtido ter sido distinto, o gradiente de eluição foi mais simples. Adicionalmente, o método cromatográfico diferiu pelo uso de metanol em detrimento da acetonitrila, fato que pode ser vantajoso em relação à custo analítico, uma vez que, em geral o metanol é mais barato que a acetonitrila. Por outro lado, quando os tempos de retenção e de eluição total foram comparados com os valores apresentados por Tang e colaboradores (2012), conseguiu-se uma análise em menor tempo, uma vez que estes autores obtiveram tempo de retenção de 5,55 minutos e de eluição total de 10 minutos. Ito e colaboradores (2001) obtiveram valores semelhantes aos apresentados por Tang e colaboradores (2012), com tempo de retenção em 6,00 minutos e tempo total de eluição de 8,00 minutos. Quando a cloxacilina foi avaliada na matriz plasma bovino por Samanidou e colaboradores (2009) o tempo de retenção por HPLC foi de 21,83 minutos.

Assim, conclui-se que o método cromatográfico desenvolvido é rápido, simples e aplicável a rotinas analíticas.

5.4. Extração da Cloxacilina de plasma bovino

A extração líquido-líquido é amplamente utilizada para extração de medicamentos de uso veterinário em matrizes de origem animal, contudo dependendo do solvente utilizado outros coextrativos da matriz podem indesejavelmente ser arrastados para o extrato (Prestes et al., 2013). A determinação da matéria seca dos extratos é uma estratégia que pode ser utilizada para prever a coextração de compostos indesejáveis da matriz biológica, preservando, assim, a coluna cromatográfica e mitigando o risco de supressão iônica durante a análise espectrométrica.

Visando avaliar a coextração de possíveis interferentes, testou-se quatro soluções orgânicas para extrair a cloxacilina do plasma bovino (relação solvente/plasma 2:1 v/v), tabela 5.

Tabela 5: Massa de extratos secos de quatro processos de extração de plasma bovino fortificado com cloxacilina (relação 1:2 plasma;solvente).

Solvente:	Massa do tubo (g)	Massa do tubo+ extrato (g)	Massa do extrato (g)	Massa do tubo +Extrato seco (g)	Massa do Extrato seco (g)
Acetonitrila	5,4327	5,4513	0,0186	5,4367	0,0040
Acetonitrila/H₂O 9:1	5,4065	5,4779	0,0714	5,4125	0,0060
Metanol	5,3215	5,3664	0,0449	5,3320	0,0105
Metanol/Acetonitrila 1:1	5,4927	5,5251	0,0324	5,5029	0,0102

Tanto acetonitrila quanto o metanol promovem a precipitação das proteínas plasmáticas, auxiliando no processo de limpeza e extração do analito. O emprego da acetonitrila pura foi a forma de extração que apresentou menor arraste de componentes do plasma. A adição de 10% de água à fase orgânica (Acetonitrila/H₂O 9:1) aumentou em 50% o arraste de componentes do plasma, quando comparado com a acetonitrila pura. Ao se trabalhar com fases orgânicas de metanol e metanol/acetonitrila (1:1) observou-se um aumento no arraste de compostos plasmáticos cerca de 150%, em relação à acetonitrila pura. Estes resultados estão de acordo com o relato de Prestes e colaboradores (2013), no qual a acetonitrila produz extratos mais límpidos que que o metanol e o acetato de etila. Por sua vez, Jank e colaboradores (2012), comparam cinco procedimentos líquido-líquido para extrair cloxacilina da matriz leite. Neste, todos os procedimentos utilizaram como base a acetonitrila pura ou em combinação com clorofórmio ou água. A extração que se mostrou mais eficaz foi a de acetonitrila pura acoplada ao sistema de salting-out com NaCl.

Ao fazer as análises cromatográficas provenientes desses extratos descritos na tabela 5, identificou-se a retenção de interferentes, entre os ensaios de análise cromatográfica (Tabela 6). Nestas análises, foram obtidas relações sinal/ruído elevadas para todas as formas de extração, contudo, a presença de interferentes retidos entre as análises provocou baixa reprodutibilidade e deslocamento do tempo de retenção da cloxacilina entre as replicatas. A provável causa deste problema foi a saturação da coluna com algum interferente plasmático não identificado coextraído da matriz.

Tabela 6: Valores de área e sinal/ruído obtidos durante a comparação dos solventes de extração 1:2 plasma:solvente.

Extração	Área	SD±	Sinal/Ruído	SD±
ACN	16108,33333	1824	418348	279423,8
ACN +H2O 9:1	13485,33333	775,983462	1129782,333	1315891
MeOH	244434	12588,37098	1159456,667	395913,3
MeOH+ACN 50/50	192749,3333	8127,762382	1516215,667	596540,2

O pH da solução, a concentração de eletrólitos, e as propriedades da solução durante a formação da gota no eletrospray vão depender da composição do extrato (King et al., 1999). Por isso, durante a extração, variações na relação solvente/matriz podem interferir no resultado analítico (Jank et al., 2012), assim, para contornar a falta de reprodutibilidade supra relatada, alterou-se a proporção da relação fase plasma/orgânica de 1:2 v/v para 1:9 v/v, visando, sobretudo, obter uma extração com baixa concentração de interferentes de modo a não saturar a coluna. Nesta nova condição foram analisados apenas a extração com acetonitrila ou metanol puros (tabela 7).

Tabela 7: Valores de área e sinal/ruído obtidos durante a comparação dos solventes de extração 1:9 plasma:solvente

Extrações	Área	SD±	Sinal/Ruído	SD±
ACN	271,66	14,36	49670	62652
MeOH	274	4,35	5599	199,4

ACN= acetonitrila; MeOH= metanol

Nessa nova condição, ambos os extratos geraram áreas abaixo da curva semelhante, a extração em acetonitrila produziu relação sinal/ruído cerca de nove vezes superior à extração realizada com metanol. Todavia, o desvio padrão foi elevado, sugerindo a presença de interferentes na amostra. Observação que foi fortalecida após a manutenção dos extratos em geladeira a 4° C por 12 horas, quando se identificou a presença de picados apenas extração em acetonitrila. O efeito matriz pode ocorrer pela reação entre o analito e um dos constituintes da matriz durante o processo de ionização, resultando em espécies que podem tanto suprimir, quanto amplificar o sinal

resposta em um espectrômetro de massas, impactando negativamente na seletividade e sensibilidade da técnica de espectrometria de massas (FUREY et al., 2013).

O teste de supressão iônica foi realizado para assegurar a ausência de interferentes coextraídos no tempo de retenção do analito. Realizando a injeção direta no espectrômetro de uma solução contendo dicloxacilina (padrão interno) e cloxacilina concomitante a uma eluição cromatográfica de extrato de plasma bovino branco, avaliou-se a presença de regiões de supressão iônica nos cromatogramas das duas formas de extração (figura 12).

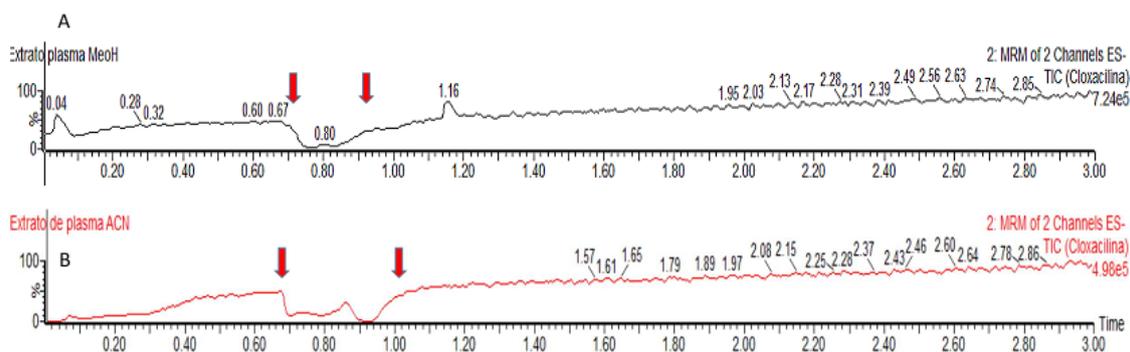


Figura 12: Cromatograma do teste de supressão iônica de extrato de plasma bovino realizado com metanol (A), e acetonitrila (B), ambos com cloxacilina e dicloxacilina. Espaço entre setas vermelhas representam as áreas de supressão.

Durante o teste de supressão iônica com o extrato metanólico de plasma bovino, observou-se uma zona de supressão entre os tempos de 0,7 e 0,92 min (região ente setas vermelhas figura 12.A). Por sua vez, na extração com acetonitrila observou-se uma região de supressão de 0,68 e 1,04 min, apresentando uma zona de supressão mais proeminente e extensa (região ente setas vermelhas figura 12.A). De uma forma geral, ambas as formas de extração apresentaram regiões de supressão, contudo, fora dos tempos de retenção da cloxacilina e dicloxacilina, respectivamente em 2,01 e 2,18 minutos.

Nesse contexto, considerando a maior uniformidade da área cromatográfica e a relação sinal/ruído, com seus respectivos valores de desvio padrão, bem como a menor região de supressão iônica, considerou-se a extração realizada com plasma:metanol na proporção 1:9 (v/v) como o método mais adequado para extrair a cloxacilina do plasma bovino.

5.5. Validação do método analítico

5.5.1. Seletividade

De uma forma geral, interferências da matriz promovem alterações no tempo de retenção, bem como no perfil cromatográfico do fármaco. Assim, a legislação (MAPA, 2011) recomenda que a seletividade do procedimento analítico deve “ser realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz, do extrato/digerido da matriz fortificada e do analito puro em solvente”.

Nesse sentido, o teste de supressão iônica realizado, demonstrou que nenhum componente do extrato promove supressão ou intensificação de sinal no tempo de retenção da cloxacilina (figura 12 A).

Adicionalmente, a seletividade também foi avaliada: I) pela comparação dos cromatogramas da cloxacilina em solução e pela cloxacilina extraída da matriz plasma bovino conforme mostrado na figura 13; II) pela comparação do sinal do plasma branco com o sinal do analito de interesse na mesma matriz, considerando que este seja pelo menos 30% maior que o sinal do plasma branco no menor nível de concentração, figura 14 (MAPA, 2011).

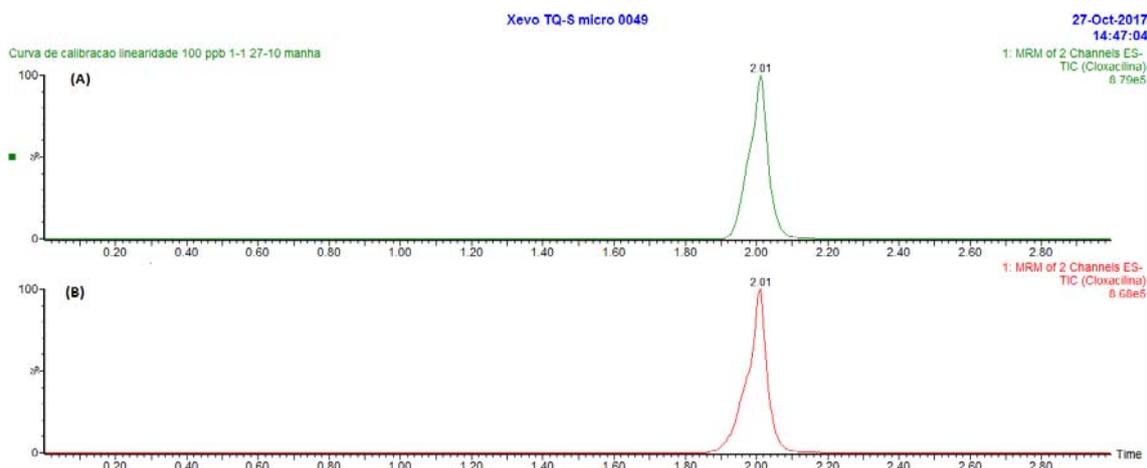


Figura 13: Comparação dos cromatogramas na matriz plasma bovino (A) e na solução de cloxacilina (B) na concentração de 100 ng/mL.

Ao se avaliar em concentração constante, não houve diferença nos cromatogramas de cloxacilina em solução, quando comparado ao cromatograma de cloxacilina em plasma bovino fortificado.

No caso da comparação de intensidade de sinal (figura 14), pode-se verificar que o sinal de cloxacilina na menor concentração da curva (1ng/mL, apresentado adiante) foi 6,5 vezes maior ($1,01 \times 10^4$) que o sinal do plasma branco sem fortificação ($1,55 \times 10^3$), indicando a capacidade do método analítico diferenciar a cloxacilina dos possíveis coextratores do plasma bovino.

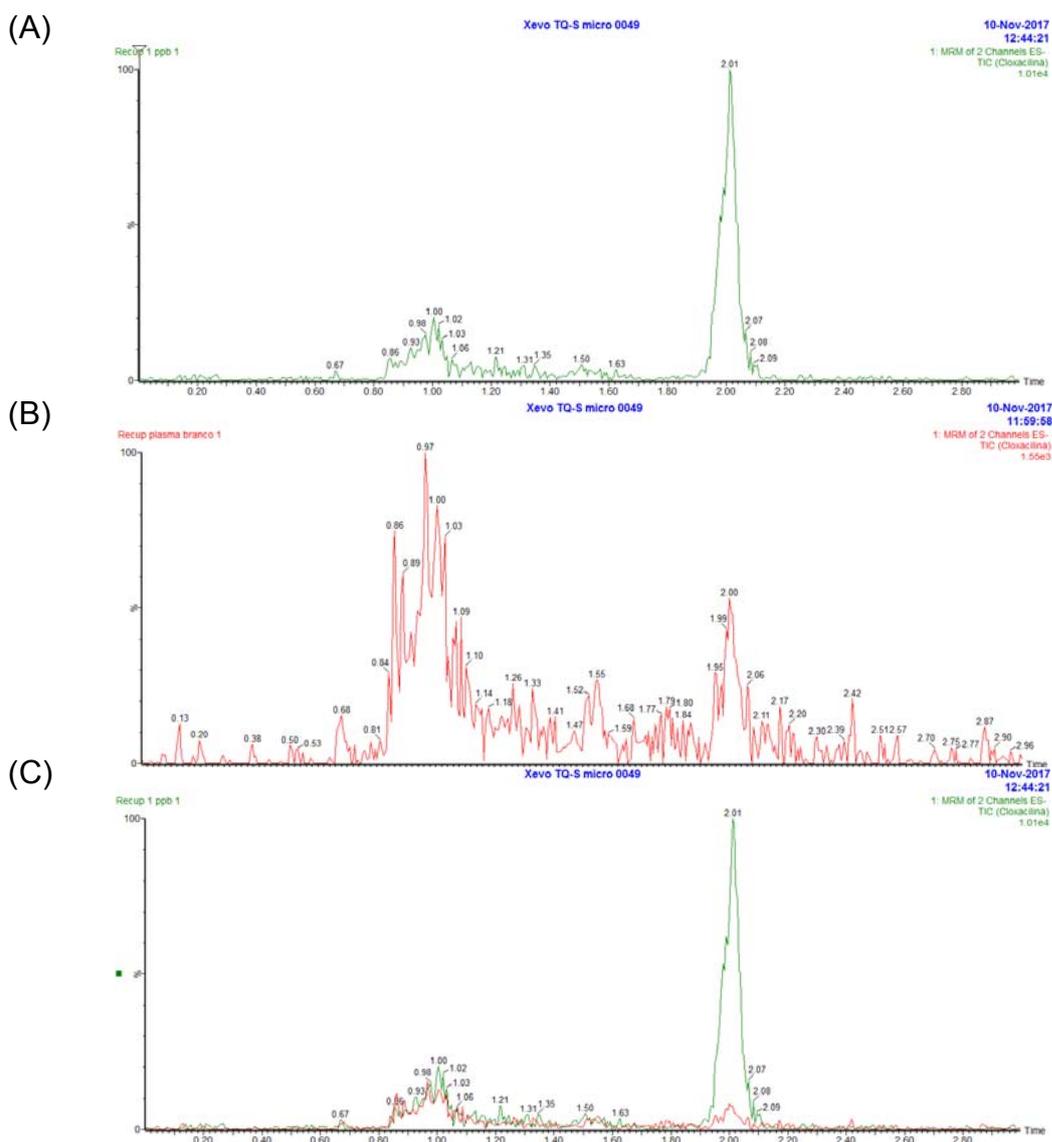


Figura 14: Comparação das intensidades de sinal dos cromatogramas de plasma branco, quando comparados ao menor nível de concentração de plasma com cloxacilina. (A) Cromatograma do plasma branco, (B) Cromatograma de cloxacilina na concentração de 1 ng/mL, e (C) os cromatogramas de cloxacilina e plasma branco sobrepostos.

Neste contexto, o método analítico desenvolvido foi seletivo.

5.5.2. Linearidade

A avaliação da linearidade de um método analítico deve ser realizada a partir do preparo de curvas de calibração em três dias consecutivos visando obter um coeficiente de colinearidade superior a $R^2=0,995$ em cada um dos dias (MAPA, 2011).

As concentrações utilizadas para o preparo da curva de calibração foram de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL, respectivamente. Suas áreas cromatográficas e seus respectivos desvios padrões nos três dias de análise estão descritas na tabela 08.

Tabela 8: Valores de área abaixo da curva para cloxacilina em plasma bovino nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/ml, para construir a curva de calibração em três dias consecutivos

Concentração (ng/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Área \pm DP	Área \pm DP	Área \pm DP
1	465,16 \pm 148,17	336,333 \pm 62,35	388,16 \pm 6,89
10	3639,83 \pm 71,97	3375,83 \pm 103,81	3473,83 \pm 49,19
25	9313,33 \pm 207,19	8540,33 \pm 48,81	8228,83 \pm 112,33
50	18166,67 \pm 541,43	17593,33 \pm 176,86	16911,5 \pm 630,30
75	27853,83 \pm 520,63	26888,33 \pm 311,99	25456,67 \pm 276,37
100	36326,67 \pm 511,70	35459,67 \pm 295,44	34038,67 \pm 328,79

*DP = desvio Padrão

Para avaliar a normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov (MAPA, 2011), os quais apresentaram distribuição normal para o nível de 5% de significância em todos os dias (anexo 2), com valores de 0,158; 0,112; e 0,115 para os dias 1, 2 e 3, respectivamente. Nesta condição, no caso de valores acima de 0,05, aceita-se a hipótese nula onde os valores apresentam distribuição normal (RAZALI E WAH, 2011).

A cedasticidade dos dados de cada nível de concentração foi determinada pelo teste de Levene. Nos dias que as análises foram realizadas foi encontrada uma distribuição de dados heterocedástica ao nível de 5% de significância (anexo 2), com valores de 0,000; 0,001; e 0,000 respectivamente para os dias 1, 2 e 3. Estes dados corroboram com a hipótese alternativa, em função dos valores obtidos estarem abaixo de 0,05 (MAPA, 2011).

A presença de dados discrepantes foi avaliada pelo teste de D-Cook e, nenhum dos dias avaliados apresentou discrepância (anexo 2), uma vez que todos os valores mínimos e máximos foram inferiores a 1,00 (FIELD, 2009). Os dias 1, 2 e 3 apresentaram, respectivamente, valores mínimos e máximos de 0,00 - 0,264; 0,000 - 0,307; e 0,000 - 0,196.

Uma vez determinados que dados relativos às análises realizadas nos dias 1, 2 e 3, apresentaram distribuição normal, heterocedástica e com ausência de dados discrepantes, determinou-se o coeficiente de colinearidade para os três dias.

Os dados das análises feitas no primeiro dia tiveram um coeficiente de colinearidade de $R^2 = 0,999$, com coeficiente angular da reta de 364,758 e coeficiente linear de 93,9388 (Figura 15) considerados como adequados demonstrando um caráter linear.

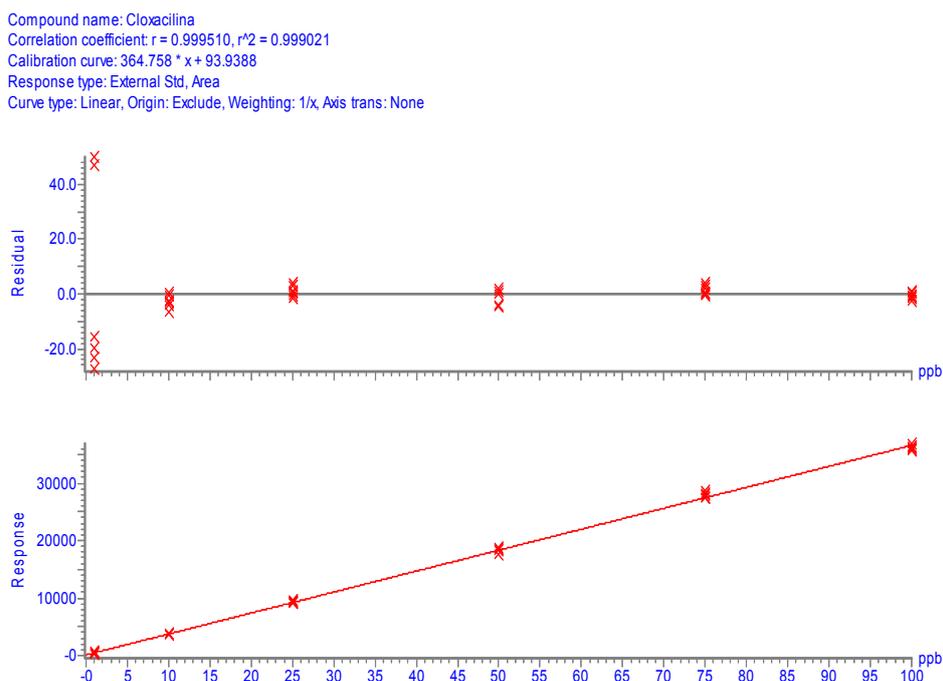


Figura 15: Coeficiente de colinearidade obtidos a partir da curva de calibração referente ao dia 1.

Por sua vez, os dados obtidos no segundo dia apresentaram coeficiente de colinearidade de $R^2 = 0,999$, com coeficiente angular de 354,101 e coeficiente linear de -37,271 (figura 16).

Compound name: Cloxacilina
 Correlation coefficient: $r = 0.999767$, $r^2 = 0.999534$
 Calibration curve: $354.101 * x + -37.271$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

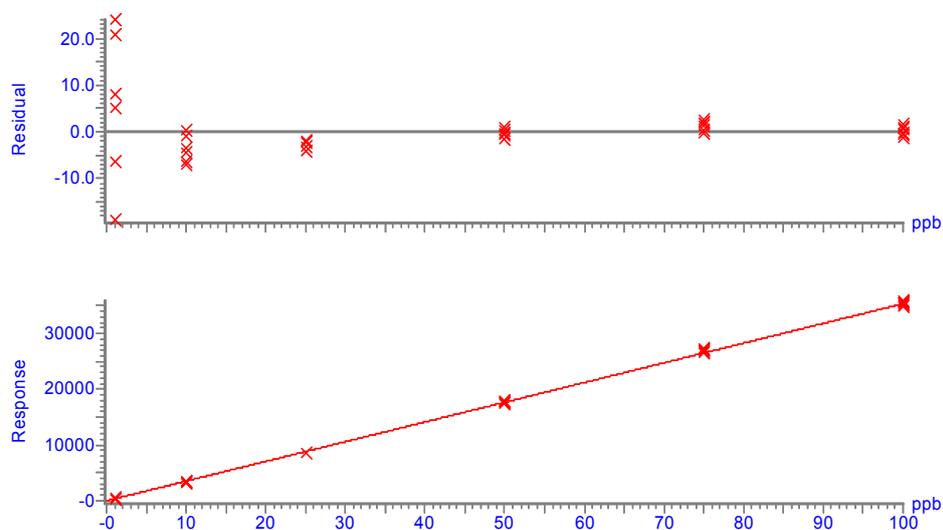


Figura 16: Coeficiente de colinearidade obtidos a partir da curva de calibração referente ao dia 2.

Por fim os dados obtidos no terceiro dia de análise apresentaram coeficiente de colinearidade de $R^2 = 0,999$, com coeficiente angular de 338,007 e coeficiente linear de 46,338 (figura 17).

Compound name: Cloxacilina
 Correlation coefficient: $r = 0.999776$, $r^2 = 0.999552$
 Calibration curve: $338.007 * x + 46.3386$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

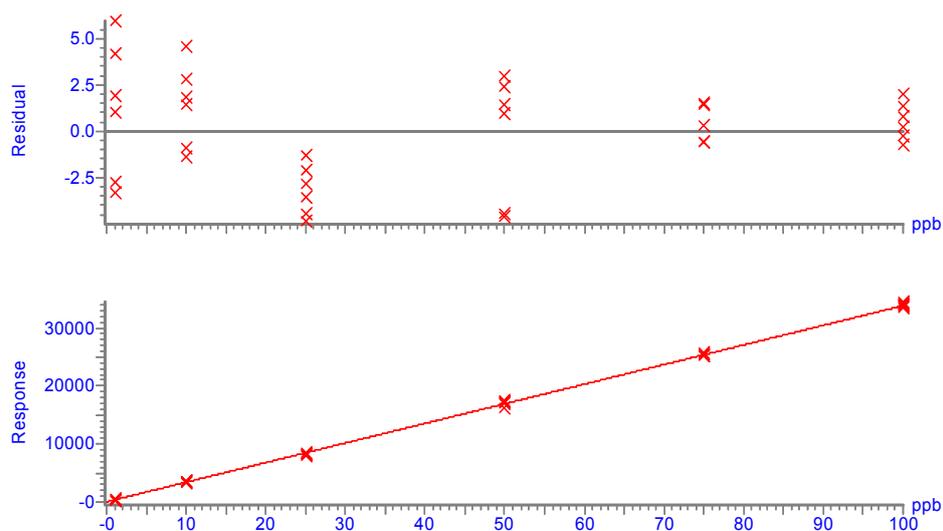


Figura 17: Coeficiente de colinearidade obtidos a partir da curva de calibração referente ao dia 3.

Baseado nos dados apresentados, o método analítico apresentou comportamento linear durante os três dias consecutivos de análise.

5.5.3. Precisão e exatidão

A precisão intradia, interdia e exatidão foram determinadas nos níveis de concentração 1; 50; 100 ng/mL. Na precisão intradia, os resultados apresentaram média de valor de área de $456,33 \pm 99,00$ para o nível de concentração de 1 ng/mL e coeficiente de variação de 21,75%. No nível de concentração de 50 ng/mL, a média de valor de área foi de $17866,33 \pm 674,10$ e o coeficiente de variação de 3,77%. No último nível de concentração, 100 ng/mL, a média do valor da área encontrado foi de $36367,16 \pm 1139,84$ e o coeficiente de variação encontrado foi 3,13%. Segundo critérios de aceitação da norma (MAPA, 2011), dentro faixa de concentração ≥ 1 ng/mL < 10 ng/mL, para a avaliação da precisão intradia aceita-se um coeficiente de variação máximo de 25%. Neste caso, o método apresentou conformidade para o parâmetro precisão intradia.

A determinação da precisão interdia foi realizada com intervalos de 24 horas entre as análises. A média das áreas encontradas para o nível de concentração de 1 ng/mL foi de $346,00 \pm 99,0$ e o coeficiente de variação de 28,6 %. Na concentração de 50 ng/mL, a média das áreas encontradas foi de $17069,34 \pm 919,621$ e o coeficiente de variação encontrado foi de 5,38 %. Por sua vez, a média das áreas encontradas para o nível de concentração de 100 ng/mL foi de $34527,72 \pm 1891,98$ e o coeficiente de variação de 5,49%. Dentro desta faixa de trabalhos, o coeficiente de variação máximo interdia permitido pela legislação brasileira é de 32% (MAPA, 2011), portanto o método também apresentou conformidade para o parâmetro precisão interdia.

No quesito exatidão, também chamado de veracidade, os valores encontrados no ensaio estão em conformidade com as faixas de erro padrão relativo aceitável para os níveis de concentração analisados. De acordo com o MAPA (2011), na faixa de concentração variando entre 1 e 10 ng/mL e entre 10 e 100 ng/mL os intervalos aceitos de erro padrão relativo são, respectivamente, de 60 a 120% e 70 e 110%. O erro padrão relativo encontrado para o nível de

concentração de 1 ng/mL foi de 81,28%, para o nível de concentração de 50 ng/mL foi de 83,38% e para o nível de concentração de 100 ng/mL foi de 86,59%.

Neste contexto, o método é preciso e exato.

5.5.4. Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e de quantificação de um método analítico são, respectivamente, a menor quantidade que um analito pode ser identificado e quantificado em amostra biológica. Baseado no ICH (1996), o limite de quantificação é definido como 10 vezes a relação sinal/ruído do equipamento e o limite de detecção 3 vezes a relação sinal/ruído (MAPA, 2011). Foi definido como limite de quantificação (LOQ) o valor de 0,5 ng/mL, com relação de sinal ruído de 58,45, enquanto o limite de detecção (LOD) obtido foi de 0,05 ng/mL, com relação de sinal ruído de 7,461.

Não foi encontrado na literatura método validado para quantificar a cloxacilina em plasma bovino por LC-MS/MS. Para esta matriz biológica Samanidou e colaboradores (2009) desenvolveram e validaram um método para quantificação da cloxacilina por HPLC acoplado a um detector do tipo PDA, contudo o LOQ foi duzentas vezes mais sensível e o LOD sessenta vezes, respectivamente, 10 e 3 ng/mL, diferença esta que pode ser atribuída ao processo de extração (SPE) e tipo de detector. Por sua vez, em soro bovino, uma matriz muito semelhante ao plasma, Daigneault e colaboradores (1990) quantificaram a cloxacilina até o limite de 3,2 µg/mL, contudo o método descrito não estava validado. Em plasma da espécie humana, Larmené-Beld e colaboradores (2013), fazendo uso de um LC-MS/MS, conseguiram um LOQ de 0,1mg/mL para a cloxacilina, em uma análise simultânea de cloxacilina e flucloxacilina.

Considerando a matriz leite bovino, Da Silva (2016) conseguiu limite de quantificação (LOQ) da mesma formulação na matriz leite de 1 ng/mL. A diferença de sensibilidade obtida por Da Silva, possivelmente se deve ao fato da matriz leite ser mais complexa, com tipos distintos e concentrações mais elevadas de proteínas, carboidratos e gordura. Por sua vez, García et al. (2015) conseguiu um LOQ para quantificação de β-lactâmicos em leite de 2

ng/mL para este grupo de fármacos, demonstrando uma sensibilidade maior que o valor supracitado. Neste trabalho, os autores desenvolveram um método multirresíduo, portanto ele pode não ter sido otimizado para a cloxacilina. Adicionalmente, métodos multirresíduos podem apresentar perda de sensibilidade do método, uma vez que a velocidade de aquisição de dados do equipamento pode estar diminuída para atender todos os fármacos, por consequência ocorre aumento do valor de LOQ (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Neste contexto, o método é altamente sensível.

5.5.5. Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada com o uso de extratos obtidos a partir de plasma fortificado com NC nas concentrações de 1 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, mediante alterações de volume de injeção (2,9 µL; 3,0 µL; 3,1 µL) (tabela 9) e de temperatura da coluna (49 °C; 50 °C; 51 °C) (tabela 10). Considerou-se para a determinação da robustez, se as variações efetuadas interferiram no tempo de retenção da cloxacilina, no formato do sinal cromatográfico ou na área abaixo da curva das concentrações.

As variações nos parâmetros analíticos estudados não alteraram o tempo de retenção da cloxacilina (2,01 minutos), assim como não promoveram alterações no perfil cromatográfico (figura 18).

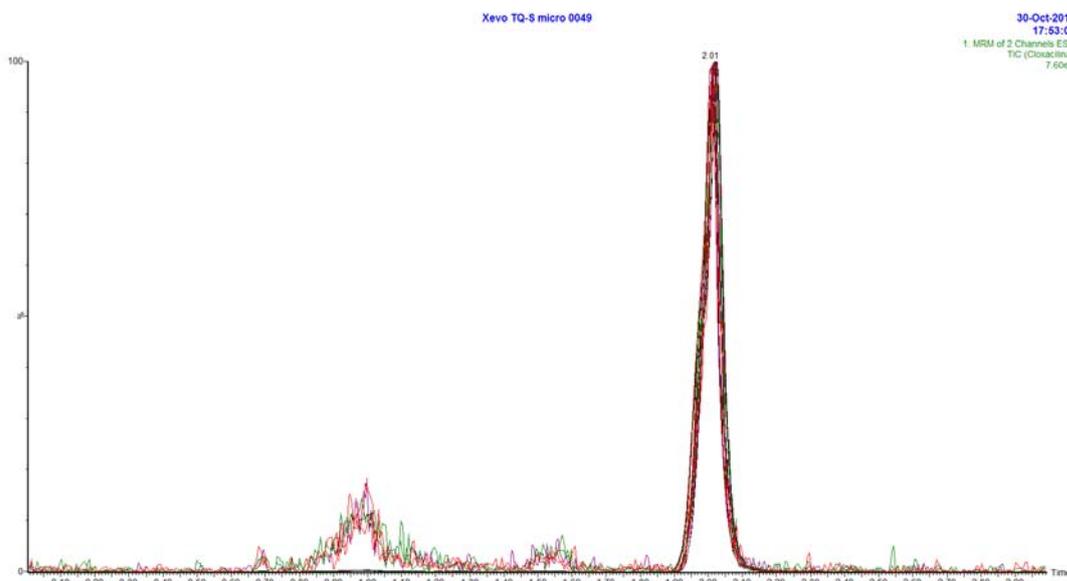


Figura 18: Gráfico de sobreposição dos cromatogramas para avaliação de robustez do método analítico

No que tange área abaixo das curvas, quando submetidas ao teste F, não foi identificada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os valores das diferentes concentrações analisadas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Estudo de robustez: áreas abaixo da curva de cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino as concentrações 1 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, seguindo distintos volumes de injeção de análise (2,9; 3; e 3,1 μ L).

Concentração (ng/mL)	Área 2,9 μ L \pm DP	Área 3,0 μ L \pm DP	Área 3,1 μ L \pm DP
1	336,0 \pm 18,38	340,5 \pm 9,19	355,5 \pm 6,36
50	15482,5 \pm 607,4	16009,0 \pm 298,39	16416,5 \pm 464,56
100	31681,0 \pm 337,99	32796,0 \pm 200,81	33699,5 \pm 38,89

*DP: desvio padrão

Tabela 10: Estudo de robustez: áreas abaixo da curva de cloxacilina nanoencapsulada em plasma bovino as concentrações 1 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, seguindo distintas temperaturas da coluna (49; 50; e 51° C).

Concentração (ng/mL)	Área 49 °C \pm DP	Área 50 °C \pm DP	Área 51 °C \pm DP
1	338,0 \pm 29,69	341,0 \pm 9,89	346,5 \pm 0,70
50	16152,5 \pm 689,42	16137,5 \pm 570,63	16122,0 \pm 497,80
100	33000,5 \pm 333,04	33137,0 \pm 582,65	32535,0 \pm 398,80

*DP: desvio padrão

Portanto, o método analítico pode ser definido, de acordo com a legislação vigente (MAPA, 2011), como robusto em relação a pequenas e deliberadas alterações de volume de injeção e temperatura.

5.6. Aplicação do método analítico em amostras de campo

Para demonstrar a aplicabilidade do método analítico, a absorção de mucosa do fármaco foi avaliada em 6 bovinos saudáveis, estágio precedente ao estudo de farmacocinética. Para tanto, os animais foram tratados com uma dose de 9,72 mg de cloxacilina nanoestruturada (figura 19), na forma de colírio, e o plasma coletado em períodos pré-definidos.



Figura 19: Foto representativa da administração tópica de cloxacilina nanoestruturada mucoadesiva na dosagem de 4,86 mg/mL em cada globo ocular.

Foram detectados cloxacilina no plasma de três animais, seis horas após a aplicação do medicamento (tabela 11), todas elas em concentrações muito próximas do limite de quantificação (0,5 e 0,6 ng/mL).

Tabela 11: Concentração plasmática de cloxacilina em bovinos tratados com 9,72 mg/mL de cloxacilina nanoestruturada mucoadesiva pela via ocular.

Animal	Concentração de cloxacilina ng/mL													
	0h	0,5h	1h	1,5h	2h	4h	6h	12h	18h	24h	36h	48h	72h	96h
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,6	ND						
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,6	ND						
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,5	ND						
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND= Não detectado

Baseado nos resultados de concentração plasmática, estimou-se que o pico de absorção do fármaco pela via tópica ocular ocorreu entre 4 e 12 horas após a aplicação do medicamento. A não identificação da cloxacilina em todos os animais pode estar relacionada à meia vida plasmática deste fármaco e a variações genéticas individuais. De uma forma geral, em animais, a cloxacilina apresenta meia vida plasmática curta, sendo 25, 75, 29 e 40 minutos, respectivamente, para gatos, cachorros, suínos e ovinos (LASHEV e DIMITROVA, 2008) e em bovinos de $19,5 \pm 12$ minutos (DAIGNEAULT *et al.*, 1990). Considerando, também, que a absorção de um medicamento em animais sofre influência de variações fisiológicas e genéticas (MARTINEZ e MODRIC, 2009; TOUTAIN *et al.*, 2010), o pico de concentração plasmática pode ter variado entre os seis animais estudados. Levando-se em conta o intervalo de coleta de sangue (4 e 6 horas) e a meia vida plasmática relativamente curta da cloxacilina para bovinos, alguns animais (i.e. 3, 5 e 6) podem ter absorvido o fármaco em concentrações abaixo do LOD (0,05 ng/mL) ou absorvido o fármaco em quantidade superior e este ter sido metabolizado e não detectado no momento de coleta de sangue.

Estudos prévios conduzidos por Daigneault e colaboradores (1990) para avaliar a absorção ocular de cloxacilina pela via tópica em bovinos não identificaram a absorção de cloxacilina. Contudo, o método analítico empregado pelos autores apresentava limite de quantificação numericamente maior (3,2 µg/mL) aos apresentados pela técnica aqui desenvolvida (0,5 ng/mL). Por outro lado, a dose aplicada por Daigneault e colaboradores, foi de

375 mg/animal de 170 kg de peso vivo em veículo oleoso, estratégia frequentemente utilizada para aumentar a retenção de antibiótico no globo ocular em bovinos (MCCONNEL et al., 2007), enquanto que a dose nesse experimento foi de 9,72 mg/animal de 450 kg de peso vivo em veículo aquoso contendo nanopartículas mucoadesivas para reter o fármaco na superfície ocular. As diferenças em formulações farmacêuticas podem modificar a absorção de fármacos (BORBÁS et al., 2018). Neste caso, a mucoadesividade das nanopartículas empregadas neste experimento foi conseguida com o uso de quitosana. Especificamente, este polímero pode se ligar a receptores de mucosa e relaxar as junções firmes, promovendo sua translocação via paracelular da nanopartícula (SONAJE et al., 2011). Neste contexto, as divergências de absorção da cloxacilina encontradas entre os resultados apresentados por Daigneault e colaboradores (1990) e os do presente experimento podem ser explicadas pelas diferenças de sensibilidade de método analítico, dose de fármaco e variações da formulação farmacêutica.

6. Conclusão

O presente trabalho permitiu o desenvolvimento de um método analítico sensível, seletivo e reprodutível para a identificação da cloxacilina em plasma bovino. Conseguiu-se ainda otimizar o método de separação da cloxacilina benzatínica para um tempo total de corrida de 5 minutos. Adicionalmente, o método analítico foi validado de acordo com as normativas previstas pelo ICH e pelo MAPA. Este método apresentou alta sensibilidade, com limite de quantificação de cloxacilina da ordem de de 0,5 ng/mL e de detecção de 0,5 ng/mL.

Foi possível ainda avaliar a absorção da cloxacilina presente em uma formulação nanoencapsulada, quando administrada por via tópica ocular em bovinos saudáveis. Baseado nos resultados *in vivo*, estimou-se que o pico máximo de absorção do fármaco pela via tópica ocular ocorreu entre 4 e 12 horas após a aplicação do medicamento. Contudo, para estudos farmacocinéticos futuros, ajustes nos tempos de coleta de sangue ainda serão necessários.

Neste contexto, o método analítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos clínicos, estudos de farmacocinética e para dar suporte ao registro da formulação farmacêutica junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

7. Referências

ALEXANDER, D. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review of cases in clinical practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n.3, p.487-503, 2010.

ANGELOS, J. A. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye). **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 61-79, 2015 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.11.006> Acesso em: 05 de novembro de 2016

BAPTISTA, P.J.H.P. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **British Veterinary Journal**, v.135, p.225-242, 1979.

BARKEMA, H.W.; VON KEYSERLINGK, M.A.G; KASTELIC, J.P.; LAM, T.J.G.M; LUBY, C.; ROT, J.-P.; LEBRANCK, S.J.;KEEFE, G.P.; KELTON, D.F. Invited review: changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-20, 2015.

BHOSALE, U.V.; DEVI, V.K.; JAIN, N. Formulation and Optimization Mucoadhesive Nanodrug delivery system of Acyclovir **J Young Pharmacists** v.3, n. 273 , p.275-283, 2011

BOESL, U.. Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. **Mass Spec Rev**, v. 36, n. 1, p. 86–109, 2017.

BORBÁS, E.; NAGY, Z.K.; NAGY, B.; BALOGH, A.; FARKAS, B.; TSINMAN, O.; TSINMAN, K.; SINKÓ, B.. The effect of formulation additives on in vitro dissolution-absorption profile and in vivo bioavailability of telmisartan from brand and generic formulations, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 310-317, 2018

BROWN, M.H.; BRIGHTMAN, A.H.; FENWICK, B.W.; RIDER, M.A.; Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine.**, v. 12, p.259–266, 1998.

CABRERA, L.; MARTINS, M.; PRIMEL, E.; PRESTES, O.; ADAIME, M.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v. 4, n. 3, p. 227-240., 2012.

CALDERON, A. J.; MUZYKANTOV, V.; MURO, S.; ECKMANN, D. M. Flow dynamics, binding and detachment of spherical carriers targeted to ICAM-1 on endothelial cells. **Biorheology**, v. 46, n. 4, p. 323-341, 2009.

CASTANHEIRA, R.G. **Nanopartículas Bioadesivas para administração intramamária: desenvolvimento, caracterização físico-química, cinética de liberação e avaliação biológica ex vivo**, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. 156 f., 2012.

CHANDLER, R.L.; BAPTISTA, P.J.H.P.; TURFREY, B. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.89, n.3, p.441-448, 1979.

CHATURVEDI, M.; KUMAR M.; PATHAK, K.. A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. **J Adv Pharm Tech Res** n.2. p.215-22., 2011

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008

CHO, E.J.; HOLBACK, H.; LIU, K.C.; ABOUELMAGD, S.A. PARK, J.; YEO, Y. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 452p., 2006.

CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 778-787, 2003.

COSTA, A.C.S.; BRANDÃO, H. M.; DA SILVA, S. R.; BENTES-SOUSA, A.R.; DINIZ JR, J. A. P.; PINHEIRO, J.J.V.; DE MELO F. C.; SILVA JR, J.O.C., MATOS, E.R.; RIBEIRO-COSTA, R.M. Mucoadhesive nanoparticles: a new perspective for fish drug application **Journal of Fish Diseases** v.39 p.503-506, 2016.

COSTA, J., SILVA, N.C., SARMENTO, B.; PINTADO, M. . **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v. 34 n. 6 p. 1255-1262, 2015.

DA SILVA, S.R. **Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia para Quantificação de Cloxacilina Nanoencapsulada em Leite por UPLC-MS/MS** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. 89 f., 2016.

DE OLIVEIRA, L. G.; KURZ, M.H.S.; GONÇALVES, F.F.; BARRETO, F.; RÜBENSAM, G.; HOFF, R.; Desenvolvimento de procedimento de extração para análise de sedativos e B-bloqueadores em rim suíno. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 8, p. 1342-1350, 2014. Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422014000800014&lng=en&nr m=iso>. Acesso em 05 Ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140185>.

DAIGNEAULT, J.; GEORGE, L. W.; BAGGOT, J. D. Ocular and serum disposition kinetics of cloxacillin after topical administration of benzathine cloxacillin and intravenous administration of sodium cloxacillin to calves. **Am J Vet Res.**, v. 51, n. 3, p. 381-5, 1990.

DANAFAR H, HAMIDI M. LC-MS Method for Studying the Pharmacokinetics and Bioequivalence of Clonidine Hydrochloride in Healthy Male Volunteers. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology** v.8, n.2, p.91-98, 2016

DUXFIELD, L.; SULTANA, R.; WANG, R.; ENGLEBRETSSEN, V.; DEO, S.; SWIFT, S.; RUPENTHAL, I.; AL-KASSAS, R. Development of gatifloxacin-loaded cationic polymeric nanoparticles for ocular drug delivery. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 21, n. 2, p. 172-179, 2016.

EL-ANEED, A., COHEN, A., BANOUB J.. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews** v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009

FARN, J.L.; STRUGNELL, R.A.; HOYNE, P.A.; MICHALSKI, W.P.; TENNENT, J.M. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.22, p.6717-6720, 2001.

FDA. Food and Drug Administration, Guidance for Industry – **Bioanalytical method validation**, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>. Acessado em: 24 de julho de 2017.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Química Nova*. Sociedade Brasileira de Química, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/25348>> Acessado em 23 de julho de 2017.

FIELD, A. **Descobrimos a estatística usando o SPSS**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 688p, 2009.

FLORENCE, A. T. & ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3. ed. São Paulo: Edusp, 2003.

FUNK, L.; O'CONNOR, A.M.; MARONEY, M.; ENGELKEN, T., COOPER, V.L.; KINYON, J.; PLUMMER, P. A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivis (IBK) in beef calves. **Vaccine**, v. 27, n.34, p. 4585–4590, 2009.

FUREY, A.; MORIARTY, M.; BANE V.; KINSELLA, B.; LEHANE, M. Ion Suppression; A Critical Review on Causes, Evaluation, Prevention and Applications, **Talanta**, v.115, p. 104-122, 2013.

GARCÍA, N.D.; JUNZA, A.; GÓMEZ, A.Z.; BARRÓN, D.; NAVALÓN, A. Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 13, 2015.

GAVA, C. M.; BERMUDEZ, J. A. Z.; PEPE, V. L. E. Novos medicamentos registrados no Brasil: podem ser considerados como avanço terapêutico? **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 3403-3412, 2010

GENTILLI, A; PERRET, D.; MARCHESI, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 704-733, 2005.

HAN, R.W.; ZHENG, N.; YU, Z.N.; WANG, J.; XU, X.M.; QU, X.Y.; LI, S.L.; ZHANG, Y.D.; WANG, J.Q. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 181, p. 119-126, 2015.

HARVEY, D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, Boston, 2000.

HAMOR, R.E.; WHELAN, N.C. - Equine infectious keratitis. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 15, n. 3, p. 623-46, 1999.

HESS, M. JONES, R. G *et al.* **Terminology Of Polymers Containing Ionizable Or Ionic Groups And Of Polymers Containing Ions.** *Pure and Applied Chemistry*, v. 78, n. 11, p.2067–2074, 2006.

HIRD, S.J.; LAU, B.P-Y.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 59-72, 2014.

HO, C.S.; LAM, C.W.K.; CHAN, M.H.M.; CHEUNG, R.C.K.; LAW, L.K.; LIT, L.C.W.; NG, K.F.; SUEN, M.W.M.; TAI, H.L.. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: **Principles and Clinical Applications**. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 24, n. 1, p. 3-12, 2003

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3 ed. Inglaterra, John Wiley e Sons, p. 502, 2007.

ICH. Validation of Analytical Procedures: text and methodology. **International Conference of Harmonization**, 1996. Disponível em: www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html. Acesso em: 24 de julho de 2016.

ITO, Y.; IKAI, Y.; OKA, H.; MATSUMOTO, H.; MIYAZAKI, Y.; TAKEBA, K.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis IV. Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine tissues by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 991, p. 217-223, 2001.

JANK, L.; MARTINS, M.T.; ARSAND, J.B.; MOTTA, M.C.; HOFF, R.B.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T.M. High-throughput method of macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tadem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). **Talanta**, v. 114, n. 1, p. 686-695, 2015.

JANK, L.; HOFF, R.B.; TAROUCO, T.C.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T.M.; β -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid–liquid extraction method, *Food Additives & Contaminants:Part A*, v. 29, n.4, p. 497-507, 2012

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization". **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 11, n. 11, p. 942–950., 2000.

KINSELLA, B., O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DAHANEY, A.; Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A** v.1216, n.46, p. 7977-8015, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.005>

LALLEMAND, F., DAULL, P., BENITA, S., BUGGAGE, R., e GARRIGUE, J.S. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 1-16, 2012.

LARMENÉ-BELD, K.; VRIES-KOENJER, M.T.L.M.; HORST, P.; HOSPES, W. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of flucloxacillin and cloxacillin in microdialysis samples. **Biomedical Chromatography**. v. 28, n.8, p.1096-1101, 2014.

LASHEV, L.; DIMITROVA, D.J. Comparative allometric analysis of three isoxazolylpenicillins in four mammalian species. **Bulg. J. Vet. Med.**, v. 11, n. 4, p. 269-273., 2008

LEGRAND, P., BARRAT, G., MOSQUEIRA, V.C.F., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. S.T.P. **Pharma Sci**, v.9, p. 411-418, 1999.

LEPPER, A.W. Vaccination against infectious bovine keratoconjunctivitis: protective efficacy and antibody response induced by pili of homologous and heterologous strains of *Moraxella bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.65, n.10, p.310-316, 1988.

LEPPER, A.W.D.; HERMANS, L.R. Characterization and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.12, p.401-405, 1986.

LI, W.; ZHANG, J.; TSE, F.L.S. Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols and Regulations. **New Jersey: Wiley & Sons**, p. 704, 2013.

LI, Y.; ZHU, K.; WANG, J.; HUANG, X.; WANG, G.; LI, C.; CAO, J.; DING, S. Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and prednisone in cows' milk by UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1, p. 74-80, 2016.

LIU, S.; CHANG, C.N.; VERMA, M.; HILEETO, D.; MUNTZ, A. ; STAHL, U.; WOODS, J.; JONES, L.; GU, F. Phenylboronic acid modified mucoadhesive nanoparticle drug carriers facilitate weekly treatment of experimentally induced dry eye syndrome. **Nano Research** v. 8. n. 2, p. 621-635, 2015.

LIU, S.; DOZOIS, M. D.; CHANG, C.N.; AHMAD, A.; NG, D.L.T.; HILEETO, D.; LIANG, H.; REYAD, M.M.; BOYD, S.; JONES, L.; GU, F.X.. Prolonged Ocular Retention of Mucoadhesive Nanoparticle Eye Drop Formulation Enables Treatment of Eye Diseases Using Significantly Reduced Dosage. **Mol. Pharmaceutics** n.9 v.13 p.2897-2905, 2016

LIU, Z.Y.. - An introduction to hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry coupled with. **J Mass Spectrom**, v. 47, n. 12, p. 1627-42, 2012.

KIRSCHNING, A.; DRÄGER, G.; DIBBERT, N.; Chemical functionalization of polysaccharides - towards biocompatible hydrogels for biomedical applications. **Chem. Eur. J.** Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/chem.201701906 , 2017

MABONI, G.; GRESSLER, L.T.; ESPINDOLA, J.P.; SCHWAB, M.; TASCA, C.; POTTER, L.; DE VARGAS, A.C.. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of. **Braz J Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 545-9, 2015.

MAIA, J. M. S. ; SILVA, S.R. ; SILVA, M. R. ; SOUSA, R. V. ; MOSQUEIRA, V.C.F. ; QUEIROZ, L. S. ; BRANDAO, H. M. ; GUIMARÃES, A. S. . Potencial clínico de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina no tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. **In: Congresso Internacional do Leite, Porto Alegre. Anais do XIII Congresso Internacional do Leite**. Juiz de Fora: Embrapa, 2015. v. 1. p. 2-4, 2015

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento); **Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009**. Disponível em: [http:// www.agricultura.gov.br/consultaslegis](http://www.agricultura.gov.br/consultaslegis). Acesso em: 20 de setembro de 2016.

MAPA. Manual de garantia da qualidade analítica. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2011. Disponível em: www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Manual_Garantia_Analitica.pdf. Acesso em: 24 de julho de 2016.

MARTINEZ, M., MODRIC, S. Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. **J. vet. Pharmacol. Therap**. v.33, p. 213–226., 2009.

MCCONNEL, C. S.; SHUM, L.; HOUSE, J. K. Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. **Production Animal**, v. 85, n. 1-2, p. 65-70, 2007.

MESTORINO, N.; ERRECALDE, J.O. Pharmacokinetic – pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment. In: *A Bird's Eye of Veterinary Medicine*. Intechpen, Argentina, 2012. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/28685.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2016.

MOSQUEIRA, V. C. F.; BRANDÃO, H. M. ; ARAUJO, R. S. **Nanoparticulate composition containing antibiotics for intramammary administration in animals**. 2011, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: WO2011150481A1, data de depósito: 01/06/2011, título: "NANOPARTICULATE COMPOSITION CONTAINING ANTIBIOTICS FOR INTRAMAMMARY ADMINISTRATION IN ANIMALS", Instituição de registro:WIPO - World Intellectual Property Organization. Instituição (ões) financiadora (s): UFOP, FAPEMIG, EMBRAPA-GL, 2011.

NOBRE, M.M.; CAMARGO, M.P.E.; MOURA, I.U.G.; ROCHA, D.T.; GERN, J.C.; MATTOSO, L. H.C.; RIBEIRO, C.; BRANDÃO, H.M. O uso do estudo de mercado como ferramenta decisória

no processo de patenteabilidade internacional da tecnologia "nanopropolis". In: **workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio**. vi. 2012, Anais. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, p. 522-524, 2012.

O'CONNOR, A. M.; WELLMAN, N. G.; EVANS, R. B.; ROTH, D. R. A review of randomized clinical trials reporting antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis in cattles. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 2, p. 119-127, 2007.

PAULSEN, F.; LANGER, G.; HOFFMANN, W.; BERRY, M.; Human lacrimal gland mucins. **Journal of Cell and Tissue Research**, v.316, p. 167-177, 2004.

PARIZOTTO, N.A. **Ação do laser de helio-neonico sobre o processo de reparo tecidual : um estudo do colageno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho** Tese (Doutorado em Engenharia elétrica) – Universidade Estadual de Campinas. 196 f., 1998.

PEREZ, B. et al. Determination of cloxacillin in milk and blood of dairy cows by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 698, n. 1-2, p. 155-60, 1997

POSTMA, G.C.; CARFAGNINI, J.C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, n. 6, p. 449-458, 2008.

POZO, O. J. et al. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1103, n. 1, p. 83-93, 2006.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R.; QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32,n.6, p.1620-1634, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422009000600046&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 05 Agosto. 2017.

PRESTES, O.D.; MARTINS, M.L.; FRIGGI, C.A.;MUNARETTO, J.S.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R.;. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422013000500015&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 05 Agosto. 2017.

PUBCHEM. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cloxacillin>>. Acesso em 20 de janeiro de 2018.

PUNCH, P.I. Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. **Research in Veterinary Science**, v.39, n.2, p.179-187, 1985.

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

RATH, S.; MARTÍNEZ-MEJIA, M.J.; SCHRODER C.H.K. Considerações e implicações práticas do guia de validação e controle de qualidade analítica de fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. **Química Nova**, *in press*, p. 1-12, 2015.

RAZALI, N.M.; WAH, Y.B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lillifors and Anderson Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v.2, n. 1, p. 21-33, 2011.

REBELO, A.M. **Desenvolvimento e validação de método analítico, via LC-ESI-MS/MS, para determinação de agrotóxicos em arroz irrigado (*Oryza sativa*, L.)**, Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. 220f.

REDDY I.M., BEOTRA A., JAIN S., AHI S.. A simple and rapid ESI-LC-MS/MS method for simultaneous screening of doping agents in urine samples. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 41 n.2 ,p. 80-86, 2009

ROGERS, D.G.; CHEVILLE, N.F.; PUGH, G.W. Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. **Veterinary Pathology**, v.24, n.4, p.287-295, 1987.

RUEHL, W.W.; MARRS, C.; FERNANDEZ, R.; FALKOW, S.; SCHOOLNIK, G.K. HINOJOZA, J.R.; BANKS, S.; BIEBER, D.; MATTICK Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. **Journal Experimental Medicine**, v.168, n.3, p.983-1002, 1988.

SAMANIDOU, V. F.; GIANNAKIS, D. E.; PAPADAKI, A. Development and validation of an HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma. **J Sep Sci**, v. 32, n. 9, p. 1302-11, 2009.

SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle system for drug administration. **Quim. Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7^o Edição. New York: Wiley, p. 550, 2005.

SHRYOCK, T.R.; WHITE, D.W.; WERNER, C.S.; - Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. **Vet Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 305-9, 1998.

SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8^a Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SLOBODNFK, J.; BRINKMAN, U. A. T. LC/MS interfacing systems in environmental analysis: application to polar pesticides. In: BARCEL, D. (Ed.). **Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance**. [s.l.] Elsevier Science B.V., v. 6, p. 935–1001, 1999.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 3^o Edição. New York: Wiley, p. 960, 2010.

SONAJE, K.; LIN, K.J.; TSENG, M.T.; WEY, S.P.; SU, F.Y.; CHUANG, E.Y.; HSU, C.W.; CHEN, C.T.; SUNG, H.W.. Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the oral absorption of endotoxins, **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8712-8721, 2011.

TANG, Y.Y.; LU, H.F.; LIN, H.Y.; SHIN, Y.C.; HWANG, D.F. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 881-882, p. 12-19, 2012.

THOREN, K.L.; COLBY, J.M.; SHUGARTS, S.B.; WU, A.H.B.; LYNCH, K.L. Comparison on information-dependent acquisition on a tandem quadrupole TOF vs a tripli quadrupole linear ion trap mass spectrometer for broad-spectrum drug screening. **Clinical Chemistry**, v. 62, p. 1-3, 2016.

THRIFT, F.A.; OVERFIELD, J.R. Impact of pinkeye (infectious bovine kerato-conjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. **Journal of Animal Science**, v.38, n.6, p. 1179–1184, 1974.

THURMAN, E. M.; FERRER, I.; ZAVITSAMOS, P.; ZWEIGENBAUM Analysis of isobaric pesticides in pepper with high-resolution liquid chromatography and mass spectrometry:

complementary or redundant? **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 2340–2347, 2013.

TOUTAIN, P.L., FERRAN A., BOUSQUET-MÉLOU A. Species Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. In: Cunningham F., Elliott J., Lees P. (eds) *Comparative and Veterinary Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 199. p.19-48 Springer, Berlin, Heidelberg, 2010

TSAI, W.; HUANG, T.; HUANG, J.; HSUE, Y.; CHUANG, H. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 2116, n. 12, p. 2263-2269, 2009.

WASHINGTON, J. A.; SUTTER, V. L. Susceptibility test: Agar and macro broth dilution procedures. In: Lennette, E. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 3° ed., ASM, Washington D. C., p. 453-458., 1980

WEBBER, J.; SELBY, L. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.179, n.8, p.823-826, 1981.

WILCOX, G.E. The etiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in Queensland. 1. *Moraxella bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.46, n.9, p.409-414, 1970.

WILFRIED M. A. NIESSEN, RICARDO A., CORREA C. **Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides**, 1° Edição. New York: Wiley, 2017. 393p, 2017.

VICH. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. **International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products**, 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM207941.pdf> Acesso em: 24 de julho de 2016.

YOSHIDA, M.; AKANE, A. Subzero-Temperature Liquid-Liquid Extraction of Benzodiazepines for High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 9, p.1918-1921, 1999.

8. Anexos:

8.1. Anexo 1:



RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

Protocolo nº: 02/2012

A Comissão de Ética No Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, referente ao projeto/experimento:
“Ensaio Clínico para avaliação de cloxacilina e eritromicina nanoestruturados para controle da ceratoconjuntivite bovina por *Moraxella bovis*”

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Manoela Lima", is written over a dotted horizontal line.

Presidente/Secretário da CEUA-EGL

8.2. Anexo 2

Linearidade:

Dia 1:

		area
N		36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	15960,92
	Std. Deviation	13078,932
Most Extreme Differences	Absolute	,188
	Positive	,188
	Negative	-,142
Kolmogorov-Smirnov Z		1,127
Asymp. Sig. (2-tailed)		,158

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Figura 20: Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados de regressão linear do dia 1.

área			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,488	5	30	,000

Figura 21: Teste de Levene para homogeneidade de variâncias dos dados de regressão linear do dia 1.

Residuals Statistics					
	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	463,45	36563,43	15960,92	13072,889	36
Std. Predicted Value	-1,185	1,576	,000	1,000	36
Standard Error of Predicted Value	68,352	126,745	93,127	19,400	36
Adjusted Predicted Value	450,51	36655,50	15962,85	13076,268	36
Residual	-840,428	1140,727	,000	397,547	36
Std. Residual	-2,084	2,828	,000	,986	36
Stud. Residual	-2,195	2,901	-,002	1,015	36
Deleted Residual	-932,504	1200,557	-1,935	422,110	36
Stud. Deleted Residual	-2,334	3,295	,003	1,076	36
Mahal. Distance	,033	2,484	,972	,818	36
Cook's Distance	,000	,264	,031	,062	36
Centered Leverage Value	,001	,071	,028	,023	36

Figura 22: Teste de D-Cook para presença de valores discrepantes dos dados de regressão linear do dia 1.

Model Summary ^b				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	1,000 ^a	,999	,999	403,351

a. Predictors: (Constant), stdconc

b. Dependent Variable: área

Figura 23: Coeficiente de colinearidade para os dados de regressão linear do dia 1.

Dia 2:

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		area
N		36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	15366,14
	Std. Deviation	12814,915
Most Extreme Differences	Absolute	,200
	Positive	,200
	Negative	-,140
Kolmogorov-Smirnov Z		1,201
Asymp. Sig. (2-tailed)		,112

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Figura 24: Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados de regressão linear do dia 2.

Test of Homogeneity of Variances

area

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,081	5	30	,001

Figura 25: Teste de Levene para homogeneidade de variâncias dos dados de regressão linear do dia 2.

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	177,53	35558,05	15366,14	12812,352	36
Std. Predicted Value	-1,185	1,576	,000	1,000	36
Standard Error of Predicted Value	44,058	81,696	60,026	12,504	36
Adjusted Predicted Value	161,17	35622,04	15365,63	12814,767	36
Residual	-584,053	609,422	,000	256,247	36
Std. Residual	-2,246	2,344	,000	,986	36
Stud. Residual	-2,366	2,405	,001	1,018	36
Deleted Residual	-648,040	641,386	,511	273,478	36
Stud. Deleted Residual	-2,551	2,601	,003	1,051	36
Mahal. Distance	,033	2,484	,972	,818	36
Cook's Distance	,000	,307	,034	,060	36
Centered Leverage Value	,001	,071	,028	,023	36

a. Dependent Variable: área

Figura 26: Teste de D-Cook para presença de valores discrepantes dos dados de regressão linear do dia 2.

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	1,000 ^a	1,000	1,000	259,988

a. Predictors: (Constant), stdconc

b. Dependent Variable: area

Figura 27: Coeficiente de colinearidade para os dados de regressão linear do dia 2.

Dia 3:

		area
N		36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	14749,61
	Std. Deviation	12196,529
Most Extreme Differences	Absolute	,199
	Positive	,199
	Negative	-,138
Kolmogorov-Smirnov Z		1,194
Asymp. Sig. (2-tailed)		,115

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Figura 28: Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados de regressão linear do dia 3.

Área			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11,857	5	30	,000

Figura 29: Teste de Levene para homogeneidade de variâncias dos dados de regressão linear do dia 3.

Residuals Statistics ^a					
	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	295,41	33965,19	14749,61	12192,841	36
Std. Predicted Value	-1,185	1,576	,000	1,000	36
Standard Error of Predicted Value	51,566	95,619	70,256	14,635	36
Adjusted Predicted Value	287,50	34004,54	14747,75	12192,450	36
Residual	-791,253	546,809	,000	299,917	36
Std. Residual	-2,600	1,797	,000	,986	36
Stud. Residual	-2,638	1,893	,003	1,010	36
Deleted Residual	-814,647	606,716	1,866	314,965	36
Stud. Deleted Residual	-2,915	1,972	-,009	1,055	36
Mahal. Distance	,033	2,484	,972	,818	36
Cook's Distance	,000	,196	,025	,040	36
Centered Leverage Value	,001	,071	,028	,023	36

a. Dependent Variable: área

Figura 30: Teste de D-Cook para presença de valores discrepantes dos dados de regressão linear do dia 3.

Model Summary ^b				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	1,000 ^a	,999	,999	304,296

a. Predictors: (Constant), stdconc

b. Dependent Variable: area

Figura 31: Coeficiente de colinearidade para os dados de regressão linear do dia 3

Robustez

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Área flux	Between Groups	2955639,111	2	1477819,556	,007	,993
	Within Groups	3,150E9	15	2,100E8		
	Total	3,153E9	17			

Figura 32: Teste F para avaliação de robustez entre valores de área no parâmetro fluxo de injeção com 5% de significância.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Area temp	Between Groups	139489,000	2	69744,500	,000	1,000
	Within Groups	3,181E9	15	2,121E8		
	Total	3,181E9	17			

Figura 33: Teste F para avaliação de robustez entre valores de área no parâmetro temperatura com 5% de significância.