

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

THAYANARA LORRANE ALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO *ECO-FRIENDLY* POR UV
PARA AVALIAÇÃO DE MARBOFLOXACINO EM COMPRIMIDOS**

GOIÂNIA, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Thayanara Lorrane Alves da Silva

Título do trabalho: Desenvolvimento e validação de método *eco-friendly* por UV para avaliação de marbofloxacino em comprimidos

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Kogawa, Professora do Magistério Superior**, em 09/08/2022, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAYANARA LORRANE ALVES DA SILVA, Discente**, em 09/08/2022, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3012997** e

o código CRC **0D5E018A**.

Referência: Processo nº 23070.034977/2022-16

SEI nº 3012997

THAYANARA LORRANE ALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO *ECO-FRIENDLY* POR UV
PARA AVALIAÇÃO DE MARBOFLOXACINO EM COMPRIMIDOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Farmácia da Universidade Federal
de Goiás sob a orientação da Profa. Ana
Carolina Kogawa.

GOIÂNIA, 2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Thyanara Lorrane Alves da
Desenvolvimento e validação de método eco-friendly por UV para avaliação de marbofloxacino em comprimidos [manuscrito] / Thyanara Lorrane Alves da Silva. - 2022.
XC, 90 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Kogawa.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2022.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Controle de qualidade. 2. Validação de método analítico. 3. Química analítica verde. 4. Marbofloxacino. 5. Espectrofotometria no UV. I. Kogawa, Ana Carolina, orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos nove dias do mês de agosto do ano de 2022 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Desenvolvimento e validação de método *eco-friendly* por UV para avaliação de marbofloxacino em comprimidos”, de autoria de Thayanara Lorrane Alves da Silva, do curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Profa. Dra. Ana Carolina Kogawa – FF/UFG, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Eric de Souza Gil - FF/UFG e Prof. Dr. Marlus Chorilli - FCFAr/UNESP. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10,0, tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Kogawa, Professora do Magistério Superior**, em 09/08/2022, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 09/08/2022, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marlus Chorilli, Usuário Externo**, em 09/08/2022, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3012993** e o código CRC **A96E4CA0**.

AGRADECIMENTOS

À Deus inicialmente por permitir que eu tenha conseguido trilhar o caminho até aqui.

À minha orientadora, professora Doutora Ana Carolina Kogawa, pela confiança, pelo constante incentivo, pelo ensino, pelas suas pontuações, pela sua disposição em me ajudar, pelo suporte e pela colaboração.

À minha mãe, que sempre foi o meu maior exemplo de determinação e esperança, por me fortalecer apesar de todas as dificuldades, sem nunca poupar esforços para estar presente e me apoiar em todas as etapas da minha vida, sempre me incentivando a continuar, por acreditar nos meus sonhos, pela sua infinita compreensão, carinho e amor. Sem a senhora nada disso seria possível.

Ao meu noivo, pelo apoio incondicional, por sempre me ouvir nos momentos mais difíceis, pela compreensão sem fim em todos os fins de semana dedicados aos estudos, por entender as minhas ausências, pelo auxílio na superação das dificuldades, pelas palavras de incentivo e otimismo e pelo amor.

Às minhas irmãs, e ao meu irmão, por me ajudarem a passar por tudo de forma mais leve, compartilhando alegrias e tristezas, pela amizade entre nós, por acreditarem, pela compreensão e pelo amor.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Aos meus colegas de laboratório, que estiveram comigo nessa jornada, compartilhando aprendizado, alegrias, frustrações e conquistas.

Aos docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, em especial aos professores que disponibilizaram os equipamentos, laboratórios e materiais para o procedimento deste trabalho: prof. Dr. Eric de Souza Gil, Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende e Profa. Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres.

RESUMO

As fluorquinolonas são uma classe de antimicrobianos que se destacam como importante alternativa para tratamento de infecções causadas por bactérias, apresentando amplo espectro de ação. Métodos analíticos encontrados na literatura relacionados ao marbofloxacino (MAR, fluorquinolona de segunda geração) mostram um predomínio no uso de solventes orgânicos tóxicos, que promovem a geração de resíduos, potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e ao operador. Diante disso, foi proposto um método analítico para a análise quantitativa de MAR em comprimidos, por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta (UV). Assim, através do desenvolvimento e validação de um método *eco-friendly*, objetivou-se rapidez, baixo custo, utilização de solventes menos tóxicos, reduzindo assim, as ações nocivas aos operadores, bem como resíduos ao meio ambiente, em conformidade com os princípios da Química Analítica Verde. O método foi desenvolvido e validado para a quantificação de MAR em comprimidos por espectrofotometria na região do UV a 296 nm, utilizando cubetas de quartzo e como diluente água purificada: etanol (80:20, v/v). O método foi linear na concentração de 3-9 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9994, preciso com desvio padrão relativo (DPR) de 1,20 % para o nível intradia, 1,68 % para o nível interdia e 3,26 % para o nível interanalista, exato com recuperação média de 100,39 %, seletivo na comparação de MAR padrão e amostra e robusto perante alterações no comprimento de onda e na proporção de etanol usado na preparação das soluções de trabalho. O teor médio de MAR nos comprimidos analisados, utilizando o método validado, foi de 103,67 %. Assim, o método pode ser aplicado para avaliação quantitativa de MAR em comprimidos de forma ecologicamente sustentável, confiável e eficaz, sendo uma opção analítica verde para laboratórios químico-farmacêuticos.

Palavras-chave: Controle de Qualidade, Validação de método analítico; Química Analítica Verde; Marbofloxacino; Espectrofotometria no UV.

ABSTRACT

Fluoroquinolones are a class of antimicrobials, which stand out as an important alternative for the treatment of infections caused by bacteria with a broad spectrum of action. Analytical methods found in the literature related to marbofloxacin (MAR, second-generation fluoroquinolone) show a predominance in the use of toxic organic solvents, which promote the generation of waste, potentially harmful to the environment and the operator. Therefore, an analytical method was proposed for the quantitative analysis of MAR in tablets, by means of spectrophotometry in the ultraviolet (UV) region. Thus, an eco-friendly method was developed and validated aiming speed, low cost, use of less toxic solvents, reducing harmful actions to operators, as well as waste to the environment, in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry. The method was developed and validated for the quantification of MAR in tablets by spectrophotometry in the UV region at 296 nm, using quartz cuvettes and purified water: ethanol (80:20, v/v) as a diluent. The method was linear at the concentration of 3-9 $\mu\text{g/mL}$, with a correlation coefficient of 0.9994 (standard), accurate with a relative standard deviation (RSD) of 1.20 % for the intraday level, 1.68 % for the interday level is 3.26 % for the interanalyst level, exact with an average recovery of 100.39 %, selective in the comparison of standard and sample MAR and robust against changes in wavelength and in the proportion of ethanol used in the preparation of stock solutions. The average content of MAR in tablets, using the validated method, was 103.67 %. Thus, the method can be applied for quantitative assessment of MAR in tablets in an ecologically sustainable, reliable and effective way, being a green analytical option for chemical-pharmaceutical laboratories.

Keywords: Quality Control, Analytical method validation; Green Analytical Chemistry; Marbofloxacin; UV spectrophotometry.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	08
Lista de Tabelas.....	09
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	10
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. MARBOFLOXACINO	17
2.1.1. Características	17
2.1.2. Mecanismo de ação.....	18
2.1.3. Espectro de ação	18
2.1.4. Aplicação	18
2.2. CONTROLE DE QUALIDADE TOTAL (CQT).....	18
2.2.1. Função do CQ	19
2.2.2. Importância do CQ na indústria farmacêutica.....	19
2.2.3. Falhas no CQ.....	20
2.2.4. Consequências de falhas no CQ	20
2.2.5. Falhas do CQ no âmbito de antimicrobianos.....	21
2.2.6. Métodos que o CQT geralmente utiliza.....	24
2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	27
2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	37
2.4.1. Seletividade/especificidade.....	38
2.4.2. Linearidade	39
2.4.3. Precisão	40
2.4.4. Exatidão	41

2.4.5. Robustez	41
2.4.6. Limite de detecção (LD)	42
2.4.7. Limite de quantificação (LQ)	43
2.5. QUÍMICA ANALÍTICA VERDE (QAV)	44
3. OBJETIVO	46
4. PARTE EXPERIMENTAL	47
4.1. Material	47
4.2. Diluentes	47
4.3. Equipamentos	47
4.4. Desenvolvimento de método analítico	47
4.4.1. Peso médio	47
4.4.2. Seleção do diluente	48
4.4.3. Desenvolvimento do método	48
4.4.4. Curva de Ringbom	48
4.5. Validação do método	49
4.5.1. Linearidade	49
4.5.2. Precisão	49
4.5.3. Seletividade	50
4.5.3.1. Degradação Forçada	50
4.5.4. Exatidão	52
4.5.5. Robustez	53
4.5.6. Limites de detecção e de quantificação	54
4.5.7. Doseamento	55
5. RESULTADOS	56

5.1. Peso Médio	56
5.2. Seleção do diluente	57
5.3. Curva de Ringbom	59
5.4. Linearidade	61
5.5. Precisão	63
5.6. Seletividade	64
5.6.1. Degradação Forçada	65
5.7. Exatidão	68
5.8. Robustez	68
5.9. Limites de detecção e de quantificação	69
5.10. Doseamento	69
6. DISCUSSÃO	71
6.1. Desenvolvimento do método	71
6.1.1. Peso médio	71
6.1.2. Seleção do diluente	71
6.1.3. Curva de Ringbom	72
6.2. Validação	72
6.2.1. Linearidade	72
6.2.2. Precisão	73
6.2.3. Seletividade	73
6.2.3.1. Degradação Forçada	73
6.2.4. Exatidão	75
6.2.5. Robustez	75
6.2.6. Limites de detecção e de quantificação	75
6.2.7. Doseamento	76

7. CONCLUSÃO	77
8. ARTIGOS PUBLICADOS	78
REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do marbofloxacino (CAS 115550-35-1).....	17
Figura 2. Representação gráfica dos métodos de análise descritos na literatura para o marbofloxacino.	37
Figura 3. Esquemática do preparo para análise de degradação forçada de amostra MAR.	52
Figura 4. Variação do peso das vinte unidades de comprimidos de MAR.....	57
Figura 5. Sobreposição dos espectros de MAR em água purificada (azul), água purificada: etanol (80:20, v/v) (verde) e água purificada: etanol (90:10, v/v) (vermelho).....	58
Figura 6. Curva de Ringbom para o MAR.	61
Figura 7. Curva analítica de soluções de MAR padrão, em concentrações de 3, 4, 5, 6, 7 e 9 µg/mL, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 296 nm.	62
Figura 8. Gráfico de resíduos para o MAR padrão pelo método espectrofotométrico na região no UV.	63
Figura 9. Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria na região do UV para as soluções de MAR padrão e MAR amostra preparadas em água purificada: etanol (80:20, v/v) na concentração de 6 µg/mL.....	64
Figura 10. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse ácida no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).	66
Figura 11. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse básica no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).	66
Figura 12. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse neutra no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).	67
Figura 13. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse fotolítica no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).	67

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino.....	29
Tabela 2. Dados obtidos com a pesagem dos comprimidos de MAR	56
Tabela 3. Parâmetros a serem testados durante o desenvolvimento do método.....	58
Tabela 4. Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva de Ringbom do MAR por espectrofotometria na região do UV	59
Tabela 5. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de MAR padrão, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	62
Tabela 6. Análise dos níveis de precisão intradia, interdia e interanalista para o MAR padrão utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	64
Tabela 7. Condições de estresse para o estudo de degradação forçada de MAR em comprimidos	65
Tabela 8. Valores determinados para a avaliação dos ensaios de degradação de MAR, pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	65
Tabela 9. Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV para avaliação de MAR	68
Tabela 10. Valores calculados nos testes F e t para variações de comprimento de onda, na porcentagem de etanol, e na variação da utilização de ultrassom no método espectrofotométrico na região do UV para determinação de MAR em comprimidos	69
Tabela 11. Valores determinados para o doseamento de MAR em comprimidos, pelo método espectrofotometria na região do UV.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
ACN	Acetonitrila
AgNO ₃	Nitrato de Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
β -CD	β -ciclodextrina
β -CD-AgNPs	<i>β-cyclodextrin-modified silver nanoparticle</i>
BPC	Boas Práticas Clínicas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas Laboratoriais
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DF	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Fluorimétrico
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massas
CLM-FL	Cromatografia Líquida Micelar com Fluorescência
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
CQ	Controle de Qualidade
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ε	Epsílon
HCl	Ácido Clorídrico
HCOOH	Ácido Fórmico

H ₂ O	Água
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-ESI-MS/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry</i>
HPLC-FD	<i>High Performance Liquid Chromatography Fluorimetric Detector</i>
HTBA	Hidróxido de Tetrabutil amônio
IC	Inclinação da Curva
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Infravermelho
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAR	Marbofloxacino
MB-Ca	Complexo de Cálcio (II) do Marbofloxacino
MLC-FL	<i>Micellar Liquid Chromatographic Fluorescence</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₃	Hidróxido de Amônia
QAV	Química Analítica Verde
QV	Química Verde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDS	Surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio
SQR	Substância Química de Referência

TBAH	<i>Tetrabutyl Ammonium Hydroxide</i>
TEA	Trietilamina
TSA	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana
IUPAQ	União Internacional da Química Pura e Aplicada
USP	<i>United States Pharmacopeia National</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometria Ultravioleta e Visível
Vis	Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

Geralmente em medicina veterinária a classe de antimicrobianos das fluorquinolonas é muito utilizada. As fluorquinolonas agem na parede estrutural das bactérias, apresentando amplo espectro de ação, elevada atividade contra bactérias, sem resistência cruzada a outros antimicrobianos, além de baixa ligação proteica, alta biodisponibilidade e tempo de meia-vida longo (OLIVEIRA et al., 2015; LI et al., 2021).

O marbofloxacino pertence a segunda geração das fluorquinolonas, que deriva do ácido carboxílico, sua estrutura possibilita que seja permeável às células e tecidos, resultando em melhor biodisponibilidade e meia-vida mais longa (BHARDWAJ et al., 2020; CORUM et al., 2020; LI et al., 2021; SILVA et al., 2021; SILVA et al., 2022). Apresenta-se como pó cristalino amarelo claro, ligeiramente solúvel em água, moderadamente ou ligeiramente solúvel em cloreto de metileno e muito ligeiramente solúvel em etanol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2019). É utilizado somente em campo veterinário, apresentando efeito bactericida, a partir da inibição das enzimas DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, que são essenciais para o isolamento do cromossomo, a replicação, a transcrição e o reparo do DNA em bactérias (BHARDWAJ et al., 2020; CORUM et al., 2020; LI et al., 2021).

Apresenta amplo espectro de ação, atuando contra várias bactérias, incluindo Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp.; Gram-positivas como por exemplo *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*; anaeróbias como *Clostridium*, bem como *Mycoplasma pneumoniae*. O marbofloxacino também se destaca ao atuar melhor contra espécies de *Pseudomonas* em comparação a outros fármacos dessa classe como o enrofloxacino, além de exibir baixa toxicidade (CORUM et al., 2020).

Esse fármaco é geralmente indicado para infecções dermatológicas, respiratórias e do trato urinário, que podem ser resultantes de bactérias já mencionadas, ressaltando que o uso indiscriminado desse fármaco pode resultar em resistência bacteriana (SHEN et al., 2012),

sendo assim, é essencial que haja uma garantia da qualidade desse medicamento, para que o mesmo seja seguro e eficiente, cumprindo com todas as suas especificações.

Com isso, torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos que assegurem propriedades de qualidade do produto. Alguns métodos foram encontrados na literatura, em especial envolvendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), e em menor quantidade, métodos por espectrofotometria e microbiológicos. Assim, cabe ressaltar que no desenvolvimento de novos métodos e técnicas analíticas existe atualmente um foco e relevância para que esses métodos se adaptem aos princípios da Química Analítica Verde (QAV), visando uma produção mais ecológica, preservando o meio ambiente e a saúde do operador, no entanto, pode-se inferir que nos métodos encontrados na literatura não se observa uma prioridade em seguir tais princípios, portanto, nesse cenário é evidente a necessidade de se abordar o uso da QAV.

Neste trabalho foi realizada uma revisão da literatura englobando os métodos analíticos existentes para o marbofloxacino, considerando de forma crítica o seguimento com relação aos princípios da QAV. Assim, foi desenvolvido um método *eco-friendly* por espectrofotometria na região do ultravioleta para a avaliação de marbofloxacino na forma de comprimidos. Foi priorizada a busca por um desenvolvimento mais ecológico, reduzindo a geração de resíduos, com o uso de solventes mais seguros e menos tóxicos, com volume reduzido, e com a utilização de menor quantidade de fármaco, minimizando assim a geração de resíduos, os impactos ao meio ambiente e à saúde do operador, além disso, buscou-se por um método mais rápido, com redução no tempo de análise, e que fosse de fácil execução e baixo custo, seguindo os princípios da QAV e sustentável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MARBOFLOXACINO

2.1.1. Características

As características do marbofloxacino (MAR) estão listadas abaixo (USP, 2018; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2019):

Fórmula Molecular: $C_{17}H_{19}FN_4O_4$, apresentando estrutura química:

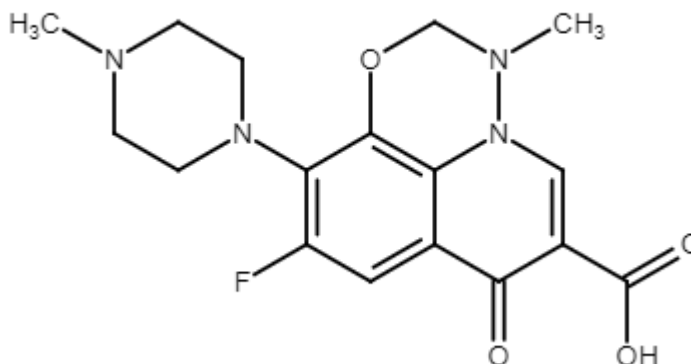


Figura 1. Estrutura química do marbofloxacino (CAS 115550-35-1).

Peso Molecular: 362,36 g/mol;

pKa: 5,38 e 6,16;

Log P: -0,53; -0,045;

Número CAS: 115550-35-1;

Ponto de fusão: 268-269 ° C;

Solubilidade: ligeiramente solúvel em água, moderadamente ou ligeiramente solúvel em cloreto de metileno, muito ligeiramente solúvel em etanol (96 %) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2019).

Formas Farmacêuticas: comprimidos e solução injetável.

Nome comercial: Aurizon e Marbocyl (laboratório Vetoquinol®) (VILALTA et al., 2012); Marbopet e Marbox (laboratório CEVA®) (CORUM et al., 2020).

2.1.2. Mecanismo de ação

O MAR é um ácido carboxílico, pertencente a segunda geração de fluorquinolonas, que atua inibindo a atividade da DNA-girase e da topoisomerase IV, enzimas fundamentais à replicação e transcrição do DNA bacteriano, assim a inibição destas enzimas leva a morte da bactéria (SHEN et al., 2012; LEI et al., 2017; SILVA et al., 2021; SILVA et al., 2022).

2.1.3. Espectro de ação

Esse fármaco apresenta amplo espectro de ação englobando tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, e também Mycoplasma (LEI et al., 2017).

2.1.4. Aplicação

Utilizado no âmbito veterinário, esse medicamento vem sendo geralmente indicado para infecções dermatológicas, respiratórias e do trato urinário, que podem ser resultantes de bactérias já mencionadas acima (SHEN et al., 2012).

2.2. CONTROLE DE QUALIDADE TOTAL (CQT)

De acordo com Trindade e colaboradores (2018) o termo controle de qualidade se refere à constante tentativa de fabricação de um medicamento perfeito, e para isso existe um conjunto de normas que regem sua segurança e eficácia. Igualmente, a qualificação do profissional responsável por atividades da indústria farmacêutica diretamente relacionadas à garantia de um produto seguro, sem apresentar qualquer perigo à população. Esse sistema de garantia de qualidade, envolve também a validação de processos.

Além disso, existem ainda outras definições desse setor, como Paula e colaboradores (2017) exemplificam qualidade no domínio empresarial sendo a aquiescência ao que os clientes exigem, tendo assim suas necessidades atendidas, com o cuidado na gestão de não conformidades, com integração de intervenções para correção. Nesse contexto, surge a gestão da qualidade cuja abordagem é a padronização de processos, que atua no desenvolvimento da organização, proporcionando vantagem competitiva.

2.2.1. Função do CQ

São muitas as funções do CQ, não importando o âmbito em que se atua. Esse setor não deve ser negligenciado pois atua como instrumento para resolução e prevenção de erros, elucidando problemas que possam vir a ocorrer (PAULA et al., 2017).

Assim sendo, Berti e Santos (2016) referem que os padrões de qualidade são utilizados pelas indústrias para seguir as normas pertinentes ao ramo e também para permanecer no mercado, então quando estão presentes nas diversas etapas do processo produtivo, maiores são os lucros para a empresa, e maior será a confiabilidade perante o consumidor e ao mercado.

Portanto, Trindade e colaboradores (2018) descrevem que o controle de qualidade tem como objetivo alcançar as melhorias necessárias em todo o processo produtivo dentro de uma indústria farmacêutica, ou qualquer outra empresa, com o enfoque nas exigências do consumidor, com necessidade em proporcionar a qualidade, eficácia, segurança, credibilidade dos medicamentos, e conseqüentemente a fidelidade do cliente.

2.2.2. Importância do CQ na indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica, esse setor é fundamental, pois como apontam Rocha e Galende (2014) o mesmo objetiva segurança, confiabilidade e eficiência de produtos e insumos farmacêuticos, compondo uma das etapas mais importantes no processo de fabricação. Assim, para garantia do cumprimento desses requisitos, as indústrias farmacêuticas devem estar de acordo com o que é preconizado por órgãos reguladores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Com isso, Trindade e colaboradores (2018) referem que a importância desse sistema está na garantia de que os medicamentos sejam planejados e desenvolvidos através de Boas Práticas Laboratoriais (BPL), para assegurar e verificar se um medicamento está dentro dos padrões de qualidade exigidos, através de avaliação e medição. Assim, inserido dentro das Boas

Práticas de Fabricação (BPF), constituindo um conjunto de normas obrigatórias feitas para a produção de medicamentos e afins.

Além disso, em conformidade com Silva e colaboradores (2017), a segurança de um medicamento, de qualquer classe, está profundamente ligada à sua qualidade, porém não se considera apenas esse critério.

Logo, como Paula e colaboradores (2017) destacam, que é fundamental a manutenção e implantação de projetos da qualidade com a certeza de melhor execução de processos, e assim, dos produtos. Sendo necessário que os componentes da organização como um todo estejam de acordo com os procedimentos implantados e da importância do cumprimento destes.

2.2.3. Falhas no CQ

Os medicamentos poderiam ser distribuídos ou comercializados antes que se tenha certificado de que cada lote de produção tenha sido produzido e controlado de acordo com os requisitos do registro e quaisquer outras normas relevantes à produção, ao controle e liberação de medicamentos e desvios, ou seja, sem um procedimento de auto inspeção ou auditoria interna de qualidade que avalie regularmente a efetividade e aplicabilidade da garantia de qualidade (TRINDADE et al., 2018).

Atuando de forma incorreta esse setor pode ainda apresentar insegurança, falta de qualidade ou ineficácia, assim aumentando os riscos inerentes em qualquer etapa da produção de um medicamento, inclusive no produto final (TRINDADE et al., 2018).

E também, como Paula e colaboradores (2017) demonstram, sem CQ seja em etapas de produção ou gerenciamento, pode-se resultar em consequências diversas como custos desnecessários, trabalhos perdidos e efeitos problemáticos aos consumidores.

2.2.4. Consequências de falhas no CQ

Das consequências que a atuação incorreta do setor de CQ proporciona, ocorre grande impacto negativo, de várias formas, principalmente em relação ao paciente, incluindo riscos

para os mesmos, caminhando assim para um cenário em que a doença não seja combatida com medicamentos de qualidade, pois o fármaco não oferecerá segurança e eficácia. Assim acarretando possível resistência, efeitos negativos, agravos na doença, contribuindo para maior disseminação da doença não curada, assim colocando em risco a qualidade de vida desses pacientes, que terão que fazer maior uso do serviço de saúde, por exemplo para tentar novamente o tratamento, fazer acompanhamento, e assim o número de casos aumentará por falta de tratamento eficaz, entre outros, o que auxilia na sobrecarga do sistema de saúde.

Dessa forma, Silva e colaboradores (2017), relatam que em saúde pública, medicamentos com qualidade duvidosa ou abaixo dos padrões exigidos pelas agências reguladoras têm se tornado um grande problema. Medicamentos esses que podem ser resultados de processos de produção e de padrões inadequados, embalagem inadequada, controle de qualidade de produtos ineficiente, entre outros.

Portanto, Martínez e colaboradores (2020), ressaltam a importância de se garantir o CQ no que permeia os produtos, destacando como exemplo da falta de garantia de qualidade nas etapas de produção, uma situação em que o produto pode não oferecer a qualidade necessária por ter sido utilizada matéria-prima que não cumpre aos parâmetros de qualidade exigidos, ou seja uma ausência de qualidade logo no início da produção, portanto o produto final apresentaria consequências ao paciente.

2.2.5. Falhas do CQ no âmbito de antimicrobianos

Como Silva e Aquino (2018) descrevem, a resistência das bactérias aos antimicrobianos mais convencionais é atualmente um dos maiores e mais consideráveis problemas para a saúde pública, sendo necessários estudos para melhora desse cenário.

Diante disso Furtado e colaboradores (2019) apontam, que o uso não racional de antimicrobianos auxilia no processo de resistência bacteriana, e também o consumo indiscriminado desses fármacos pode originar bactérias multirresistentes.

Visto que, segundo a *World Health Organization* (2017) essas bactérias que vêm apresentando resistência, representam uma ameaça específica em hospitais, lares de idosos e entre pacientes cujos cuidados requerem dispositivos como ventiladores e cateteres de sangue, e como exemplos de algumas bactérias mais críticas destacam-se, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e, várias *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* e *Proteus*. Salientando que as mesmas podem causar infecções que podem levar ao óbito, como infecções na corrente sanguínea e pneumonia.

Diante disso, considerando a rápida multiplicação destes microrganismos, e o uso indiscriminado de antimicrobianos, tem-se o aumento no desenvolvimento de resistência aos mesmos (SILVA & AQUINO, 2018).

E também, em concordância com Furtado e colaboradores (2019), com o controle do consumo de antimicrobianos, colabora-se com avaliações em variados graus, como hábitos de prescrição, introdução de novos fármacos e variação da flora bacteriana local.

Assim, estudos sugerem, que o contato direto do trabalhador com o paciente infectado pode facilitar a disseminação de superbactérias e aumentar assim o risco de o profissional adquirir resistência aos antimicrobianos disponíveis (LARIOS et al., 2017).

Visto que, existem ainda diversas formas de se adquirir essa resistência, como Larios e colaboradores (2017) exemplificam, que existem evidências científicas de que antibióticos podem estar suspensos no ar, destacando o que ocorre durante a manipulação da penicilina, em que os profissionais podem inspirar poeiras, soluções e aerossóis desse fármaco, o que pode vir a auxiliar em resistência.

Dessa forma, Silva e Aquino (2018), relatam que as indústrias farmacêuticas enfrentam desafios para o desenvolvimento constante de novos medicamentos, tratamentos e estratégias, com objetivo de melhorar esse cenário que a resistência antimicrobiana apresenta.

No entanto, como apresentam Silva e Aquino (2018), esse setor teve sua produção reduzida, o que se torna um problema pois assim o empenho na descoberta de novos medicamentos antimicrobianos decresceu, o que é uma situação preocupante pois esse setor resulta em produtos fundamentais, e com a ocorrência de resistência se torna necessária a descoberta de novos antimicrobianos eficazes.

Sendo assim, Silva e Aquino (2018) descrevem ainda que a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos tem decaído muito pois são pesquisas a longo tempo para uma situação em que poderá ter ausência de retorno do investimento e também em razão da resistência recorrente ocorre rápido desuso dos mesmos.

Dessa forma, Browne e colaboradores (2020) ressaltam que o teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) de alta qualidade é uma importante ferramenta de saúde pública, que possibilita a identificação de resistência antimicrobiana.

Além disso, maior prudência e monitoramento no que se trata da resistência antimicrobiana, com relatórios padronizados de dados de (TSA) e implementação de avaliação de controle de qualidade externa, é fundamental para favorecer a política e prática de tratamento baseada em evidências (BROWNE et al., 2020).

Diante disso, existem muitas leis e normas que regem esse setor, em consonância com Sampaio e colaboradores (2018) pode-se exemplificar a Lei nº 9.782, de 1999, que criou o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução CNS nº 338, de 2004, instituindo a Política Nacional de Assistência Farmacêutica, tendo grande relevância para o controle da utilização de medicamentos.

Também, como apresentado por Sampaio e colaboradores (2018), com a intenção de apoio ao uso racional de antimicrobianos, a ANVISA publicou em 2017 o Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde, que complementa a já publicada RDC 20 (2011) por abranger os serviços de saúde.

Dessa forma, Costa e Silva Junior (2017), reforçam que para combater o problema da resistência microbiana, pesquisas nas ciências direcionadas ao reconhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana são essenciais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, assim como as nanociências e a nanotecnologia para o melhoramento dos medicamentos existentes e desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. E acima de tudo, a qualidade dos produtos é o primeiro passo para o uso correto de medicamentos e o combate à resistência microbiana.

2.2.6. Métodos que o CQT geralmente utiliza

Sendo assim, Paula e colaboradores (2017), referem que ferramentas e programas da qualidade representam importantes e necessários instrumentos para que o sistema da garantia da qualidade obtenha máxima eficiência e eficácia, e também que processos de melhoria contínua da qualidade são baseados no ciclo PDCA, método utilizado para planejar ou desenvolver, realizar ou implementar, checar ou monitorar, e padronizar ou melhorar os preceitos da qualidade nas organizações.

Segundo Silva e colaboradores (2017), esse setor analisa características que exigem realização de análises físico-químicas e biológicas, com necessidade de conhecimento de suas propriedades físico-químicas, imunológicas e citotóxicas, bem como de seus perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

Portanto Trindade e colaboradores (2018), referem ainda que a utilização do CQ na indústria farmacêutica, necessita da validação de processos, um documento que indica resultados positivos de que o método de fabricação é seguro estando dentro dos limites estabelecidos, tendo resultados almejados. E também, esse sistema engloba a revisão da cadeia produtiva, incluindo instalações e equipamentos garantindo a qualidade desejada dos produtos.

Para garantir a qualidade do produto farmacêutico existem diversos métodos, como exemplificam Prado e Rocha (2015), as técnicas espectroscópicas vibracionais de

infravermelho (IV), consistem no estudo de vibrações moleculares fundamentais, que são sensíveis às estruturas, às conformações e ao ambiente de um composto e, por isso, são usadas para caracterização e identificação de formas cristalinas de insumos farmacêuticos ativos.

Com isso, a espectroscopia no IV é um método fundamental muito utilizado para identificação de substâncias, em que a região do IV no espectro eletromagnético está situada entre as regiões do visível e das micro-ondas, e é subdividida em três partes: próximo, médio e distante, sendo que a mais utilizada é a do IV médio, embora as regiões do distante e, principalmente do próximo, venham ganhando maior aceitação (AMORIM et al., 2013).

Por fim, a implementação de métodos cromatográficos é fundamental para o CQ, em conformidade com Gomes e colaboradores (2020), destacam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), que tem como principal propriedade a capacidade de separar e quantificar substâncias de diferentes polaridades e, associada à espectrometria de massas, identificá-las ou confirmar as suas identidades somente com uma medida analítica.

Também, a técnica de CLAE é muito versátil, com boa eficiência, exatidão e precisão de resposta, o que a torna uma ferramenta analítica indispensável nos processos de controle de qualidade de produtos contendo vários princípios ativos, aditivos e/ou componentes enriquecidos. No entanto, para a separação das espécies químicas de um determinado produto, a CLAE emprega uma coluna cromatográfica que é um dos componentes de mais alto custo e de vida útil mais curta, de acordo com o tipo de amostra analisada e das condições de análises empregadas (GOMES et al., 2020).

As análises espectrofotométricas desempenham um papel importante nos laboratórios de CQ, principalmente na indústria farmacêutica, no entanto com a utilização da cromatografia essas técnicas eficientes passaram a ser menos utilizadas, mesmo oferecendo resultados ótimos após sua validação (ALÉSSIO et al., 2017).

Apesar da superioridade do uso da CLAE nas análises farmacêuticas, o espectrofotômetro ainda é um instrumento analítico muito usado atualmente, e essa técnica apresenta diversas vantagens como disponibilidade, fácil utilização, possibilidade do uso de vários diluentes, baixo custo, rapidez, precisão e exatidão, se tornando assim um método excelente em análise química (ALÉSSIO et al., 2017). Porém, essa técnica também possui suas limitações, incluindo em certos casos baixa seletividade e dificuldade de análise de matrizes complexas.

A espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis) permite a identificação e quantificação de substâncias, contando com rapidez e simplicidade, é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas, sendo aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos, para avaliação da qualidade de águas residuais, para identificação de componentes da matriz orgânica, uma vez que a maioria dos compostos orgânicos e alguns compostos minerais solúveis (como os nitratos) absorvem radiação na região UV-Vis (BRITO et al., 2013). Dessa forma, essa técnica baseia-se na interação da luz com a matéria, em que o intervalo referente ao UV-Vis corresponde a faixa de comprimento de onda compreendida entre 190 a 400 nm (UV) e 400 a 750 nm (Vis) (CANASSA et al., 2018).

Diante disso, esse método costuma funcionar com uma fonte de luz que emite um espectro amplo envolvendo toda faixa de comprimento de onda que o aparelho engloba, o feixe de luz emitido deve passar por dois processos, configurando comprimento de onda e intensidade, ao incidir sobre a amostra, parte dessa intensidade pode ser absorvida pela amostra devido a excitação de elétrons de ligação em moléculas e íons orgânicos, ou ainda alguns ânions inorgânicos. Também, esse espectro pode trazer ainda informação de absorção (Abs) ou transmissão (T) em função do comprimento de onda (λ em nm), e esses fatores se relacionam formando a equação ($Abs = \log (1/T) = \log (I_0/I)$) (CANASSA et al., 2018).

Sendo assim, esse espectro é como uma impressão digital da qualidade da amostra, refletindo a sua composição química e física, de acordo com a Lei de Lambert-Beer ($Abs = \epsilon \cdot b \cdot c$), na qual a grandeza ϵ (épsilon) representa a absorvidade molar, Abs representa o valor da absorção da solução em um dado comprimento de onda, pela distância (b) percorrida pelo feixe de radiação e pela concentração (c) dos componentes da amostra por ele atravessada (CANASSA et al., 2018).

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

Métodos analíticos são fundamentais em produção e desenvolvimento envolvendo a indústria farmacêutica, essas análises englobam a realização de avaliações físico-químicas e biológicas, sendo necessário o conhecimento das propriedades físico-químicas, imunológicas e citotóxicas do medicamento, bem como de seus perfis de biodisponibilidade. Constituem etapa importante para o sistema de garantia da qualidade. Além disso, seria muito interessante atualmente se os procedimentos analíticos estivessem em concordância com os princípios da QAV, uma vez que esses processos contribuem para a geração de toxicantes, podendo acarretar efeitos negativos ao meio ambiente e ao operador, torna-se necessário, portanto, que os preceitos da QAV sejam prezados nas etapas de experimentação.

O MAR é um antimicrobiano utilizado exclusivamente no âmbito veterinário. A literatura disponibiliza suas informações físico-químicas, assim como metodologias analíticas para sua determinação (BHARDWAJ et al., 2020). Diante disso, os métodos analíticos disponíveis na literatura para a avaliação do MAR estão dispostos na Tabela 1.

Considerando os métodos expostos na Tabela 1, ressalta-se que não foram relatadas preocupações com o seguimento dos preceitos de QAV, como exemplo pode-se inferir que para as condições de estudo são utilizadas substâncias tóxicas como a acetonitrila, que é facilmente absorvida, por via dérmica, inalatória ou oral, oferecendo ainda efeitos tóxicos ao organismo vivo, pela sua degradação em cianeto (CASSINI et al., 2013), além disso pode-se ressaltar a

escassez de métodos UV para análise de produtos farmacêuticos com a inclusão de alternativas mais ecológicas, destacando que essas podem apresentar benefícios durante todas as etapas de experimentação, que incluem preservar a saúde do operador, reduzir os custos de descarte, utilizar de metodologia mais simplificada e conseqüentemente reduzir tempo de análise, prezando ainda pela redução de impactos ao meio ambiente como com a diminuição de resíduos gerados.

Tabela 1. Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE	Coluna: Kromasil® 100 C18 (150 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: solução tamponante pH 2,7-metanol-acetonitrila-ácido acético-trietilamina (74:20:4:1:1, v/v/v/v/v). Vazão 0,6 mL/min.	295 nm	Soro de lhamas	LANGRE et al., 2012
CLAE	Coluna: Phenomenex Luna® C18 (4,6 ×150 mm; 5 µm). Fase móvel: mistura gradiente de A: solução tamponante (fosfato aquoso 17,5 mM e hidróxido de tetrabutyl amônio 1,5mM), ajustado para pH 3 com ácido-fosfórico e B: 50 % de ACN e 50 % de metanol.	293 nm	Soro de ovelhas	MAHMOOD et al., 2012
CLAE	Coluna: Zorbax® SB-Aq-C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: metanol/acetonitrila/ácido cítrico 0,02 M e acetato de amônio 0,03 M, em 0 min (10:10:80, v/v/v), após 20 min para (13:11:76, v/v/v), e então para (10:30:60, v/v/v) e mantida por 10 min. O volume de injeção foi de 50 µL.	278 nm	Diferentes tecidos de animais	YU et al., 2012

Continua na próxima página

Tabela 1. (Continuação) Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE	Coluna: Simetria Waters® (150 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: água (pH ajustado para 2,5 com HCl 37 %) -ACN (90:10, v/v). Vazão: 1,2 mL/min.	275 nm	Adsorção de argilas montmorilonita e caulinita	STURINI et al., 2015
CLAE	Coluna: Agilent® C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: HCOOH a 0,1 % + ACN (18:82, v/v). Vazão: 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL.	299 nm	Soro suíno	LEI et al., 2017
CLAE	Coluna: Gemini® C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: ACN 17 %, 0,04 % de trietilamina, 83 % ácido orto-fosfórico. Vazão: 1,0 mL/min.	280 nm	Plasma de cordeiros	ALTAN et al., 2018
CLAE	Coluna: Merck Purospher® C18 (250 × 4 mm; 5 µm). Fase móvel: solução tamponante 87,5 %, metanol 10 % e ACN 2,5 %. Vazão: 1,0 mL/min.	295 nm	Plasma de cabras	BHARDWAJ et al., 2018

Continua na próxima página

Tabela 1. (Continuação) Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE	Coluna: Gemini® C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: ACN e trietilamina (0,04 %) + ácido orto-fosfórico (0,04 %) (17:83, v/v). Vazão: 1,0 mL/min.	280 nm	Plasma de ovelhas	ALTAN et al., 2019
CLAE	Coluna: Kromasil® 100, C18, (20 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (pH 2,6) (componente A) e metanol (componente B), um gradiente inicial de 25 % a 100 % B por 13 min, então 100 % B a 25 % B em 2 min. Vazão: 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL.	280 nm	Amostras de urina humana	SANTIGOSA et al., 2019
CLAE	Coluna: Gemini® C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel: ACN (18 %) e 0,4 % de trietilamina (82 %), incluindo 0,4 % de ácido orto-fosfórico. Vazão: 1,0 mL/min.	280 nm	Trutas arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	CORUM et al., 2020

Continua na próxima página

Tabela 1. (Continuação) Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-DF	Coluna: Ascentis RP-Amide Supelco® (250 ×4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: 25 mM HCOOH + ACN (85:15, v/v) por 30 min, seguido por um gradiente linear de 1 min a 100 % ACN. Vazão: 1,0 mL/min.	297/507 nm	Solo agrícola	STURINI et al., 2012
CLAE-EM/EM	Coluna: Gemini® C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: (solvente A: HCOOH 0,5 % v/v em água ultrapura; solvente B: ACN). Vazão: 1,2 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL.	297/507 nm	Solo agrícola	STURINI et al., 2012
CLAE-EM/EM	Coluna: Hypersil Golden® (150×2,1 mm; 3,5 µm). Fase móvel: (A) metanol, (B) acetonitrila e (C) acetato de amônio 5 mM e solução aquosa de ácido fórmico a 0,2 %, inicialmente (20:2:78, v/v/v), após 4 min (20:5:75, v/v/v), por fim (20:10:70, v/v/v) aos 20 min, mantendo-se por 5 min. Vazão: 0,25 mL/min. O volume de injeção foi de 10µL.	278 nm	Diferentes tecidos de animais	YU et al., 2012

Continua na próxima página

Tabela 1. (Continuação) Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-EM/EM	Coluna: Thermo Fisher Scientific® accucore fenilhexil (100 × 2,1 mm; 2,6 μm). Fase móvel: HCOOH a 0,5 % em solução tamponante de acetato de amônio 1 mM (eluente A) e metanol (eluente B) (1:10, v/v). Vazão: 0,2 mL/min aumentado para 0,6 mL/min. O volume de injeção foi de 2 μL.	280 nm	Plasma de frango	JANUSCH et al., 2014
CLAE-EM/EM	Coluna: Luna® C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: HCOOH (0,5 %) em água ultrapura-ACN (85:15, v/v). Vazão 1,2 mL/min. O volume de injeção foi de 5 μL.	$m/z = [m+1]^+ = 337$	Adsorção de argilas montmorilonita e caulinita	STURINI et al., 2015
CLM-FL	Coluna: Kromasil Scharlab® C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm). Fase móvel: 5 % de etanol e SDS 0,05 M (5:95, v/v). Vazão: 1 mL/min em temperatura ambiente em modo isocrático. O volume de injeção foi de 20 μL.	300/488 nm	Mel	TAYEB-CHERIF et al., 2016

Continua na próxima página

Tabela 1. (Continuação) Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
IV	Diluyente: solução de β -CD-AgNPs.	Bandas características	β -CD-AgNPs	ZHAO et al., 2020
Microbiológico	Microrganismo: <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922). Diluições seriadas de dez vezes (em PBS pH = 7, de 10^{-1} a 10^{-8}). 100 μ L de cada diluição foram inoculados em placas de ágar MacConkey (MLA) ($n = 3$) e incubados durante a noite a 37 C.	Suscetibilidade	Flora intestinal de cabras	BHARDWAJ et al., 2020
UV	Diluentes: água, 0,01 M CaCl ₂ .	290 nm	Argila montmorilonita	RIVAGLI et al., 2014
UV	Diluentes: 4 mL de diclorometano + acetona (1:3, 2:2, 3:1, v/v) e 3 mL de clorofórmio.	335 nm	Micropartículas poliméricas	LEE et al., 2016
UV	Diluentes: H ₃ PO ₄ (85 %, 1:5, p/p), 10 mL de solução aquosa 100 mM de TBAH-ACN (70:30, v/v), HCl e NaOH.	290 nm	Sepiolitas	STURINI et al., 2016

Continua na próxima página

Tabela 1. (Continuação) Métodos analíticos existentes na literatura para análise do marbofloxacino

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
UV	Diluyente: ACN. Reagente: borato de sódio (bórax) $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.	360 a 512 nm	Tecido liofilizado de animais	PAGANI & IBAÑEZ, 2019
UV	Diluentes: solução padrão de MB-Ca (ou MB) em água a 35 C.	291 e 332 nm	MB-Ca	XIE et al., 2020
UV	Diluentes: solução de β -CD-AgNPs.	288 e 336 nm	β -CD-AgNPs	ZHAO et al., 2020

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês HPLC: *high performance liquid chromatography*); β -CD: β -ciclodextrina; β -CD-AgNPs: nanopartículas de prata modificadas com ciclodextrina (do inglês: *cyclodextrin-modified silver nanoparticle*); MB-Ca: complexo de cálcio (II) do marbofloxacino (do inglês: *calcium (II) complex of marbofloxacin*); MB: marbofloxacino; CLAE-DF: cromatografia líquida de alta eficiência com detector fluorimétrico (do inglês HPLC-FD: *high performance liquid chromatography fluorimetric detector*); CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês LC-MS/MS: *liquid chromatography tandem mass spectrometry*); UV: ultravioleta; UV-Vis: ultravioleta-visível; CLM-FL: cromatografia líquida micelar com detector fluorescente (do inglês MLC-FL: *micelar liquid chromatographic fluorescence*); CLAE-EM/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (do inglês HPLC-

ESI-MS/MS: *high performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*); ACN: acetonitrila; SDS: surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio; TEA: trietilamina; HCl: ácido clorídrico; NaOH: hidróxido de sódio; CaCl₂: cloreto de cálcio; HCOOH: ácido fórmico; H₃PO₄: ácido fosfórico; AgNO₃: nitrato de prata; NaCl: cloreto de sódio; NH₃: hidróxido de amônia; H₂O: água; CuSO₄: sulfato de cobre; HTBA: hidróxido de tetrabutyl amônio (do inglês TBAH: *tetrabutyl ammonium hydroxide*); Mg (NO₃)₂: nitrato de magnésio.

A proporção dos diferentes tipos de métodos analíticos disponíveis para avaliação do MAR é explanada na Figura 2.

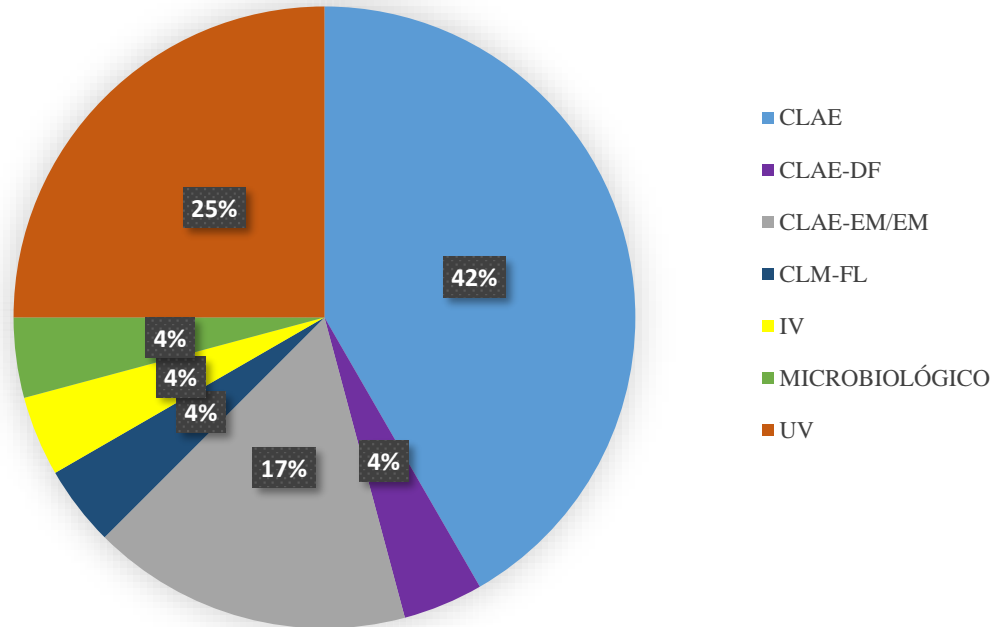


Figura 2. Representação gráfica dos métodos de análise descritos na literatura para o marbofloxacino.

2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método de análise tem como princípio provar que o método em questão é adequado ao fim que lhe é proposto. Com isso apresenta alguns outros objetivos dos quais incluem a determinação de quantidade, necessidade ou propriedades que um ingrediente apresenta em um produto; também a identificação de um produto e seus constituintes, se o mesmo satisfaz as especificações e regulamentos exigidos; e ainda proporcionar ambiente adequado (AOAC, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Comumente são relatados os surgimentos de deficiências, interferências, falta de reagentes ou instrumentos, entre outros problemas inesperados, quando se trata de uma experiência inicial com a validação ou aplicação de um método. Dessa forma, se torna necessário retornar esse método a etapa de desenvolvimento, apesar de que geralmente não é

possível distinguir esses dois procedimentos, que assim atuam de forma interativa. Além disso, um método pode funcionar positivamente em um laboratório, mas em outro não. Sendo assim, estão envolvidos na validação algumas particularidades do desenvolvimento que possibilitam uma visão do desempenho do método (AOAC, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Pode ser preciso uma revalidação em casos que possam apresentar alterações no que se refere a síntese da substância do medicamento, na composição do produto acabado ou no procedimento analítico. Assim, para que o grau de revalidação seja definido, deve-se considerar os diferentes tipos de alterações (ICH, 2005).

O objetivo do procedimento analítico deve ser bem esclarecido e entendido, pois é através disto que são regidas as características de validação que precisam de avaliação. Dessa forma, podem ser citados alguns aspectos de validação geralmente utilizados como precisão, repetibilidade, precisão intermédia, especificidade, seletividade, exatidão, limite de detecção e de quantificação, linearidade (AOAC, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.4.1. Seletividade/especificidade

Pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (UIQPA ou IUPAC do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) o termo especificidade caiu em desuso, dando espaço ao termo mais aceito seletividade. Dessa forma, a seletividade consiste em categorizar o quanto o método é capaz de avaliar o analito alvo em meio a outros componentes, e também matrizes, entre outros elementos degradantes como impurezas ou solventes. Então, a mesma pode ser feita a partir da separação da substância de análise, com auxílio de procedimentos de separação de fases, como de extração seletiva com solvente, extração em fase sólida, cromatografia, ou pela utilização de mecanismos próprios da substância a ser analisada, que incluem reações bioquímicas ou instrumentação (AOAC, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Quando ocorre carência de seletividade, em determinado método analítico individual, podem ser assimilados outros métodos para assistência, que condizem com identificação, avaliação de pureza, ou ensaios. Além disso, a partir da validação concernente a esses testes de apoio, a seletividade pode ser investigada, a depender do objetivo do procedimento determinado (ICH, 2005).

Os métodos envolvendo seletividade devem demonstrar boa aplicabilidade em obtenção de resultado positivo para quando a amostra consistir analito e resultado negativo para presença de outros componentes na amostra, podendo ser utilizada a combinação de vários métodos, visando alcançar o nível necessário de seletividade. Ainda assim, utiliza-se dos ensaios para se alcançar resultado negativo em casos de substâncias que são comuns ao analito desejado, como adulterantes os substituintes, demonstrando dessa forma seletividade (BRASIL, 2017).

2.4.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico consiste na capacidade de se alcançar na amostra respostas de testes em proporção direta à concentração do analito. Dessa forma, uma relação linear deve ser analisada por toda a região estabelecida para o procedimento, em que havendo essa estimativa de linearidade devem ser envolvidos métodos estatísticos próprios para avaliação das respostas (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Além disso, antes que seja feita uma avaliação de regressão, em determinados casos de obtenção da linearidade, os dados encontrados podem ser demonstrados através da matemática, possibilitando análise do grau de linearidade, no qual os cálculos feitos para essa análise devem ser obtidos através dos dados de concentrações reais com resultados analíticos individuais (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Também, com a utilização do procedimento proposto, a linearidade pode ser verificada com base no componente do medicamento, que pode ser associado a pesagens separadas de misturas sintéticas das substâncias do produto do medicamento. Diante disso, para que a

linearidade seja determinada, as soluções utilizadas devem ser dispostas de maneira independente, podendo ser assimiladas por diluição a partir de uma mesma solução de estoque padrão. Sendo assim, devem ser utilizadas no mínimo cinco concentrações distintas da substância química de referência (SQR) com soluções preparadas a partir de no mínimo três testes (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.4.3. Precisão

Em um método analítico, precisão pode ser descrita como a capacidade de que seja alcançado um grau próximo de conformidade entre ensaios com múltiplas medições de diversas amostras homogêneas e autênticas, que partem de uma amostra padrão, preparadas de acordo com determinadas circunstâncias do método a ser validado. Em casos onde não é possível o resultado homogêneo da amostra, pode ser feita uma avaliação com auxílio de amostras artificiais. Também, em ensaios com amostras sólidas e semissólidas, não se recomenda o uso de soluções diluídas partindo de uma solução padrão (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Dessa forma, a precisão pode ser expressa em três categorias, que incluem repetibilidade, intermediária e reprodutibilidade. Além disso, pode ser expressa por variância, desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR) de uma sucessão de medidas, em que esses dados juntamente com o intervalo de confiança devem ser relatados para cada tipo de precisão avaliada (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Em conformidade, a repetibilidade ou precisão intra-ensaio, permite obtenção de precisão sob condições operacionais iguais em uma faixa curta de tempo, podendo ser avaliada através de no mínimo nove determinações ou seis a cem por cento da concentração do ensaio. Já a precisão intermediária demonstra variações dentro dos laboratórios, em diferentes dias, analistas, instrumentos, entre outros, dependendo assim das condições do procedimento. A reprodutibilidade apresenta a precisão em laboratórios, através da proximidade de resultados provenientes de laboratórios distintos, podendo ser aplicada em pesquisas colaborativas que

visam a padronização do método, como por exemplo a inclusão desses em farmacopeias (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.4.4. Exatidão

Essa técnica analítica pode ser demonstrada através do nível em concordância entre as respostas individuais do procedimento analisado em relação a um valor aceito como verdadeiro. Para ser verificada, a exatidão precisa de no mínimo nove determinações, que englobam uma faixa linear do procedimento analítico, isto é, três concentrações: baixa, média e alta, com três cópias em cada nível. Além disso, as amostras nesse método devem ser produzidas de forma independente, e ainda com o uso de soluções diluídas a partir de uma mesma solução de estoque padrão (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Para que a exatidão seja obtida, deve ser priorizada a abordagem apropriada em concordância com o método analítico estudado, incluindo para insumos farmacêuticos ativos, para produto final ou para impurezas. No que se refere as concentrações dos analitos, um mesmo modelo de cálculo deve contemplar todos os casos, de acordo com o determinado método. Sendo assim, o desvio padrão relativo deve ser calculado para cada uma das concentrações (BRASIL, 2017).

São variados os métodos disponíveis para que a exatidão seja alcançada, como por exemplo, a utilização de um procedimento analítico envolvendo um analito de pureza ou de impureza conhecida, ou quando envolve complexos sintéticos que têm como base a adição de quantidades conhecidas da substância farmacêutica de análise. Além disso, a exatidão pode ser inferida a partir da determinação da precisão, linearidade e seletividade (ICH,2005).

2.4.5. Robustez

A robustez de um processo analítico pode ser determinada pelo potencial de resistência a pequenas e deliberadas variações nos princípios do procedimento, o que permite um determinado grau de confiabilidade de uma análise durante o uso habitual. A avaliação desse

aspecto de validação deve ser utilizada durante a fase de desenvolvimento a depender do tipo de procedimento em estudo. Entretanto, em casos em que há interferência das variações, as condições analíticas devem ser controladas adequadamente, ou deve ser incluída no método uma declaração de precaução (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

A avaliação da robustez deve derivar princípios estabelecidos de adequação sistemática, que possam garantir que a validade do método analítico seja pertinente sempre que empregado. Diante disso, em métodos quantitativos os mesmos critérios de exatidão devem ser aplicados para medir a repercussão das variações dispostas nos resultados, qualitativos, avalia-se se as variações oferecidas estão inferindo nas respostas obtidas. Sendo assim, ressalta-se que quando qualquer variação não seja avaliada, deve existir uma justificativa para tal (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.4.6. Limite de detecção (LD)

Esse aspecto de validação pode ser entendido como a obtenção de quantidade mínima de analito em uma amostra, que pode ser verificado, no entanto não quantificado, sob circunstâncias previamente determinadas pelo experimento. São vários os métodos, para determinar o LD, a depender do tipo de procedimento, dentre esses tipos tem-se o método visual, sinal-ruído, instrumental e não-instrumental (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Diante disso, a avaliação visual determina o LD, com base em análises amostrais com concentrações conhecidas de analito e também partindo do menor nível de concentração que o analito pode ser visualizado com confiabilidade, essa avaliação pode envolver métodos instrumentais e não-instrumentais. A abordagem pautada na razão sinal-ruído, pode ser utilizada apenas em experimentos analíticos que apresentem ruído de base, podendo ser determinada através da comparação de sinais amostrais estimados em baixas concentrações conhecidas de analito com amostras de branco, além de estipular uma concentração mínima

aceitável no qual seja possível verificar o analito, em que uma relação sinal-ruído aceitável deve ser maior ou igual a 2:1 (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Além disso, o limite de detecção pode ser calculado através da Equação I:

$$LD = (3,3 \times \sigma) / (IC) \text{ Equação I}$$

Em que σ equivale ao desvio padrão da resposta; e IC é a inclinação da curva de calibração. Dessa forma, a IC pode ser determinada a partir da curva de calibração da substância de análise, já a estimativa de σ pode ser obtida através de diversas formas, como por exemplo, baseando-se no desvio padrão do branco, no qual pode-se calcular o desvio padrão através de respostas provenientes da análise de uma determinada quantidade de amostras em branco; ou respaldando-se na curva de calibração, em que ao se usar amostras contendo um analito dentro do LD, pode-se alcançar uma curva de calibração específica, que ao ser analisada apresenta o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, e também a partir do desvio padrão residual de uma linha de regressão, podendo servir como o desvio padrão desejado (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.4.7. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação infere a quantidade mínima de analito em uma amostra que pode ser estabelecida em suma com precisão e exatidão toleráveis em conformidade com as circunstâncias analíticas determinadas, esse tipo de aspecto de validação é mais utilizado para determinação de impurezas e/ou produtos de degradação. As técnicas para obtenção desse limite são variadas, mas dependem do tipo de procedimento disposto, que são os mesmos apresentados no tópico de limite de detecção (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Sendo assim, a avaliação visual nesse caso pode ser usada a partir de métodos não instrumentais e de métodos instrumentais, em que o LQ pode ser visualizado por meio de análises de amostras com contrações conhecidas de analito, estabelecendo ainda o menor nível para quantificação desse analito, almejando precisão e exatidão adequadas. Por outro lado, para utilizar-se da abordagem de sinal-ruído, os procedimentos analíticos devem oferecer ruído de

base, assim como já apresentado para limite de detecção, esse método pode ser determinado por meio de comparação, se diferenciando deste em função da razão sinal-ruído, que para o LQ é de no mínimo 10:1 (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Além disso, o limite de quantificação pode ser calculado através da Equação II:

$$LQ = (10 \times \sigma) / (IC) \text{ Equação II}$$

E assim como no tópico de LD, σ equivale ao desvio padrão da resposta, e IC à inclinação da curva de calibração, podendo os mesmos serem calculados da mesma forma que já explicado no tópico de LD, ou seja, com base no desvio padrão do branco, ou na curva de calibração, em que neste último método há a diferença que para a obtenção do desvio padrão são utilizadas amostras contendo um analito dentro da faixa do LQ (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.5. QUÍMICA ANALÍTICA VERDE (QAV)

No ano de 1998, Anastas e Warner trouxeram o conceito de Química Verde (QV), em que visa promover a produção mais ecológica em laboratórios e indústrias, exaltando a necessidade de redução ou eliminação do uso e da geração de agentes tóxicos à saúde e ao meio ambiente, como por exemplo com a utilização de solventes mais seguros, benignos e menos tóxicos, ou o não uso dos mesmos, além disso levanta a importância da redução de reagentes e auxiliares (TOBISZEWSKI et al., 2015).

Dessa forma, a QV se apoia sobre doze princípios, sendo eles: Prevenção; Economia de átomos; Síntese de produtos menos perigosos; Desenho de produtos seguros; Uso de solventes e auxiliares seguros; Eficiência energética; Uso de matérias-primas renováveis; Evitar a formação de derivados; Catálise; Desenho para a degradação; Análise em tempo real; Química intrinsecamente segura (SANDRI & FILHO, 2019).

Assim, Paul Anastas em 1999, levantou a discussão da importância dos princípios que edificam a QV, no desenvolvimento de novos métodos e técnicas analíticas, em prol da redução

de danos ambientais, considerando que a difusão de metodologias analíticas é um estudo muito diligente na pesquisa e desenvolvimento da QV, foi feita uma adaptação dos doze princípios para atender a chamada Química Analítica Verde (QAV) (MARCO et al., 2019).

Diante disso, ao se considerar a importância que a obtenção do produto tem no desenvolvimento químico industrial, e que no decorrer da produção existem os resíduos gerados pelo produto final, os impactos ambientais da metodologia analítica e suas alternativas devem ser monitorados de forma apropriada, pois o procedimento analítico contribui para a geração de resíduos, no qual o mesmo visa a criação de um produto muito específico, em que as perdas no processo não podem ser totalmente extinguidas, mas podem ser reduzidas, assim relevando os princípios da QAV (TOBISZEWSKI, 2015).

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a validação analítica de um método por espectrofotometria na região do UV para avaliação de comprimidos de MAR, visando obedecer aos princípios da QAV e sustentável.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material

O padrão utilizado foi o marbofloxacino, teor de 100,1 %, lote 2020051801, adquirido pela Farmácia de Manipulação Veterinária Droga VET (Goiânia, Goiás, Brasil).

A forma farmacêutica utilizada foi comprimido de marbofloxacino 27,5 mg, lote 002, adquiridos no comércio (Pet Shop Atacadão Animal, Goiânia, Goiás, Brasil). Na composição dessa forma farmacêutica os adjuvantes são: 15 % de celulose microcristalina (CAS 9004-34-6), 8 % de estearato de magnésio vegetal (CAS 557-04-0), 0,22 % de glicolato de amido sódico (CAS 9063-38-1), 15,38 % de fosfato de cálcio dibásico (CAS 7757-93-9) e 12,55 % de lactose malha 100 (CAS 63-42-3).

4.2. Diluentes

No ensaio foram utilizados como diluentes a água purificada, água purificada: etanol (80:20, v/v), água purificada: etanol (82:18, v/v) e água purificada: etanol (90:10, v/v).

4.3. Equipamentos

Balança analítica modelo AUW220D (Shimadzu®), Balança semianalítica modelo BK3000 classe II (Gehaka®) para pesar padrão, Espectrofotômetro UV VIS de varredura modelo Q798U2VS (Quimis®) e cubeta de quartzo foram utilizados no estudo.

4.4. Desenvolvimento de método analítico

4.4.1. Peso médio

Para a realização do peso médio foram pesados individualmente 20 comprimidos. Em que os limites superior e inferior e o valor médio foram descritos através de um gráfico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

4.4.2. Seleção do diluente

O MAR foi testado nos diluentes: água purificada, água purificada: etanol (80:20, v/v), água purificada: etanol (90:10, v/v). Sendo preparadas soluções, para serem testadas após 0, 4, 6, 8 e 24 horas para que se verifique a solubilidade e estabilidade do MAR nestes diluentes.

4.4.3. Desenvolvimento do método

Os 20 comprimidos de marbofloxacino (Marbopet 27,5 mg, laboratório CEVA®) foram colocados em um gral de porcelana, então triturados e homogeneizados com pistilo, em que o pó formado foi transferido para um recipiente de vidro âmbar, assim foi obtida a amostra.

Foram pesados 0,00499 g (equivalente a 5 mg) de padrão MAR e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, em que todas as soluções estoque foram submetidas a 2 minutos em banho ultrassônico antes de sua utilização, e seus volumes completados com os diluentes já mencionados.

Para cada diluente foram feitas diluições a partir da solução estoque, até obter concentração com valores de absorvância dentro dos limites da Lei de Lambert-Beer. Sendo as leituras feitas em intervalos de tempo definidos em 0, 4, 6, 8, e 24 horas, para verificar a estabilidade do fármaco nos diferentes diluentes.

4.4.4. Curva de Ringbom

Foram pesados, 0,00499 g de MAR padrão, e transferidos para balão volumétrico de 50 mL para produção de solução estoque. A substância foi dissolvida em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantida em banho ultrassônico por 2 minutos. O volume do balão foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 100 µg/mL. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas para balão volumétrico (5 mL), obtendo-se a curva com 33 pontos, com concentrações variando de 0,1 a 30 µg/mL de MAR. As leituras das soluções foram efetuadas a 296 nm, utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) como branco. A curva analítica foi construída em triplicata.

4.5. Validação do método

4.5.1. Linearidade

A partir da curva de Ringbom foram escolhidos 6 pontos para avaliação da linearidade do método. Para isso foram pesados 0,00499 g de MAR padrão, transferidos para balão volumétrico de 50 mL, dissolvidos em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantidos em aparelho de ultrassom por 2 minutos. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas soluções com concentrações de 3,0 a 9,0 µg/mL de MAR. As leituras das soluções foram efetuadas a 296 nm, utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) como branco. A curva analítica foi construída em três dias diferentes e em triplicata.

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

4.5.2. Precisão

Foi avaliada a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para isso foram pesados 0,00499 g de padrão MAR transferidos para balão volumétrico de 50 mL, dissolvidos em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantidos em aparelho de ultrassom por 2 minutos. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas seis soluções com a mesma concentração de 6,0 µg/mL de MAR. As leituras das soluções foram efetuadas a 296 nm, utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) como branco. Foram feitos três níveis de precisão, como se descreve a seguir.

Precisão intradia: concordância entre os resultados dentro de um único dia com o mesmo analista e mesma instrumentação. Sendo feita a partir da leitura de seis soluções na concentração de 6,0 µg/mL de padrão MAR, de uma mesma solução estoque, analisadas estatisticamente.

Precisão interdia: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com mesmo analista e mesma instrumentação. A determinação da precisão interdia foi feita em dois dias seguidos, sendo comparadas as leituras de forma estatística.

Precisão interanalista: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas em dias diferentes e com analistas diferentes e mesma instrumentação. A partir da leitura de seis soluções na concentração de 6,0 µg/mL de padrão MAR, para cada analista, e analisadas estatisticamente.

A precisão foi expressa com o desvio padrão e desvio padrão relativo destas séries de medidas, segundo a Equação III:

$$\text{DPR (\%)} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100 \text{ Equação III}$$

Em que:

DP = desvio padrão

CMD = a concentração média determinada

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5 %.

4.5.3. Seletividade

Verificou-se a capacidade que o método possui de quantificar MAR na amostra. Para isso foi utilizada uma solução na concentração de 6,0 µg/mL de padrão MAR, e uma de amostra MAR na mesma concentração, diluídas das respectivas soluções estoque já preparadas, descritas no item 8.5.6 abaixo, as leituras destas soluções foram efetuadas a 296 nm, utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) como branco.

4.5.3.1. Degradação Forçada

Para verificar a seletividade do método foram realizados ensaios de degradação forçada. Sendo assim, inicialmente foram preparadas as soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M e

hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. Para o preparo da solução de HCl 0,1 M foi transferida uma alíquota de 212,5 µL de HCl concentrado para um balão volumétrico de 25 mL já previamente preenchido parcialmente com água purificada, após, o balão foi completado com água purificada e a solução foi homogeneizada. Na solução de NaOH 0,1 M foram pesados 0,1 g de NaOH em um béquer, que foi lavado com água purificada tendo todo o seu conteúdo transferido para um balão de 25 mL, então o balão foi completado com água purificada e homogeneizado. Todas as soluções foram preparadas em capela. Assim foram obtidas as duas soluções a serem utilizadas como degradantes.

Então, foram pesados 0,01396 g de amostra MAR (equivalente a 2,5 mg de MAR padrão) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, para produção de solução estoque. A substância foi dissolvida em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantida em banho ultrassônico por 2 minutos, para completa solubilização do fármaco. O volume do balão foi completado com o mesmo diluente, obtendo-se solução com concentração final de 100 µg/mL. A partir desta solução estoque, uma alíquota de 18 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o mesmo diluente da solução estoque, obtendo-se solução de trabalho de concentração de 18 µg/mL. Após, 20 mL desta solução foram transferidos para cada um dos quatro frascos de vidro, sendo acrescentados respectivamente em cada um dos frascos 20 mL de soluções de HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M e diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) aos dois últimos frascos, assim essas soluções foram homogeneizadas obtendo-se as soluções para degradações ácida, básica, neutra e fotolítica, respectivamente.

As degradações ácida, básica e neutra foram realizadas em banho a 60 °C por 2 horas, enquanto a degradação fotolítica foi feita também por 2 horas, mas sendo exposta em câmara de luz UV em temperatura ambiente. Para cada uma das quatro soluções, foram retiradas alíquotas para leituras efetuadas a 296 nm em espectrofotômetro, feitas em intervalos de tempo definidos em 0, 0,5, 1 e 2 horas. Foi utilizado como branco o diluente água purificada: etanol

(80:20, v/v). O preparo de soluções e as condições de degradação analisadas são demonstradas pelo esquema exemplificado pela Figura 3.

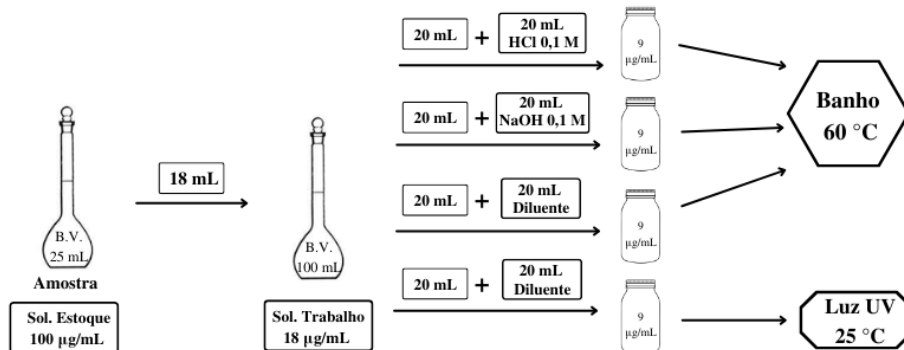


Figura 3. Esquematização do preparo para análise de degradação forçada de amostra MAR.

4.5.4. Exatidão

A exatidão foi determinada pela proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Foi utilizada a análise pelo método de adição de solução padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas do padrão de referência ao medicamento. A exatidão foi calculada como teste de recuperação da quantidade conhecida do padrão de referência adicionado à amostra.

Foram selecionadas concentrações dentro da faixa linear de 3,0 a 9,0 µg/mL, obtendo-se diluições com concentração 3,0 µg/mL para solução MAR padrão e para MAR amostra, assim diluições na concentração de 6,0 µg/mL equivalentes a 100 % foram feitas para o R2, já para o R1 a concentração de 4,8 µg/mL (80 %) foi utilizada, e para o R3 foram feitas diluições na concentração de 7,2 µg/mL (120 %). Para o preparo da solução estoque padrão, foram pesados 0,00499 g de padrão MAR, transferidos para balão volumétrico de 25 mL, dissolvidos em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantidos em aparelho de ultrassom por 2 minutos. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas três diluições com a mesma concentração de 3,0 µg/mL de MAR padrão, equivalentes a alíquotas de 75 µL. Para o preparo da solução estoque amostra, foram pesados 0,02793 g de amostra do MAR (equivalente a 5 mg

de MAR padrão), transferidos para balão volumétrico de 25 mL, dissolvidos em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantidos em aparelho de ultrassom por 2 minutos. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas três diluições com a mesma concentração de 3,0 µg/mL de MAR amostra, equivalentes a alíquotas de 75 µL. Para o preparo das diluições do R1, feitas em triplicata, foram misturados em cada diluição 75 µL de solução amostra e 45 µL de solução padrão, obtendo-se concentração final de 4,8 µg/mL. Para o preparo da R2, em triplicata, foram misturados em cada diluição 75 µL de solução amostra e 75 µL de solução padrão, obtendo-se concentração igual a 6,0 µg/mL. Para o preparo da R3, em triplicata, foram adicionados em cada diluição 75 µL da solução amostra e 105 µL da solução padrão, obtendo-se concentração igual a 7,2 µg/mL. Cada diluição já descrita foi feita em balão de 5 mL, tendo seu volume completado com diluente água purificada: etanol (80:20, v/v). Em que as leituras das soluções foram efetuadas a 296 nm, utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) como branco. Todo o procedimento descrito foi feito em triplicata e analisado por três dias.

4.5.5. Robustez

A robustez foi determinada pela avaliação da capacidade do método analítico em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Indicando assim sua confiança durante o uso rotineiro. Foram testadas pequenas e deliberadas alterações, de três diferentes formas.

Para cada uma das análises de alterações, foi preparada uma solução estoque, seguindo o procedimento de pesar 0,00499 g de padrão MAR, transferir para balão volumétrico de 25 mL, dissolver em diluente determinado, manter em aparelho de ultrassom por 2 minutos, exceto na terceira alteração. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas três soluções com a mesma concentração de 6,0 µg/mL de MAR. As leituras das soluções foram efetuadas de acordo com os comprimentos de onda determinados, utilizando diluente determinado como branco.

A primeira alteração foi a mudança de comprimento de onda, sendo feita a análise dos resultados obtidos pela variação de duas unidades de comprimento de onda acima e abaixo de 296 nm, assim 294 e 298 nm. As diluições e leituras foram feitas em triplicata para cada comprimento de onda.

Outra forma foi a alteração na porcentagem de etanol, utilizando diluente água purificada: etanol (82:18, v/v), foi feita a leitura a 296 nm, comparando-se com a leitura a 296 nm utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v). As diluições e leituras foram feitas em triplicata.

A terceira alteração foi de não se utilizar o aparelho ultrassom para preparo da solução estoque. Foi feita a leitura a 296 nm, em triplicata das soluções obtidas, e comparou-se com a leitura a 296 nm da solução estoque preparada na primeira alteração.

Os resultados obtidos pelas variações foram analisados por teste F (Snedecor) e teste t (Student).

4.5.6. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) do MAR foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas do ensaio de linearidade, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (b) e inclinação média do coeficiente angular (a), conforme a Equação IV:

$$LD = (3,3 \times \sigma \text{ de } b) / (\text{IC de } a) \text{ Equação IV}$$

O limite de quantificação (LQ) do MAR foi obtido com base nos mesmos dados descritos acima, segundo a Equação V:

$$LQ = (10 \times \sigma \text{ de } b) / (\text{IC de } a) \text{ Equação V}$$

Em que:

IC = inclinação da curva de calibração

σ = desvio padrão da resposta

4.5.7. Doseamento

Para essa etapa foram pesados 0,02793 g de amostra do MAR (equivalente a 5 mg de MAR padrão), transferidos para balão volumétrico de 25 mL, dissolvidos em água purificada: etanol (80:20, v/v) e mantidos em aparelho de ultrassom por 2 minutos. Com a utilização de pipetadores automáticos foram obtidas seis soluções com a mesma concentração de 6,0 µg/mL de MAR. As leituras das soluções foram efetuadas a 296 nm, utilizando diluente água purificada: etanol (80:20, v/v) como branco. Para o preparo da solução padrão de MAR, foram pesados 0,00499 g, e seguiu-se da mesma forma já descrita para a análise da amostra. A análise foi feita por três dias e os resultados foram analisados estatisticamente.

5. RESULTADOS

5.1. Peso Médio

Na Tabela 2 estão dispostos os resultados do ensaio de peso médio dos comprimidos de MAR.

Tabela 2. Dados obtidos com a pesagem dos comprimidos de MAR

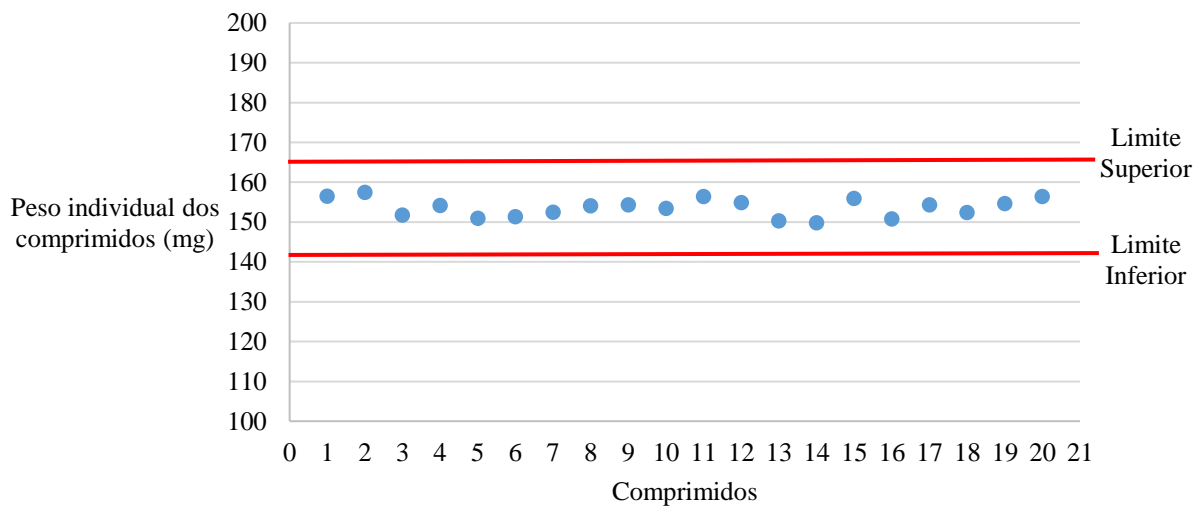
Comprimido	Peso individual (mg)	Peso médio(mg)	DPR (%)
1	156,52		
2	157,43		
3	151,72		
4	154,20		
5	150,92		
6	151,36		
7	152,50		
8	154,06		
9	154,36		
10	153,48	153,62	1,50
11	156,42		
12	154,90		
13	150,34		
14	149,79		
15	155,92		
16	150,79		
17	154,33		

Continua na próxima página

Tabela 2. (Continuação) Dados obtidos com a pesagem dos comprimidos de MAR

Comprimido	Peso individual (mg)	Peso médio(mg)	DPR (%)
18	152,36		
19	154,63		
20	156,44		

Para verificar a distribuição dos pesos obtidos para cada unidade da amostra estudada em relação aos limites superior e inferior foi elaborado a Figura 4, de acordo com a variação permitida pela Farmacopeia Brasileira (2019).

**Figura 4.** Variação do peso das vinte unidades de comprimidos de MAR.

5.2. Seleção do diluente

Foi feita a varredura na faixa de 200 a 400 nm para determinação do comprimento de onda de máxima absorção. Dessa forma, os parâmetros testados para o desenvolvimento do método estão dispostos na Tabela 3.

A partir dos dados da Tabela 3, constata-se que o fármaco apresentou maiores absorvâncias com o uso do diluente água purificada: etanol (80:20, v/v). A estabilidade foi

observada para cada um dos diluentes, destacando-se a água como mais estável entre os três, apresentando valores com menores variações.

Tabela 3. Parâmetros a serem testados durante o desenvolvimento do método

Diluyente	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Comprimento de onda (nm)	Absorvância*				
			(t0)	(t4)	(t6)	(t8)	(t24)
Água purificada	6	290	0,582	0,556	0,555	0,551	0,557
Água purificada: Etanol (80:20 v/v)	6	296	0,715	0,685	0,654	0,640	0,648
Água purificada: Etanol (90:10 v/v)	6	294	0,642	0,521	0,520	0,513	0,515

*Valores referentes a triplicata

Os espectros de absorção do MAR para cada diluyente testado, considerando o tempo 0, estão representados na Figura 5.

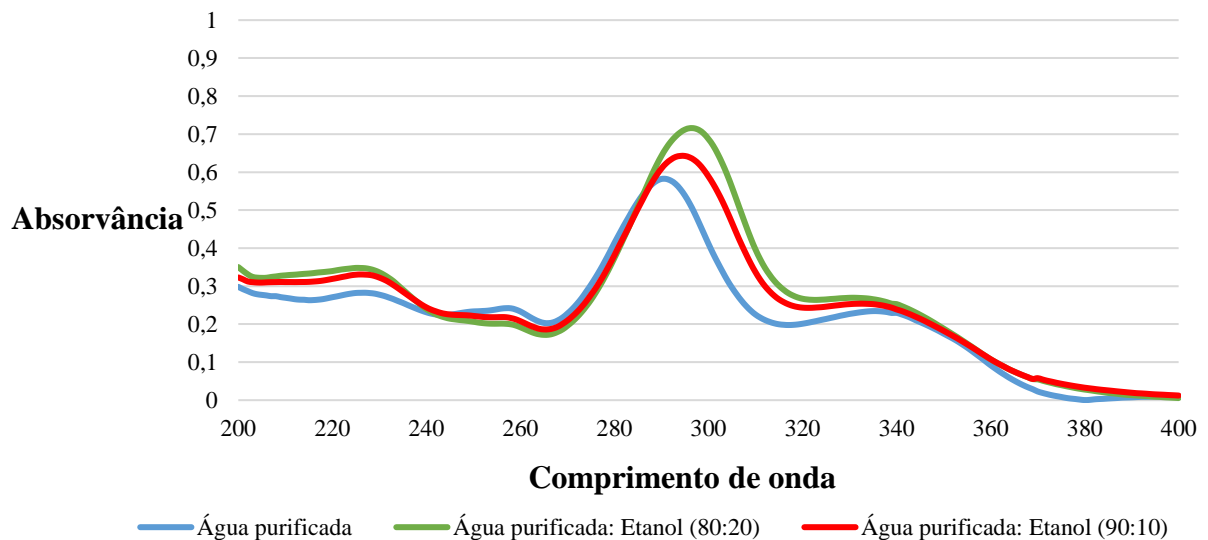


Figura 5. Sobreposição dos espectros de MAR em água purificada (azul), água purificada: etanol (80:20, v/v) (verde) e água purificada: etanol (90:10, v/v) (vermelho).

De acordo com o que demonstra a Figura 5, tem-se que o fármaco apresentou maior absorvância com o uso do diluente água purificada: etanol (80:20, v/v), com isso maior solubilidade, além disso, considerando os dados representados pela Tabela 3, manteve-se relativamente estável no decorrer das 24 horas de leitura.

5.3. Curva de Ringbom

Tabela 4. Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva de Ringbom do MAR por espectrofotometria na região do UV

Concentração (µg/mL)	Absorvância*	100 - % de Transmitância
0,1	0,007	1,607
0,2	0,008	1,928
0,4	0,018	4,149
0,6	0,040	8,815
0,8	0,053	11,558
1,0	0,078	16,512
1,5	0,129	25,731
2,0	0,183	34,425
2,5	0,248	43,548
3,0	0,273	46,647
3,5	0,373	57,668
4,0	0,390	59,227
4,5	0,428	62,659
5,0	0,491	67,723
5,5	0,526	70,185

*Média de 3 determinações

Continua na próxima página

Tabela 4. (Continuação) Valores das absorvâncias determinadas para a construção da curva de Ringbom do MAR por espectrofotometria na região do UV

Concentração (µg/mL)	Absorvância*	100 - % de Transmissão
6,0	0,568	72,976
6,5	0,629	76,477
7,0	0,677	78,971
7,5	0,690	79,591
8,0	0,761	82,644
8,5	0,785	83,580
9,0	0,853	85,962
10	0,943	88,601
12	1,109	92,228
14	1,308	95,083
16	1,464	96,564
18	1,647	97,748
20	1,852	98,592
22	2,068	99,145
24	2,380	99,583
26	2,598	99,748
28	2,836	99,854
30	3,135	99,927

*Média de 3 determinações

100-T

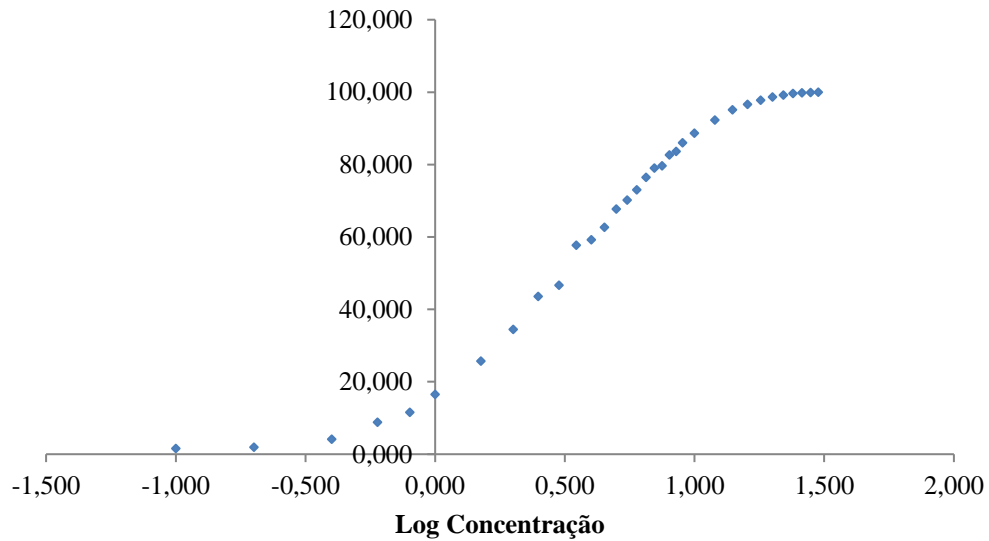


Figura 6. Curva de Ringbom para o MAR.

Considerando que cada valor corresponde à média de três determinações, os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de MAR padrão para a obtenção da curva de Ringbom são mostrados na Tabela 4 e Figura 6.

5.4. Linearidade

A curva analítica de MAR padrão foi construída com as médias das médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas com concentrações de 3,0 a 9,0 $\mu\text{g/mL}$ obtidas durante os ensaios de linearidade.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 0,0881x + 0,009$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9989, e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994, para o MAR padrão. Demonstram-se os resultados na Figura 7.

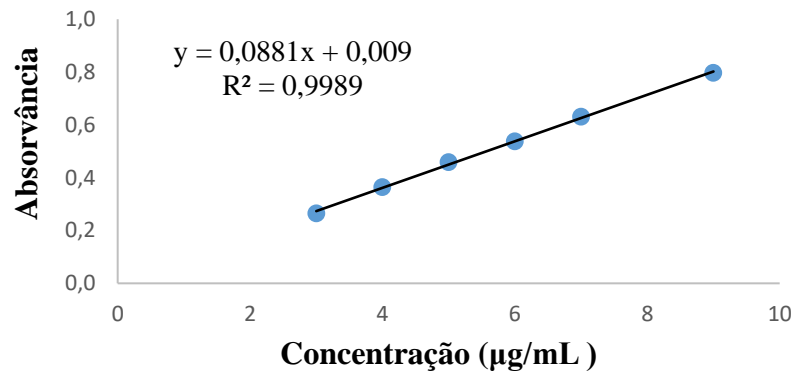


Figura 7. Curva analítica de soluções de MAR padrão, em concentrações de 3, 4, 5, 6, 7 e 9 µg/mL, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 296 nm.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de MAR padrão é mostrada na Tabela 5. A partir da ANOVA foi realizada a análise de resíduos com os 18 (dezoito) pontos em observação, exemplificado na Figura 8.

Tabela 5. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de MAR padrão, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F _{calc}	F _{tab}
Entre	5	0,54417	0,10883	26,07*	3,11
Regressão linear	1	0,54293	0,54293	130,07*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,00124	0,0003093	0,07	3,26
Resíduo	12	0,0041740	0,000347833	-	-
Total	17	0,54834	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$

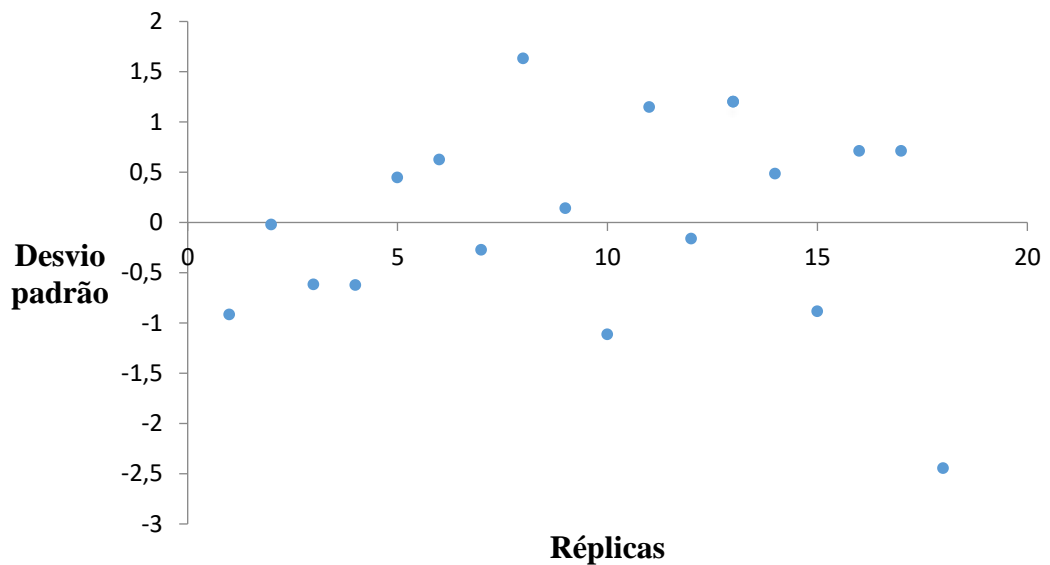


Figura 8. Gráfico de resíduos para o MAR padrão pelo método espectrofotométrico na região no UV.

5.5. Precisão

A precisão intradia foi comprovada através de tratamento estatístico com os valores obtidos na análise de seis diluições com concentração 6,0 $\mu\text{g/mL}$ de MAR padrão, avaliados dentro de um único dia, encontrando-se a média a partir das seis absorvâncias encontradas nas leituras, além da determinação do desvio padrão relativo das leituras analisadas. Para a precisão interdia foram utilizados valores obtidos na análise de seis diluições com concentração 6,0 $\mu\text{g/mL}$ de MAR padrão, sendo feitas e avaliadas por dois diferentes dias, encontrando-se a média e o DPR (%) a partir das absorvâncias das doze medidas (6 em cada dia). Na precisão interanalista foram utilizados valores obtidos na análise de seis diluições com concentração 6,0 $\mu\text{g/mL}$ de MAR padrão, feitas e avaliadas por dois diferentes analistas em dias diferentes, obtendo-se a média das doze absorvâncias, e também o DPR (%). Os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Análise dos níveis de precisão intradia, interdia e interanalista para o MAR padrão utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

296 nm	Absorvância						Absorvância	DPR
							média	(%)
Precisão intradia	0,526	0,519	0,512	0,526	0,519	0,512	0,519	1,20
Precisão interdia	0,539	0,536	0,530	0,521	0,516	0,519	0,523	1,68
	0,526	0,519	0,512	0,526	0,519	0,512		
Precisão interanalista	0,494	0,553	0,542	0,535	0,534	0,551	0,527	3,26
	0,526	0,519	0,512	0,526	0,519	0,512		

5.6. Seletividade

A Figura 9 apresenta a comparação dos espectros de absorção das soluções de MAR padrão e amostra, em água purificada: etanol (80:20, v/v), entre 200 e 400 nm.

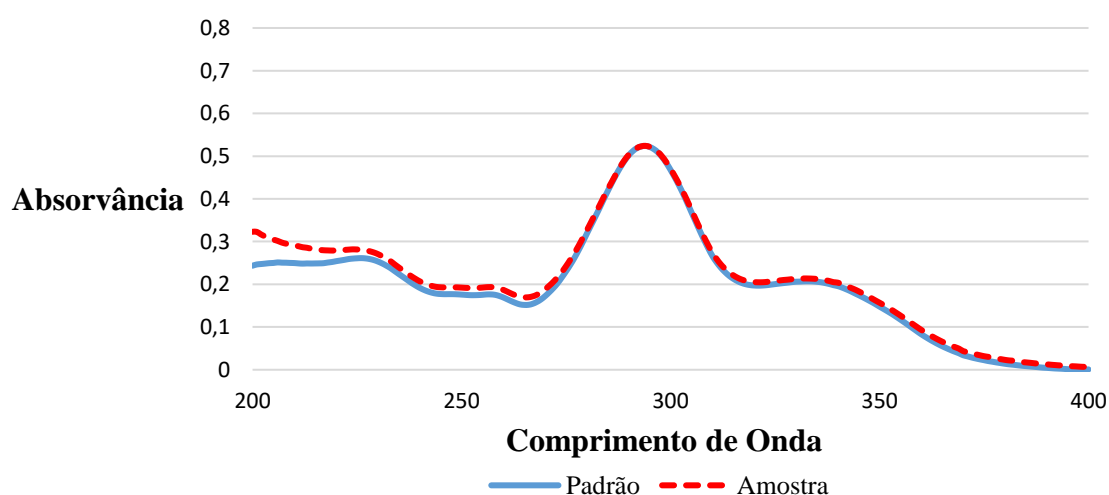


Figura 9. Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria na região do UV para as soluções de MAR padrão e MAR amostra preparadas em água purificada: etanol (80:20, v/v) na concentração de 6 µg/mL.

5.6.1. Degradação Forçada

As condições analisadas para o ensaio de degradação estão representadas pela Tabela 7.

Tabela 7. Condições de estresse para o estudo de degradação forçada de MAR em comprimidos

Parâmetro	Condição degradante
Solução ácida	0,1 M HCl à 60 °C
Solução básica	0,1 M NaOH à 60 °C
Solução neutra	Água purificada: etanol (80:20, v/v) à 60 °C
Fotólise	Água purificada: etanol (80:20, v/v); Câmara de luz UV à ± 25 °C

Dessa forma, para analisar a degradação em cada condição testada, foi feito o cálculo de acordo com a equação da reta determinada no ensaio de linearidade, e os resultados encontram-se dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores determinados para a avaliação dos ensaios de degradação de MAR, pelo método espectrofotométrico na região do UV

Condição degradante	Absorvância (t0)	Absorvância (t2)	Degradação (%)
0,1 M HCl	0,921	0,915	0,68
0,1 M NaOH	0,712	0,708	0,63
Água purificada: etanol (80:20, v/v)	0,640	0,639	0,14
Água purificada: etanol (80:20, v/v); Câmara de luz UV	0,653	0,456	30,64

Diante disso, os espectros de absorção contendo comparações entre os tempos 0 e 2 horas obtidos para cada uma das diferentes condições de degradação para o MAR, estão demonstrados pelas Figuras 10, 11, 12 e 13.

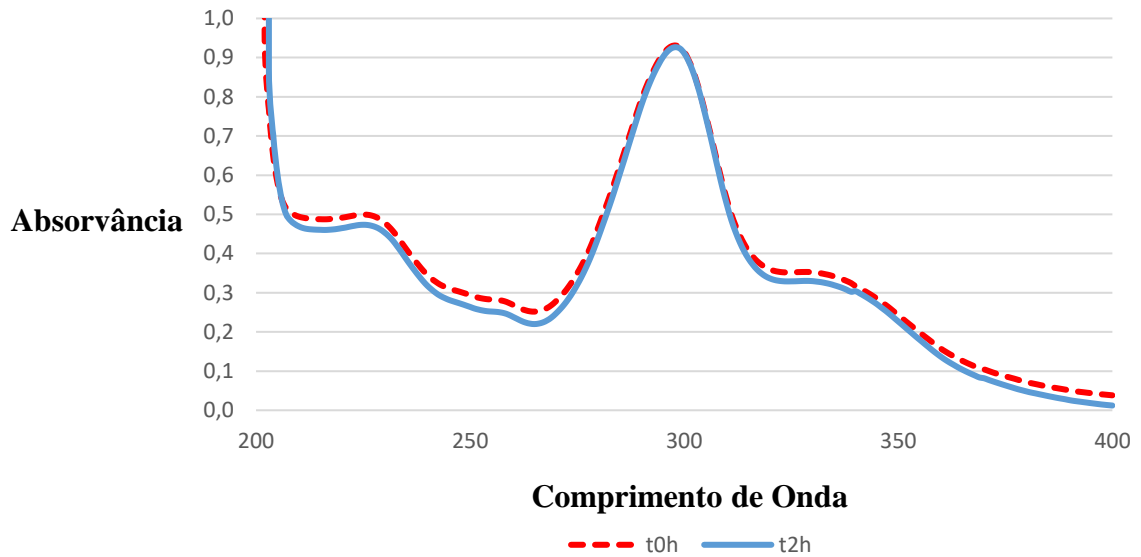


Figura 10. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse ácido no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).

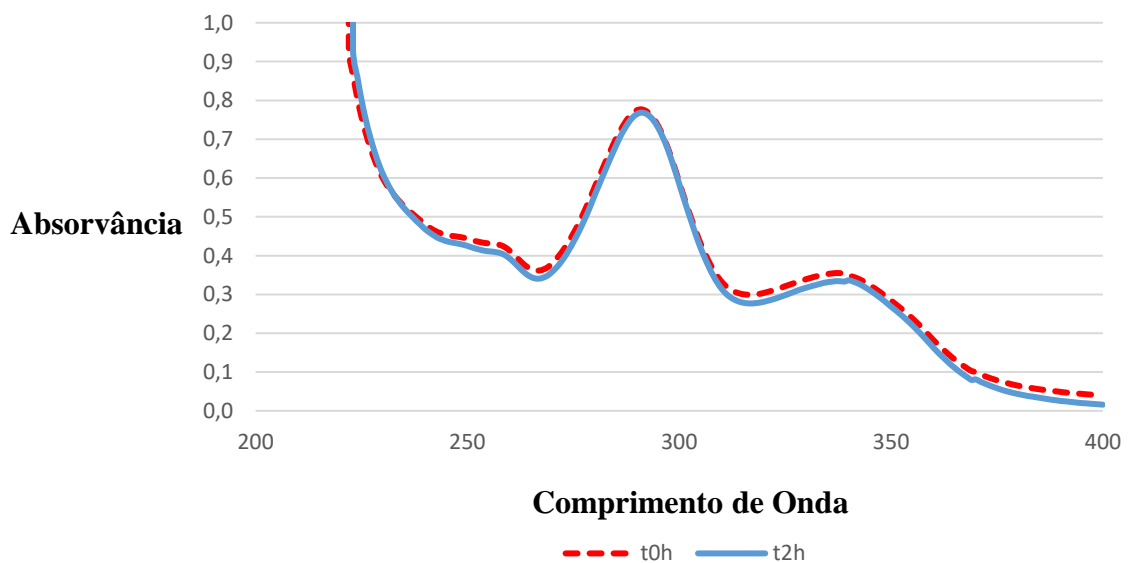


Figura 11. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse básico no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).

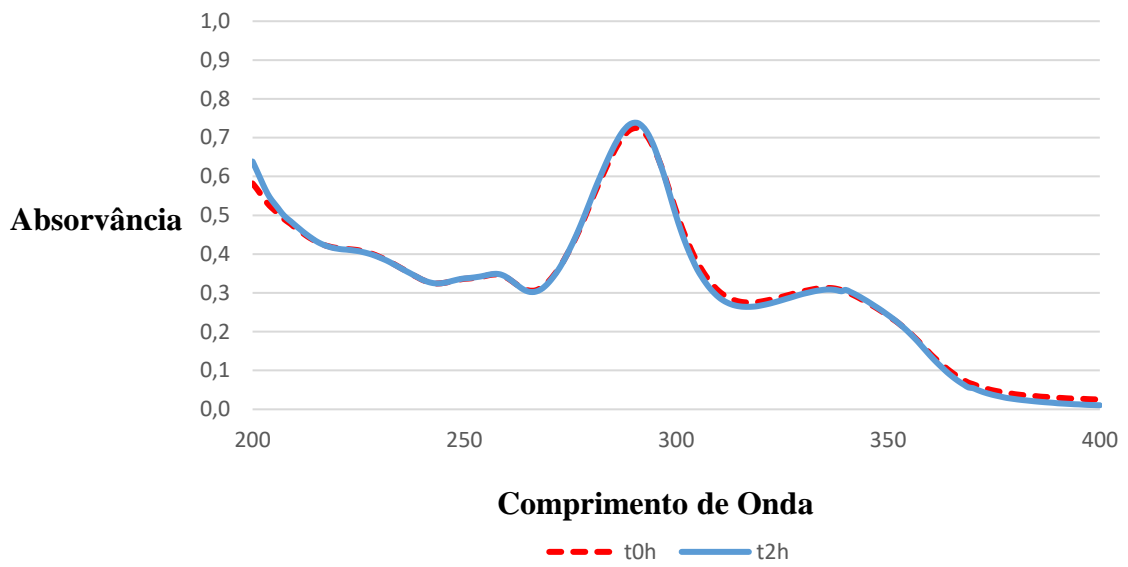


Figura 12. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse neutro no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).

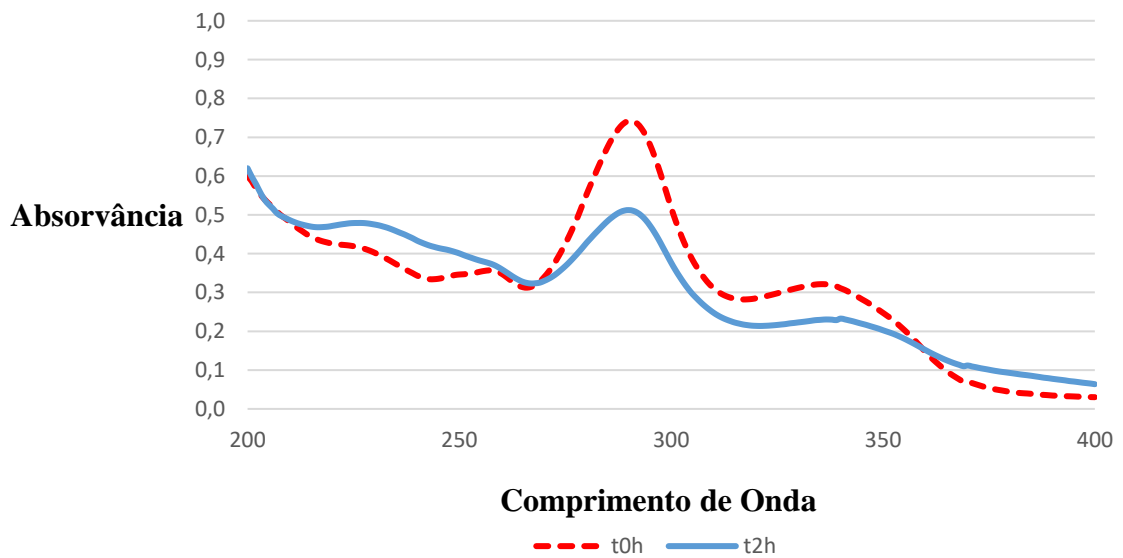


Figura 13. Sobreposição dos espectros de MAR na condição de estresse fotolítico no tempo 0 (vermelho) e tempo 2 h (azul).

5.7. Exatidão

Na Tabela 9 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotometria na região do UV.

Tabela 9. Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV para avaliação de MAR

	MAR padrão adicionado (µg/mL)	MAR padrão recuperado (µg/mL)	Recuperação (%) *	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	4,8	4,77	99,30		
R2	6,0	6,04	100,61	100,39	0,99
R3	7,2	7,29	101,25		

*Cada valor corresponde à média de três determinações.

5.8. Robustez

As médias das variações no comprimento de onda, da porcentagem de etanol, e das variações na utilização de aparelho ultrassom, para avaliar o parâmetro robustez foram analisadas estatisticamente e os resultados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Valores calculados nos testes F e t para variações de comprimento de onda, na porcentagem de etanol, e na variação da utilização de ultrassom no método espectrofotométrico na região do UV para determinação de MAR em comprimidos

Condição	Parâmetros		Fcal	Ftab	tcal	ttab
	Normal	Alterado				
λ (nm)	296	294	4,34	19	0,09	2,78
	296	298	7,96	19	0,16	2,78
Diluyente	Água purificada: etanol (80:20, v/v)	Água purificada: etanol (82:18, v/v)	1,34	19	1,18	2,78
Aparelho	Com Ultrassom	Sem Ultrassom	8,80	19	2,88	2,78
Ultrassom	(2 min)					

5.9. Limites de detecção e de quantificação

Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação foram 0,39 $\mu\text{g/mL}$ e 1,18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

5.10. Doseamento

Os valores de teor do MAR em comprimidos, determinados durante o ensaio de doseamento, encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Valores determinados para o doseamento de MAR em comprimidos, pelo método espectrofotometria na região do UV

Dia	Teor de MAR em comprimidos*		Teor médio	DPR (%)
	$\mu\text{g/mL}$	%		
1	6,27	104,43		
2	6,22	103,67	103,67	1,42
3	6,10	101,59		

*Valores obtidos a partir da média de seis determinações.

6. DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento do método

6.1.1. Peso médio

A determinação do peso médio foi feita considerando comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme, assim tem-se que apenas duas unidades podem estar fora dos limites especificados, no entanto nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas pelos valores: 80 mg ou menos $\pm 10,0 \%$; mais que 80 mg e menos que 250 mg $\pm 7,5 \%$; 250 mg ou mais $\pm 5,0 \%$ (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

De acordo com o que foi mencionado acima, conforme o especificado pela Farmacopeia Brasileira (2019), há um limite de variação aceitável de $\pm 7,5 \%$, assim, considerando que os comprimidos de MAR apresentavam peso médio de 153,62 mg, e que os limites inferior e superior são, respectivamente, 142,10 mg e 165,14 mg, nenhuma unidade estava fora dos limites impostos e, portanto, a forma farmacêutica comprimido encontra-se de acordo com as especificações.

6.1.2. Seleção do diluente

Os diluentes a serem utilizados foram escolhidos de acordo com os dados disponíveis pela *European Pharmacopoeia* (2019), sobre a solubilidade do MAR, como já descrito no tópico 5.1 de características do mesmo, além do que está disposto em estudos como de Xie e colaboradores (2020) e Rivagli e colaboradores (2014). As concentrações da mistura de solventes etanol e água foram definidas com base no que está descrito na *European Pharmacopoeia* (2019) e na USP (2018).

Considerando os resultados encontrados a partir dos testes feitos, o fármaco apresentou melhor solubilidade no diluente água purificada: etanol (80:20, v/v), além de estabilidade, julgando pelas variações a partir da leitura do tempo zero. Apesar do diluente água purificada ser o que mais manteve valores semelhantes de absorção, tendo a melhor estabilidade dentre os

três, a solubilidade foi menor, considerando a faixa de maior absorvância. Enquanto no diluente água purificada: etanol (90:10, v/v), o analito apresentou o segundo maior valor de absorção dentre os três diluentes considerando o tempo zero, ou seja, maior solubilidade, no entanto, ao considerar a variações dos valores de absorvância no decorrer dos tempos, observa-se grande variação, apresentando valores de absorção que oscilaram de 0,642 a 0,515, assim demonstrando pouca estabilidade.

6.1.3. Curva de Ringbom

No desenvolvimento do método foram testadas concentrações que variaram de 0,1 a 30 µg/mL. Sendo assim, foi possível identificar e escolher as concentrações de 2,5 a 9 µg/mL, uma vez que apresentaram linearidade de resposta. Com isso, foi possível testar dentre essas concentrações da faixa linear encontrada quais seriam utilizadas para o ensaio de linearidade do método. Além disso, o desvio padrão e o desvio padrão relativo de todos os pontos da curva, também seguiram conforme o que é recomendado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 (2017).

6.2. Validação

6.2.1. Linearidade

Foi possível construir a curva analítica para MAR padrão com as médias das médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas com concentrações de 3,0 a 9,0 µg/mL obtidas durante os ensaios de linearidade. Assim, para avaliar a linearidade do método construiu-se o gráfico de concentração x absorvância, o qual demonstrou proporcionalidade entre estes dois fatores.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 0,0881x + 0,009$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9989, e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994, para o MAR padrão. Estando esse resultado de acordo com o que é aceito pela RDC 166 (BRASIL, 2017).

Dessa forma, foi possível o envolvimento de métodos estatísticos para a avaliação dos resultados, em que linearidade foi evidenciada pela ANOVA, a qual demonstrou haver regressão linear entre as concentrações e desvio de linearidade não significativo, em conformidade com o que é determinado pelo ICH (2005) e por BRASIL (2017).

Além disso, um gráfico de réplicas x desvio padrão foi construído, contemplando os resultados de análise de resíduos. Sendo possível determinar que os pontos relacionados às absorvâncias estavam abaixo do valor de 1 desvio padrão (1,96), com exceção de um ponto, podendo esse ser considerado um outlier. Ademais, os pontos ficaram dispersos não apresentando nenhuma tendência.

6.2.2. Precisão

Com os resultados é possível determinar que existe um grau de proximidade entre os ensaios. Tendo em vista que a precisão para os três níveis testados, sendo intradia, interdía e interanalista, apresentaram respectivamente um desvio padrão relativo nos valores de 1,20, 1,68 e 3,26 %, abaixo de 5 % como é preconizado pela RDC 166 (BRASIL, 2017). Com isso, validando a precisão do método espectrofotométrico na região do UV para análise do marbofloxacino em comprimidos.

6.2.3. Seletividade

A seletividade do método pôde ser confirmada pela comparação das absorvâncias do padrão e da amostra. Em que, os espectros de soluções de MAR padrão e comprimidos foram analisados. O resultado da sobreposição dos espectros mostrou que é possível quantificar MAR na amostra, assim a presença dos excipientes não demonstra interferência nas leituras das análises.

6.2.3.1. Degradação Forçada

Estudos de Kogawa e Salgado (2015), referem que em ensaios de degradação forçada podem ser obtidos degradantes primários, os quais se apresentam numerosos e podem ocorrer

em uma condição específica de estresse forçada. Dessa forma, é essencial que sejam formuladas condições que atinjam valores de degradação inferiores a faixa de 10 a 20 %, para que estes degradantes primários não sejam perdidos, considerando que em muitas situações os degradantes secundários e terciários se mostram como menos importantes do que os primários.

Através da análise dos dados obtidos, constata-se que as condições de degradação térmica juntamente com estresse ácido, básico e neutro não ultrapassaram a quantificação de 10 a 20 %, limite que pode ser encontrado na literatura, pois como já demonstrado na Tabela 8 e pelas Figuras 10, 11, 12 e 13 de comparação dos tempos 0 e 2 horas, foram obtidas degradações entre 0,14 e 0,68 %. Sendo assim, os comprimidos de marbofloxacino mantiveram-se estáveis no decorrer das 2 horas de degradação e o método foi capaz de mostrar a degradação ocorrida.

Por outro lado, quando a amostra foi submetida à condição de fotólise em temperatura ambiente, como demonstrado pela Figura 13, foram obtidos espectros de absorção sugestivos de alta degradação, pois observou-se uma decaída de absorvância no comprimento de onda de máxima absorção no decorrer dos tempos analisados, no qual conforme a comparação dos tempos 0 e 2 horas foi possível obter 30,64 % de degradação. Diante disso, cabe ressaltar que a USP (2018) e a European Pharmacopoeia (2019), atribuem que o MAR apresenta fotossensibilidade, preconizando que o mesmo deve ser manipulado protegido da luz além de ser armazenado em embalagem resistente à luz, o que pode estar relacionado intrinsecamente a essa escala de degradação obtida. Novamente, o método foi capaz de mostrar a degradação forçada.

Além disso, estudos de Sturini e colaboradores (2015), relatam a importância do conhecimento com relação a característica de fotossensibilidade que fluorquinolonas apresentam, ressaltando que a condição de fotodegradação auxilia na remoção desses produtos

que são extensamente liberados nos ecossistemas por diversas vias, assim propiciando concentrações reduzidas.

6.2.4. Exatidão

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada uma recuperação média de 100,39 %. Estando de acordo com a especificação que é 98,0 a 102,0 % (AOAC, 2002) para análises farmacêuticas. Além das médias apresentarem DPR de 0,99 %.

6.2.5. Robustez

A robustez do método foi confirmada pela variação do comprimento de onda na leitura das análises e pela variação na porcentagem de etanol usado. Os resultados mostram que não há diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o método pode ser considerado robusto para essas alterações.

Já para a variação da não utilização do aparelho ultrassom, a robustez do método não foi confirmada, visto que nos resultados estatísticos do teste t (Student) foi encontrado um valor de t calculado acima do que se tem determinado pelo t tabelado. Sendo assim, para essa modificação o método não se apresentou robusto.

Dessa forma, é evidente que o método mesmo se for submetido às duas primeiras variações nas condições analíticas descritas acima, ainda é capaz de apresentar o resultado sem sofrer alterações significativas, demonstrando-se robusto perante tais variações, e a partir do que foi constatado pela última variação em que houve alteração significativa no resultado do método, precauções devem ser alertadas e incluídas no procedimento para controlar o processo.

6.2.6. Limites de detecção e de quantificação

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação do marbofloxacino (LD = 0,39 µg/mL e LQ = 1,18 µg/mL) indicam a sensibilidade adequada do método para determinação do fármaco.

6.2.7. Doseamento

O teor de MAR presente nas amostras analisadas foi de 103,67 %, com DPR 1,42 %. O MAR comprimidos não tem monografia descrita em compêndios oficiais (USP, 2018; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2019; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). No entanto, se comparado ao teor de outras fluorquinolonas descritas em farmacopeias, como o ofloxacino em comprimidos, em que o teor aceitável é de 90,0 a 110,0 % (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), ou o levofloxacino em comprimidos, com teor aceitável de 90,0 a 110,0 % (USP, 2018), também o cloridrato de ciprofloxacino em comprimidos, em que o teor aceitável é de 90,0 a 110,0 % (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), e ainda o mesilato de gemifloxacino com teor aceitável entre 90,0 e 110,0 % (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), o teor de MAR comprimidos estaria aprovado.

7. CONCLUSÃO

Na literatura podem ser encontrados alguns métodos analíticos para avaliação de marbofloxacino em diferentes matrizes, no entanto, estes métodos não priorizam contemplar os princípios da Química Analítica Verde, revelando uma lacuna no desenvolvimento de novos métodos, visando uma produção mais ecológica, com a necessidade de redução ou eliminação do uso e da geração de agentes tóxicos para o operador e para o meio ambiente, como por exemplo com a utilização de solventes mais seguros e menos tóxicos, além de redução do tempo de análise e de custos.

O método *eco-friendly* por espectrofotometria na região do ultravioleta proposto para avaliação de marbofloxacino em comprimidos foi considerado adequado, em que considerando os parâmetros avaliados de linearidade, precisão, seletividade, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação foi possível a quantificação segura, eficaz e confiável de comprimidos de marbofloxacino em 296 nm utilizando como diluente água purificada: etanol (80:20, v/v).

Este trabalho apresentou um método inovador frente aos presentes na literatura, seguindo os princípios da Química Analítica Verde, devido à menor quantidade de fármaco utilizado, bem como a redução do volume de diluente também utilizado, gerando menos resíduos para o meio ambiente, além disso, o uso de solventes menos tóxicos foi proposto visando menos toxicidade para o operador e para o meio ambiente, e mostrou-se eficiente, sendo uma importante alternativa para os solventes orgânicos utilizados atualmente, também é um método de fácil execução, de baixo custo e rápido.

8. ARTIGOS PUBLICADOS

SILVA, T.L.A.; FERREIRA, R.G.L.; LUSTOSA, I.A.; KOGAWA, A.C. An overview of analytical methods for the quantification of marbofloxacin in pharmaceutical, biological, and food matrixes. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. 105, p. 456-462, 2022.

SILVA, T.L.A.; LUSTOSA, I.A.; TORRES, I.M.S.; KOGAWA, A.C. Eco-Friendly UV Spectrophotometric Method for Evaluation of Marbofloxacin in Tablets: Stability Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. 105, p. 1017-1022, 2022.

REFERÊNCIAS

ALÉSSIO, P.V.; KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quality of ceftriaxone sodium in lyophilized power for injection evaluated by clean, fast, and efficient spectrophotometric method. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2017, p. 1-4, 2017.

ALTAN, F.; CORUM, O.; CORUM, D.D.; ALTAN, S.; UNEY, K. Pharmacokinetics of marbofloxacin following intramuscular administration at different doses in sheep. *Small Ruminant Research*, v. 174, p. 88-91, 2019.

ALTAN, F.; CORUM, O.; CORUM, D.D.; ATIK, O.; UNEY, K. Pharmacokinetics and bioavailability of marbofloxacin in lambs following administration of intravenous, intramuscular and subcutaneous. *Small Ruminant Research*, v. 159, p. 5-10, 2018.

AMORIM, S.R.; KLIER, A.H.; ANGELIS, L.H. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 94, p. 234-242, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plano nacional para a prevenção e o controle da resistência microbiana nos serviços de saúde. 84 p. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=m6vpZEgtdjw%3D>>. Acesso em: 18 fev. 2021.

AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Guidelines-for-single-laboratory-validation-of-for-Pustaka-Badan/a7f8ebbf8e00235cae90ae6d4714f260d09c6228>>. Acesso em: 11 mar. 2021.

BERTI, R.C.; SANTOS, D.C. Importância do controle de qualidade na indústria alimentícia: prováveis medidas para evitar contaminação por resíduos de limpeza em bebida UHT. *Atas de Ciências da Saúde*, v. 4, p. 23-38, 2016.

BHARDWAJ, P.; KAUR, G.; RAMPAL, S. Impact of marbofloxacin administration on the emergence of marbofloxacin-resistant *E. coli* in faecal flora of goats and elucidation of molecular basis of resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 21, p. 116-123, 2020

BHARDWAJ, P.; SIDHU, P.K.; LONARE, M.K.; KAUR, R.; DUMKA, V.K.; RAMPAL, S. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of marbofloxacin after single and repeated intravenous administration in goats. *Research in Veterinary Science*, v. 121, p. 111-115, 2018.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Congresso Nacional, Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19782.htm>. Acesso em: 18 fev. 2021.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 11 mar. 2021.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle dos medicamentos à base de substâncias antimicrobianas, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. Diário Oficial da União, Brasília, 2011. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0020_05_05_2011.html>. Acesso em: 18 fev. 2021.

BRITO, R.S.; FERREIRA, F.; LOURENÇO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; MATOS, J.S. Espectrofotometria para monitorização da qualidade de água residual em drenagem urbana. *Revista Recursos Hídricos*, v. 34, p. 5-16, 2013.

BROWNE, A.J.; HAMADANI, B.H.K.; KUMARAN, E.A.P.; RAO, P.; LONGBOTTOM, J.; HARRISS, E.; MOORE, C.E.; DUNACHIE, S.; BASNYAT, B.; BAKER S.; LOPEZ, A.D.; DAY, N.P.J.; HAY, S.I.; DOLECEK, C. Drug-resistant enteric fever worldwide, 1990 to 2018: a systematic review and meta-analysis. *Biomedicine Central*, v. 18, p. 01-22, 2020.

CANASSA, T.A.; LAMONATO, A.L.; RIBEIRO, A.V. Use of the Lambert-Beer law to determine the concentration of solutions. *Journal of Experimental Techniques and Instrumentation*, v. 1, p. 23-30, 2018.

CASSINI, S.T.A.; ANTUNES, P.W.P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 36, p. 1208-1213, 2013.

CNS. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 338, de 06 de maio de 2004. Aprova a Política Nacional de Assistência Farmacêutica. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2004. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2004/res0338_06_05_2004.html>. Acesso em: 18 fev. 2021.

CORREA, C.B.M.; KOGAWA, A.C.; CHORILLI, M.; SALGADO, H.R.N. Eco-friendly and miniaturized analytical method for quantification of rifaximin in tablets. *Drug Analytical Research*, v. 3, p. 23-29, 2019.

CORUM, O.; TERZI, E.; CORUM, D.D.; KENANOGLU, O.N.; BILEN, S.; UNEY, K. Pharmacokinetic/pharmacodynamics integration of marbofloxacin after oral and intravenous administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 514, p. 1-5, 2020.

COSTA, A.L.P.; SILVA JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, p. 45-57, 2017.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 10. ed. Strasbourg Cedex, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. v. 1, 2019.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 10. ed. Strasbourg Cedex, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. v. 2, 2019.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019.

FURTADO, D.M.F.; SILVEIRA, V.S.; FURTADO, D.M.F.; KILISHEK, M.P. Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. Revista Pan Amazônica Saúde, v. 10, p. 1-8, 2019.

GOMES, K.A.; SANTOS, A.L.R.; FARIA, A.M. Avaliação de aditivos de fase móvel e temperatura na vida útil de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, v. 43, p. 300-306, 2020.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005. Disponível em: <<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2021.

JANUSCH, F.; SCHERZ, G.; MOHRING, S.A.I.; STAHL, J.; HAMSCHER, G. Comparison of different solid-phase extraction materials for the determination of fluoroquinolones in chicken plasma by LC-MS/MS. Journal of Chromatography B, v. 951-952, p. 149-156, 2014.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Impurities and Forced Degradation Studies: A Review. Current Pharmaceutical Analysis, v. 11, p. 1-7, 2015.

LANGRE, S.R.; LUCAS, J.J.; LITTERIO, N.J.; AGUILAR, S.; BOGGIO, J.C.; ANDRÉS, M.I.S. Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous, subcutaneous

and intramuscular administrations in llamas (*Lama glama*). *Small Ruminant Research*, v. 106, p. 64-69, 2012.

LARIOS, I.F.; OLIVEIRA, F.S.A.; MARZIELE, M.H.P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. *Ata Paulista de Enfermagem*, v. 3, p. 651-657, 2017.

LEE, J.; KWON, H.J.; JI, H.; CHO, S.H.; CHO, E.H.; HAN, H.D.; SHIN, B.C. Marbofloxacin-encapsulated microparticles provide sustained drug release for treatment of veterinary diseases. *Materials Science and Engineering: C*, v. 60, p. 511-517, 2016.

LEI, Z.; LIU, Q.; YANG, B.; KHALIQ, H.; CAO, J.; HE, Q. PK-PD Analysis of marbofloxacin against *Streptococcus suis* in Pigs. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, p. 1-11, 2017.

LI, H.C.; XU, Q.M.; LIU, L.M.; WU, L.H.; TANG, Z.T.; CUI, H.; LIU, Y.C. A new magnesium (II) complex of marbofloxacin: Crystal structure, antibacterial activity and acute toxicity. *Inorganica Chimica Acta*, v. 516, p. 1-9, 2021.

MAHMOOD, A.H.; MEDLEY, G.A.; GRICE, J.E.; LIU, X.; ROBERTS, M.S. Determination of trovafloxacin and marbofloxacin in sheep plasma samples by HPLC using UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 62, p. 220-223, 2012.

MARASCHI, F.; STURINI, M.; SPELTINI, A.; PRETALI, L.; PROFUMO, A.; PASTORELLO, A.; KUMAR, V.; FERRETTI, M.; CARATTO, V. TiO₂-modified zeolites for fluoroquinolones removal from wastewaters and reuse after solar light regeneration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, p. 2170-2176, 2014.

MARCO, B.A.; RECHELO, B.S.; TÓTOLI, E.G.; KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 27, p. 1-8, 2019.

OLIVEIRA, L.H.; FILHO, L.A.P.; SANTOS, A.L.; TAKEUCHI, R.M.; TRINDADE, M.A.G. Comparação de processamentos matemáticos de dados voltamétricos: aplicação na determinação simultânea de fluorquinolonas. *Química Nova*, v. 38, p. 1300-1306, 2015.

ORÚS, P.; PEREZ, L.G.; LERANOZ, S.; BERLANGA, M. Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. *International Microbiology*, v. 18, p. 51-59, 2015.

PAGANI, A.P.; IBAÑEZ, G.A. Analytical approach for the simultaneous determination of quinolones in edible animal products. Modeling pH–modulated fluorescence excitation–emission matrices four–way arrays. *Talanta*, v. 192, p. 52-60, 2019.

PAULA, L.N.; ALVES, A.R.; NANTES, E.A.S. A importância do controle de qualidade em indústria do segmento alimentício. *Revista Conhecimento Online*, v. 2, p. 78-91, 2017.

PRADO, L.V.; ROCHA, H.V.A. Estado sólido na indústria farmacêutica: Uma breve revisão. *Revista Virtual Química*, v. 7, p. 2080-2112, 2015.

RAMOS-MARTÍNEZ, B.; ALONSO-HERREROS, J.M.; ROSALES-CABRERA, A.M.M. La importancia del control de calidad de las materias primas empleadas en formulación magistral. *Farmacia Hospitalaria*, v. 44, p. 32-33, 2020.

RIVAGLI, E.; PASTORELLO, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; SPELTINI, A.; ZAMPORI, L.; SETTI, M.; MALAVASI, L.; PROFUMO, A. Clay minerals for adsorption of veterinary FQs: Behavior and modeling. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, p. 738-744, 2014.

ROCHA, T.G.; GALENDE, S.B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. *Revista Uningá*, v. 20, p. 97-103, 2014.

SAMPAIO, P.S.; SANCHO, L.G.; LAGO, R.F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. *Cadernos Saúde Coletiva*, v. 26, p. 15-22, 2018.

SANDRI, M.C.M.; FILHO, O.S. Los modelos de enfoque de la química verde em la enseñanza de la química. *Educación Química*, v. 30, p. 34-46, 2019.

SANTIGOSA, E.; MASPOCH, S.; PAYÁN, M.R. Liquid phase microextraction integrated into a microchip device for the extraction of fluoroquinolones from urine samples. *Microchemical Journal*, v. 145, p. 280-286, 2019.

SHEN, J.; QIAN, J.J.; GU, J.M.; HU, X.R. Marbofloxacin. *Acta Crystallographica*, v. 68, p. 998-999, 2012.

SILVA, C.B.; HAUSER-DAVIS, R.A.; SILVA, A.L.O.; MOREIRA, J.C. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. *Cadernos Saúde Coletiva*, v. 25, p. 362-370, 2017.

SILVA, M.O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 8, p. 472-482, 2018.

SILVA, T.L.A.; FERREIRA, R.G.L.; LUSTOSA, I.A.; KOGAWA, A.C. An overview of analytical methods for the quantification of marbofloxacin in pharmaceutical, biological, and food matrixes. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. 105, p. 456-462, 2022.

SILVA, T.L.A.; LUSTOSA, I.A.; TORRES, I.M.S.; KOGAWA, A.C. Eco-Friendly UV Spectrophotometric Method for Evaluation of Marbofloxacin in Tablets: Stability Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. 105, p. 1017-1022, 2022.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; PRETALI, L.; FASANI, E.; ALBINI, A. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin. *Chemosphere*, v. 86, p. 130-137, 2012.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; TARANTINO, S.; GUALTIERI, A.F.; ZEMA, M. Removal of fluoroquinolone contaminants from environmental waters on sepiolite and its photo-induced regeneration. *Chemosphere*, v. 150, p. 686-693, 2016.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PRETALI, L.; MALAVASI, L.; PROFUMO, A.; FASANI, E.; ALBINI, A. Sunlight photodegradation of Marbofloxacin and Enrofloxacin adsorbed on clay minerals. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 299, p. 103-109, 2015.

TAYEB-CHERIF, K.; PERIS-VICENTE, J.; CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J. Use of micellar liquid chromatography to analyze oxolinic acid, flumequine, marbofloxacin and enrofloxacin in honey and validation according to the 2002/657/EC decision. *Food Chemistry*, v. 202, p. 316-323, 2016.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. *The National Formulary (NF 36)*. 36. ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, v. 2, 2018.

TOBISZEWSKI, M.; MARC, M.; GALUSZKA, A.; NAMIESNIK, J. Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules*, v. 20, p. 10928-46, 2015.

TRINDADE, M.T.; FERRAZ, M.A.; FRANCO, A.J.; DINIZ, R.S. Controle e garantia de qualidade na indústria. *Revista Científica Univiçosa*, v. 10, p. 1068-73, 2018.

VACCARO, L. Green chemistry. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v.12, p. 2763-2765, 2016.

VILALTA, C.; GALOFRÉ, N.; ARAGON, V.; ROZAS, A.M.P.; FRAILE, L. Effect of marbofloxacin on *Haemophilus parasuis* nasal carriage. *Veterinary Microbiology*, v. 159, p. 123-129, 2012.

WHO. World Health Organization. A OMS publica lista de bactérias para as quais novos antibióticos são urgentemente necessários. Genebra, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 18 fev. 2021.

XIE, Y.J.; YU, M.X.; YANG, Q.Z.; LIU, Y.C.; LIU, R.X.; DONG, J.X.; WU, X.Y.; GUO, R.F.; PAN, Y.X.; CHEN, Z.F.; LIANG, H. A new calcium (II) complex of marbofloxacin showing much lower acute toxicity with retained antibacterial activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 203, p. 1-8, 2020.

YU, H.; TAO, Y.; CHEN, D.; PAN, Y.; LIU, Z.; WANG, Y.; HUANG, L.; DAI, M.; PENG, D.; WANG, X.; YUAN, Z. Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography B*, v. 885–886, p. 150-159, 2012.

ZHAO, R.; BI, S.; SHAO, D.; SUN, X.; LI, X. Rapid determination of marbofloxacin by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles modified by β -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 229, p. 1-7, 2020.