

Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal

Cláudia Esteban, Celso Antonio Rodrigues, Elizabeth de Souza Nascimento*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

As doenças podais em bovinos são, via de regra, acompanhadas de infecções existentes na área lesionada. O sucesso do tratamento relaciona-se com a concentração do fármaco nas sinóvias dos animais, sendo tetraciclina e oxitetraciclina, entre os antibióticos os principais quimioterápicos atualmente utilizados. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver um método analítico que permita a determinação de tetraciclina por Cromatografia a Líquido de Alta Pressão em líquido sinovial de vacas leiteiras portadoras de enfermidades podais pós-tratamento via intravenosa do antibiótico. O método analítico apresentou limite de detecção e quantificação para a tetraciclina em líquido sinovial de 38 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente. A recuperação das concentrações baixa, média e alta foram superiores a 75%. A linearidade foi avaliada na faixa dinâmica de 50 – 15.000 ng/mL. A precisão e a exatidão para as concentrações baixas, médias e altas foram consideradas adequadas para a realização das análises. Os resultados da concentração máxima e tempo para atingir a concentração máxima foram, respectivamente de $T_{max}= 1,37$ h, $C_{max}=3471,57$ ng/mL em líquido sinovial de vacas com doença podal.

Unitermos

- Líquido Sinovial
- Tetraciclina
- CLAE
- Doença podal bovina

*Correspondência:

E.S. Nascimento
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas, FCF/USP
Av Lineu Prestes, 580, bloco 13B.
05389-970 - São Paulo - SP, Brasil
E-mail:esnasci@usp.br

INTRODUÇÃO

A maioria das claudicações em bovinos é originada de doenças podais nas quais pode haver a participação de microorganismos. As opções de tratamento para tais patologias são limitadas e agravam-se ainda mais quando o processo infeccioso atinge os ossos e as articulações (Clarkson *et al.*, 1996; Desrochers *et al.*, 1995; Kofler, 1995; Navarre *et al.*, 1999; Stanek, 1994).

A escolha de um fármaco de amplo espectro de ação bem como da sua concentração na região afetada torna-se

fundamental para o sucesso do tratamento (Ferguson; 1997; Orsini, 1983; Trent, Redic-Kill, 1997).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação de concentração de tetraciclina em líquido sinovial de vacas leiteiras com enfermidades podais submetidas ao tratamento intravenoso da substância ativa considerada.

A escolha da fase móvel, bem como a escolha da coluna cromatográfica selecionada, baseou-se na estrutura química da molécula de tetraciclina (Figura 1), bem como

em função das outras características físico-químicas.

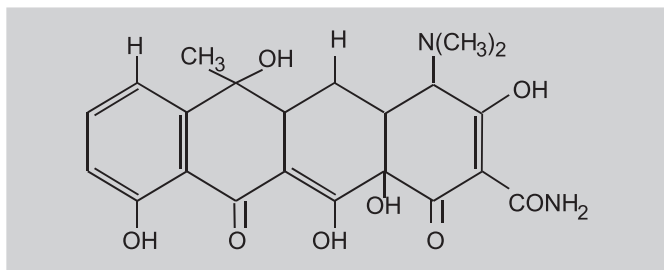


FIGURA 1 - Fórmula estrutural da tetraciclina.

Em virtude dos diferentes grupos funcionais em sua molécula, o mecanismo pelo qual a substância é retida nos sistemas cromatográficos pode ser bastante complexo. Devido à alta polaridade das tetraciclinas, são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso. Em tais sistemas de fase, a formação de pares iônicos, a complexação e a forte interação com grupos silanóis residuais desempenham importantes papéis, pois dificultam a quantificação das tetraciclinas (Pena *et al.*, 1997).

Na análise cromatográfica desses compostos são utilizadas as colunas de fase reversa em que a fase estacionária permite a retenção das tetraciclinas através de alguns mecanismos, como a formação de pares iônicos, locais de competição, locais ativos e não ativos, troca iônica e interação com grupos silano (Pena *et al.*, 1997).

As tetraciclinas sofrem quelação com íons metálicos e ligam-se a proteínas. Desta forma, recomenda-se a adição de ácidos fortes e agentes desproteinizantes na extração destes compostos, a partir de matrizes biológicas (Fedeniuk, Shand, 1998). Além disso, estas substâncias podem adsorver-se nos grupos silanóis na coluna de fase reversa, tendendo a apresentar picos com caudas e baixa

resolução. Estes problemas podem ser minimizados pela adição de ácido oxálico na fase móvel e pelo uso de colunas de poliestirenodivinilbenzeno (Oka *et al.*, 2000; Schenck, Callery, 1998).

Uma alternativa para evitar a formação destes complexos e sua adsorção nas colunas de fase reversa é adicionar outros ácidos na fase móvel, como por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido perclórico, ácido tartárico (Pena *et al.*, 1997).

MATERIAL E MÉTODO

Animais

O modelo experimental previu a administração do cloridrato de tetraciclina, por via intravenosa, em 6 vacas, em período de lactação. Assim, foi administrado cloridrato de tetraciclina cristalina (Talcin[®]), em dose única na concentração de 10 mg/kg corpóreo, em 6 vacas através de punção jugular e infusão contínua por, aproximadamente, 10 segundos. As frações de 1 mL de líquido sinovial foram coletadas mediante antrocentese seriada, utilizando agulhas hipodérmicas descartáveis (30×10), a partir do tarso de todos os animais nos seguintes tempos: antes da administração, 22 minutos, 45 minutos, 1 h e 22 min, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-administração. Todas as amostras de líquido sinovial foram acondicionadas em recipientes limpos, fechados e posteriormente armazenados à temperatura - 20 °C por até 30 dias para posterior análise laboratorial.

A Figura 2 ilustra a divisão dos animais submetidos ao tratamento por tetraciclina intravenosa

As amostras de líquido sinovial, obtidas de acordo com o esquema ilustrado na Figura 2, foram analisadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

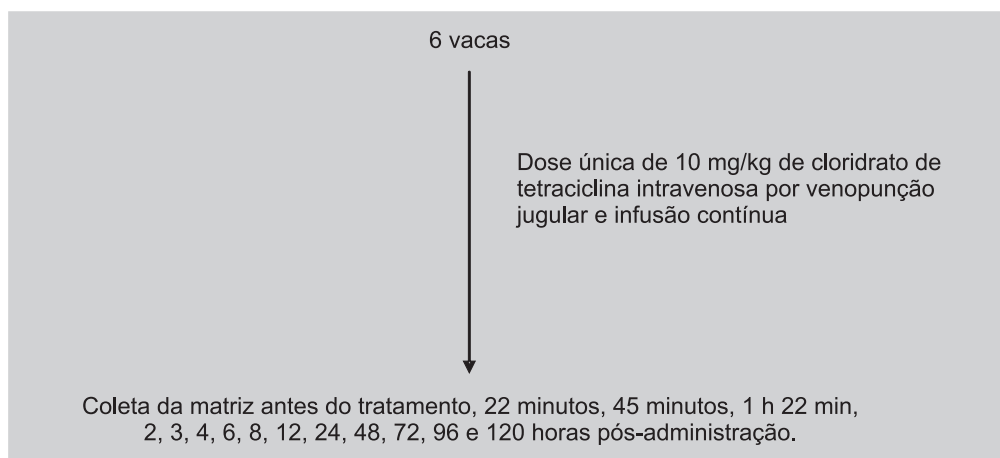


FIGURA 2 - Esquema do tratamento dos animais submetidos à administração de cloridrato de tetraciclina intravenosa.

Material

Reagentes

- Ácido oxálico, pureza 99,9%, solução a 0,01M - MERCK
- Ácido tricloroacético, pureza 99,5%, solução a 80% em acetonitrila - MERCK
- Acetonitrila Omnisolv, grau de pureza cromatográfica – EM Science®
- Metanol Omnisolv, grau de pureza cromatográfica – EM Science®
- Trietilamina para síntese MERCK
- Padrão de tetraciclina, teor 98,2%, fornecido pela UNIVET S.A. Indústria Veterinária
- Água Millipore® (Milli Q – resistividade > 16 megaOhm)
- Talcin®

Equipamentos, acessórios e vidraria

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett Packard®, modelo 1100, equipado com detector de arranjo de diodo, acoplado ao computador modelo Vectra XM, série 4-5/150, com ChemStation para integração e processamento dos cromatogramas.
- Coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60A°, 4 µm (3,9 x 150 mm)
- Sistema de purificação de água Milli Q – Plus Millipore®
- Filtro Millipore®, membrana HV em PVDF 0,45 mm, 47 mm de diâmetro
- Unidade Filtrante HV Millex e polietileno com membrana durapore 0,45 mm, 13 mm

Condições Cromatográficas

As amostras de líquido sinovial foram analisadas por CLAE, nas seguintes condições:

- Coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60 °A, 4 µm (3,9 x 150 mm)
- Temperatura do termostato da coluna 35 °C
- Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min
- Comprimento de onda: 363 nm
- Tempo de corrida: 6 minutos
- Gradiente da fase Móvel, conforme a Tabela I

Procedimento analítico

- Em um tubo de centrifuga foram adicionados 500 mL das amostras de líquido sinovial e 500 µL da solução de ácido tricloroacético a 80% em acetonitrila;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Ultra-som por 10 min;
- Centrifugação a 3500 rpm (1600g) por 25 min;

TABELA I - Gradiente da fase móvel usado na detecção da tetraciclina em líquido sinovial

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Fluxo (mL/min)
0	90	10	1
1	90	10	1
3	85	15	0,8
3,5	85	15	1
6	90	10	1

Fase Móvel: Solução A: Ácido oxálico 0,01M ; Acetonitrila: Trietilamina (90:9,9:0,1); Solução B: Acetonitrila 100%

- Filtração em filtro com membrana 0,45 µm, 13 mm;
- Injeção automática de 40 µL do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas anteriormente.

A quantificação da tetraciclina nas amostras foi realizada após extração do analito em líquido sinovial, de acordo com a marcha analítica ilustrada na Figura 3.

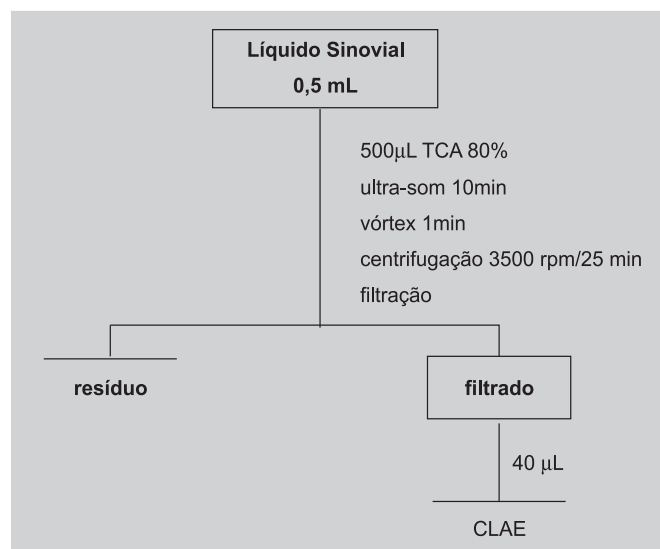


FIGURA 3 - Marcha analítica da determinação de tetraciclina em líquido sinovial.

Validação do método

A validação do método consistiu na avaliação das seguintes figuras de mérito: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, curva de calibração, recuperação, precisão inter e intra-dias, exatidão e estabilidade.

Limite de Detecção

Foi estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (Brasil, 2003). As análises para essa determinação foram realizadas em 6 replicatas, segundo procedimento analítico descrito na Figura 3.

Limite de Quantificação

Estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Considera-se este limite quando for 10 vezes superior ao ruído da linha de base (Brasil, 2003).

As análises para essa determinação foram realizadas em 6 replicatas, segundo procedimento analítico descrito na Figura 3.

Recuperação

A recuperação da tetraciclina na amostra de líquido sinovial foi avaliada comparando-se a concentração obtida quando a tetraciclina é extraída de uma amostra de líquido sinovial com a extração de um branco de amostra de líquido sinovial (de animal não tratado), e posteriormente adicionada de padrão de tetraciclina. Para tal foram consideradas 3 concentrações (50; 5.000 e 15.000 ng/mL), realizadas em 10 replicatas.

A seguinte equação é utilizada para determinar a porcentagem de extração (Chasin *et al.*, 1998)

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração de amostra (conc. extraída)}}{\text{Concentração branco adicionado (conc. não extraída)}} \times 100$$

Estudo de linearidade

O estudo de linearidade do método, que corresponde ao intervalo das concentrações em que a intensidade da resposta do detector é proporcional às concentrações consideradas (Chasin *et al.*, 1998), foi realizado através da adição de diferentes concentrações de tetraciclina às amostras de líquido sinovial abrangendo o seguinte intervalo de faixa dinâmica: 50; 500; 1.000; 5.000; 10.000; 15.000 ng/mL. Estas amostras, juntamente com o branco, foram analisadas em seis replicatas.

Curva de calibração

Para o preparo da curva de calibração, foi adicionada às amostras de líquido sinovial solução-padrão de tetraciclina, visando obter as seguintes concentrações: 50; 1.000, 5.000 e 15.000 ng/mL. Tais amostras, assim como um branco de líquido sinovial, foram submetidas ao procedimento analítico descrito na Figura 3. Para cada bateria de amostras analisadas foi confeccionada uma curva de calibração correspondente.

Precisão do método analítico

A precisão do método analítico corresponde ao parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ou reprodutibilidade (Chasin *et al.*, 1998). A precisão foi avaliada a partir de amostras de líquido sinovial enriquecidas com três concentrações diferentes de tetraciclina: 50; 5.000 e 15.000 ng/mL e foram preparadas e analisadas em seis replicatas, conforme procedimento analítico ilustrado na Figura 3, em um único dia para o estabelecimento da precisão intra-ensaio e em três dias consecutivos, para a precisão inter-ensaio.

Exatidão

Para o estudo da exatidão, que é a diferença entre o valor nominal da substância presente na amostra e o valor obtido no momento da análise (Chasin *et al.*, 1998), amostras de líquido sinovial enriquecidas com três concentrações diferentes: 50; 5.000 e 15.000 ng/mL de tetraciclina foram preparadas e, em seguida, analisadas, conforme procedimento analítico ilustrado na Figura 3, em seis replicatas para cada concentração.

A exatidão pode ser expressa como inexatidão do método através da equação:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração Obtida} - \text{Concentração Nominal}}{\text{Concentração Nominal}} \times 100$$

Estabilidade do analito na amostra

As amostras de *pool* de líquido sinovial, enriquecidas de tetraciclina com duas concentrações diferentes: 50 e 15.000 ng/mL, foram preparadas e armazenadas em alíquotas num período de 91 dias a -20 °C (freezer), e, em seguida,

analisadas conforme procedimento ilustrado na Figura 3. Os valores foram comparados com as concentrações obtidas no tempo zero de armazenamento (Chasin *et al.*, 1994).

RESULTADOS

Limite de detecção

O limite de detecção do método para a tetraciclina em líquido sinovial é de 38 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 19,15% e desvio padrão de 0,39.

Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para a tetraciclina em líquido sinovial é de 50 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 9,51% e desvio padrão de 0,28.

Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a tetraciclina em líquido sinovial são apresentados na Tabela II.

Linearidade

Através da confecção do gráfico das concentrações versus a área do pico obteve-se a equação da reta, corro-

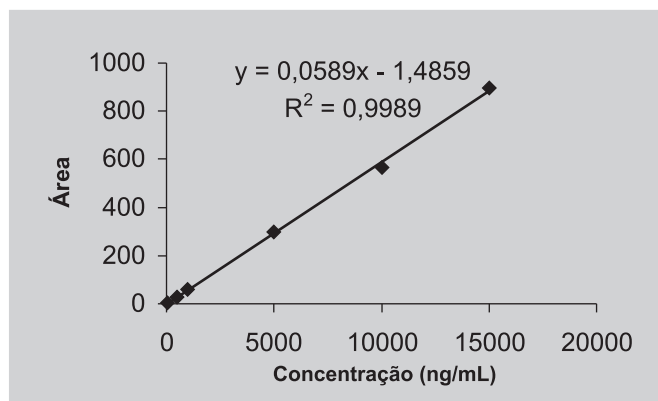


FIGURA 4 - Representação gráfica da linearidade da tetraciclina em líquido sinovial 50-15.000 ng/mL.

borando a linearidade dos pontos pertencentes à faixa dinâmica.

A Figura 4 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de um *pool* de líquido sinovial com as seguintes concentrações: 50, 500, 1.000, 5.000, 10.000 e 15.000 ng/mL de tetraciclina e apresenta o coeficiente de determinação da equação da reta.

Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra e inter ensaios para as amostras de líquido sinovial adicionadas de tetraciclina são apresentadas na Tabela III.

TABELA II - Recuperação da tetraciclina em líquido sinovial

Concentração de tetraciclina em líquido sinovial (ng/mL)	Recuperação* (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
50	98,88	0,26	9,44
5.000	95,07	28,14	9,90
15.000	96,73	31,45	3,64

* Média dos valores das análises em seis replicatas

TABELA III - Precisão intra e inter-ensaios para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial

Conc. de tetraciclina em líquido sinovial (ng/mL)	Precisão intra-ensaio*		Precisão inter ensaio (3 dias)*	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
50	9,64	0,28	6,58	0,18
5.000	8,37	34,86	3,35	9,90
15.000	3,89	25,05	3,80	33,03

* Média dos valores das análises em seis replicatas

Exatidão

A exatidão do método é representada pela tendenciosidade, através do cálculo da inexatidão (Chasin *et al.*, 1998), apresentada na Tabela IV.

TABELA IV - Porcentagem de inexatidão para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial

Concentração de tetraciclina em plasma (ng/mL)	Inexatidão (%)*
50	-7,96
5.000	-2,94
15.000	-1,84

*Média dos valores das análises em seis replicatas

Perfil cromatográfico

A Figura 5 ilustra o perfil cromatográfico obtido nas

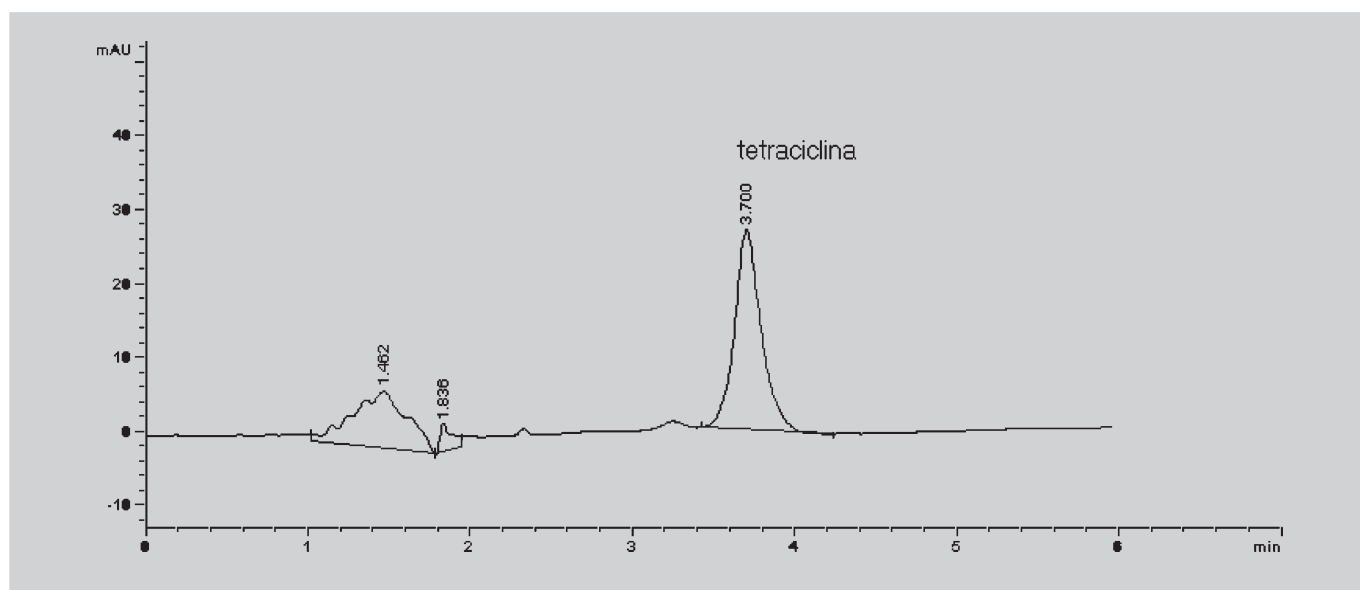


FIGURA 5 - Perfil cromatográfico da tetraciclina (5.000 ng/mL) em líquido sinovial.

TABELA V - Análise da estabilidade da tetraciclina em líquido sinovial, nas concentrações de 50 e 15.000 ng/mL conservadas a -20°C por 3 meses.

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração no tempo zero (ng/mL)*	Concentração após 90 dias (ng/mL)*	CV (%)
50	53,47	45,8	11,84
15.000	15.220,81	14.724,21	2,38

* Média dos valores das análises em seis replicatas

análises do *pool* de líquido sinovial adicionado de tetraciclina.

Estabilidade do analito na amostra

Os resultados do estudo de estabilidade das amostras de tetraciclina em líquido sinovial nas concentrações 50 e 15.000 ng/mL, após 90 dias em freezer, são apresentados na Tabela V. As concentrações obtidas se referem à média da determinação da tetraciclina realizada em seis replicatas.

Concentrações identificadas pós-tratamento intravenoso

As concentrações, determinadas utilizando-se o presente método, de tetraciclina no líquido sinovial após tratamento intravenoso encontram-se dispostas na Tabela VI.

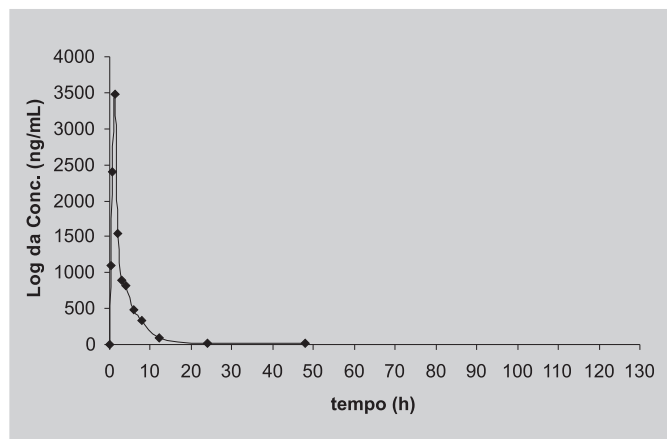
A Figura 6 ilustra o log da concentração dos resíduos de tetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intravenosa.

TABELA VI - Concentração em ng/mL de tetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0 - 120 h) após tratamento intravenoso

Tempo pós-administração (horas)	Animal 136	Animal 329	Animal 349	Animal 311	Animal 337	Animal 358	Média	EPM**
M0 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0
M1 (0,37)	0	1.659,28	2.410,15	678,31	145,44	1.712,92	1.101,02	395,98
M2 (0,75)	2.759,63	3.366,90	3.737,14	813,26	453,40	3.247,52	2.396,31	573,80
M3 (1,37)	4.133,33	3.929,18	5.915,34	932,64	571,05	5.347,87	3.471,57	912,85
M4 (2)	1.934,37	1.638,52	2.041,64	882,47	1.204,27	1.598,73	1.550,00	179,83
M5 (3)	1.427,45	733,68	448,21	1.107,38	738,87	943,02	899,77	139,14
M6 (4)	773,47	569,32	1.394,58	1.010,49	565,86	546,83	810,09	137,85
M7 (6)	216,38	128,14	731,95	1.091,81	562,40	214,65	490,89	153,58
M8 (8)	24,34*	3,57*	491,46	932,64	432,64	102,19	331,14	147,38
M9 (12)	0	0	32,99*	356,52	173,12	12,20*	95,81	58,66
M10 (24)	0	0	0	162,74	0	0	27,12*	27,12
M11 (48)	0	0	0	97,00	0	0	16,17*	16,17
M12 (72)	0	0	0	0	0	0	0	0
M13 (96)	0	0	0	0	0	0	0	0
M14 (120)	0	0	0	0	0	0	0	0

* Abaixo do limite de quantificação

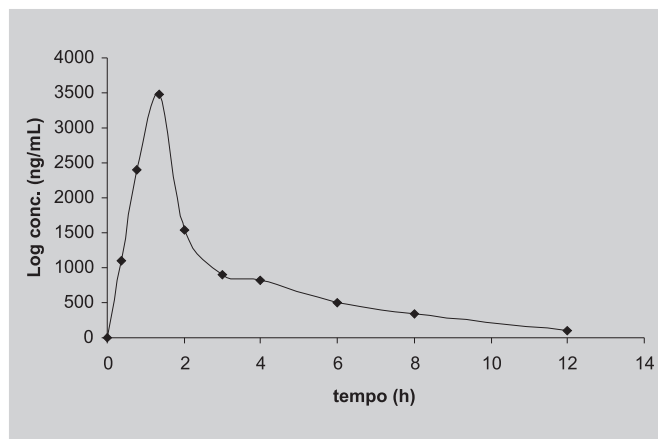
** Erro Padrão Médio

**FIGURA 6** – Log da concentração dos resíduos de tetraciclina em líquido sinovial x tempo.

A Figura 7 ilustra claramente o log da concentração dos resíduos de tetraciclina em líquido sinovial nas primeiras 12 h após a administração, observando-se a concentração e o tempo para atingir a concentração máxima (Tmax= 1,37 h, Cmax=3471,57ng/mL) da tetraciclina.

DISCUSSÃO

Os parâmetros de validação do método analítico utilizado e a respectiva condição cromatográfica permi-

**FIGURA 7** – Log da concentração dos resíduos de tetraciclina em líquido sinovial nas primeiras 12 h após a administração.

tem assegurar resultados confiáveis para a matriz biológica estudada.

A composição da fase móvel é de suma importância para o comportamento cromatográfico das tetraciclinas. Pena *et al.* (1997) constataram que na análise destes antibióticos os melhores resultados foram obtidos em pH 2, tanto com o tampão oxalato, quanto o citrato ou o fosfato. No presente estudo, observou-se maior eficiência na resolução cromatográfica, em pH 2, e com a adição de

ácido oxálico na fase móvel, propiciando a geração sem cauda do pico de tetraciclina.

A utilização de agentes desproteinizantes ácidos auxilia na extração das tetraciclinas em amostras biológicas conforme proposto por Furusawa (1999), que utilizou o ácido tricloroacético a 20% no processo de extração de oxitetraciclina em leite. Navarre *et al.* (1999) também utilizou esta técnica na extração de ceftiofur por CLAE em plasma. Tal procedimento igualmente apresentou sucesso na matriz biológica estudada constituindo-se de uma técnica simples, rápida e econômica.

Embora a técnica da extração utilizada apresentasse vantagens em relação ao tempo e a utilização de um único reagente economicamente viável nas condições de trabalho, o líquido sinovial apresenta alta viscosidade, o que acarretou numa dificuldade na manipulação do mesmo, principalmente na obtenção do volume utilizado no experimento (500 µL).

O líquido sinovial corresponde a matriz biológica rica em ácido hialurônico. Sottofattori *et al.* (2000), utilizaram a enzima hialuronidase no processo de extração de adenosina de líquido sinovial humano, seguido de incubação a 37 °C por 20 minutos e filtração em membrana de 0,8 µm. Esta técnica de extração apresentou algumas vantagens na manipulação da matriz estudada, uma vez que reduziu a viscosidade do líquido sinovial além de não necessitar de posterior centrifugação. Entretanto, a utilização de um reagente relativamente caro aumentaria consideravelmente o custo das análises das amostras do presente estudo.

Alternativamente, como agente desproteizante em matrizes biológicas, tais como plasma e líquido sinovial, pesquisadores utilizam metanol a frio, seguido de centrifugação e filtração em membranas (Owens *et al.*, 2002; Orsini *et al.*, 1983; Orsini *et al.*, 2004).

O método apresentou resultados adequados das figuras de mérito analisadas, ou seja, linearidade entre 50 µg/mL a 415 ng/mL, limites de detecção e de quantificação do método foram 37 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente, a precisão do método mostrou valores de coeficiente de variação inferiores a 10% e 5%, para as menores e maiores concentrações, respectivamente, e foram obtidas recuperação de 99,28 e exatidão de 98,78%. Assim, este método validado no presente trabalho mostrou-se apropriado para a quantificação da presença de tetraciclina na faixa dinâmica considerada em líquido sinovial, constituindo-se de uma técnica simples, rápida e de fácil execução.

Os valores médios da concentração de tetraciclina entre os momentos M1 e M7 (Tabela VI) não diferiram significativamente ($P > 0,05$), evidenciando este intervalo

como o de maior concentração do antibiótico no líquido sinovial.

Observaram-se concentrações mais elevadas de tetraciclina nas sinóvias dos animais até 8 horas da aplicação intravenosa do medicamento, sendo rapidamente distribuído para este tecido, apresentando, assim, concentração sinovial máxima em 1,37 horas pós-administração. Entretanto, após 2 horas da aplicação do medicamento, ou seja, 22,2 min posteriormente à concentração máxima atingida, o teor do fármaco se mostrou drasticamente reduzido nas sinóvias dos animais, em, aproximadamente, 44,65%, corroborando a rápida permanência do fármaco no local de ação. Assim, poder-se-ia utilizar medicamentos de liberação lenta ou outras vias de administração que pudessem aumentar o tempo de ação do fármaco no local da lesão, o que sugere menor tempo de tratamento dos animais para esta patologia e possível redução dos custos envolvidos.

A tetraciclina no líquido sinovial nesses animais apresentou baixa concentração, em virtude da reduzida distribuição deste medicamento neste tecido. Este achado reveste-se de grande importância clínica, pois, nas enfermidades podais, além da dificuldade de distribuição adequada do antibiótico, devido à morfologia dos tecidos envolvidos, ocorre ainda inflamação, favorecendo a permanência de microorganismos (Orsini, 1984; Honnas *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1996; Trent, Redic-Kill, 1997). Uma vez que a distribuição é pobre no líquido sinovial, considera-se que a terapia local, como por exemplo, a via intravenosa regional, com tetraciclina, poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento destas enfermidades, pois, possui um amplo espectro de ação e capacidade de atingir elevadas concentrações nos diversos tecidos acometidos em uma infecção podal (Hauck-Bauer, 1977; Trent, Redic-Kill, 1997; Fajt, Apley, 2001).

As grandes diferenças existentes, entre as concentrações no líquido sinovial dos animais, refletiram a dificuldade de absorção e distribuição da tetraciclina na articulação. Este achado revela que a Concentração Inibitória Máxima (CIM) de um determinado antimicrobiano, não deve ser extrapolada para o tratamento das enfermidades locais. Apesar de útil em certas circunstâncias e basear-se no princípio que a concentração tecidual, é reflexo direto da concentração sérica do antimicrobiano, a CIM pode sofrer distorções teciduais em sua concentração (Fajt, Apley, 2001).

Os resultados insatisfatórios do tratamento antibacteriano sistêmico nas doenças podais dos bovinos, devem-se em parte a diminuição do pH tecidual causado pelos processos infecciosos, com produção de enzimas proteolíticas e formação de coágulos de fibrina que favo-

recem a permanência de microorganismos no interior dos tecidos. Outro ponto importante a ser considerado é que o tecido ósseo conectivo denso, caracterizado por um limitado suprimento sangüíneo e reduzida drenagem venosa e linfática, tornando restritas as rotas de eliminação do material necrótico (Orsini, 1984; Trent, Redic-Kill, 1997). Os ligamentos e tendões apresentam reduzido suprimento sangüíneo, com limitada habilidade regenerativa (Honnas *et al.*, 1991; Trent, Redic-Kill, 1997). Desta forma, a escolha de um antimicrobiano deve estar baseada na sensibilidade microbiana à substância e também nas suas características farmacocinéticas, devendo esta escolha recair sobre um fármaco de amplo espectro de ação e capaz de atingir elevadas concentrações nos diversos tecidos acometidos na infecção podal (Orsini, 1984; Honnas *et al.*, 1991; Ferguson; 1997; Trent, Redic-Kill, 1997), destacando-se o ceftiofur e a oxitetraciclina (Morck *et al.*, 1998).

ABSTRACT

Analytical method to the determination of tetracycline in synovial fluid of cows with lameness in foot

Lameness in cattle is, as a rule, accompanied by infection in the wounded area. Many antimicrobial agents of wide spectrum are used in this therapy, being the concentration of the active principle of paramount importance in the treatment. One of the most used antibiotics is the tetracycline family, having as main representants oxtetracycline and tetracycline due to their treatment success. Therefore, the present work aims the development of an analytical method which allows the determination of tetracycline by High Pressure Liquid Chromatography in synovial fluid of dairy cows, with lameness in foot, post-administration of antibiotic by intravenous via. The analytical method presented detection and quantification limits in synovial fluid of 38 and 50 ng/mL, respectively. Recovery of low, medium and high concentrations were higher than 75%. The method presented linearity in the dynamic range evaluated (50-15.000 ng/mL). Precision and accuracy to the low, average and high concentrations were considered suitable to perform the analyses. Tmax and Cmax of tetracycline in synovial liquid of dairy cows with lameness in foot, after intravenous administration were 1.37h and 3471.57ng/mL, respectively.

UNITERMS: Synovial Fluid. Tetracycline. HPLC. Bovine lameness.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D. E. et al. Traumatic flexor tendon injuries in 27 cattle. *Vet. Surg.*, v.25, n.6, p.320-26, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Inspeção. Centros de Bioequivalência. Legislação. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res\[655-2-0\].html](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res[655-2-0].html)>. Acesso em: 23 jun. 2003.
- CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.
- CLARKSON, M.J.; DOWNHAM, D.Y.; FAULL, W.B.; HUGHES, J.W.; MANSON, F.J.; MERRIT, J.B.; MURRAY, R.D.; RUSSEL, W.B.; SUTHERST, J.E.; WARD, W.R. Incidence and prevalence of lameness in dairy cattle. *Vet. Rec.*, London, v.8, p.563-567, 1996.
- DESROCHERS, A.; SAINT JEAN, G.; ANDERSON, D.E. Use of facilitated ankylosis in the treatment of septic arthritis of the distal interphalangeal joint in cattle: 12 cases (1987-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.206, n.12, p.1923-1927, 1995.
- EURACHEM Guide. Guide to quality in Analytical Chemistry. An Aid to accreditation, 2002.
- FAJT, V. R., APLEY, M. D. Antimicrobial issues in bovine lameness. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.17, n.1, p.159-74, 2001.
- FEDENIUK, R. W.; SHAND, P.J. Theory and methodology of antibiotic extraction from matrices. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.812, p.3-15, 1998.

- FERGUSON, J.G. Surgery of distal limb. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D., (Eds.). *Lameness in cattle*. 3.ed. Philadelphia, London: W.B. Saunders, 1997. cap.16, p.248-261.
- FURUSAWA, N. Rapid liquid chromatography determination of oxytetracycline in milk. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.839, p.24251, 1999.
- HAUCK-BAUER, R. Untersuchungen über den therapeutischen Nutzens der regionalen intravenösen Verabreichung von Oxytetracyclin in die Vv. digit. dors. comm. III et IV bei Klauenerkrankungen des Rindes. Hannover, 1977. 49p. [Doctor Medicinæ Veterinariæ Tierärztliche Hochschule Hannover – Aus der Klinik für Rinderkrankheiten der Tierärztliche Hochschule Hannover].
- HONNAS CM, SCHUMACHER J, COHEN ND, WATKINS JP, TAYLOR TS. Septic tenosynovitis in horses: 25 cases (1983-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, p.1616-1622, 1991.
- KOFLER, J. Septic arthritis of the pastern in cattle-clinical, radiological and sonographic findings and treatment. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.*, Berlin, v.108, n.8, p.281-289, 1995.
- MORCK DW, OLSON ME, LOUIE TJ, KOPPEA, QUINN B. Comparison of ceftiofur sodium and oxytetracycline for treatment of acute interdigital phlegmon (foot rot) in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.212, p.254-257, 1998.
- NAVARRE, C.B.; ZHANG, L.; SUNKARA, G.; DURAN, S.H.; KOMPELLA, U.B. Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, Oxford, v.22, n.1, p.13-19, 1999.
- OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.882, p.109-133, 2000.
- ORSINI, J.A. Strategies for treatment of bone and joint infections in large animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.185, n.10, p.1190-1193, 1983.
- ORSINI, J. A.; MOAT, P.J.; ENGILES, J.; NORMAN, T.; POPPENGA, R.; BENSON, C.E.; BOSTON, R.C. Cefotaxime kinetics in plasma and synovial fluid following intravenous administration in horses. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, Oxford, v.27, p. 293-298, 2004.
- OWENS, T.S.; DODDS, H.; FRICKE, K.; HANNA, S.K.; CREWS, K.R. High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of irinotecan and three metabolites in human plasma. *J. Chromatogr., B*, Amsterdam, v.788, p.65-74, 2002.
- PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclina: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v.47, n.4, p.149-154, 1997.
- SOTTOFATTORI, E.; ANZALDI, M.; OTTONELLO, L. HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *J. Pharm. Biochem. An.*, v.24, p.1143-1146, 2001.
- STANEK, C. Basis of the intravenous regional antibiotics in digital surgery in cattle. *Isr. J. Vet. Med.*, Tel Aviv, v.49, n.2, p.53-58, 1994.
- TRENT, A.M.; REDIC-KILL, K.A. Clinical pharmacology. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D., (Eds.). *Lameness in cattle*. 3.ed. Philadelphia, London: W.B. Saunders, 1997. cap.5, p.56-70.

Recebido para publicação em 12 de agosto de 2005.

Aceito para publicação em 16 de abril de 2007.