

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAYSSA ARAÚJO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS FÍSICO-
QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO PARA DOSEAMENTO DE
ESPIRAMICINA EM COMPRIMIDOS**

Alfenas/MG

2021

RAYSSA ARAÚJO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS FÍSICO-
QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO PARA DOSEAMENTO DE
ESPIRAMICINA EM COMPRIMIDOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas – MG.
Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Rudy Bonfilio.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S237d Santos, Rayssa Araújo dos.
Desenvolvimento e validação de métodos físico-químico e
microbiológico para doseamento de espiramicina em comprimidos. / Rayssa
Araújo dos Santos. -- Alfenas/MG, 2021.
120f.: il. –

Orientador: Rudy Bonfilio.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Espiramicina. 2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. 3.
Estudo de Validação. 4. Técnicas Microbiológicas. 5. Controle de
Qualidade. I. Bonfilio, Rudy. II. Título.

CDD-615.1

RAYSSA ARAÚJO DOS SANTOS

"DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS FÍSICOQUÍMICO E MICROBIOLÓGICO
PARA DOSEAMENTO DE ESPIRAMICINA EM COMPRIMIDOS"

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pela Universidade Federal de
Alfenas. Área de concentração: Ciências
Farmacêuticas

Aprovada em: 25 de março de 2021

Prof. Dr. Rudy Bonfilio
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Lucélia Magalhães da Silva
Instituição: Instituto Federal do Paraná

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Rudy Bonfilio, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2021, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucélia Magalhães da Silva, Usuário Externo**, em 25/03/2021, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Gonçalves Santos, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2021, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0485419** e o código CRC **94659158**.

Dedico aos meus pais João Carlos dos Santos e Magali Benjamim de Araújo, minhas irmãs Ana Laura Araújo Santos e Larissa Araújo dos Santos, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho, e a Deus por ser meu alicerce a todo momento.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Rudy Bonfilio pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, pela paciência, e confiança depositada na realização deste trabalho.

À Prof. Titular Magali Benjamim de Araújo pelo suporte, ensinamentos e assistência nas horas difíceis e contentes.

À Prof. Titular Gislaíne por oferecer o espaço laboratorial para a realização de parte dos experimentos.

Ao Mestre Marcus Rubatino por me auxiliar e depositar seu tempo e esforço para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG pelo incentivo à produção acadêmica.

Aos alunos Homero Junior, Maríllia Toti e Thúlio Barbosa, pela amizade e auxílio na realização desse mestrado e a toda equipe do Laboratório Núcleo de Controle de Qualidade da Unifal-MG.

Aos meus amigos Raíssa Mendonça, Ana Lúcia Pinheiro, Marcela Crivellenti, Sara Franchin, Tiago Blosfeld, Igor Carriço, Bruno Vezzani, Antônio Vítor que continuamente me motivavam e tornaram a sobrecarga do trabalho mais leve. E aos outros colegas que estiverem presente durante este período.

Aos órgãos de fomento: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, às empresas Cimed e Cristália pelo material doado.

E a todos que participaram de alguma forma desta conquista.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“De um pequeno grão nasce uma majestosa árvore. A semente contém em si uma porção mínima, um *quantum* de uma essência que é impressa em um código genético. Nesse código, estão as informações sobre o seu potencial máximo, que é também aquilo que ela vai realizar quando for plantada na terra. E o seu potencial máximo são os frutos que ela vai dar.”

(Sri Prem Baba, 2016)

RESUMO

Os antibióticos são medicamentos de grande importância na terapêutica e merecem destaque em estudos analíticos. Dentre os antibióticos, os macrolídeos possuem ação bacteriostática e bactericida. A espiramicina, fármaco pertencente à esta classe, é comercializada em alguns países, inclusive no Brasil, onde foi registrada recentemente. O medicamento referência é encontrado no comércio na forma de comprimidos. A garantia da qualidade é de extrema relevância para a eficácia do medicamento durante o tratamento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver e validar métodos para quantificação de espiramicina em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio de potência microbiológica. Para o desenvolvimento e otimização do método cromatográfico foram inicialmente testadas diferentes condições por meio de planejamento fatorial completo 2^3 , em que foram testadas diferentes proporções de metanol na fase móvel, fluxos de fase móvel e variações com relação à temperatura. Na sequência, a otimização dos parâmetros cromatográficos foi obtida utilizando a Matriz de Doehlert e metodologia de superfície de resposta, o que permitiu obter uma separação rápida e eficiente para espiramicina I com tempo de retenção relativamente curto. Além disso, solventes menos agressivos ao meio ambiente foram utilizados, favorecendo aplicação do método na rotina do controle de qualidade. O método foi validado utilizando ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 e metanol (67:33, v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, coluna NST C-8 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) como fase estacionária, detecção em 232 nm e volume de injeção de 20 μ L. O método analítico mostrou-se seletivo não havendo interferência dos excipientes na quantificação do fármaco, linear ($r=0,9995$), preciso (DPR <2,5%), exato (98,5-101,0%), robusto, com limite de detecção de 1,61 μ g/mL e limite de quantificação de 4,88 μ g/mL. O ensaio microbiológico por difusão em ágar foi desenvolvido e validado segundo as diretrizes da International Council of Harmonization, United States Pharmacopeia 40ª edição e alguns trabalhos descritos da literatura. O método demonstrou ser seletivo frente ao excipientes ($p>0,05$), linear ($r=0,9997$), preciso (DPR<2,5%) e exato. Ademais, foi possível mensurar a potência do antibiótico a partir da metodologia desenvolvida.

Palavras-chave: Espiramicina. Validação analítica. Cromatografia líquida de alta eficiência. Potência microbiológica. Controle de qualidade.

ABSTRACT

Antibiotics are drugs of great importance in therapy and deserve to be highlighted in analytical studies. Among them, the macrolides have bacteriostatic and bactericidal action. Spiramycin is a drug belonging to this class and is commercialized in some countries, including Brazil, where it was recently registered. The reference medicine is found commercially in the form of tablets. Quality assurance is extremely relevant to the effectiveness of the medication during treatment. Thus, the objective of this work was to develop and validate methods for quantification of spiramycin in tablets by high performance liquid chromatography and microbiological potency assay. For development and optimization of the chromatographic method, different conditions were initially tested using the 2³ full factorial design, in which different proportions of methanol in mobile phase, mobile phase flow rates and oven temperatures were tested. Then, optimization of the chromatographic parameters was made using the Doehlert Matrix and response surface methodology, in order to obtain fast and efficient separation for spiramycin I in relatively short retention time. In addition, more ecofriendly solvents were used, which favors the use of the method in the quality control routine. The method was validated using phosphoric acid 0.1% v/v in HPLC water and methanol (67:33, v/v) as a mobile phase, flow rate at 1.0 mL.min⁻¹, NST C-8 analytical column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) as a stationary phase, detection at 232 nm and injection volume of 20 µL. The analytical method was selective, with no excipients interfering in the quantification, linear ($r = 0.9997$), precise (RSD < 2,5%), accurate (98,5-101,0%) and robust. The limits of detection and quantification were 1,61 µg.mL⁻¹ and 4,88 µg.mL⁻¹, respectively. The microbiological assay by agar diffusion was developed and validated according to the guidelines of the International Council of Harmonization, United States Pharmacopoeia 40th edition and some studies from literature. The method proved to be selective against the excipients ($p > 0,05$), linear ($r = 0,9997$), precise (RSD < 2,0%) and accurate.. Futhermore, it was possible to measure the potency of the antibiotic using the method developed.

Keywords: Spiramycin. Analytical validation. High performance liquid chromatography. Microbiological potency. Quality control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos principais componentes da espiramicina e suas substâncias relacionadas.....	22
Figura 2 - Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3x3.....	62
Figura 3 - Varreduras espectrais de espiramicina (SRC) em diferentes solventes.....	68
Figura 4 - Varredura espectral de solução de espiramicina SRC, na concentração de 20 µg/mL, utilizando metanol e água (50:50, v/v) como solvente por espectrofotometria.....	69
Figura 5 - Cromatogramas para escolha da fase móvel para o método de quantificação de espiramicina I (seta verde).....	71
Figura 6 - Gráfico representativo de logD (coeficiente de distribuição) da espiramicina.....	73
Figura 7 - Diagrama de Pareto.....	74
Figura 8 - Superfície de resposta para otimização de método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	78
Figura 9 - Curva de nível para otimização de método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	77
Figura 10 - Perfil cromatográfico de soluções de SRC e de amostras de comprimidos com tempo de retenção de 17,63 e 18,08 minutos, respectivamente, utilizando método por CLAE otimizado.....	79
Figura 11 - Curvas analíticas realizadas para o ensaio de seletividade por efeito matriz utilizando método de adição de analito na matriz da amostra.....	81
Figura 12 - Representação gráfica da resposta analítica em função da concentração do analito ($r^2 = 0,9995$) em estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE a 232 nm, utilizando como fase móvel metanol e ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 (33:67, v/v).....	84
Figura 13 - Plotagem dos resíduos gerados pela regressão aplicada aos dados dos ensaios de linearidade para espiramicina I por CLAE.....	85
Figura 14 - Curvas analíticas realizadas para a determinação da concentração de espiramicina a ser utilizada no ensaio microbiológico de difusão em ágar.....	95

Figura 15 - Teste realizado na concentração de inóculo a 2% para a determinação dos parâmetros a serem utilizados no desenvolvimento do método microbiológico.....	96
Figura 16 - Teste realizado em um período de incubação de 16 horas para a determinação dos parâmetros a serem utilizados no desenvolvimento do método microbiológico.....	97
Figura 17 - Ensaio microbiológico de difusão em ágar para a determinação dos parâmetros utilizados para o desenvolvimento do método.....	98
Figura 18 - Representação gráfica da resposta analítica em função do log da concentração do analito ($r^2 = 0,9994$) em estudo de linearidade para determinação de espiramicina em ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Composição dos solventes testados para desenvolvimento de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	47
Tabela 2	-	Relação de solventes e proporções utilizadas nos ensaios preliminares para escolha da fase móvel de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	49
Tabela 3	-	Fatores e seus níveis empregados na construção de planejamento fatorial completo 2^3 para otimização de condições cromatográficas de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	50
Tabela 4	-	Planejamento fatorial 2^3 utilizado na otimização de condições cromatográficas de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	50
Tabela 5	-	Matriz de Doehlert utilizada na otimização final do método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	52
Tabela 6	-	Preparo da curva da amostra fortificada com a SRC para estudo de efeito matriz de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	54
Tabela 7	-	Preparo das soluções de espiramicina SRC para estudo de linearidade de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	55
Tabela 8	-	Preparo das soluções para realização do teste de exatidão do método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	56
Tabela 9	-	Variáveis e seus níveis usados no estudo de robustez do método desenvolvido por CLAE, para quantificação de espiramicina I, de acordo com o teste de robustez de Youden e Steiner.....	58
Tabela 10	-	Parâmetros testados para a otimização do ensaio microbiológico por difusão em ágar para determinação de potência de espiramicina em comprimidos.....	60

Tabela 11 -	Proporção dos excipientes utilizados para o preparo do placebo.....	64
Tabela 12 -	Preparo das soluções para realização do ensaio de seletividade do método microbiológico por difusão em ágar.....	65
Tabela 13 -	Preparo das soluções de espiramicina para estudo de linearidade, utilizando como solvente final solução tampão fosfato 0,05 M pH 8,0.....	66
Tabela 14 -	Resultado das varreduras espectrais de espiramicina por espectrofotometria, utilizando diversos solventes.....	67
Tabela 15 -	Metodologias utilizadas em alguns ensaios cromatográficos para o fármaco espiramicina.....	70
Tabela 16 -	Valores obtidos no planejamento fatorial 2^3 utilizado para otimização do método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	74
Tabela 17 -	Valores obtidos pela matriz de Doehlert utilizada na otimização final do método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.....	76
Tabela 18 -	Dados obtidos no ensaio de seletividade para espiramicina I por CLAE, utilizando como fase móvel: metanol e ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 (33:67, v/v).....	79
Tabela 19 -	Valores de áreas obtidas no ensaio de efeito matriz das soluções de SRC e de amostras fortificadas com a SRC nas diferentes concentrações.....	80
Tabela 20 -	Coeficientes angulares das curvas analíticas do estudo de seletividade por efeito matriz.....	82
Tabela 21 -	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	82
Tabela 22 -	Valores experimentais obtidos no ensaio de linearidade para construção da curva analítica de espiramicina por CLAE.....	83
Tabela 23 -	Valores de resíduos obtidos em estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE.....	85
Tabela 24 -	Resultados do teste de Shapiro-Wilk para estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE.....	86
Tabela 25 -	Valores de resíduos padronizados obtidos no estudo de linearidade para determinação de espiramicina por CLAE.....	87

Tabela 26 -	Valores obtidos na análise de variância (Anova) para ensaio de linearidade do método para espiramicina I por CLAE.....	87
Tabela 27 -	Equação da reta, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (R^2) a partir de dados obtidos em estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE.....	88
Tabela 28 -	Valores de áreas de picos obtidos a partir do ensaio de exatidão para espiramicina nas amostras de comprimidos por CLAE.....	88
Tabela 29 -	Valores obtidos no ensaio de exatidão do método para quantificação de espiramicina por CLAE.....	89
Tabela 30 -	Valores obtidos no estudo de precisão por repetibilidade do método analítico para quantificação de espiramicina por CLAE.....	89
Tabela 31 -	Valores obtidos no estudo de precisão intermediária de método analítico para quantificação de espiramicina por CLAE.....	90
Tabela 32 -	Resultados obtidos a partir do teste proposto por Youden e Steiner (1975) para determinação de robustez do método de quantificação de espiramicina I em comprimidos, por CLAE.....	91
Tabela 33 -	Resultado da análise de efeitos obtidos a partir do teste de Youden e Steiner (1975), por CLAE.....	91
Tabela 34 -	Valores de coeficiente angular e coeficiente linear, obtidos a partir do ensaio de linearidade para quantificação de espiramicina I por CLAE..	92
Tabela 35 -	Resultados do estudo de estabilidade para amostra e padrão das soluções de espiramicina armazenadas a 4°C.....	92
Tabela 36 -	Estudo de regressão para o padrão e amostra de comprimidos de espiramicina no ensaio de estabilidade de soluções.....	93
Tabela 37 -	Valores médios dos halos de inibição de crescimento microbiano obtidos em ensaio preliminar para determinação da dosagem.....	94
Tabela 38 -	Parâmetros utilizados no desenvolvimento e validação de espiramicina no ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	98
Tabela 39	Valores médios dos diâmetros dos halos obtidos a partir do ensaio de seletividade e sua respectiva análise estatística.....	99
Tabela 40 -	Valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição, obtidos no estudo de linearidade, para o ensaio microbiológico para espiramicina solução padrão.....	100

Tabela 41 -	Valores obtidos na análise de variância (ANOVA) para ensaio de linearidade do método para espiramicina (SQR), por difusão em ágar.....	101
Tabela 42 -	Valores de precisão intra e interdias do método microbiológico por difusão em ágar para forma farmacêutica comprimido contendo espiramicina.....	102
Tabela 43 -	Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método microbiológico por difusão em ágar.....	103
Tabela 44 -	Valores experimentais obtidos para o doseamento de espiramicina pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	104
Tabela 45 -	Resultados de teor obtido pelo método cromatográfico desenvolvido.....	104
Tabela 46 -	Resultados de teor obtido pelo método microbiológico desenvolvido.....	104

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	ANTIBIÓTICOS.....	19
2.2	MACROLÍDEOS.....	20
2.3	ESPIRAMICINA.....	21
2.3.1	Métodos de análise de espiramicina.....	23
2.4	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	30
2.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	32
2.6	MÉTODOS DE ANÁLISE.....	34
2.6.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	34
2.6.2	Ensaio Microbiológico.....	37
2.6.2.1	Método turbidimétrico.....	38
2.6.2.2	Método por difusão em ágar.....	40
2.6.2.3	Delineamento de ensaios microbiológicos.....	41
3	OBJETIVO.....	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	44
4.1	MATERIAIS.....	44
4.1.1	Substância química de referência.....	44
4.1.2	Substância de Referência Certificada.....	44
4.1.3	Produto Farmacêutico.....	44
4.1.4	Microrganismo padrão.....	44
4.2	REAGENTES.....	45
4.3	EQUIPAMENTOS.....	45
4.4	VIDRARIAS E OUTROS MATERIAIS.....	46
5	METODOLOGIA.....	47
5.1	ESCOLHA DO SOLVENTE DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	47
5.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	48
5.2.1	Escolha do comprimento de onda.....	48
5.2.2	Escolha inicial da fase móvel.....	48

5.2.3	Otimização multivariada	49
5.3	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS APÓS OTIMIZAÇÃO.....	52
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	53
5.4.1	Preparo das soluções estoque para o ensaio cromatográfico	53
5.4.2	Seletividade	53
5.4.2.1	Pureza de pico.....	53
5.4.2.2	Efeito Matriz.....	54
5.4.3	Linearidade	55
5.4.4	Exatidão	55
5.4.4.1	Preparo da SRC de espiramicina.....	56
5.4.4.2	Preparo das soluções amostra.....	56
5.4.5	Precisão	57
5.4.6	Robustez	57
5.4.7	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	58
5.4.8	Estudo de estabilidade das soluções	59
5.5	DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO.....	59
5.5.1	Desenvolvimento de ensaio microbiológico	59
5.5.2	Microrganismo e inóculo	60
5.5.3	Execução do ensaio microbiológico	61
5.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR.....	63
5.6.1	Preparo das soluções estoque para o ensaio microbiológico	63
5.6.2	Seletividade	64
5.6.3	Linearidade	65
5.6.4	Precisão	66
5.6.5	Exatidão	66
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
6.1	ESCOLHA DO SOLVENTE DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	67
6.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	68
6.2.1	Escolha do comprimento de onda	68
6.2.2	Escolha da fase móvel	69
6.2.3	Otimização multivariada	73
6.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	78

6.3.1	Seletividade	78
6.3.1.1	Pureza de pico.....	78
6.3.1.2	Efeito matriz.....	80
6.3.2	Linearidade	83
6.3.3	Exatidão	88
6.3.4	Precisão	89
6.3.5	Robustez	90
6.3.6	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	92
6.3.7	Estabilidade das soluções	92
6.4	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO	93
6.4.1	Desenvolvimento do ensaio microbiológico	93
6.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO	99
6.5.1	Seletividade	99
6.5.2	Linearidade	100
6.5.3	Precisão	102
6.5.4	Exatidão	102
6.5.5	Determinação da potência do medicamento	104
6.6	RESULTADOS DE ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS	104
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
	REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

O processo de industrialização dos produtos farmacêuticos vem sendo acompanhado pela evolução tecnológica do século atual, envolvendo todas as etapas de produção, desde a síntese da molécula até a obtenção do produto acabado (PINTO; KANEKO; OHARA, 2010).

O uso clínico de antibióticos é um tema de grande relevância devido ao surgimento de microrganismos com cepas cada vez mais resistentes, mostrando a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e/ou formas farmacêuticas para o combate das infecções. Por outro lado, englobam os medicamentos mais comumente prescritos e, também, os mais frequentemente falsificados e adulterados (CHAMBERS; MAC-DOUGALL, 2011; DAFALE, 2012).

Destaca-se também o uso incorreto de antibióticos por parte dos produtores agropecuários, em contrariedade a aplicação das boas práticas de uso de medicamentos veterinários, o que leva a presença de resíduos destes fármacos em produtos alimentícios como leite, ovos e alimentos para animais, o que representa risco à saúde dos consumidores e provoca a seleção de formas resistentes, além de efeitos tóxicos (DUBOIS *et al.*, 2001; CIVITAREALE *et al.*, 2004; GARCÍA-MAYOR *et al.*, 2006; GOMIS *et al.*, 2006; VINCENT *et al.*, 2007; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2007; WANG; LEUNG, 2009; BRASIL, 2010).

Dentre os antimicrobianos utilizados na terapêutica humana e na pecuária, têm-se os antibióticos macrolídeos, cujo precursor é a eritromicina. São fármacos que contêm um anel lactona macrocíclico central constituído de 14 a 16 átomos, ao qual ligam-se um ou mais açúcares (ALVAREZ-ELCORO; YAO, 2002; BARROS *et al.*, 2008; CHAMBERS; MAC-DOUGALL, 2011).

Os antibióticos macrolídeos possuem ação bacteriostática e bactericida, sendo considerados medicamentos com boa eficácia clínica, devido a maior estabilidade ácida e melhor tolerância digestiva, além da absorção mais rápida, maior meia-vida de eliminação e grau de penetração celular (CHAMBERS; MAC-DOUGALL, 2011; MAHMOUDI *et al.*, 2016).

A espiramicina, antibiótico macrolídeo, é obtida por meio da fermentação de cultura de cepas de *Streptomyces ambofaciens*. Possui estrutura química composta pelo anel de lactona macrocíclica de 16 membros e dos açúcares forasamina na posição C-9 e

um dissacarídeo composto de açúcares de micaminose e micarose na posição C-5 (LIN *et al.*, 2018).

A espiramicina atua inibindo a síntese proteica bacteriana pela ligação reversível à porção 50S do ribossomo do patógeno. Possui também propriedades anti-inflamatórias por inibição da síntese de toxinas microbianas e outros fatores de virulência que induzem respostas pró-inflamatórias (CHAMBERS; MAC-DOUGALL, 2011; STEEL *et al.*, 2012).

O medicamento contendo espiramicina, encontrava-se patenteado até o ano de 2015 sob o número US 5403594 (CALVO *et al.*, 1995), sendo comercializado em vários países como Canadá, Europa e México (DRUGBANK, 2007). Nos Estados Unidos, a espiramicina é considerada um fármaco experimental, contudo em casos especiais, como toxoplasmose em grávidas, é possível obter permissão do FDA para seu uso (MAYO CLINIC, 2020). No Brasil, o medicamento de referência é a Rovamicina[®] disponibilizado na forma farmacêutica comprimidos revestidos de 1,5 MUI (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021).

Atualmente, o grande número de incidentes que envolvem produtos alimentícios e medicamentosos nas indústrias traz uma preocupação com a qualidade desses produtos durante sua produção. Estes devem ser fabricados visando um produto final com qualidade, que obtenha os efeitos esperados e seja seguro quanto ao seu uso (ICHIMURA, 2013).

A qualidade do medicamento, segundo David A. Garvin (SUAREZ, 2015), está associada aos parâmetros de desempenho, confiabilidade, conformidade, durabilidade, atendimento, aparência/estética e qualidade percebida e inclui todas as características, desde a fase de pesquisa da molécula ativa, passando pelos estudos pré-clínicos, pesquisa clínica, produção da matéria-prima em escala industrial e sua distribuição, processos envolvidos na fabricação e no controle da qualidade do medicamento, utilização pelo paciente e acompanhamento pós-registro (GIL, 2010).

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método analítico simples, rápido e “eco-friendly” por cromatografia líquida de alta eficiência para separação e quantificação deste fármaco em comprimidos. Constitui também por interesse o desenvolvimento e validação de um ensaio para avaliação da potência microbiológica para espiramicina na forma farmacêutica comprimidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos pertencem à classe de substâncias químicas sintéticas ou provenientes de organismos vivos como bactérias ou fungos. Estes fármacos possuem a capacidade de inibir processos vitais de outros organismos, mesmo em pequenas concentrações (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Devido a isso, constituem a classe de fármacos que são considerados agressivos e problemáticos para o meio ambiente, decorrente da sua baixa biodegradabilidade e efeito tóxico sobre as bactérias, além da potencialidade de promover o desenvolvimento de espécies mais resistentes (CHANG *et al.*, 2010; MINETTO, 2013).

A resistência é uma propriedade da bactéria de inativar ou excluir antibióticos, sendo um mecanismo que bloqueia a ação e interrompem os efeitos do fármaco. Isto pode ser uma característica do organismo, adquirida por meios de mutação no seu DNA ou aquisição de DNA resistente a partir de outra fonte. A mutação ocorre de forma espontânea no DNA bacteriano que modifica e elimina o alvo de ação do antibiótico, causando alterações na superfície da bactéria, assim promovendo a produção de uma enzima que inativa o antibiótico (BERGER-BACHI; MCCALLUM, 2006).

Por consequência do uso de antibióticos deliberado e equivocado pela sociedade, essa resistência tem aumentado exponencialmente para a maioria dos patógenos humanos, levando ao reconhecimento do assunto como uma questão de saúde pública (JANSEN *et al.*, 2006).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos, compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, etc), tetraciclinas (doxiciclina, minociclina, tigeciclina, etc), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, estreptomicina, etc), macrolídeos (eritromicina, azitromicina, espiramicina, etc), peptídeos cíclicos (daptomicina, ciclozantoxilano A, desotamide B, etc), estreptograminas (pristinamicina, quinupristina, dalfopristina, etc), entre outros. Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2009).

2.2 MACROLÍDEOS

O termo macrolídeo tem como origem de duas palavras: ‘macro’ que significa grande e ‘olideo’ que significa lactona. Depois da família das β -lactamas, estes compostos são a segunda classe antibacteriana mais importante empregada no tratamento humano, além de serem utilizados como uma alternativa em pacientes que são alérgicos às penicilinas. (HU; HU, 2005).

Estes fármacos possuem amplo espectro de ação e, devido a isso, têm sido muito utilizados na medicina humana e veterinária, tanto na prevenção de algumas doenças como no tratamento clínico (HU; HU, 2005; WANG, 2009). Geralmente são utilizados para tratar infecções da pele e do trato respiratório causado por bactérias Gram-positivas. Também possuem efeito contra algumas bactérias Gram-negativas e anaeróbicas (CHAMBERS; MAC-DOUGALL, 2011; KWIATKOWSKA; MAŚLIŃSKA, 2012; STEEL *et al.*, 2012). Além disso, possuem eficácia no combate às infecções por parasitos intracelulares, como *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp (SINAGRA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2009; PETROPOULOS *et al.*, 2009; SRIVASTAVA *et al.*, 2011; AVCI *et al.*, 2015; CALCAGNILE *et al.*, 2018).

Os macrolídeos são produzidos por vários microrganismos do gênero *Streptomyces* e podem ser modificados por derivação química. Apresentam em comum um anel de lactona macrocíclico contendo 14, 15 ou 16 átomos com açúcares (desosamina, cladinose, micaminose, micarose, micsamina e forosamina) conectados por meio de ligações glicosídicas, podendo apresentar caráter neutro e/ou básico (KANFER; SKINNER; WALKER, 1998).

O mecanismo de ação desses fármacos consiste na inibição da síntese proteica pela ligação reversível à porção 50S do ribossomo bacteriano, impedindo a translocação de peptídeos patógeno. A cadeia polipeptídica em formação, que se encontratemporariamente no local A da reação da transferase, não consegue deslocar-se ao local P, ou doador (CHAMBERS; MAC-DOUGALL, 2011). São considerados seletivos para o microrganismo sensível, porque não se ligam à subunidade do ribossomo 80S dos mamíferos (POULSEN; KOFOED; VESTER, 2000; GOLAN *et al.*, 2009). Diferente de outros antibióticos, possuem propriedades anti-inflamatórias inibindo a síntese de toxinas microbianas e fatores de virulência que induzem respostas pró-inflamatória (TAVARES, 1996; ALVAREZ-ELCORO; YAO, 2002; STEEL *et al.*, 2012, TOKU-E, 2019).

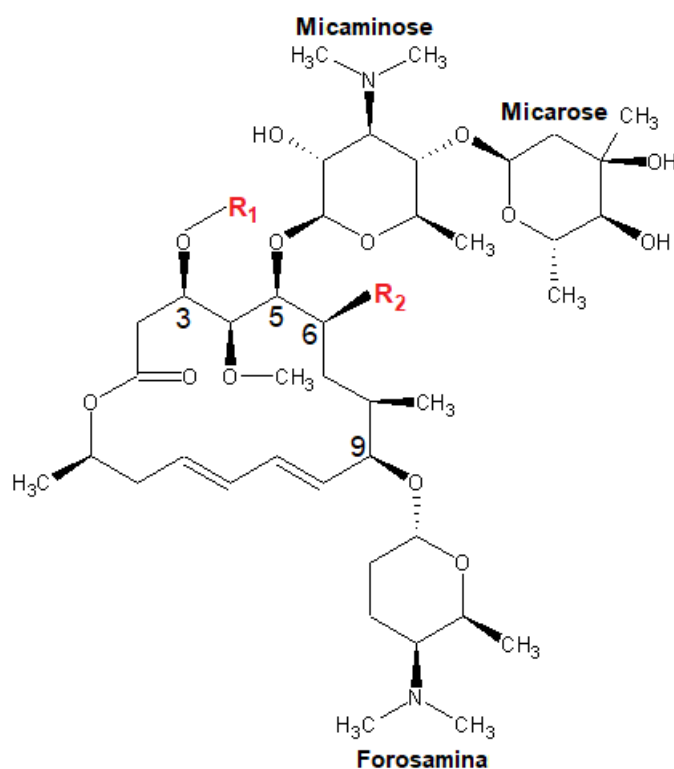
2.3 ESPIRAMICINA

A espiramicina (FIGURA 1), antibiótico pertencente à classe farmacológica dos macrolídeos, é obtida por meio da fermentação de cultura de cepas de *Streptomyces ambofaciens*. Como sendo um produto de fermentação, as impurezas da espiramicina variam de acordo com sua estrutura química e são pouco controladas em relação aos antibióticos sintetizados, sendo importante controlar a sua qualidade. A estrutura química principal inclui dois açúcares, a forasamina na posição C-9 e micaminose e micarose na posição C-5 do anel de lactona macrocíclico (LIN *et al.*, 2018). Seus três componentes principais estruturalmente relacionados são: espiramicina I (mais de 80%); espiramicina II (menos de 5%) e espiramicina III (menos de 10%) (MOURIER; BRUN, 1997; HORIE *et al.*, 1998; SAGAN *et al.*, 2005; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Além disso, outros componentes podem estar presentes em menores quantidades: espiramicina IV, neoespiramicinas I, II e III, deoxi-dehidro espiramicina, metileno-espiramicina e outras substâncias relacionadas desconhecidas (LIU; ROETS; HOOGMARTENS, 1997; CHEPKWONY *et al.*, 2001). A espiramicina I é a mais polar e a espiramicina III a menos polar. Sendo assim, a ordem de eluição crescente em sistemas de cromatografia em fase reversa normalmente é: espiramicina I, espiramicina II e espiramicina III.

A espiramicina é comercializada no Brasil na dosagem de 1,5 MUI (equivalente à 450 mg, de acordo com Mahmoudi *et al.* (2016) na forma farmacêutica comprimidos (ANVISA, 2021).

A espiramicina se apresenta como pó branco ou levemente amarelado, levemente higroscópico e estrutura amorfa. É ligeiramente solúvel em água, livremente solúvel em acetona, álcool e metanol, apresenta massa molecular 843,05 g/mol, fórmula molecular $C_{43}H_{74}N_2O_{14}$, possui logP igual a 2,99, pKas de 12,53 (ácido) e 9,28 (alcalino), pH da solução entre 8,5 a 10,5 e rotação específica entre -80° a -85° . Apresenta potência mínima de 4100 IU/mg em relação a substância seca e possui pressão de vapor a 25°C de $9,9 \times 10^{-31}$ mmHg (DRUGBANK, 2007; EP, 2008; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019; TOKU-E, 2019).

Figura 1 - Estrutura química dos principais componentes da espiramicina e suas substâncias relacionadas.



Composto	R ₁	R ₂	Fórmula molecular	Micarose
Espiramicina I	H	CH ₂ -CHO	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	+
Espiramicina II	CO-CH ₃	CH ₂ -CHO	C ₄₅ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	+
Espiramicina III	CO-CH ₂ -CH ₃	CH ₂ -CHO	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₁₅	+
Espiramicina IV	H	CH ₂ -CH ₂ -CHO	C ₄₄ H ₇₆ N ₂ O ₁₄	+
Neoespiramicina I	H	CH ₂ -CHO	C ₃₆ H ₆₂ N ₂ O ₁₁	-
Neoespiramicina II	CO-CH ₃	CH ₂ -CHO	C ₃₈ H ₆₄ N ₂ O ₁₂	-
Neoespiramicina III	CO-CH ₂ -CH ₃	CH ₂ -CHO	C ₃₉ H ₆₆ N ₂ O ₁₂	-
Deoxi-dehidro espiramicina	H	CH ₂ -CH ₃	C ₄₃ H ₇₆ N ₂ O ₁₃	+
Metileno-espiramicina	H	C(CH ₂)-CHO	C ₄₄ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	+

Fonte: adaptado de Liu, Roets, Hoogmartens, 1997; Chepkwony *et al.*, 2001; European, 2008; Lin *et al.*, 2018; Pubchem, 2020.

O processo de absorção da espiramicina é rápido, porém incompleto, com biodisponibilidade em torno de 40% (FRYDMAN, 1988). Apesar da baixa biodisponibilidade é possível encontrar “resquícios” de espiramicina em tecidos como pulmões, amígdalas, brônquios, entre outros (ALLEN *et al.*, 1988; GENNARO, 1990) e estas concentrações teciduais persistem por longo tempo após as concentrações plasmáticas terem caído para níveis baixos (REYNOLDS, 1993). A meia vida plasmática do fármaco é de 8 horas (FRYDMAN *et al.*, 1988; ANVISA, 2021).

O metabolismo da espiramicina ainda é pouco estudado, entretanto, sabe-se que é metabolizada principalmente no fígado em neoespiramicina, que é identificado como o principal metabólito e possui uma atividade antimicrobiana estimada de 88% em relação

à espiramicina (FRYDMAN *et al.*, 1988; DRUGBANK, 2007; WANG; LEUNG, 2009; ANVISA, 2021;).

Sua eliminação é lenta. Na urina as concentrações encontradas não chegam a 10% da dose ingerida. A eliminação biliar é muito importante com taxas de 15 a 40 vezes acima das concentrações plasmáticas, sendo encontrada em quantidades apreciáveis nas fezes. Também é excretada no leite materno (ANVISA, 2021).

2.3.1 Métodos de análise de espiramicina

A literatura registra vários métodos para análise de espiramicina em matérias-primas, medicamentos e matrizes biológicas, os quais estão descritos em ordem cronológica a seguir.

Um artigo de 1964 descreve a análise de sessenta e dois antibióticos em matérias-primas por cromatografia em papel utilizando diferentes fases móveis (BETINA, 1964). Em uma primeira etapa, todos os antibióticos foram analisados utilizando os mesmos sistemas de solventes como fases móveis. Os antibióticos foram então divididos em cinco diferentes classificações, sendo que cada classe foi posteriormente analisada por outras fases móveis específicas. A espiramicina foi dissolvida em metanol e detectada bioautograficamente utilizando *Bacillus subtilis*. Os autores afirmam que é possível utilizar este método para identificação, comparando o cromatograma do antibiótico analisado com cromatogramas de outras substâncias pertencentes à mesma classe. Entretanto, os autores afirmam que a identificação de um antibiótico desconhecido deve ser confirmada por outras técnicas, como espectroscopia no infravermelho, espectroscopia no ultravioleta e outras propriedades físicas e químicas.

Omura e colaboradores (1973) descreveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para separação e detecção de antibióticos macrolídeos em matérias-primas, incluindo espiramicinas I e III. Embora o trabalho seja focado na separação de componentes da leucomicina, os autores afirmam que o método pode ser útil para separação de outros macrolídeos, como a espiramicina. O cromatograma apresentado demonstra um tempo de corrida de aproximadamente 30 minutos.

Mourot *et al.* (1978) foram os primeiros a descrever um método para quantificação de espiramicinas I, II e III em matérias-primas por CLAE. As espiramicinas foram separadas por eluição isocrática. Para-nitrofenol foi utilizado como padrão interno. Os autores demonstram que foi obtida separação das três espiramicinas e do padrão interno em aproximadamente 10 minutos.

Bens, Van Den Bossche e Moerloose (1979) descreveram dois sistemas por CLAE para quantificar as espiramicinas I, II e III em matérias-primas, comprimidos e supositórios. Em ambos os casos, o tempo de corrida foi de aproximadamente 13 minutos, permitindo assim a separação e quantificação das espiramicinas.

Bens, Crombez e Moerloose (1982) descreveram métodos por CLAE para separação de turimicinas e espiramicinas I, II e III em matérias-primas. Todas as condições utilizadas no trabalho permitiram a separação das três espiramicinas em torno de 10 minutos.

Dow e colaboradores (1985) descreveram um método por CLAE para determinação de espiramicina I em plasma utilizando espiramicina II como padrão interno. O método consistiu de injeção direta de plasma utilizando *column-switching* para extração seletiva dos analitos na primeira coluna (coluna extratora) e separação na segunda coluna (coluna analítica). Os autores apresentaram cromatogramas com tempo de corrida de até 40 minutos. Foram obtidas recuperações de espiramicina I entre 71,0 a 96,0% e o limite de detecção do método foi de 50 ng/mL.

Horie *et al.* (1988) descreveram um método para quantificação dos componentes da espiramicina (espiramicinas I, II e III e neoespiramicinas I, II e III) em formulações farmacêuticas por CLAE. Os autores apresentaram cromatogramas com tempos de corrida de até 20 minutos. Segundo os autores, o conteúdo de espiramicina I nas preparações farmacêuticas foi de cerca de 70% e o método é útil para análises quantitativas. Entretanto, de acordo com Chepkwony e colaboradores (2001) e Liu, Roets e Hoogmartens (1997), o método descrito por Horie e colaboradores (1988) resulta em separação incompleta de espiramicina I.

Carlhant e colaboradores (1989) descreveram um método para determinação de espiramicina em plasma sanguíneo e humor vítreo por CLAE com extração em fase sólida utilizando cartuchos C-18. A espiramicina II foi utilizada como padrão interno para a determinação da espiramicina I. O método apresentou limite de detecção de 50 ng/mL; desvio padrão relativo de 6,1% e 5,2% para as concentrações de 0,2 e 10 µg/mL, respectivamente; e recuperações entre 48,0 a 97,0% para a espiramicina I. Os autores comentam que métodos por CLAE possibilitam a separação das diferentes formas da espiramicina e de seus metabólitos, além de permitirem análise simultânea de outros antibióticos utilizados em terapias combinadas com a espiramicina, representando assim uma importante vantagem sobre métodos microbiológicos. Os cromatogramas apresentados demonstram análises em até 30 minutos.

Renard e colaboradores (1994) descreveram um método por CLAE para determinação de espiramicina e neoespiramicina em plasma e leite bovinos. Os analitos foram extraídos das amostras de plasma e leite bovinos, a partir de um procedimento de extração líquido-líquido utilizando clorofórmio, seguido de extração em fase sólida com cartuchos Varian® AASP (*advanced automated sample processor*) do tipo diol. Segundo os autores, os limites de quantificação da espiramicina no plasma e no leite bovinos foram 0,023 e 0,013 µg/mL, respectivamente, e os da neoespiramicina foram 0,058 e 0,006 µg/mL, respectivamente. O método foi aplicado para estudos farmacocinéticos em ambas as matrizes e foi capaz de separar os analitos em cerca de 10 minutos.

Sanders e Delépine (1994) descreveram um método por CLAE e detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM) para análise confirmatória de espiramicina em músculo bovino. As amostras (2 g de músculo) foram preparadas por extração líquido-líquido, seguida de extração em fase sólida utilizando cartuchos do tipo diol. O tempo de corrida foi de aproximadamente 50 minutos e o limite de detecção foi de 20 µg/Kg.

Veiga e de Eulate (1994) estudaram o processo de dissolução de espiramicina em diferentes meios de dissolução sob diferentes velocidades de agitação. A espiramicina dissolvida foi quantificada por espectrofotometria no comprimento de onda de 234 nm. Os perfis de dissolução apresentados pelos autores demonstram que a quantidade de espiramicina dissolvida nos meios variou entre 50 a 500 mg/L, aproximadamente.

Liu, Roets e Hoogmartens (1997) descreveram um método por CLAE para análise de espiramicinas I, II e III em matérias-primas na presença de impurezas. O tempo de corrida foi de aproximadamente 60 minutos. De acordo com Chepkwony *et al.* (2001), este método descrito por Liu, Roets e Hoogmartens apresentou baixa sensibilidade, embora demonstrasse seletividade satisfatória.

González-Hernández *et al.* (1999) desenvolveram e validaram um método analítico para a determinação da espiramicina I na presença de suas substâncias relacionadas por eletroforese capilar. De acordo com os autores, foi obtida boa seletividade entre a espiramicina I e suas substâncias relacionadas. Além disso, o método foi descrito como linear ($r = 0,9992$) e preciso (desvio padrão relativo = 1,3%). Os limites de detecção e quantificação foram 7 pg (0,025%) e 22 pg (0,08%), respectivamente, em relação a uma solução a 2 mg/mL. Entretanto, de acordo com Chepkwony e colaboradores (2001), este método por eletroforese capilar é adequado apenas para separação dos principais componentes da espiramicina e quatro das substâncias relacionadas.

Chepkwony e colaboradores (2001) descreveram um método por CLAE para análise de uma mistura de espiramicinas I, II, III e IV e neoespiramicinas I, II e III. A mistura de analitos foi preparada no laboratório. O tempo de corrida foi cerca de 70 minutos.

Civitareale *et al.* (2004) desenvolveram e validaram um método por CLAE para identificação e quantificação de espiramicina I e tilosina A em alimentos para animais. Os analitos foram extraídos utilizando metanol, e então purificados e concentrados utilizando cartuchos de extração em fase sólida do tipo cianopropil com posterior eluição através de coluna contendo alumina. Os cromatogramas demonstram tempo de análise de aproximadamente 20 minutos. O limite de detecção para espiramicina foi de 176 ng/g, a recuperação média variou entre 74 a 99% e os desvios padrões relativos não excederam 15%.

Sagan e colaboradores (2005) descreveram um método analítico por CLAE-EM para determinação simultânea das concentrações de metronidazol e espiramicina I em plasma humano, saliva e fluido crevicular gengival. Ornidazol foi utilizado como padrão interno e o pré-tratamento da amostra foi realizado por extração líquido-líquido. Os cromatogramas demonstram que os analitos foram separados em cerca de 8,0 minutos. Segundo os autores, o método demonstrou precisão, exatidão e sensibilidade adequados.

García-Mayor e colaboradores (2006) desenvolveram um método por CLAE para quantificação simultânea de sete macrolídeos (eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, josamicina, espiramicina, tilosina e ivermectina) em leite de ovelha. A extração dos resíduos de antibióticos em leite envolveu uma combinação de hidróxido de sódio concentrado e acetato de etila. A recuperação dos antibióticos foi entre 55% e 77%, com desvios padrão relativos variando de 1% a 6,5%. O limite de quantificação foi de 24,1 µg/kg para espiramicina. Os cromatogramas demonstram um tempo de análise de aproximadamente 30 minutos. Segundo os autores, o procedimento foi utilizado com sucesso para determinação dos macrolídeos em níveis abaixo das concentrações máximas permitidas legalmente para amostras de leite.

Pendela *et al.* (2007) descreveram um método por CLAE-EM para caracterização de espiramicina e substâncias relacionadas em matérias-primas comerciais. Os cromatogramas demonstram um tempo de análise de aproximadamente 160 minutos. No total, os autores identificaram 17 substâncias, dentre as quais três são relatadas como impurezas na Farmacopeia Europeia.

O método descrito na European Pharmacopoeia (2008) para doseamento de espiramicina é o método microbiológico geral preconizado para doseamento de antibióticos. Para determinação de substâncias relacionadas, é descrito um método por CLAE. Segundo a

farmacopeia, a quantidade mínima de espiramicina I em matérias-primas é 80,0%; a quantidade máxima de espiramicina II é de 5,0% e a quantidade máxima de espiramicina III é de 10,0%.

Vincent e colaboradores (2007) descreveram um método por cromatografia em camada delgada com detecção bioautográfica para identificação de espiramicina, tilosina e virginiamicina em alimentos. Os analitos foram extraídos utilizando uma mistura de metanol e água com posterior partição líquido-líquido utilizando clorofórmio. A separação cromatográfica foi realizada utilizando sílica gel como fase estacionária e a detecção bioautográfica foi realizada através de pulverização das placas secas com suspensão de *Micrococcus luteus*. Um estudo de validação interlaboratorial foi realizado com participação de sete laboratórios e o limite de detecção para espiramicina foi de 2 mg/kg.

Maher e Youssef (2009) descreveram dois métodos cromatográficos para determinação simultânea de metronidazol e espiramicina em comprimidos comerciais. O primeiro método foi baseado na separação por cromatografia em camada delgada de alta eficiência seguida de medida de densitometria das manchas em 240 nm. O segundo método foi baseado na utilização da CLAE. O cromatograma apresentado pelos autores mostra que o método por CLAE separa metronidazol, espiramicina I, II e III em cerca de 10 minutos. Ambos os métodos foram validados de acordo com as especificações do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH). De acordo com os autores, os métodos propostos são simples, precisos e reprodutíveis.

Wang e Leung (2009) descreveram um método para quantificação e confirmação de espiramicina e neoespiramicina em leite cru por CLAE-EM. Os resíduos de espiramicina e neoespiramicina em leite cru foram extraídos utilizando acetonitrila e posteriormente purificados e concentrados com cartuchos de extração em fase sólida. Os cromatogramas demonstram que a separação cromatográfica foi obtida em menos de 5 minutos. A exatidão do método, expressa como porcentagem de recuperação, foi de 82,1 a 108,8%, e a precisão intermediária foi inferior a 20%. Os limites de detecção para espiramicina e a neoespiramicina foram inferiores a 1,0 µg/kg.

Kwiecień, Krzek e Gadek (2014) desenvolveram um método por cromatografia em camada delgada seguida de densitometria para identificação e quantificação simultânea de azitromicina, claritromicina, roxitromicina, espiramicina e troleandomicina em comprimidos. O método foi validado de acordo com as especificações do ICH. O tempo de análise foi de 30 minutos. De acordo com os autores, o método pode ser utilizado para a determinação dos antibióticos em preparações farmacêuticas como alternativa a outras técnicas de separação.

Elkhouday, Salam e Hadad (2016) desenvolveram um método por CLAE para análise simultânea de metronidazol, espiramicina, diloxanida e cliquinol em comprimidos, utilizando as ferramentas estatísticas de planejamento fatorial fracionário e delineamento de compósito central. Os quatro analitos foram separados em cerca de 15 minutos. Entretanto, os autores não discutem qual espiramicina (I, II, III ou IV) é analisada.

Katsidzira, Wessels e Aucamp (2016) desenvolveram um método por CLAE para análise de claritromicina ou espiramicina em matérias-primas, dispersões sólidas amorfas e em comprimidos. O tempo de corrida foi cerca de 5 minutos para espiramicina e 13 minutos para claritromicina. O método foi validado de acordo com o ICH. De acordo com os autores, o método desenvolvido mostrou ser simples e suficientemente sensível para a detecção e quantificação de claritromicina ou espiramicina em matrizes farmacêuticas. Entretanto, os autores não abordam se o método separa os principais componentes da espiramicina (I, II e III).

Mahmoudi *et al.* (2016) descreveram um método por CLAE para análise simultânea de eritromicina, azitromicina e espiramicina em comprimidos e pó para suspensão oral. O tempo de corrida foi cerca de 15 minutos. O método foi validado de acordo com as especificações da Farmacopeia dos Estados Unidos da América e do ICH. De acordo com os autores, o método mostrou seletividade adequada em relação aos três analito. Entretanto, os autores não abordam se o método separa os principais componentes da espiramicina (I, II e III).

García-Mayor e colaboradores (2017) sintetizaram e caracterizaram polímeros de impressão molecular (MIPs) para a determinação de espiramicina em leite de ovelha. O MIP, considerado ideal pelos autores foi caracterizado morfológicamente e utilizado para pré-concentração de espiramicina em amostras de leite de ovelha, seguida por análise por CLAE. O tempo de corrida foi cerca de 30 minutos. As recuperações médias em três concentrações nas amostras de leite foram superiores a 90% com desvios padrões relativos inferiores a 5%. O limite de quantificação foi 24,1 µg/kg. De acordo com os autores, o MIP ideal mostrou uma boa seletividade pela espiramicina, demonstrando potencial para pré-tratamento rápido, sensível e eficaz em amostras de leite de ovelha.

Zhou *et al.* (2017) desenvolveram e validaram um método por CLAE-EM para determinação simultânea de 16 antibióticos macrolídeos e 4 metabólitos em amostras de leite. Os analitos foram extraídos de amostras de leite obtidas em supermercados utilizando-se o método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) o qual foi previamente otimizado de forma multivariada, através de delineamento de compósito central e

metodologia de superfície de resposta, a fim de se obter a maior recuperação dos 20 analitos. Os cromatogramas demonstram tempos de corrida de até 30 minutos. Foram obtidas recuperações entre 62,27% e 115,28% e os limites de detecção e quantificação estiveram dentro da faixa de 0,30 - 0,85 µg/kg e 1,1 - 4,0 µg/kg, respectivamente.

Decheng e colaboradores (2018) desenvolveram um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) para determinação simultânea de 40 antibióticos (incluindo a espiramicina) e 3 amantadinas em amostras de alimentos derivados de animais. Foram obtidas recuperações entre 65,8 e 104,4% com desvios padrões relativos inferiores a 15%. Os limites de detecção variaram entre 0,5 a 5,0 µg/Kg. De acordo com os autores o método é simples, preciso, sensível e conveniente, fornecendo assim uma maneira promissora de monitorar antibióticos e amantadinas alimentos derivados de animais.

Liu, Wan e Cao (2018) sintetizaram polímeros de impressão molecular (MIPs) para purificação de espiramicina I de caldos de fermentação. O efluente foi coletado e analisado por CLAE. Os MIPs foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento dinâmico de luz, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e análise elementar. O MIP que exibiu melhores propriedades de transferência de massa, capacidade de adsorção e seletividade apresentou recuperação e pureza de 61% e 83%, respectivamente.

Lin *et al.* (2018) escreveram o desenvolvimento e validação de um método por CLAE para quantificação de espiramicinas I, II, III e IV e neoespiramicinas I, II e III em matérias-primas. O cromatograma apresentado pelos autores demonstra a separação das espiramicinas, neoespiramicinas e várias outras impurezas desconhecidas em cerca de 45 minutos. Além disso, foram realizados experimentos para caracterização de impurezas por CLAE-EM. Os cromatogramas demonstram tempos de corrida de até 30 minutos. Os autores analisaram quatro lotes de matérias-primas e encontraram que o conteúdo das espiramicinas I, II e III foi acima de 84,2% e abaixo de 0,4% e 3,4%, respectivamente, com valores de desvios padrões relativos abaixo de 2,2%. Os autores afirmam que, comparando o método proposto com métodos anteriores, o tempo de análise foi cerca de duas vezes mais rápido e as impurezas foram melhor separadas.

Liu e colaboradores (2018) desenvolveram um método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) modificado para extração de resíduos de antibióticos (incluindo espiramicina) em leite com posterior quantificação por CLUE-EM. Os cromatogramas demonstram tempos de corrida de até 10 minutos. Foram obtidas

recuperações entre 70,5 e 98,0% com desvios padrões relativos inferiores a 10%. As capacidades de detecção variaram entre 0,2 a 2,0 µg/L.

Lofrano *et al.* (2018) avaliaram diferentes processos para remoção de espiramicina em amostras de águas residuais provenientes de uma estação de tratamento de efluentes. A espiramicina em amostras de água foi quantificada por CLAE-EM. De acordo com os autores, o limite de quantificação do método foi de 0,1 ng/mL e o processo de fotocatalise se mostrou o mais eficiente para remoção de espiramicina de águas residuais.

2.4 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O controle de qualidade é de grande relevância em qualquer unidade de fabricação de medicamentos, pois certifica a qualidade e confere segurança e credibilidade aos produtos que estão sendo repassados ao consumidor (ROCHA; GALENDE, 2014).

O desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e robustos, dentro das inúmeras funções do controle de qualidade, é de extrema importância, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas para a empresa e para saúde do consumidor (RIBANI *et al.*, 2004; LA ROCA *et al.*, 2007).

Primeiramente, ao analisar um fármaco ou matéria-prima, deve-se recorrer aos compêndios oficiais. Quando se tem a metodologia disponível, é necessário que se utilize as condições descritas para averiguar se os resultados atenderão às expectativas. Em alguns casos, há necessidade de otimizar o método descrito, ou seja, alterar algumas condições experimentais para aperfeiçoar o desempenho do sistema cromatográfico, pois pode haver diferenças inter-laboratoriais que, por consequência, prejudicam os resultados finais. Em situações em que não exista métodos oficiais ou apenas dados na literatura, é preciso elaborar o método (BRAGA, 2018).

Para desenvolver um método analítico adequado, demanda-se tempo e esforços significativos, sendo que vários fatores devem ser considerados nesta etapa, tais como: propriedades físico-químicas do analito de interesse; informações sobre a amostra (matriz); métodos existentes; necessidade de método de extração rápido, separação de todos os compostos presentes na matriz, tempo de análise curto, baixo custo, sistema de detecção adequado, baixo limite de quantificação, mínima geração de resíduos tóxicos e/ou agressivos ao meio ambiente, etc (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; WATZIG, 2008; VOGT; KORD, 2011; SWARTZ; KRULL, 2012; GUPTA *et al.*, 2012).

Para o desenvolvimento do método analítico, realiza-se a otimização das variáveis envolvidas. A otimização tem por objetivo melhorar o desempenho do método, de forma a obter dele o máximo de benefícios possíveis. À vista disso, utiliza-se o termo otimização, em química analítica, para se referir a um conjunto de experimentos que visam a obter as condições de um método que, ao serem aplicadas, produzem as melhores características analíticas (ARAÚJO; BRERETON, 1996; BEZERRA *et al.*, 2008; NOVAES *et al.*, 2017).

Os processos de otimização podem ser realizados pelo monitoramento de uma condição analítica por vez, sendo este tipo de processo conhecido como otimização univariada. No entanto, nos anos recentes, a utilização de ferramentas quimiométricas multivariadas tem aumentado, pois normalmente reduz o número de experimentos, resultados em menor tempo para otimização e, conseqüentemente, menor gasto com reagentes. Ademais, a otimização multivariada permite avaliar os efeitos de interação entre os fatores analisados, o que não é possível por meio da otimização univariada (NOVAES *et al.*, 2017).

Dentre as diferentes ferramentas quimiométricas multivariadas para otimização de métodos analíticos, o mais indicado quando se deseja estudar inicialmente os efeitos de duas ou mais variáveis na resposta de um método analítico, é o planejamento fatorial. Este tipo de planejamento comumente é representado por b^k , sendo “b” o número de níveis escolhidos (condições de operação) e k o número de fatores (variáveis em estudo). O evento mais simples de planejamento fatorial é o de dois níveis (experimento fatorial 2^k). Regularmente, o nível mais baixo é indicado como sinal negativo (-) e o mais alto com sinal positivo (+). Depois de realizar os experimentos do planejamento fatorial, avalia-se o efeito de cada fator, definindo como a mudança ocorrida na resposta quando se muda de nível baixo (-) para o nível alto (+). Os efeitos podem ser graficamente representados por meio do diagrama de Pareto (NEVES *et al.*, 2002; CUNICO *et al.*, 2008).

Posterior à análise dos efeitos, as variáveis que influenciam significativamente na resposta analítica normalmente são otimizadas utilizando planejamentos experimentais tipo Box-Behnken, Composto Central ou Dohler. Executando estes experimentos, permite-se o ajuste de modelos matemáticos empíricos aos dados experimentais obtidos, por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR). Deste modo, é possível descrever o comportamento das respostas de acordo com a variação dos níveis a partir de uma função quadrática (NOVAES *et al.*, 2017).

Na otimização das condições cromatográficas, alguns artigos que descrevem a utilização de planejamentos experimentais são: Harang; Karlsson; Josefson (2001); Dincel; Basci (2007); Tappin *et al.* (2008); Aragão; Veloso; Andrade (2009); Barmpalexis; Kanaze; Georgarakis (2009); Iuliani; Carlucci; Marrone (2009); Nemutlu *et al.* (2009); Andrade-Eiroa; Diérvate; Dagaute (2010); Ghari; Kobarfardb; Mortazavia (2013); Liew; Peh; Tan (2013) e Alhazmi *et al.* (2018). Após as etapas de desenvolvimento e otimização do método analítico, deve ser feita sua validação, com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos.

2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os avanços nas pesquisas na área farmacêutica vêm viabilizando a introdução de novos fármacos no mercado, os quais são lançados pelas indústrias farmacêuticas que mantêm sigilo sobre os métodos analíticos utilizados para quantificação do ativo no produto farmacêutico (SILVA, 2012). Para um novo método ser considerado adequado para uso, esse deve ser avaliado de forma apropriada e demonstrar a sua adequação ao uso, bem como sua reprodutibilidade (PINTO; KANEKO; OHARA, 2010; ANVISA, 2017).

No Brasil, há dois órgãos credenciadores para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam manuais para o procedimento de validação de métodos analíticos (SANTOS, 2011).

Existem algumas definições para o termo “validação de métodos analíticos”. Segundo a *United States Pharmacopeia* (2017), validação analítica é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do procedimento atendem aos requisitos para as aplicações analíticas pretendidas. Para o guia *Eurachem* (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014) é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 determina que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017).

O objetivo do procedimento analítico deve ser compreendido de modo claro, uma vez que regerá as características de validação que precisam ser avaliadas. As características típicas que devem ser consideradas são:

Especificidade e Seletividade: Grau em que um método pode quantificar o analito com precisão na presença de interferentes. Idealmente, a seletividade deve ser avaliada para qualquer interferente importante que possa estar presente. É particularmente importante verificar os interferentes que são prováveis, de acordo com os princípios químicos, de responder ao teste (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002).

Linearidade: É sua capacidade de obter resultados de teste que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração de analito em amostras dentro de um determinado intervalo. Assim, nesta seção, linearidade se refere à linearidade da relação de concentração e medição do ensaio (USP, 2017).

Faixa de Trabalho: É o intervalo entre os níveis superior e inferior do analito (incluindo esses níveis) que demonstraram ser determinados com um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade usando o procedimento conforme escrito (USP, 2017).

Precisão: Avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (ANVISA, 2017). Deve ser expressa por meio de:

Repetitividade (precisão intra-corrída): Concordância entre resultados dentro de curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Deve ser verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2017).

Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): Concordância entre resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2017).

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): Concordância entre resultados obtidos por laboratórios diferentes com estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão se expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR) (ANVISA, 2017).

Exatidão: Avaliada por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2017).

Robustez: é uma medida de sua capacidade de não ser afetado por pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal ((INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005).

Limite de Quantificação: É a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2020).

Limite de Detecção: É a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob condições estabelecidas para o ensaio (INMETRO, 2020).

2.6 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A palavra cromatografia se origina do grego “chroma” (cor) e “graphein” (escrita), escrita da cor e remete aos primeiros métodos cromatográficos em que a separação de compostos se baseava na diferença de cor. A técnica foi descoberta e desenvolvida pelo botânico Michael Tswett no século XX. A cromatografia a líquido consiste em um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura. No caso da cromatografia líquida em coluna, a fase móvel (FM), denominada eluente, flui continuamente (percola) através de uma fase estacionária, a qual é acondicionada dentro de uma coluna (cilindro/tubo geralmente de vidro ou metal). As moléculas da mistura irão se distribuir diferencialmente entre as fases, sendo que os analitos que apresentarem maior interação com a fase móvel irão permanecer por menor tempo na fase estacionária, por consequência se deslocarão mais rapidamente através da coluna. Essas diferentes interações que ocorrem entre os analitos e as fases leva a tempos de retenção distintos para cada componente da amostra (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; COLLINS, 2009; RAMOS, 2014).

Existem diferentes critérios para a classificação das técnicas cromatográficas, e podem ser categorizados em função de:

- a) quanto ao mecanismo de separação: processos físicos, químicos ou mecânicos;
- b) quanto à técnica empregada;
- c) em relação ao tipo de fase móvel utilizada.

Quanto ao mecanismo de separação, esta pode ser classificada nas modalidades afinidade e exclusão por tamanho. Na modalidade afinidade, a separação ocorre por meio de processos físicos: adsorção ou partição (absorção), ou processos químicos: troca iônica. Na modalidade exclusão, estão a cromatografia por permeação em gel (*size exclusion chromatography*, SEC) e a cromatografia de filtração em gel (*gel filtration chromatography*, GFC), os quais são processos mecânicos onde não se deve existir nenhum tipo de interação com a fase estacionária, ocorrendo somente a separação física por tamanho (LANÇAS, 2009; RAMOS, 2014).

Quanto à técnica, leva em conta a geometria da superfície na qual a separação ocorre. Se a fase estacionária se encontra dentro de um tubo cilíndrico, a técnica é denominada cromatografia em coluna, enquanto que, se em uma superfície plana, é denominada cromatografia planar ou em camada delgada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Quanto à natureza da fase móvel, a cromatografia pode ser classificada em gasosa, líquida ou com fluido supercrítico (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

Embora a técnica por cromatografia gasosa (CG) seja mais eficiente na capacidade de separação dos componentes de uma mistura, a mesma possui limitações pelo fato de que os componentes a serem analisados devem ser voláteis e termicamente estáveis, restringindo a utilização desta técnica para o atual trabalho. Devido a isso, a escolhida como foco do trabalho é a cromatografia líquida.

Em cromatografia líquida, a fase estacionária pode ser tanto um líquido (cromatografia líquido-líquido) quanto um sólido (cromatografia líquido-sólido). Nesta última, a fase estacionária é um sólido, de grande área superficial, onde os solutos da amostra irão interagir e ficarem mais ou menos retidos, dependendo da natureza química de ambos. Já em cromatografia líquido-líquido, geralmente um líquido de elevada massa molecular é depositado na superfície de um suporte sólido por processos de radiação e temperatura. Logo a FE fica fisicamente depositada sobre o suporte e o conjunto é colocado dentro da coluna. Contudo, este tipo de fase não se mostrou muito eficiente, pelo fato de que a FM (solvente) remove facilmente a fase líquida depositada sobre o suporte sólido, danificando com facilidade a coluna (LANÇAS, 2009).

Nos dias atuais, reações químicas vem substituindo este procedimento, gerando fases quimicamente ligadas (*bonded phases*) ao suporte e, conseqüentemente, desenvolvendo fases mais estáveis. A partícula de sílica é quimicamente modificada de maneira que, seus grupos funcionais ativos, os silanóis, sejam substituídos por diferentes

grupos funcionais, octadecilsilano (ODS ou C18), octilsilano (C8), fenil, ciano, amino, e outros. As principais reações efetuadas para a modificação são: esterificação, reação com aminas, reações de Grignard e formação de siloxanos, além de uma proposta baseada na formação de um hidreto de sílica como intermediário de reação (TONHI *et al.*, 2002).

Durante o estabelecimento da técnica cromatográfica, a forma mais habitual era o uso de fases estacionárias bastante polares (alumina, sílica, etc.) e a fase móvel menos polar (hexano, iso-octano ou pentano modificado), tendo por principal mecanismo de separação a adsorção. Contudo, com a evolução da técnica, tornou-se possível substituir o grupo silanol (Si-OH) da superfície da sílica tanto por grupos polares (amino - NH₂) quanto por grupos apolares (C-18). Nestes casos, o mecanismo predominante é a partição (absorção). Em vista disso, para diferenciar uma forma da outra, determinou-se que quando a fase quimicamente ligada é preparada para substituir o grupo silanol por um grupo polar, a coluna opera em fase normal. Quando a substituição do grupo silanol da sílica é feita por grupos apolares (C18, C8, C6, C4, etc.), determinou-se que fase estacionária seria denominada como fase reversa, atribuindo que este mecanismo era o inverso da adsorção (SILVA *et al.*, 2004).

Ao definir entre os dois métodos de cromatografia (fase normal ou reversa), deve ser feito um estudo de solubilidade dos compostos/analitos a serem analisados, pois estes devem, necessariamente, ser solúveis na FM escolhida (RAMOS, 2014). A cromatografia em fase reversa se baseia no uso de uma FM polar, geralmente constituída de uma mistura contendo água e solvente orgânico (acetonitrila ou metanol). A retenção é governada pela hidrofobicidade do soluto, e devido a isso, quanto maior a polaridade do soluto, maior será sua afinidade pela fase móvel (LANÇAS, 2009). Outro fator importante é a capacidade doadora ou aceptora de prótons e o momento dipolar do soluto, do solvente e da fase móvel, pois definem em grande parte a seletividade do sistema. Entretanto, para algumas separações este sistema não é eficiente, requerendo a adições de tampões, íons metálicos ou outras estratégias (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) surgiu graças a mudanças em vários parâmetros da técnica, permitindo um melhor desempenho do sistema como um todo. Um dos aspectos mais importantes foi a utilização de bombas para a pressurização do sistema para forçar a passagem de um solvente por meio de colunas fechadas que continham partículas muito finas, assim proporcionando separações muito eficientes entre os componentes de uma mistura (PIRES, 2017). No desenvolvimento de um método

analítico, os objetivos se consistem em obter uma separação adequada em um tempo razoável para análise (HARRIS, 2012).

No mercado existem diferentes modelos de cromatógrafos, e por esse motivo, no momento da aquisição de um equipamento, características como versatilidade, rapidez, reprodutividade e detectabilidade, devem ser levadas em consideração (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A análise quantitativa de compostos presentes em misturas foi muito favorecida e viabilizada com a aplicação da CLAE devido ao acoplamento de detectores aos cromatógrafos. Os detectores utilizam radiação UV-Vis, espalhamento de luz, fluorescência, dentre outros, aliados a softwares, contribuem para análise de componentes em misturas com concentrações extremamente baixas (LANÇAS, 2009).

A técnica tem sido amplamente empregada para análise quantitativa de antibióticos macrolídeos em métodos analíticos e bioanalíticos. Em sua maior parte, os autores utilizam fase móvel a base de acetonitrila e tampão fosfato de amônio e coluna cromatográfica do tipo C18 (TORAÑO; GUCHELAAR, 2001; KOUSOLOS *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2015; BALAJI; NISHA SHRI, 2016).

2.6.2 Ensaio Microbiológico

Os ensaios microbiológicos para quantificação da atividade de antibióticos são metodologias relativas, que exigem o emprego de uma avaliação comparativa frente a uma substância química de referência. Por conta da alta variabilidade inerente ao ensaio, torna-se indispensável a utilização de delineamentos experimentais adequados e a análise estatística dos resultados (KAVANAGH, 1972; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; ESMERINO *et al.*, 2004).

Ainda que possa se determinar a dosagem de antibióticos por métodos químicos e físico-químicos, os ensaios microbiológicos são, geralmente, os métodos de escolha para retirar dúvidas quanto à perda de atividade, não apresentada pelos outros métodos (LOURENÇO, 2006). Foi o que demonstrou Manfio *et al.* (2013) ao comparar a potência de produtos de degradação do antibiótico ceftriaxona pelos métodos microbiológico por difusão em ágar e HPLC-UV.

Estes ensaios, em especial, aplicam-se àqueles antibióticos de origem biológica, que podem conter misturas de substâncias com efeitos compatíveis, sinérgicos ou antagônicos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; USP, 2017).

Os métodos microbiológicos são recomendados por compêndios oficiais para determinação da potência destes agentes em preparações farmacêuticas, sendo utilizados com frequência o ensaio turbidimétrico e o ensaio por difusão em ágar (JAMIL *et al.*, 2016). Algumas farmacopeias exigem o ensaio microbiológico como método de controle de qualidade de matérias-primas de antimicrobianos e suas formulações farmacêuticas (FARMACOPEIA, 2019; USP, 2017).

Existem vários trabalhos na literatura que descrevem os métodos microbiológicos utilizando o ensaio por difusão em ágar e o turbidimétrico. Para espiramicina Liu e colaboradores (1999) realizaram um estudo interlaboratorial para determinar individualmente as potências de espiramicina I, II e III através dos ensaios microbiológicos de difusão em ágar, utilizando *Bacillus subtilis*, e/ou método turbidimétrico, utilizando *Staphylococcus aureus*. Seis laboratórios participaram dos experimentos, sendo que cinco laboratórios relataram resultados por difusão em ágar e três laboratórios relataram resultados obtidos pelo método turbidimétrico. O método de difusão em ágar demonstrou que as atividades de espiramicina II e III foram 57 e 72%, respectivamente, em relação à espiramicina I. Este método apresentou desvios padrões relativos interlaboratoriais entre 3,6 a 16,3%. Já o método turbidimétrico demonstrou que as atividades de espiramicina II e III foram 45 e 52%, respectivamente, em relação à espiramicina I, com desvios padrões relativos interlaboratoriais entre 2,6 a 7,7%. As análises apresentaram exatidão entre 95 a 105%, exceto para um dos laboratórios.

Antibióticos macrolídeos têm se tornado alvo de estudos para o desenvolvimento de métodos analíticos que aplicam o ensaio microbiológico por difusão em ágar, utilizando diversas cepas como microrganismo revelador (BREIER *et al.*, 2002; VITAL *et al.*, 2004; MAHMOUDI *et al.*, 2015). Na Farmacopeia Brasileira, dois exemplos são os ensaios preconizados para a eritromicina e azitromicina, tanto matéria-prima quanto produto acabado (FARMACOPEIA, 2019).

2.6.2.1 Método turbidimétrico

O método turbidimétrico é semelhante ao teste de diluição em série, contudo o efeito inibitório do antibiótico não se caracteriza por resposta tudo ou nada para a determinação do ponto final, e sim por uma redução gradual do crescimento microbiano (KAVANAGH, 1963). O método é caracterizado por uma série de tubos contendo concentrações diferentes de antibiótico, além de meio de cultura líquido e microrganismo-teste. Os dados obtidos da

leitura turbidimétrica, após incubação, permitem construir uma curva que relaciona a concentração do antibiótico com a turbidez resultante (GAVIN, 1957b; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Alguns fatores influenciam no método turbidimétrico, sendo alguns similares aos do método por difusão em ágar. É o caso das soluções, do pH e da composição do meio de cultura (GAVIN, 1957b). Outros fatores que podem influenciar são:

- a) substâncias a serem ensaiadas;
- b) incubação;
- c) término da incubação;
- d) medida de turbidez;
- e) limpeza da vidraria.

As substâncias utilizadas no ensaio devem ser solúveis em água ou em solvente miscível em água que não interfiram no crescimento microbiano na concentração usada, também não devem causar turvação ou precipitar. No preparo das soluções, estas devem ser estéreis para a realização do ensaio (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A incubação pode ser feita em estufa, mais comum, ou em banho-maria. Todavia, em banho-maria a variação de temperatura é maior, principalmente quando empregado um banho com circulação de água (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Os ensaios de antibióticos são finalizados por adição de uma substância que interrompe o crescimento microbiano. Geralmente, essa substância é o formaldeído a 12%, ou aquecimento a 80°C. Segundo Kavanagh e Ragheb (1979), o aquecimento em banho-maria a 80°C é método sugerido, pois todos os tubos podem ser imersos ao mesmo tempo. Já a adição de formaldeído tubo a tubo possui uma diferença de tempo entre o primeiro e o último tubo a receber a solução, assim promovendo um erro na medida de crescimento.

Na medição de turbidez, as células devem estar homogeneamente distribuídas no caldo. Em vista disso, o tubo deve ser invertido várias vezes a leitura realizada 15 minutos após a ressuspensão (KAVANAGH; RAGHEB, 1979).

Outro fator importante para o bom desempenho do método é a limpeza da vidraria utilizada no ensaio, além de outras questões, com o resíduo das substâncias usadas no processo de limpeza. Estas podem ser tão eficientes quanto ao antibiótico em reduzir o crescimento microbiano. A utilização de uma mistura de ácido sulfúrico e nítrico (95:5) é eficiente para evitar problemas com íons de cromo que podem ser originados a partir de resíduos da solução limpeza. A vidraria tem de ser imersa na solução ácida por 24 horas e o

enxágue deve ser realizado três vezes em água corrente e duas vezes em água destilada (KAVANAGH, 1963).

Curbete e Salgado (2016) desenvolveram e validaram um método microbiológico para quantificação de ácido fusídico em creme dermatológico por turbidimetria. O método proposto atendeu aos requisitos estabelecidos pela diretriz internacional, e a partir de análises estatísticas (ANOVA) o método desenvolvido em comparação com o método por cromatografia líquida não se diferenciam estatisticamente. Ao mesmo tempo, o ensaio turbidimétrico permitiu determinar a verdadeira atividade biológica do ácido fusídico, quando comparado com métodos físico-químicos como cromatografia líquida.

2.6.2.2 Método por difusão em ágar

O ensaio por difusão, desenvolvido para antibióticos, é fundamentalmente um método físico, no qual o microrganismo é utilizado como indicador da concentração do antibiótico. Aplica-se ao método um sistema de mono ou bicamada, em que, o meio de cultura sólido inoculado é distribuído, uniformemente, em placas onde a substância teste se difunde. (KAVANAGH, 1972; KAVANAGH; RAGHEB, 1979; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Após a realização do ensaio, as placas são incubadas e o crescimento do microrganismo ocorre respeitando as áreas onde tenha ocorrido a difusão da substância antimicrobiana, assim gerando contraste e resultando na chamada halo ou zona de inibição de crescimento (HEWITT, 1989; SOLANO, 2008). O diâmetro dessas áreas de inibição depende da concentração da substância ativa e tal fenômeno origina todo princípio do método de difusão (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Como preconizado na Farmacopeia Brasileira, é fundamental trabalhar com repetições para esses ensaios de forma a compensar os desvios inerentes (BRASIL, 2019).

Muitos estudos foram realizados no âmbito físico-biológico, permitindo assim o entendimento do mecanismo de difusão do antibiótico ou do fator e crescimento. A substância utilizada deve difundir num meio semi-sólido, e as diferentes condições técnicas permite evidenciar o fenômeno da difusão de uma região para outra, até que em um prazo de tempo haverá concentração constante da mesma (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A avaliação de potência de antibióticos exige uma padronização das condições técnicas, pois é necessária a conciliação de fenômenos físicos (difusão) e biológicos (microrganismo sensível, meio de cultura, incubação), a fim de que a distância de difusão seja medida experimentalmente após a revelação sob a forma de halo de inibição de crescimento.

Isto é, o microrganismo tem seu crescimento inibido em função da concentração do antimicrobiano difundido, sendo este capaz de impedir o seu desenvolvimento, em oposição ao restante do meio de cultura (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Vários fatores específicos afetam a definição dos halos e a natureza da curva dose-resposta. Um desses é a formação de halos duplos atribuídos à aquisição de resistência do microrganismo-teste na frente da difusão da substância, onde a concentração é menor que no reservatório e a população já é maior que a inicial, considerando a incubação do sistema. A composição do meio de cultura, volume do cilindro para depósito da substância, espessura do ágar e temperatura de incubação, também são outros fatores de grande importância que determinam a otimização do ensaio. Dentre os citados, o fator que possui maior influência e causa uma maior variabilidade nas respostas é a espessura do ágar, pois quanto mais fina a camada, maior será o efeito do volume contido no cilindro sobre a distância de difusão (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Para a realização do ensaio microbiológico por difusão em ágar, o microrganismo é preparado repicando-o em um caldo de enriquecimento e, em seguida, incuba-se por um período de tempo. Após a incubação, o caldo é diluído até que se obtenha uma suspensão de $25\% \pm 2$ de transmitância. A suspensão de microrganismo é inoculada em um meio de cultura que permita o isolamento de microrganismos heterotróficos, assim sendo denominada camada inoculada. Este ensaio pode ser realizado em mono ou bicamada, sendo que a última possui uma camada mais volumosa, denominada camada base. Faz-se necessário aguardar a solidificação da camada base, após a mesma ser vertida em placas de Petri para que a segunda camada (inoculada) seja empregada (FARMACOPEIA, 2019).

A solução teste que se deseja trabalhar, deve ser aplicada sobre a superfície do meio em uma área delimitada por *templates*, ou cilindros de aço inoxidável, ou discos de papel. Logo após o procedimento, as placas são levadas para a incubação por um tempo adequado ao método e ao final é realizada a leitura dos halos de inibição obtidos. Para fins de comparação uma solução de padrão deve ser preparada e o ensaio realizado nas mesmas condições descritas para amostras (FARMACOPEIA, 2019).

2.6.2.3 Delineamento de ensaios microbiológicos

Em alguns ensaios é necessário realizar uma inspeção preliminar dos dados experimentais para averiguar se estes seguem as suposições particulares de cada ensaio. No doseamento microbiológico é considerado que: pode ser representado por uma linha reta a

relação entre o logaritmo da concentração e a resposta analítica na faixa empregada; as respostas obtidas para cada concentração são normalmente distribuídas; o desvio padrão de cada resposta é independente do efeito em si e a distribuição dos tratamentos é um processo randômico (INTERNATIONAL PHARMACOPEIA, 1979).

O delineamento 3x3 é dito simétrico, pois a razão entre as concentrações adjacentes e o número de concentrações ensaiadas do padrão e da amostra é constante. Ao plotar as respostas analíticas obtidas para o padrão e amostra *versus* o logaritmo da concentração, duas retas são obtidas e estas devem ser paralelas, uma vez que o padrão e amostra contêm a mesma substância. Também, devem apresentar regressão significativa, ou seja, o microrganismo deve responder de forma diferente às concentrações da substância antimicrobiana. E finalmente, a relação entre o logaritmo da concentração (dose) e o diâmetro do halo de inibição deve ser linear. Baseado nestes três fatores, as fórmulas para o cálculo de potência foram desenvolvidas (HEWITT, 1977; FARMACOPEIA, 2019).

O delineamento retas paralelas 2x2 é o mais simples, uma vez que são utilizadas apenas duas concentrações de cada preparação. Todavia, é preconizado na farmacopeia brasileira que seu emprego somente seja feito após o desenvolvimento do ensaio 3x3 (FARMACOPEIA, 2019).

No delineamento 5x1, se empregam cinco concentrações do padrão para obtenção da curva analítica e uma da preparação da amostra. Em vista disso, é um ensaio assimétrico (FARMACOPEIA, 2019).

Hewitt (2004) classificou este ensaio como sendo de retas paralelas, devido à base do cálculo ser a mesma do ensaio de retas paralelas: a resposta analítica deve ser diretamente proporcional ao logaritmo da concentração.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico por difusão em ágar para quantificação de espiramicina na forma farmacêutica comprimidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São os objetivos específicos do trabalho:

- a) utilizar ferramenta quimiométrica multivariada para otimização do método cromatográfico;
- b) desenvolver e validar um método cromatográfico para quantificação de espiramicina em comprimidos;
- c) desenvolver e validar um método microbiológico para determinação da potência de espiramicina em comprimidos utilizando o ensaio por difusão em ágar;
- d) aplicar os métodos validados em amostra comercial de espiramicina na forma farmacêutica comprimidos.

4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados nesse trabalho são especificados a seguir.

4.1.1 Substância química de referência

A substância química de referência foi o padrão de espiramicina adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), com teor declarado de espiramicina (I, II e III) de 91,0%.

4.1.2 Substância de Referência Certificada

A substância utilizada como substância de referência certificada (SRC) foi a espiramicina adquirida da empresa Copermed (Pouso Alegre, Brasil) com teores declarados de espiramicinas I, II e III de 95,3%; 0,24% e 3,37%, respectivamente.

4.1.3 Produto farmacêutico

O produto farmacêutico utilizado no desenvolvimento e validação dos métodos foram comprimidos referência de espiramicina 1,5 MUI (equivalente à 450 mg, de acordo com Mahmoudi *et al.* (2016), adquiridos comercialmente em Alfenas/MG.

4.1.4 Microrganismo padrão

A cepa utilizada no ensaio microbiológico por difusão em ágar foi a *Bacillus Subtilis* ATCC 6633.

4.2 REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados nesse trabalho estão listados a seguir:

- a) Acetonitrila UV/HPLC, Merck Millipore®;
- b) Ácido acético glacial, Dinâmica Química Contemporânea®;
- c) Ácido fosfórico P.A (orto), Vetec®;
- d) Acetato de sódio, Êxodo Científica®;
- e) Ágar Triptona de Soja, Oxoid®;
- f) Álcool metílico UV/HPLC, Dinâmica Química Contemporânea®;
- g) Caldo Infuso de Cérebro e Coração, Oxford®;
- h) Fosfato de potássio monobásico, Êxodo Científica®;
- i) Fosfato de potássio dihidrogenado, Êxodo Científica®;
- j) Hidróxido de sódio P.A, Neon®.

4.3 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados neste trabalho os seguintes equipamentos:

- a) Aparelho de ultrassom Unique®, modelo USC 2800^a;
- b) Autoclave vertical Quimis®, modelo Q190-24;
- c) Autoclave vertical Primatec®, modelo CS;
- d) Balança analítica Sartorius®, modelo CP225D;
- e) Balança analítica Kern®, modelo 210;
- f) Banho-maria Nova técnica®, modelo NT265;
- g) Centrífuga Baby® I, modelo 206/1;
- h) Coluna cromatográfica C8 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), marca NST®;
- i) Coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4.6 mm, 5µm), marca Thermoscientific®;
- j) Espectrofotômetros UV/Vis (Shimadzu®, Tokyo, Japan), modelos 1601PC e 2001PC;
- k) Estufa bacteriológica Quimis®, modelo Q136M4;
- l) Filtros de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos com 0,45 µm de poro, Analítica®;
- m) Gabinete de fluxo laminar vertical Filterflux®;
- n) Medidor de pH, Marconi®, modelo PA 200;
- o) Mesa agitadora, Marconi®, modelo MA420;

- p) Micropipetadores de volume fixo e variável, marcas: Kacil[®] e Gilson[®];
- q) Paquímetro digital Marberg[®];
- r) Seringa agulha fixa 710SNR 100 µL, Hamilton[®];
- s) Sistema de cromatografia a líquido Shimadzu série LC-10 A com sistema de integração CLASS-VP, bomba LC-ADvp, desgaseificador DGU-14^a, injetor manual 7725i, detector UV SPD-10Avp, forno CTO-10Avp e controlador SCL-10Avp;
- t) Sistema de cromatografia a líquido Shimadzu[®] com sistema de integração LC-Solution, bomba LC-20AD, desgaseificador DGU-20^a 3r, injetor automático SIL-20AC ht, detector DAD modelo SPD-M20A, forno CTO-20^a e controlar CBM-20^a;
- u) Sistema de cromatografia a líquido Shimadzu[®] com sistema de integração LC-Solution, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20^a 5r, injetor automático SIL-20^a ht, detector UV/Vis modelo SPD-20^a e controlador CBM-20^a;
- v) Sistema purificador de água Gehaka[®], modelo OS20LXE.

4.4 VIDRARIAS E OUTROS MATERIAIS

Outros materiais que foram utilizados para a realização dos experimentos:

- a) Alça de cultivo;
- b) Balão de vidro para cultivo (50 mL);
- c) Cilindros de aço inoxidável (8 x 9 x 10 mm);
- d) Placas de Petri de fundo plano (100 x 20 mm);
- e) *Templates* de aço inoxidável;
- f) Tubos de ensaio com rosca (16 x 25 mm).

5 METODOLOGIA

5.1 ESCOLHA DO SOLVENTE DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A escolha dos solventes apropriados para o desenvolvimento do método analítico para quantificação de espiramicina I foi embasada nas condições de solubilidade descritas para matéria-prima de espiramicina na Farmacopeia Europeia (EP, 2008).

As soluções foram preparadas a partir da pesagem de 10 mg de espiramicina SRC e transferência para balões volumétricos de 50 mL. Conforme composição dos solventes apresentado na Tabela 1, adicionaram-se cerca de 30 mL de cada solvente e, em seguida, as soluções foram levadas ao ultrassom por 20 minutos. Completou-se o volume dos balões com os respectivos solventes (qsp). Posteriormente, transferiu-se, com auxílio de uma micropipeta automática, alíquota de 1,0 mL dessas soluções para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume dos balões com os mesmos solventes utilizados na primeira diluição. As soluções foram filtradas em filtros PTFE 0,45 μm antes das leituras.

Tabela 1 – Composição dos solventes testados para desenvolvimento de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Solvente	
Acetonitrila (ACN)	Metanol (MeOH)
ACN:H ₂ O (50:50 v/v)	MeOH:H ₂ O (50:50 v/v)
ACN:tampão pH 4,1 (50:50 v/v)	MeOH:tampão 4,1 (50:50 v/v)
ACN:tampão pH 6,5 (50:50 v/v)	MeOH:tampão 6,5 (50:50 v/v)
ACN:H ₃ PO ₄ (50:50 v/v)	MeOH:H ₃ PO ₄ (50:50 v/v)

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: ACN = Acetonitrila (grau HPLC); H₂O = água ultrapura; MeOH = Metanol (grau HPLC);

H₃PO₄ = Ácido Fosfórico 0,1%; Tampão 4,1 = Tampão acetato pH 4,1;

Tampão 6,5 = Tampão fosfato pH 6,5.

Cada solução foi analisada em espectrofotômetro por varredura espectral na região entre 400 e 200 nm, após zerar o equipamento com os respectivos solventes.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMTOGRÁFICO

5.2.1 Escolha do comprimento de onda

A partir da escolha do solvente, foi preparada solução pela pesagem de 10 mg de espiramicina SRC e transferência para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se cerca de 30 mL do solvente metanol. Em seguida, a solução foi levada ao ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o respectivo solvente (qsp). Em seguida, transferiu-se, com auxílio de uma micropipeta, alíquota de 1,0 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol:água (50:50, v/v) (concentração final de 20 µg/mL). Procedeu-se a varredura espectral em espectrofotômetro na região entre 200 e 400 nm, após zerar o equipamento com o respectivo solvente da última diluição.

5.2.2 Escolha inicial da fase móvel

A escolha da fase móvel e da coluna cromatográfica foi baseada nas propriedades físico-químicas da molécula do fármaco e nas literaturas que registram metodologias para separação do fármaco em diferentes matrizes (SAGAN *et al.*, 2005; WANG; LEUNG, 2009; ELKHOUDARY; SALAM; HADAD, 2016; KATSIDZIRA; WESSELS; AUCAMP, 2016; LIN *et al.*, 2018). A Tabela 2 apresenta a relação dos solventes e suas respectivas proporções utilizadas nos ensaios preliminares.

Tabela 2 - Relação de solventes e proporções utilizadas nos ensaios preliminares para escolha da fase móvel de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Solventes	Proporção (%)	
Tampão acetato pH 4,1:Metanol	40:60 (v/v)	
	60:40 (v/v)	
	80:20 (v/v)	
Metanol:Água	50:50 (v/v)	
	60:40 (v/v)	
	90:10 (v/v)	
Ácido Fosfórico 0,1%:Metanol	10:90 (v/v)	55:45 (v/v)
	20:80 (v/v)	60:40 (v/v)
	30:70 (v/v)	65:35 (v/v)
	40:60 (v/v)	70:30 (v/v)
	50:50 (v/v)	75:25 (v/v)
Metanol	100	

Fonte: Da autora (2021).

Ao realizar os ensaios, todas as fases móveis foram devidamente filtradas a vácuo por meio de membrana (Milipore®) e levadas ao ultrassom por 30 minutos para possível degaseificação das mesmas.

5.2.3 Otimização multivariada

A abordagem experimental para otimização de condições cromatográficas foi realizada de acordo com a literatura (MONTGOMERY, 2002), onde foi realizado inicialmente um planejamento fatorial completo 2^3 , cujos fatores e níveis estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Fatores e seus níveis empregados na construção de planejamento fatorial completo 2^3 para otimização de condições cromatográficas de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Fatores	Nível dos fatores	
	Menor (-)	Maior (+)
F1 - Metanol (%)	35	40
F2 - Vazão (mL/min)	0,8	1,2
F3 - Temperatura (°C)	30	40

Fonte: Da autora (2021).

Neste tipo de experimento, os fatores são examinados em dois níveis, o nível mais alto, codificado com o sinal positivo (+) e o nível mais baixo, codificado com o sinal negativo (-). Estes três fatores foram inicialmente selecionados porque normalmente influenciam significativamente nas separações cromatográficas. Além disso, seus níveis foram selecionados com base em alguns experimentos preliminares, onde se observou separações razoáveis próximas destes valores.

A partir da definição dos fatores e seus níveis, foram realizados oito experimentos utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 em duplicata, em ordem aleatória, de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3 utilizado na otimização de condições cromatográficas de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Ensaio	F1 Metanol (%)	F2 Vazão (mL/min)	F3 Temperatura (°C)
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: F = fator.

As respostas analíticas buscadas na otimização da metodologia foram: maior resolução entre as bandas cromatográficas, maior número de pratos teóricos, menor tempo de corrida e assimetria mais próxima de 1,0.

Posteriormente, empregou-se o cálculo de função de desejabilidade proposto por Derringer e Suich (DERRINGER; SUICH, 1980). Neste tipo de abordagem, as respostas obtidas em diferentes grandezas y_i , ($i = 1, 2, \dots, m$) foram dimensionadas em uma mesma escala (d_i), que varia entre 0, para respostas indesejáveis e 1 para as respostas buscadas. As equações abaixo descrevem as fórmulas utilizadas para obtenção das funções de desejabilidade parcial:

$$d_i = \{0, \text{ se } y_i \leq a; [(y_i - a)/(b - a)], \text{ se } a < y_i < b; 1, \text{ se } y_i \geq b\} \quad (1)$$

em que: y_i = resposta observada; a = limite inferior e b = limite superior.

$$d_i = \{1, \text{ se } y_i \leq a; [(y_i - b)/(a - b)], \text{ se } a < y_i < b; 0, \text{ se } y_i \geq b\} \quad (2)$$

em que: y_i = resposta observada; a = limite inferior e b = limite superior.

A equação 1 é descrita como do tipo “maior é melhor”, ou seja, ela é utilizada quando se busca respostas analíticas com os maiores valores. Neste estudo, esta fórmula foi utilizada nas resoluções entre as bandas cromatográficas e pratos teóricos. Já a equação 2 é descrita como do tipo “menor melhor”, ou seja, ela é utilizada quando se busca respostas com valores menores. Neste estudo, ela foi utilizada no tempo de corrida e assimetria, buscando a obtenção de um menor tempo de análise e valores de assimetria mais próximos de 1.

Após as funções foram definidas para cada resposta de interesse, uma função de desejabilidade global (D) foi calculada pela média geométrica das funções de desejabilidade individuais. Portanto, D foi calculado como a raiz enésima do produto das funções de desejabilidade individuais. Valor de D próximo de 1 indica que a combinação dos diferentes critérios é ótima e as respostas estão próximas aos valores desejados.

As respostas analíticas obtidas foram então utilizadas para construção do diagrama de Pareto utilizando software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.[®], Tulsa, Oklahoma, EUA).

Após análise do diagrama de Pareto, uma otimização final foi realizada, utilizando a Matriz de Doehlert com dois fatores, a qual compreende 7 condições, com um ponto central realizado em triplicata (FERREIRA *et al.*, 2004). Entretanto, neste segundo estudo, utilizou-se somente resolução (maior é melhor) e tempo de corrida (menor é melhor) para cálculo da função de desejabilidade global (D). Os fatores utilizados na

otimização final e seus níveis foram: vazão da fase móvel (0,5; 0,8 e 1,1) e proporção de metanol utilizado na fase móvel (29%, 31%, 33%, 35% e 37%). Os experimentos foram realizados segundo a Tabela 5, demonstrada abaixo:

Tabela 5 - Matriz de Doehlert utilizada na otimização final do método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Ensaio	Vazão da fase móvel (mL/min)	Proporção de metanol da fase móvel (%)
1 (triplicata)	0,8	33
2	0,8	29
3	1,1	31
4	0,8	37
5	0,5	35
6	0,5	31
7	1,1	35

Fonte: Da autora (2021).

A partir da matriz de Doehlert, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, a fim de otimizar os níveis dos dois fatores. Esta metodologia se baseia na construção de um modelo matemático empírico, que geralmente emprega funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização (TEOFILO; FERREIRA, 2006).

A superfície de resposta foi construída por meio do software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.[®], Tulsa, Oklahoma, EUA).

5.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS APÓS OTIMIZAÇÃO

Após a otimização da metodologia, a análise por CLAE foi realizada utilizando ácido fosfórico 0,1% (pH 2,1) e metanol (67:33, v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, coluna NST C-8 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) como fase estacionária, detecção em 232 nm e volume de injeção de 20 µL.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A validação do método analítico por CLAE para avaliação de teor de espiramicina I foi conduzida segundo a Resolução-RDC nº166, de 24 de julho de 2017, com determinação, dos parâmetros de seletividade por pureza do pico cromatográfico e efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção.

5.4.1 Preparo das soluções estoque para o ensaio cromatográfico

As soluções estoques utilizadas nos ensaios de validação estão descritas a seguir:

- Solução padrão: foram pesados exatamente 10 mg de espiramicina SRC (contém 95,3% de espiramicina I), transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se cerca de 30 mL do solvente metanol, levou-se ao ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente.

- Solução amostra: vinte comprimidos do medicamento referência foram pesados individualmente e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados e do pó resultante foram pesados exatamente 41,1 mg (0,1 peso médio) que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se cerca de 30 mL de solvente metanol (concentração de 822 μ .g/mL). Em seguida, as soluções foram levadas ao ultrassom por 20 minutos e o volume foi completado com solvente metanol.

5.4.2 Seletividade

5.4.2.1 Pureza de pico

A seletividade do método analítico foi comprovada avaliando a pureza dos picos cromatográficos de espiramicina I, obtidos a partir de análises por CLAE de soluções de SRC e de amostras.

A partir do preparo da solução estoque no item 5.4.1, transferiu-se 5,0 mL da solução padrão para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o solvente metanol:água (50:50, v/v), para concentração final de 95,3 μ g/mL de espiramicina I. Para solução amostra, transferiu-se 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o solvente metanol:água (50:50, v/v). Os procedimentos foram realizados em

triplicata sendo que as soluções de trabalho foram preparadas de forma independente. Além disso, foram filtradas em filtros PTFE 0,45 μm e analisadas por CLAE com detector de DAD (Detector Array Diode).

5.4.2.2 Efeito Matriz

A seletividade do método para matrizes complexas é avaliada pelo efeito matriz. Na ausência da matriz sem o analito, a determinação é feita por meio da comparação entre a inclinação (coeficiente angulares) da curva analítica da SRC do analito com a inclinação da curva da amostra fortificada com a SRC do analito (INMETRO, 2020).

A curva analítica da SRC do analito foi construída em seis níveis de concentração em triplicata e de forma independente, seguindo as mesmas condições do estudo de linearidade. Portanto, será descrita no item 5.4.3.

A curva da amostra fortificada com a SRC do analito foi preparada em triplicata de forma independente, e o preparo de solução estoque está descrito no item 5.4.1. As subsequentes diluições foram feitas a partir da transferência de 1,0 mL da solução estoque da amostra para balões volumétricos de 10 mL e adicionaram-se concentrações conhecidas de SRC do analito na amostra, conforme demonstrado na Tabela 6. O volume das soluções finais foi completado com metanol e água (50:50, v/v) e todas as soluções foram filtradas em filtros PTFE 0,45 μm antes das leituras.

Tabela 6 - Preparo da curva da amostra fortificada com a SRC para estudo de efeito matriz de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Nível de concentração	Volume adicionado de solução de SRC do analito (mL)	Concentração adicionada de SRC do analito ($\mu\text{g/mL}$)
1	3,5	148,91
2	4,0	158,44
3	4,5	167,97
4	5,0	177,50
5	6,0	196,56
6	6,5	206,09

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SRC = Substância de referência certificada.

As soluções de SRC do analito e de amostras fortificadas com a SRC do analito ($n_{\text{total}} = 36$) foram quantificadas por CLAE e, a partir das curvas obtidas, comparou-se

estatisticamente a inclinação das mesmas. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz.

5.4.3 Linearidade

A linearidade do método foi demonstrada por meio da capacidade de se obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra. Além disso, a relação linear foi avaliada em toda a faixa estabelecida para o método. Dessa maneira, a partir do preparado das soluções estoque de padrão no item 5.4.1, com o auxílio de uma bureta de 25 mL, procedeu-se às diluições das soluções, conforme Tabela 7, transferindo para balões volumétricos de 10 mL e completando o volume com o solvente metanol e água (50:50, v/v). Foram preparadas três réplicas para cada concentração com amostras independentes.

Tabela 7 - Preparo das soluções de espiramicina SRC para estudo de linearidade de método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Nível de concentração	Volume da solução padrão (mL)	Concentrações de espiramicina I ($\mu\text{g/mL}$)
1	3,5	66,71
2	4,0	76,24
3	4,5	85,77
4	5,0	95,3
5	6,0	114,36
6	6,5	123,89

Fonte: Da autora (2021).

As soluções de espiramicina SRC ($n = 18$) foram quantificadas por CLAE e, a partir das três curvas obtidas, construiu-se a curva analítica plotando os valores individuais das áreas dos picos cromatográficos em função das concentrações medidas. Em seguida, determinou-se a equação da reta; o coeficiente de correlação (r); o teste F e ANOVA de mínimos quadrados para análise das variâncias e significância do coeficiente angular; teste de Cochran e estatística de regressão.

5.4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor

de referência. Dessa maneira, para determinação da exatidão utilizou-se a abordagem contemplando o intervalo linear do método analítico com concentrações baixa (70%), média (100%) e alta (130%) da curva de calibração, em triplicata e avaliada pelo teste de recuperação.

5.4.4.1 Preparo da SRC de espiramicina

A partir do preparo das soluções estoque de padrão (item 5.4.1), volumes de 3,5; 5,0 e 6,5 mL foram adicionados às soluções de amostras em balões volumétricos de 10 mL, totalizando soluções com concentrações de espiramicina I adicionadas a 66,71 µg/mL, 95,3 µg/mL e 123,89 µg/mL. O procedimento foi realizado em triplicata e de forma independente.

5.4.4.2 Preparo das soluções amostra

A partir da solução estoque amostra (item 5.4.1), transferiu-se alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, adicionaram-se quantidades conhecidas de analito (espiramicina I) e completou-se o volume com o solvente metanol e água (50:50, v/v), conforme demonstrado na Tabela 8. As soluções foram filtradas em filtros PTFE 0,45 µm antes das leituras. O procedimento foi realizado em triplicata e de forma independente.

Tabela 8 - Preparo das soluções para realização do teste de exatidão do método analítico para quantificação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

Solução	Concentração de espiramicina I adicionada (µg/mL)	Concentração Final (µg/mL)
A	-	82,2
SRC adicionada em A (70%)	66,71	148,91
SRC adicionada em A (100%)	95,3	177,50
SRC adicionada em A (130%)	123,89	206,09

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: A= amostra; SRC= substância de referência certificada.

O percentual de recuperação foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{Ca - Cna}{Cp}$$

Em que,

Ca: Concentração de amostra adicionada de espiramicina I (experimental);

Cna: Concentração de amostra não adicionada de espiramicina I;

Cp: Concentração teórica de espiramicina I adicionada.

5.4.5 Precisão

A precisão foi analisada pelos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pela análise de seis soluções amostra de espiramicina comprimidos (100%), preparadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. Calculou-se o desvio padrão relativo entre as determinações a partir da fórmula abaixo. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição do procedimento em dois diferentes dias, por dois diferentes analistas.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

5.4.6 Robustez

Foi avaliada a partir do teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN; STEINER, 1975), no qual foram empregadas sete variáveis que podem interferir no resultado analítico, com posterior análise de dados. As variáveis selecionadas foram: fluxo da fase móvel, lote da coluna cromatográfica, marca comercial do metanol, pH da fase móvel, proporção de metanol na fase móvel, o tempo de sonificação das soluções e temperatura do forno no sistema cromatográfico. As condições normais das variáveis foram indicadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos indicadas pelas correspondentes letras

minúsculas a, b, c, d, e, f, e g (TABELA 9). A partir dos resultados obtidos no ensaio, foram calculados o percentual de recuperação e, em seguida, foi estimado o efeito de cada variável pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com a letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com a letra minúscula. Tendo em vista o desvio padrão entre os oito resultados, os valores de efeito maiores do que o produto do desvio padrão pela raiz quadrada de dois ($s\sqrt{2}$) foram considerados significantes e, portanto, alteram a resposta analítica.

Tabela 9 – Variáveis e seus níveis usados no estudo de robustez do método desenvolvido por CLAE, para quantificação de espiramicina I, de acordo com o teste de robustez de Youden e Steiner.

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condições experimentais							
			1	2	3	4	5	6	7	8
pH da fase móvel	2,1 (A)	2,3 (a)	A	a	A	a	A	a	A	a
Proporção de MeOH (%)	33 (B)	35 (b)	B	B	b	b	b	b	B	B
Lote da coluna	1 (C)	2 (c)	C	c	C	c	c	C	c	C
Temperatura do forno (°C)	30 (D)	25 (d)	D	d	d	D	D	d	d	D
Fluxo (mL/min)	1 (E)	0,8 (e)	E	e	e	E	e	E	E	e
Marca do metanol	Êxodo (F)	Analítica (f)	F	F	f	f	F	f	f	F
Sonificação (min)	20 (G)	15 (g)	G	G	g	G	g	G	g	g

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: MeOH = metanol.

5.4.7 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção é definido a partir da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, contudo, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Dessa forma, a determinação foi baseada em parâmetros da curva analítica utilizando a equação abaixo, indicada pela RDC nº166 (ANVISA, 2017):

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

Em que:

IC = inclinação média das três curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade;

σ = desvio padrão residual da linha de regressão.

O limite de quantificação é definido a partir da menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Logo, a determinação foi baseada em parâmetros da curva analítica utilizando a equação abaixo, indicada pela RDC nº166 (ANVISA, 2017):

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

Em que:

IC = inclinação média das três curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade;

σ = desvio padrão residual da linha de regressão.

5.4.8 Estudo de estabilidade das soluções

A estabilidade das soluções foi avaliada durante a validação do método em desenvolvimento (ANVISA, 2017). Dessa maneira, soluções amostra e padrão de espiramicina I em metanol a 95,3 $\mu\text{g/mL}$ foram armazenadas em refrigerador a aproximadamente 4 °C. A área do pico cromatográfico da espiramicina I foi verificada no intervalo de 0, 24 e 48 horas após a preparação. Em seguida, foram plotados gráficos das respostas analíticas em função do tempo e realizado uma análise estatística de regressão. Caso a regressão não seja significativa, demonstra que as áreas são estatisticamente iguais, comprovando a estabilidade das soluções nas condições analisadas.

5.5 DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO

5.5.1 Desenvolvimento do ensaio microbiológico

Foram realizados ensaios preliminares para o desenvolvimento do método microbiológico para determinação de potência de espiramicina em comprimidos. A tabela 10 apresenta os parâmetros estudados.

Tabela 10 – Parâmetros testados para a otimização do ensaio microbiológico por difusão em ágar para determinação de potência de espiramicina em comprimidos.

Parâmetros	Descrição
Concentração do inóculo (%)	1,0
	2,0
Concentrações das soluções do padrão (SRC) (µg/mL)	30,0; 60,0; 90,0; 120,0; 180,0; 240,0; 270,0; 360,0; 480,0; 540,0
Meio de cultura	Ágar Triptona de Soja (TSA)
	Meio de cultura A (EP, 2008)
Tempo de incubação (horas)	16
	18

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: TSA=Tryptic Soy Agar; EP, 2008 = European Pharmacopoeia, 2008;
SRC = Substância de referência certificada.

Posterior à avaliação dos parâmetros pré-estabelecidos, o doseamento microbiológico foi validado seguindo os parâmetros definidos.

5.5.2 Microrganismo e inóculo

Para matérias-primas de espiramicina, a farmacopeia europeia descreve uma metodologia por difusão em ágar para a realização do ensaio microbiológico. A partir disso, visando definir o microrganismo revelador a ser utilizado em um método para determinação de potência em comprimidos, foi feita sugestão e escolha pelo *Bacillus Subtilis* (ATCC 6633). Foram realizados ensaios qualitativos em placas de Petri, a fim de comprovar a eficiência do fármaco sob o microrganismo.

As cepas foram cultivadas em caldo infuso de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Broth* - BHI), previamente preparado e autoclavado por um período de 24 horas em estufa bacteriológica a temperatura entre 32 e 35°C, para a ativação do mesmo. Após este período, a partir da alçada do caldo, foi realizada a inoculação em placas de petri contendo ágar triptona de soja, a fim de se obter o desenvolvimento de colônias em meio sólido. As placas de petri foram também incubadas por 24 horas a temperatura entre 32 a 35°C. Os meios de cultura

foram fornecidos pelo laboratório NCQ de forma desidratada, tendo sido preparados com água purificada conforme as orientações do fabricante.

Após a reativação das cepas, colônias foram coletadas a partir do meio sólido e transferidas novamente para o caldo de enriquecimento BHI. Este material foi incubado por 18 horas em estufa bacteriológica (32-35°C).

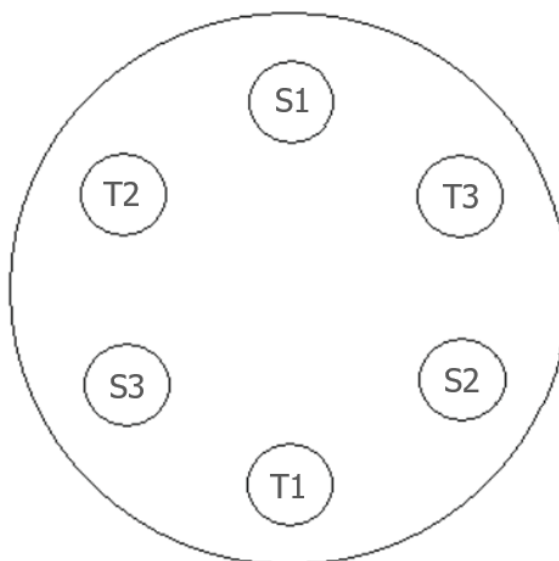
O caldo obtido após o período de incubação foi diluído em caldo não inoculado, com o objetivo de obter uma solução com $25 \pm 2\%$ de transmitância em comprimento de onda de 580 nm, a qual foi analisada por espectrofotometria. Após a padronização, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, uma alíquota de 1 mL dessa suspensão de microrganismo foi vertida em 100 mL de ágar tripton de soja, à temperatura adequada, que não prejudicasse o microrganismo, de modo a se obter a camada inoculada com concentração de 1%.

5.5.3 Execução do ensaio microbiológico

Os materiais utilizados para a realização do ensaio foram autoclavados em temperatura de 121°C por tempo de 15 minutos e todos os procedimentos foram executados em gabinete de fluxo laminar. Foram empregadas placas de petri de 100 mm x 20 mm, as quais proporcionam maior facilidade para aplicação dos cilindros inoxidáveis, sem que os mesmos perfurem o meio de cultura ao fechá-las. Também foi utilizado papel Kraft para recobrir a parte interna da tampa da placa de Petri, visando evitar gotículas de condensação que prejudicassem o ensaio. Sobre as placas foi aplicada uma camada de 20 mL de meio de cultura ágar tripton de soja e, após o resfriamento, aplicou-se a camada inoculada, conforme descrito no item 2.6.2.2.

Foram dispostos e distribuídos seis cilindros de aço inoxidável sobre a camada inoculada de modo a formarem entre si ângulos de aproximadamente 45° (FIGURA 2), sendo que em três cilindros foram introduzidos 200 µL das soluções padrão de espiramicina (S1, S2 e S3) e nos demais 200 µL de soluções trabalho (T1, T2 e T3).

Figura 2 – Esquema do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar, delineamento 3x3.



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: disposição das soluções padrão (S) e amostra (T) na placa de petri, onde S₁ (120,0 µg/mL); S₂ (60,0 µg/mL); S₃ (30,0 µg/mL) e T₁ (120,0 µg/mL); T₂ (60,0 µg/mL); T₃ (30,0 µg/mL).

O procedimento experimental foi realizado pela incubação das placas em estufa bacteriológica na temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no período de 18 horas. Após o tempo de incubação, cuidadosamente, foi realizada a medição dos diâmetros dos halos de inibição formados pelo antibiótico utilizando-se paquímetro digital. Em cada ensaio os resultados foram analisados estatisticamente e a potência de cada doseamento calculada. Ao término do experimento, todo material utilizado foi autoclavado a 121°C por período de 20 minutos.

Para determinação da potência antibiótica sobre o microrganismo, utilizou-se a equação de Hewitt descrita a seguir.

$$\text{Potência (\%)} = 10^M \times 100$$

Em que:

Potência da amostra:

$$M = \frac{F}{b}$$

Inclinação da curva:

$$b = \frac{E}{I}$$

Razão logarítmica entre as doses:

$$I = \log(2) = 0,301$$

Diferença na resposta entre as doses altas, médias e baixas do padrão e da amostra:

$$F = \frac{(T3 + T2 + \overline{T1}) - (\overline{S3} + \overline{S2} + \overline{S1})}{3}$$

Diferença na resposta entre doses altas e baixas do padrão e da amostra:

$$E = \frac{(\overline{T1} + \overline{S1}) - (\overline{T3} + \overline{S3})}{4}$$

*S = diâmetro do halo do padrão (standard); *T = diâmetro do halo da amostra (solução trabalho).

5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR

A validação do método microbiológico para avaliação da potência do fármaco espiramicina foi conduzida segundo as diretrizes da The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (2005), USP (2017), Martins *et al.* (2020), Mahmoudi *et al.* (2015) e Pinto, Lourenço (2009) com determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão. De acordo com as farmacopeias, os limites de detecção e quantificação não são requeridos para esta categoria de ensaio.

5.6.1 Preparo das soluções estoque para o ensaio microbiológico

- Solução padrão: foram pesados exatamente 60 mg de espiramicina SRC (contém 95,3% de espiramicina I), transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se cerca de 30 mL do solvente metanol, levou-se ao ultrassom por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente.

- Solução amostra: vinte comprimidos do medicamento referência foram pesados individualmente e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados e do pó resultante foram pesados exatamente 41,1 mg (0,1 peso médio) que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se cerca de 30 mL de solvente metanol (concentração de 822 µ.g/mL). Em seguida, as soluções foram levadas ao ultrassom por 20 minutos e o volume foi completado com solvente metanol.

5.6.2 Seletividade

Segundo Mahmoudi *et al.* (2015), os testes anteriores propostos com amostra para comparação com o padrão devem detectar excipientes e/ou prováveis impurezas e, neste caso, o conteúdo seria proposicional à inibição microbiológica. Portanto, a seletividade do método desenvolvido foi avaliada a partir da comparação das médias dos diâmetros dos halos de inibição da solução de espiramicina SRC e da solução de espiramicina SRC adicionado aos excipientes (PINTO; LOURENÇO, 2009; MARTINS *et al.*, 2020).

Inicialmente, preparou-se uma mistura contendo todos os excipientes declarados na bula do medicamento referência. Devido à falta de informação específica com relação à quantidade de cada excipiente, preparou-se a mistura contendo proporções de excipientes normalmente utilizadas em comprimidos, com base em descrições da literatura (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2009), de acordo com a Tabela 11.

Tabela 11 – Proporção dos excipientes utilizados para o preparo do placebo.

Excipiente	Proporção (%)
Amido de milho pré gelatinizado	10,0
Celulose microcristalina	50,0
Croscarmelose Sódica	3,0
Dióxido de silício	1,0
Dióxido de titânio	3,0
Estearato de Magnésio	5,0
Hiprollose	20,0
Hipromelose	5,0
Macrogol 6000	3,0

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: Hiprollose = hidroxipropilcelulose; hipromelose = hidroxipropilmetilcelulose.

Em seguida, pesou-se 4,2 mg da mistura de excipientes (placebo) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se cerca de 30 mL de solvente metanol. Na sequência, a solução foi levada ao ultrassom por 20 minutos para solubilização e completou-se o volume do balão volumétrico com o mesmo solvente (qsp). A solução estoque do placebo foi diluída de acordo com a Tabela 12.

A partir da solução estoque do placebo, transferiram-se alíquotas para balão volumétrico de 10 mL e adicionaram-se quantidades conhecidas de SRC de espiramicina, completando o volume dos balões com solução tampão pH 8,0, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Preparo das soluções para realização do ensaio de seletividade do método microbiológico por difusão em ágar.

Quantidade de Padrão adicionado (mL)	Concentração do placebo ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração total padrão + placebo ($\mu\text{g/mL}$)
0,25	4,2	34,2
0,5	8,4	68,4
1,0	16,8	136,8

Fonte: Da autora (2021).

As soluções foram analisadas pelo método microbiológico conforme descrito e os halos de inibição de crescimento medidos por meio de paquímetro digital, após o período de incubação. Os diâmetros foram comparados utilizando o teste estatístico *t-student*.

5.6.3 Linearidade

Para construção da curva analítica foram realizados nove ensaios independentes, em três dias consecutivos. Cada ensaio realizado foi constituído a partir de seis placas, totalizando 54 medições por dose. Consideraram-se para fins de obtenção da curva analítica as médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento obtidas pelas soluções padrão de referência (S1, S2 e S3) em função do logaritmo da dose utilizada. A equação da reta para a representação gráfica da curva analítica foi determinada pela regressão linear.

As soluções utilizadas para o ensaio foram preparadas a partir do item 5.6.1. As diluições subsequentes foram realizadas conforme a Tabela 13 e com o auxílio de uma pipeta volumétrica automática, transferindo para balões volumétricos de 10 mL e completando o volume com o solução tampão pH 8,0.

Tabela 13 - Preparo das soluções de espiramicina para estudo de linearidade, utilizando como solvente final solução tampão pH 8,0.

Amostras	Volume da solução padrão (mL)	Concentrações (µg/mL)
S1	1,0	120,0
S2	0,5	60,0
S3	0,25	30,0

Fonte: Da autora (2021).

Lengenda: S = Padrão (Standard).

5.6.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pela medição dos halos de inibição produzidos pela solução padrão e amostra de espiramicina e expressa a partir do desvio padrão relativo (DPR%). A repetibilidade foi avaliada realizando três ensaios por dia (intradia) sobre as mesmas condições experimentais e por um mesmo analista. A precisão intermediária foi determinada pela variação dos resultados obtidos em três dias consecutivos (interdias).

5.6.5 Exatidão

A exatidão do método microbiológico proposto foi avaliada a partir da técnica de placebo contaminado. As médias dos halos de inibição obtidas pelo ensaio foram aplicadas na equação da curva analítica realizada no mesmo dia do ensaio e a porcentagem de recuperação foi calculada por meio da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

As soluções estoque foram preparadas como retratado no tópico 5.6.1 e, as diluições subsequentes foram analisadas pelo método microbiológico conforme descrito e os halos de inibição de crescimento medidos por meio de paquímetro digital, após o período de incubação. O ensaio foi realizado em dois dias consecutivos, sendo realizadas 6 medições por dose em cada dia.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 ESCOLHA DO SOLVENTE DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para escolha do melhor solvente a ser utilizado na CLAE foram realizadas varreduras espectrais entre as faixas de 400 nm a 200 nm, e assim observando se havia ou não turvação e/ou precipitação da solução (solvente + fármaco). A Tabela 14 apresenta os resultados observados.

Tabela 14 - Resultado das varreduras espectrais de espiramicina por espectrofotometria, utilizando diversos solventes.

Solvente	Turbidez/Precipitação
ACN	Não
ACN:H ₂ O (50:50 v/v)	Não
ACN:tampão pH 4,1 (50:50 v/v)	Não
ACN:tampão pH 6,5 (50:50 v/v)	Não
ACN:H ₃ PO ₄ 0,1% (50:50 v/v)	Sim
MeOH	Não
MeOH:H ₂ O (50:50 v/v)	Não
MeOH:Tampão 4,1 (50:50 v/v)	Não
MeOH:Tampão 6,5 (50:50 v/v)	Não
MeOH:H ₃ PO ₄ 0,1% (50:50 v/v)	Não

Fonte: Da autora (2021).

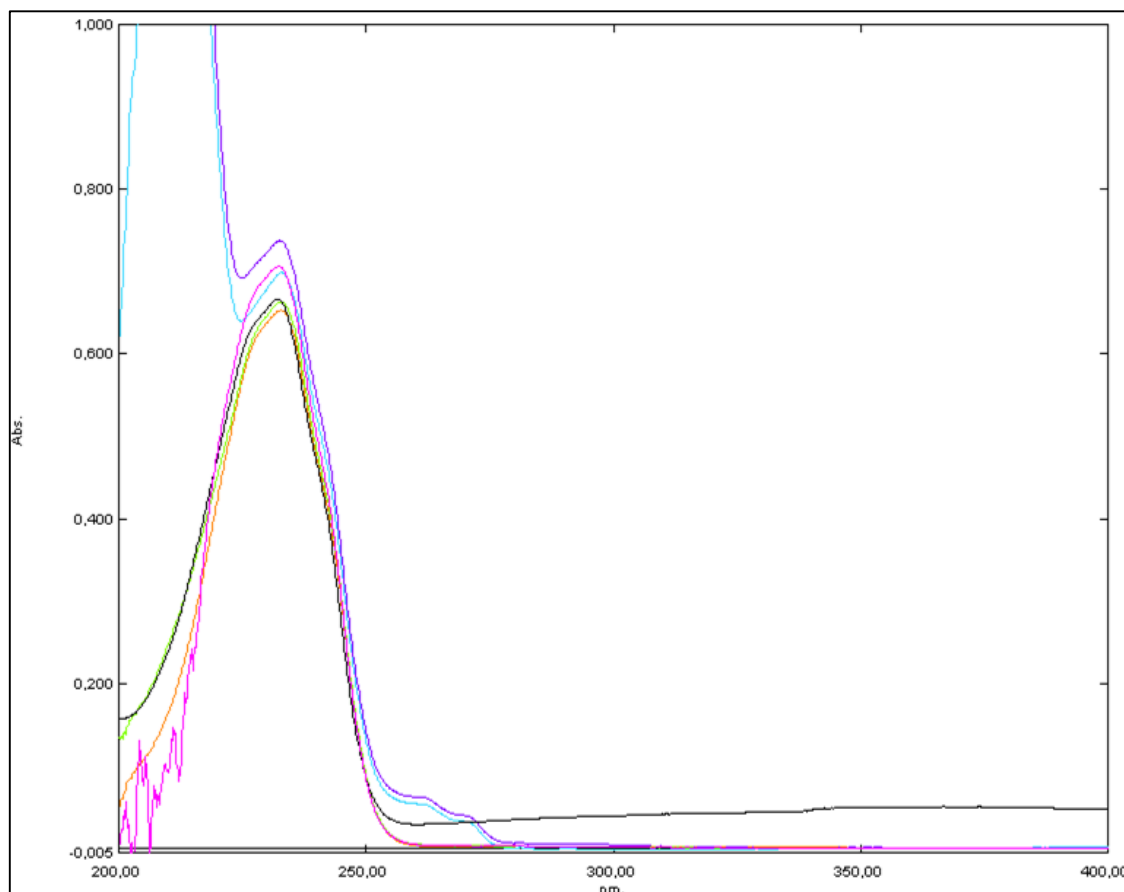
Legenda: ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; H₃PO₄ = ácido fosfórico 0,1%; Tampão 4,1 = tampão acetato; Tampão 6,5 = tampão fosfato.

Observa-se que há turvação somente na solução composta por acetonitrila e ácido fosfórico 0,1% (50:50, v/v), apresentada na Figura 3. Isto comprova que essa mistura não é adequada para uso nas análises, pois não solubilizou o fármaco. Desse modo, a mistura acetonitrila e ácido fosfórico (50:50, v/v) foi descartada. Os demais solventes foram selecionados para o estudo, considerando as condições de solubilidade da molécula.

Segundo a Farmacopeia Europeia (2008), a espiramicina é ligeiramente solúvel em água e livremente solúvel em metanol. Considerando a possibilidade de utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e de menor custo, dos solventes analisados, o metanol foi escolhido. A proporção metanol:água (50:50, v/v) foi utilizada como segundo

diluyente das amostras de espiramicina, uma vez que foi satisfatória para diluir a espiramicina para as concentrações utilizadas no método por CLAE.

Figura 3 – Varredura espectral do fármaco espiramicina (SRC) em diferentes solventes.



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: Rosa – Metanol 100%; Preto – Acetonitrila:Ácido Fosfórico (50:50, v/v);

Laranja – Metanol:Água (50:50, v/v); Verde – Metanol:Ácido Fosfórico (50:50, v/v);

Roxo – Metanol:Tampão Fosfato 6,5 (50:50, v/v); Azul – Metanol:Tampão Acetato 4,1 (50:50, v/v).

6.2 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO

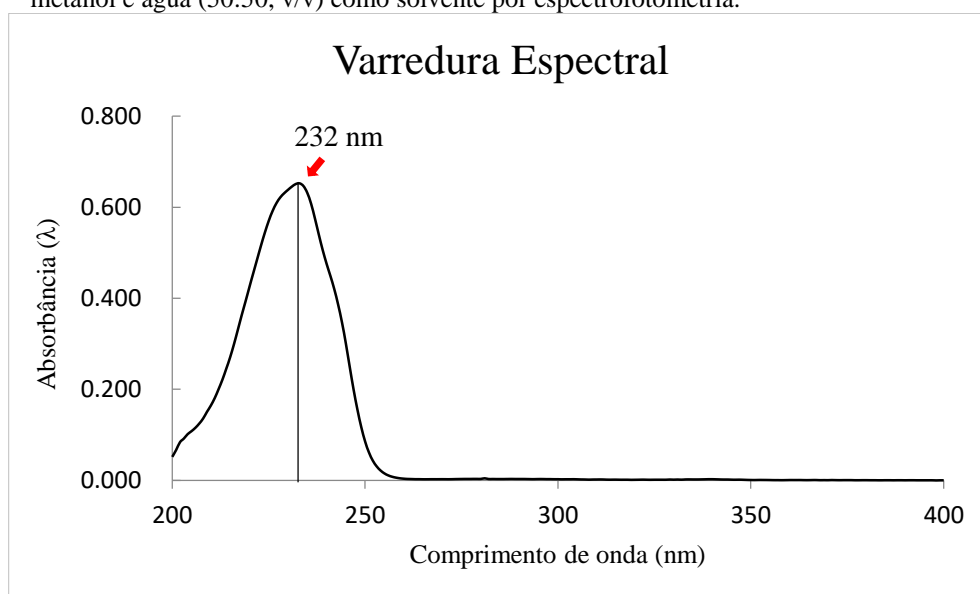
6.2.1 Escolha do comprimento de onda

Os métodos de detecção espectrofotométricos são muito utilizados para determinações qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos. Essa metodologia baseia-se na medida de absorbância da luz por compostos que absorvem na região espectral do ultravioleta (≈ 200 a ≈ 400 nm) e do visível (≈ 400 a ≈ 800 nm) por apresentarem cromóforos

em sua estrutura. Além disso, as vantagens são medidas rápidas, precisas e baixo custo. (KOCHAKIAN, 1988; ROZET, 2013).

Em vista disso, foi realizada uma varredura espectral na faixa de 400 a 200 nm com solução de espiramicina SRC, na concentração de 20 µg/mL. O resultado obtido mostrou um pico de máxima absorção em 232 nm, o qual foi utilizado para análises posteriores, conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Varredura espectral de solução de espiramicina SRC, na concentração de 20 µg/mL, utilizando metanol e água (50:50, v/v) como solvente por espectrofotometria.



Fonte: Da autora (2021).

6.2.2 Escolha da fase móvel

Primeiramente foi realizado um levantamento bibliográfico das metodologias utilizadas em ensaios cromatográficos para espiramicina. Na Tabela 15 encontram-se alguns trabalhos apresentando a fase móvel utilizada, a fase estacionária e o tipo de detecção.

Tabela 15 – Metodologias utilizadas em alguns ensaios cromatográficos para o fármaco espiramicina.

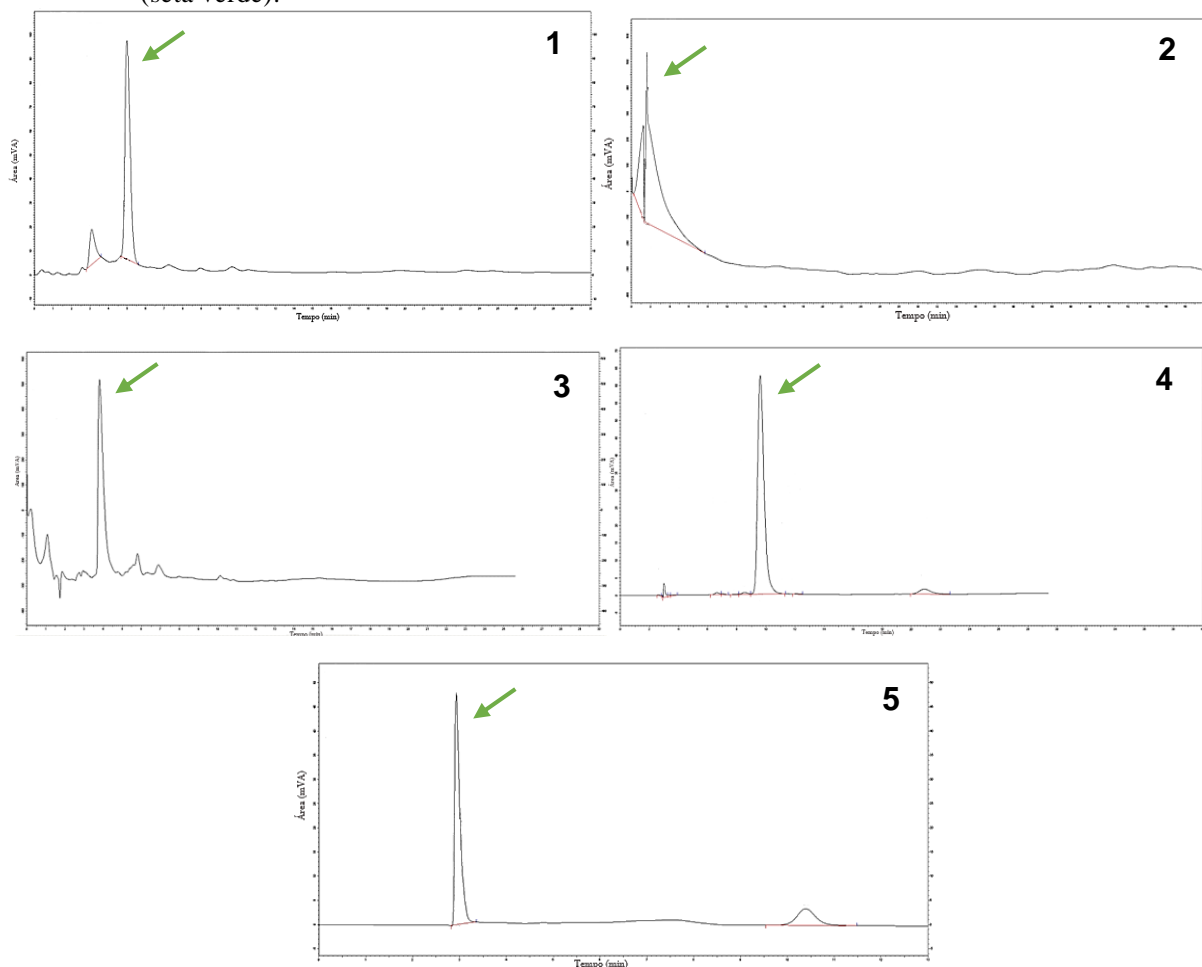
Fase Estacionária	Fase Móvel	Deteção	Referência
C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0/ACN	UV – 232 nm	Lin <i>et al.</i> , 2018
C18 (150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm)	Tampão fosfato 0,2 M, pH 8,3/H ₂ O/ACN	UV- 232 nm	Katsidzira, Wessels e Aucamp, 2016
C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato 50 mM, pH 4,27/MeOH	UV- 242 nm	Elkhouday, Salam e Hadad, 2016
C18 (50 mm x 2,0 mm, 120 Å) pré-coluna: C18 (20 mm x 2,0 mm, 120 Å)	ACN/1% CH ₂ O ₂ /H ₂ O	(ESI-MS/MS)	Wang e Leung, 2009
C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	ACN/H ₂ O/CH ₂ O ₂	(LC-MS/MS)	Sagan <i>et al.</i> , 2006

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; H₂O = água purificada; CH₂O₂ = ácido fórmico.

Em seguida, foram realizadas corridas cromatográficas com as proporções de fases móveis apresentadas na Tabela 2 do item 5.2.2. A proporção de cada ensaio fora aplicada a partir de estudos preliminares na literatura, como também a partir dos resultados obtidos pelas corridas realizadas. Os resultados estão demonstrados na Figura 5.

Figura 5 – Cromatogramas para escolha da fase móvel para o método de quantificação de espiramicina I (seta verde).



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; H₃PO₄ = ácido fosfórico 0,1%;

Tampão 4,1 = tampão acetato; Tampão 6,5 = tampão fosfato.

1) MeOH:H₂O (50:50, v/v);

2) ACN:H₃PO₄ 0,1% (50:50, v/v);

3) MeOH:Tampão 4,1 (50:50, v/v);

4) H₃PO₄ 0,1%:MeOH (50:50, v/v);

5) MeOH 100%.

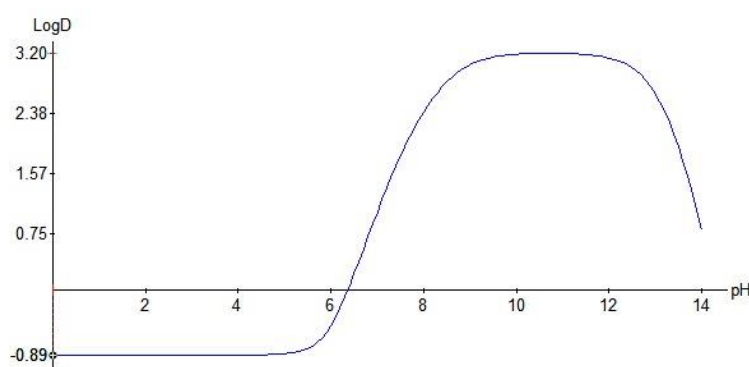
Na Figura 5 é possível observar que utilizando ácido fosfórico 0,1% e metanol (50:50, v/v) houve uma separação razoável de espiramicina I das suas impurezas e substâncias relacionadas. A partir disso pressupõe-se que a mistura ácido fosfórico e metanol seria adequada para ser utilizada como fase móvel para as análises cromatográficas.

Simultaneamente ao ensaio cromatográfico, foi realizada análise das características físico-químicas da molécula. De acordo com o programa ChemSketch (ACD/Labs Software 6.0, 2018), o pKa dos grupos básicos nitrogênio da amina terciária

e nitrogênio da lactona da molécula de espiramicina possuem valores de $8,62 \pm 0,60$ e $7,40 \pm 0,70$, respectivamente. Além disso, o gráfico de $\log D$ apresentado na figura 6 demonstra que a espiramicina possui maior lipofilicidade entre pHs 8,0 e 13,0. Sendo assim, em sistemas de fase reversa, o ideal seria trabalhar com fases móveis que propiciassem pHs acima de 8,0, para uma maior interação entre a espiramicina e a fase estacionária, permitindo uma separação eficiente. Entretanto, há dois inconvenientes de se utilizar fases móveis com altos valores de pHs: i) degradação ou diminuição da vida útil de colunas convencionais, cujas fases estacionárias normalmente se degradam em pHs básicos e ii) provável necessidade de se utilizar grandes quantidades de metanol ou acetonitrila na fase móvel, uma vez que a espiramicina provavelmente irá interagir fortemente com fases estacionárias reversas em pHs altos ($\log D = 3,20$). A observação da Figura 6 também nos permite verificar que, na faixa de pHs entre 6,0 e 8,0, haverá diferentes proporções de espiramicina ionizada e não ionizada dependendo do pH, sendo necessário o tamponamento da fase móvel, para que não haja variações de tempos de retenção em função de oscilações de pHs. Entretanto, o tamponamento de fases móveis afeta a vida útil de colunas e pode causar entupimentos frequentes no sistema de cromatografia a líquido. Considerando ainda a Figura 6 e as propriedades físico-químicas da molécula, nota-se que em pHs abaixo de 5,0 a espiramicina se encontra majoritariamente na forma ionizada e, conseqüentemente, com menores valores de $\log D$ (menor lipofilicidade), apresentando menor interação com fases estacionárias reversas, sendo necessário utilizar menores proporções de metanol na fase móvel para eluir a espiramicina do que em pHs mais altos. Sendo assim, optou-se pelo ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 e metanol para análises cromatográficas de espiramicina, uma vez que essa composição de fase móvel não utiliza sistema de tamponamento e requer menores volumes de solventes orgânicos, os quais são caros, tóxicos e agressivos ao meio ambiente. Com relação à fase estacionária, a coluna C-8 foi selecionada por apresentar menor cadeia hidrofóbica do que a coluna C-18. Portanto, colunas do tipo C-8 apresentam maior interação com a espiramicina em pHs ácidos, o que foi confirmado experimentalmente.

Na seqüência, fez-se necessário determinar qual seria a proporção adequada de metanol na fase móvel, além das outras condições como a temperatura e fluxo. Então, a partir disso, foi realizada uma otimização multivariada das condições cromatográficas.

Figura 6 - Gráfico representativo de logD (coeficiente de distribuição) da espiramicina.



Fonte: Da autora (2021).

6.2.3 Otimização multivariada

O modo mais comum para otimização de condições experimentais é o univariado, em que se avalia uma variável por vez, enquanto as demais são mantidas constantes. No entanto, este modo indica somente ótimos locais e requer uma grande quantidade de experimentos, além de não identificar interações entre as variáveis. Já a otimização multivariada utiliza planejamentos experimentais, nos quais as variáveis são alteradas simultaneamente, assim possibilitando obter ótimos globais com redução do número de experimentos e identificação da influência das interações (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O primeiro passo para a construção de um planejamento experimental é determinar as variáveis independentes (fatores) e as variáveis dependentes (respostas) de interesse no estudo. A etapa seguinte é determinar o tipo de planejamento mais apropriado, que depende do objetivo que se deseja atingir com os experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Com objetivo de determinar quais fatores têm influência significativa na resposta, a metodologia analítica foi otimizada de forma multivariada, a fim de se obter um método de análise capaz de separar a espiramicina I de suas impurezas no menor tempo de corrida possível, utilizando apenas os recursos disponíveis no laboratório, sem a necessidade de adquirir colunas ou equipamentos cromatográficos mais caros.

Conforme descrito no item 5.2.3, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 . A partir dos resultados de resolução, pratos teóricos, tempo de corrida e assimetria obtidos em cada condição descrita na matriz de planejamento, calculou-se a função de desejabilidade global (D). Os resultados estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores obtidos no planejamento fatorial 2^3 utilizado para otimização do método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

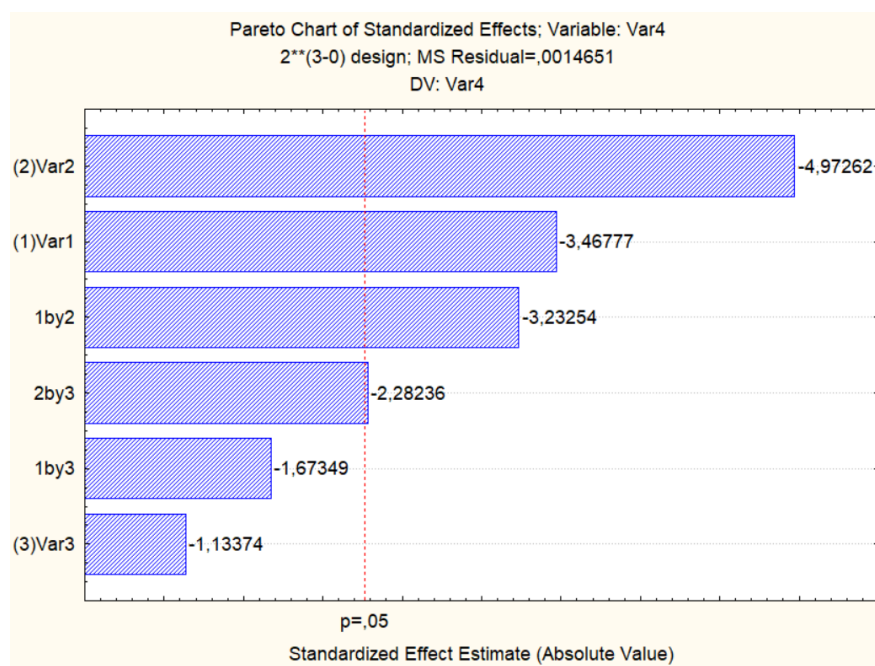
Ensaio	F1 Metanol (%)	F2 Vazão (mL/min)	F3 Temperatura (°C)	Resposta Analítica (D)		Média das respostas (D)
				Resposta 1	Resposta 2	
1	-	-	-	0,3381	0,3598	0,349
2	-	-	+	0,3569	0,4612	0,409
3	-	+	-	0,3541	0,3767	0,365
4	-	+	+	0,3017	0,3502	0,326
5	+	-	-	0,3504	0,4148	0,383
6	+	-	+	0,3255	0,4073	0,366
7	+	+	-	0,2487	0,2776	0,263
8	+	+	+	0,1784	0,1652	0,172

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: F = Fatores; D = Função de desejabilidade global.

As respostas analíticas obtidas foram então utilizadas para construção do diagrama de Pareto através do software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.[®], Tulsa, Oklahoma, EUA). Os resultados estão descritos na Figura 7.

Figura 7 - Diagrama de Pareto.



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: Diagrama de pareto de efeitos padronizados; Var = Variável; Estimativa do efeito padronizado.

Var1 = porcentagem de metanol na fase móvel; Var2 = vazão de fase móvel;

Var3 = temperatura do forno da coluna (°C).

O diagrama de Pareto é um gráfico de colunas que indica quais são os fatores que influenciam significativamente na resposta analítica, por meio de cálculo de efeitos. Quando valores absolutos de efeitos obtidos são maiores do que o erro estimado (indicado pela linha vermelha tracejada na Figura 7, isto indica que estes valores têm influência na resposta analítica. Os efeitos positivos indicam que o aumento nos seus níveis produz o aumento na resposta analítica e efeitos negativos indicam que a resposta analítica tende a diminuir com o aumento nos seus níveis (inversamente proporcional).

A partir dos resultados demonstrados no diagrama de Pareto, conclui-se que a variável 2 (vazão de fase móvel) influencia significativamente na resposta analítica, pois o efeito foi maior do que o erro estimado. Além disso, o efeito foi negativo, o que indica que a resposta analítica aumenta com diminuições na vazão.

Outro fator que influenciou significativamente na resposta analítica foi a variável 1 (porcentagem de metanol na fase móvel). Considerando que o efeito também foi negativo, pode-se concluir que menores porcentagens de metanol na fase móvel produzem maiores respostas analíticas.

Com relação à temperatura do forno, a mesma não influenciou na resposta analítica. Portanto, fixou-se a temperatura em 30°C para os experimentos posteriores.

Considerando a significativa influência da vazão e da porcentagem de metanol na resposta analítica, e que foi observada interação entre estes fatores (coluna 1by2 no diagrama de Pareto), realizou-se uma otimização final utilizando a Matriz de Doehlert empregando os seguintes fatores e níveis: vazão da fase móvel (0,5; 0,8 e 1,1) e proporção de metanol utilizado na fase móvel (29%, 31%, 33%, 35% e 37%). Entretanto, neste segundo estudo, utilizou-se somente resolução (maior é melhor) e tempo de corrida (menor é melhor) para cálculo da função de desejabilidade global (D), uma vez que todos os valores de assimetria e pratos teóricos foram satisfatórios (assimetria próximo de 1,0 e pratos teóricos acima de 2000). Os resultados estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores obtidos pela matriz de Doehlert utilizada na otimização final do método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

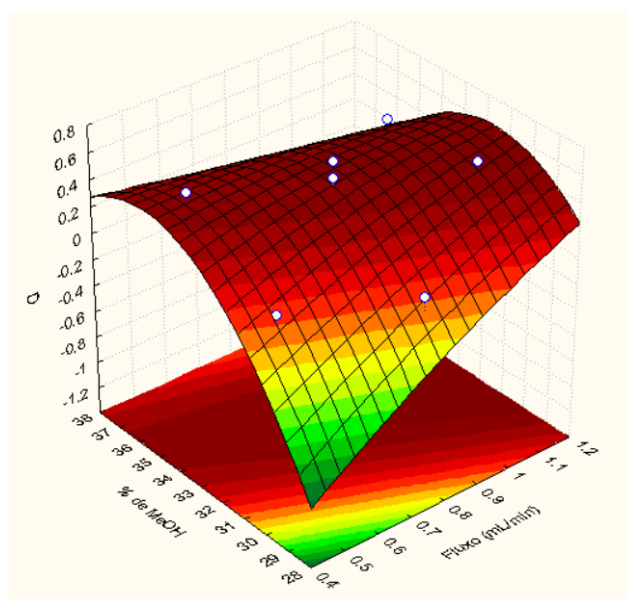
Ensaio	Vazão da fase móvel (mL/min)	Proporção de metanol da fase móvel (%)	Resposta analítica (D)		
1 (triplicata)	0,8	33	0,616	0,4222	0,4922
2	0,8	29		0,0327	
3	1,1	31		0,5041	
4	0,8	37		0,1819	
5	0,5	35		0,5007	
6	0,5	31		0,0264	
7	1,1	35		0,4271	

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: D = Função de desejabilidade global.

A partir da matriz de Doehlert, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, a fim de otimizar os níveis dos dois fatores. Esta metodologia se baseia na construção de um modelo matemático empírico, que geralmente emprega funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização (TEOFILO; FERREIRA, 2006). A superfície de resposta foi construída utilizando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.®, Tulsa, Oklahoma, EUA). Os resultados estão descritos na Figura 8.

Figura 8 - Superfície de resposta para otimização de método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.

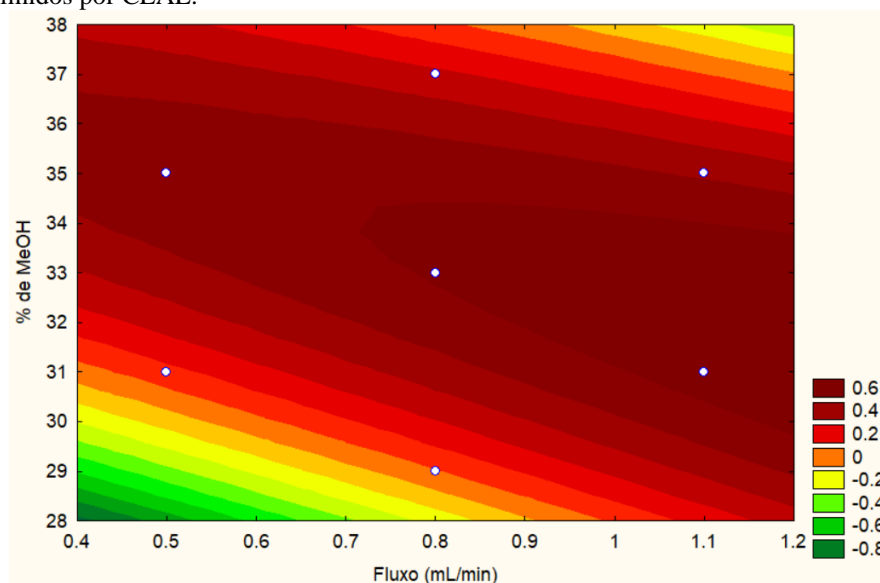


Fonte: Da autora (2021).

Legenda: D = Função de desejabilidade global; % de MeOH = proporção de metanol.

A observação da superfície de resposta nos permite concluir que há uma região de máximo em relação aos fatores estudados. A fim de visualizar melhor qual (is) condição (ões) permite (m) a obtenção de maior resposta analítica (D), construiu-se a curva de nível (função *fitted surface*) utilizando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.®, Tulsa, Oklahoma, EUA). Os resultados estão descritos na Figura 9.

Figura 9 - Curva de nível para otimização de método analítico para determinação de espiramicina I em comprimidos por CLAE.



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: % de MeOH = Proporção de metanol.

A observação da curva de nível nos permite concluir que há uma região de máxima resposta com vazões entre aproximadamente 0,8 e 1,2 mL/min e porcentagens de metanol entre aproximadamente 31% e 34% (vermelho escuro da FIGURA 9). Além disso, a condição que utiliza vazão de 1,0 mL/min e 33% de MeOH na fase móvel está localizada no ponto central da região ótima. Portanto, para que houvesse margem de segurança, essas condições foram estabelecidas, uma vez que pequenas oscilações na vazão ou na proporção de metanol na fase móvel dificilmente causariam diminuição na resposta analítica.

O método desenvolvido neste trabalho permitiu a separação de espiramicina I de suas impurezas e substâncias relacionadas em 42 minutos, com tempo de retenção em aproximadamente 18 minutos. Os métodos relatados na literatura descrevem a separação da espiramicina I de suas impurezas e/ou excipientes em tempos de corrida variando de 10 a 160 minutos, com tempo de retenção da espiramicina variando de 3,5 a 40 minutos. Portanto, o método proposto possui uma análise tempo comparável aos métodos descritos na literatura.

Além disso, a otimização multivariada possibilitou condições analíticas ideais usando recursos já disponíveis em nosso laboratório, sem a necessidade de adquirir colunas ou equipamentos cromatográficos caros. Portanto, o método desenvolvido neste trabalho é uma alternativa viável aos métodos existentes e a estratégia de otimização multivariada é uma ferramenta extremamente útil para otimização de métodos analíticos.

Sendo assim, após a otimização, o método foi validado utilizando como fase móvel: ácido fosfórico 0,1% e metanol (67:33, v/v) com vazão a 1,0 mL/min, temperatura de forno de 30 °C, coluna analítica C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), comprimento de onda a 232 nm e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel foi filtrada em membrana (Millipore®) com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, a vácuo e desgaseificada no ultrassom durante 30 minutos.

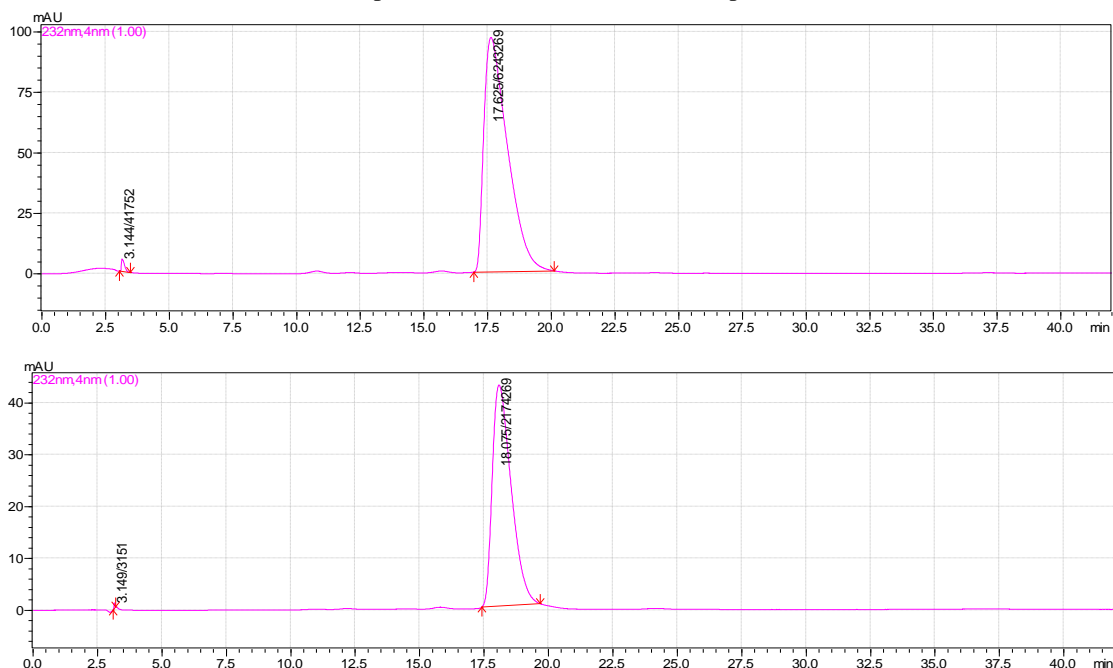
6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

6.3.1 Seletividade

6.3.1.1. Pureza de Pico

As corridas cromatográficas de soluções de SRC e de amostras de comprimidos estão apresentadas na Figura 10.

Figura 10 – Perfil cromatográfico de soluções de SRC e de amostras de comprimidos com tempo de retenção de 17,63 e 18,08 minutos, respectivamente, utilizando método por CLAE otimizado.



Fonte: Da autora (2021).

Os resultados de seletividade por pureza do pico cromatográfico de soluções de SRC e de amostras de comprimidos de espiramicina estão demonstrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados obtidos no ensaio de seletividade para espiramicina I por CLAE, utilizando como fase móvel: metanol e ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 (33:67, v/v).

Amostras	Impureza	Índice de pureza do pico
SRC 1	-	1,000000
SRC 2	-	1,000000
SRC 3	-	1,000000
Comp. 1	-	1,000000
Comp. 2	-	0,999999
Comp. 3	-	0,999999

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SRC = Substância de referência certificada; Comp. = Comprimidos.

A Tabela 18 demonstra a pureza cromatográfica do pico de espiramicina I, indicando ausência de interferentes e confirmando a seletividade do método analítico.

6.3.1.2 Efeito Matriz

A avaliação da seletividade do método frente aos excipientes foi demonstrada pelo preparado das três curvas independentes da SRC de espiramicina e três curvas independentes de amostra fortificada com a SRC nos mesmos níveis de concentração da linearidade. As corridas cromatográficas foram realizadas e os valores das áreas dos picos registrados. Na Tabela 19, estão demonstrados os resultados dos ensaios.

Tabela 19 – Valores de áreas obtidas no ensaio de efeito matriz das soluções de SRC e de amostras fortificadas com a SRC nas diferentes concentrações.

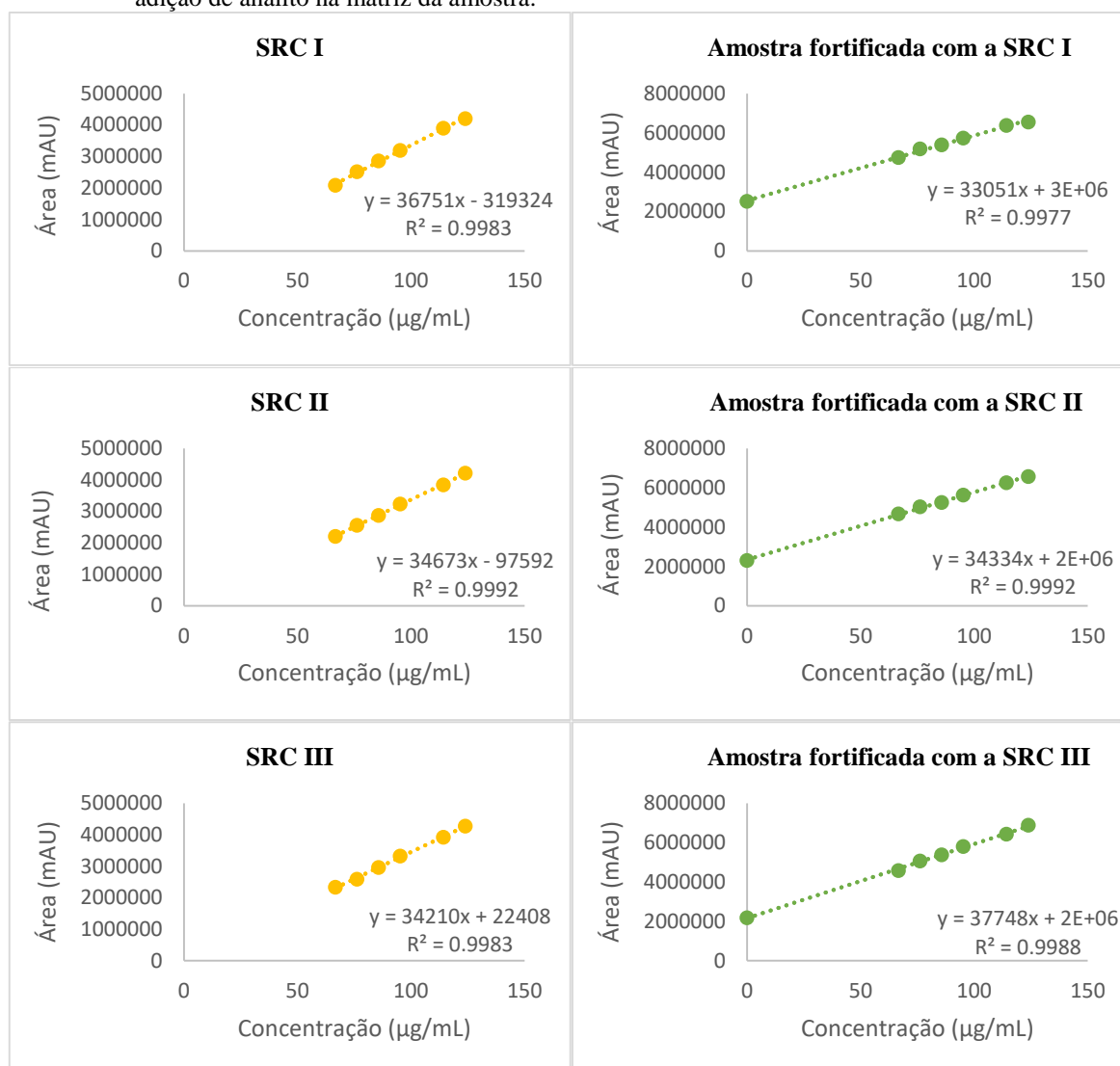
Conc. de espiramicina I adicionada (µg/mL)	SRC			Amostras fortificadas com a SRC		
	1	2	3	1	2	3
0	-	-	-	2518299	2309484	2180390
66,71	2081374	2201267	2328857	4746959	4664530	4579389
76,24	2516359	2559779	2581093	5183181	5030369	5065867
85,77	2857260	2870738	2959452	5384355	5256299	5374165
95,30	3190985	3230475	3319669	5733575	5621278	5804105
114,36	3899285	3834441	3914093	6371783	6252781	6426314
123,89	4202981	4213399	4266672	6549973	6565956	6872373

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: Conc. = Concentração; SRC = substância de referência certificada.

A partir dos resultados das áreas obtidas nas corridas cromatográficas, foram plotadas seis curvas analíticas, uma para cada réplica, assim apresentadas na Figura 11.

Figura 11 – Curvas analíticas realizadas para o ensaio de seletividade por efeito matriz utilizando método de adição de analito na matriz da amostra.



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SRC = Substância de referência certificada.

A partir dos resultados obtidos pelas curvas analíticas, foi feita a média dos coeficientes angulares ($y = ax+b$) do analito sem matriz e da amostra fortificada com analito. Os dados obtidos estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20 - Coeficientes angulares das curvas analíticas do estudo de seletividade por efeito matriz.

Inclinação	SRC	Amostras fortificadas com a SRC
1	36751	33051
2	34673	34334
3	34210	37748

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SRC = Substância de referência certificada.

A análise estatística (teste t ao nível de significância de 5%), apresentada na Tabela 21, mostra que as médias dos coeficientes angulares tanto da SRC quanto da amostra fortificada com o analito são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Em vista disso, é possível afirmar o paralelismo aproximado entre as retas e que os placebos não interferem na resposta analítica, sendo o método seletivo para espiramicina I.

Tabela 21 – Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	SRC Variável 1	Amostras fortificadas com a SRC
Média	35211,33	35044,33
Variância	1831522,33	5893882,33
Observações	3	3
Variância agrupada	3862702,33	
Hipótese de diferença de médias	0	
gl	4	
Stat t	0,10	
P(T<=t) uni-caudal	0,46	
t crítico uni-caudal	2,13	
<u>P(T<=t) bi-caudal</u>	<u>0,92</u>	
t critical <u>bi-caudal</u>	<u>2,78</u>	

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SRC = Substância de referência certificada; gl = Graus de liberdade.

6.3.2 Linearidade

Os resultados do estudo de linearidade para espiramicina I por CLAE a 232 nm, utilizando como fase móvel: metanol e ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 (33:67, v/v), estão demonstrados na Tabela 22.

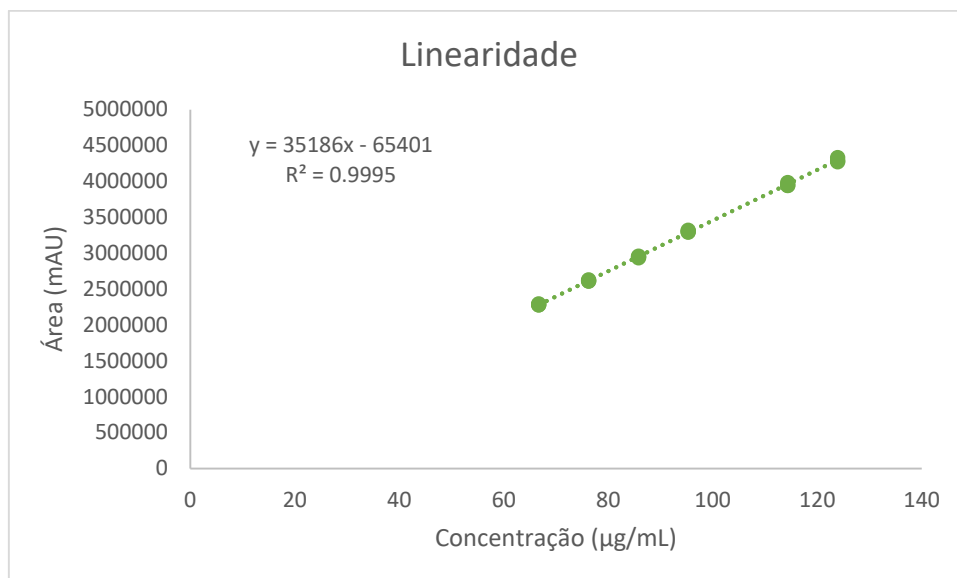
Tabela 22 - Valores experimentais obtidos no ensaio de linearidade para construção da curva analítica de espiramicina por CLAE.

Concentração de espiramicina I (µg/mL)	Resposta (área)	Médias das áreas	Desvio padrão	DPR%
	2275475			
66,71	2277489	2281716	9120,7	0,4
	2292183			
	2612436			
76,24	2626798	2615858	9692,7	0,4
	2608341			
	2932490			
85,77	2955112	2945462	11671,3	0,4
	2948785			
	3299227			
95,30	3314600	3301156	12590,8	0,4
	3289641			
	3941326			
114,36	3940697	3954226	22890,3	0,6
	3980655			
	4269449			
123,89	4283133	4293258	30173,1	0,7
	4327191			

Fonte: Da autora (2021).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 22, construiu-se o gráfico das respostas em função das concentrações do analito por meio do método dos mínimos quadrados. Os resultados estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12 - Representação gráfica da resposta analítica em função da concentração do analito em estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE a 232 nm, utilizando como fase móvel metanol e ácido fosfórico 0,1% pH 2,1 (33:67, v/v).



Fonte: da autora (2021).

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que é possível observar visualmente que o método para determinação de espiramicina em comprimidos segue tendência linear.

Os dados obtidos no estudo de linearidade foram utilizados para verificação de homocedasticidade (igualdade de variância) pelo teste de Cochran. O valor de $C_{\text{calculado}}$, obtido pela equação abaixo, foi de 0,477.

$$C = \frac{\text{maior variância em } Y}{\text{soma de todas as variâncias em } Y}$$

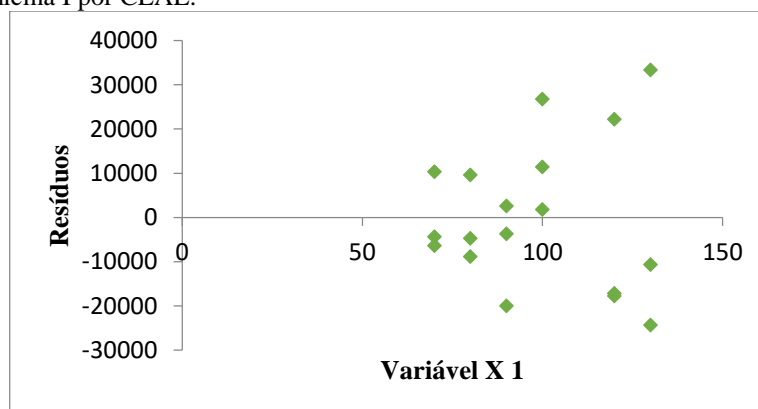
Este valor é menor do que o valor C_{tabelado} (ou $C_{\text{crítico}}$) para 6 pontos e 3 réplicas (0,616). Portanto, é aceitável a hipótese nula de que as variâncias são estatisticamente iguais (dados homocedásticos). Os dados obtidos no estudo de linearidade foram utilizados para cálculo de resíduos. Os resultados estão demonstrados na Tabela 23 e Figura 13.

Tabela 23 - Valores de resíduos obtidos em estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE.

Observação	Resíduos
1	-6387,99
2	-4373,99
3	10320,01
4	-4750,40
5	9611,60
6	-8845,40
7	-20019,82
8	2602,18
9	-3724,82
10	11393,76
11	26766,76
12	1807,76
13	-17154,06
14	-17783,06
15	22174,93
16	-24354,48
17	-10670,48
18	33387,52

Fonte: Da autora (2021).

Figura 13 - Plotagem dos resíduos gerados pela regressão aplicada aos dados dos ensaios de linearidade para espiramicina I por CLAE.



Fonte: Da autora (2021).

Os resultados da Tabela 23 e Figura 13 demonstram que há comportamento aleatório, não sendo observada nenhuma tendência no gráfico de resíduos.

Na sequência, a hipótese de que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno da média, foi avaliada estatisticamente pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados estão demonstrados na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE.

Tamanho da amostra	18
Média	0,0000
Desvio Padrão	16368,1343
W	0,9578
p	0,5332

Fonte: Da autora (2021).

Conforme demonstrado na Tabela 24, o *p-valor* obtido (0,5332) foi maior do que o nível de significância de 0,05. Portanto, aceita a hipótese nula de que os dados analisados (resíduos) seguem distribuição normal. Os dados obtidos no estudo de linearidade foram utilizados para cálculo de resíduos padronizados. Os resultados estão demonstrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Valores de resíduos padronizados obtidos no estudo de linearidade para determinação de espiramicina por CLAE.

Observação	Resíduos Padronizados
1	-0,390
2	-0,267
3	0,630
4	-0,290
5	0,587
6	-0,540
7	-1,223
8	0,159
9	-0,228
10	0,696
11	1,635
12	0,110
13	-1,048
14	-1,086
15	1,355
16	-1,488
17	-0,652
18	2,040

Fonte: Da autora (2021).

Os resultados apresentados na Tabela 25 demonstram que nenhuma das observações podem ser consideradas como um “*outlier*”, pois todos os resíduos padronizados estão dentro do intervalo de -3 a +3.

Os dados obtidos no estudo de linearidade foram avaliados por meio do teste F, na análise da variância (ANOVA) da regressão. Os resultados estão demonstrados na Tabela 26.

Tabela 26 – Valores obtidos na análise de variância (Anova) para ensaio de linearidade do método para espiramicina I por CLAE.

	GL	SQ	MQ	F	F de Significância
Regressão	1	9,05E+12	9,05E+12	31797,75	8,04E-28
Residual	16	4554568949	284660559,3		
Total	17	9,06E+12			

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio;
Q = quadrado; *F_{tabelado} = 4,49

Conforme demonstrado na Tabela 26, o valor $F_{\text{calculado}}$ (31797,75) foi maior do que o valor de F_{tabelado} (4,49). Dessa maneira, rejeita-se a hipótese nula de que o coeficiente angular é estatisticamente igual à zero.

Os dados obtidos no estudo de linearidade foram utilizados para cálculos de equação da reta, coeficiente de correlação (r) e coeficiente de determinação (R^2). Os resultados estão demonstrados na Tabela 27.

Tabela 27 - Equação da reta, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (R^2) a partir de dados obtidos em estudo de linearidade para determinação de espiramicina I por CLAE.

Equação	$y = 35186x - 65401$
r	0,9997
R^2	0,9995

Fonte: Da autora (2021).

Conforme demonstrado na Tabela 27, pode-se dizer que o método é linear no intervalo de 66,71 a 123,89 $\mu\text{g/mL}$, pois o coeficiente de correlação obtido (0,9997) foi maior do que o valor mínimo de 0,990 estabelecido pela resolução RDC nº 166 de 2017 (ANVISA, 2017).

6.3.3 Exatidão

A exatidão foi expressa pela porcentagem de recuperação de espiramicina SRC adicionada na amostra de comprimidos, considerando as faixas de 70, 100, 130% da linearidade.

Os resultados das áreas obtidas estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Valores de áreas de picos obtidos a partir do ensaio de exatidão para espiramicina nas amostras de comprimidos por CLAE.

SRC (95,3 $\mu\text{g/mL}$)	A	70%	100%	130%
		SRC (66,71 $\mu\text{g/mL}$) + A	SRC (95,3 $\mu\text{g/mL}$) + A	SRC (123,89 $\mu\text{g/mL}$) + A
3409353	2261947	4699157	5678347	6883525
3400245	2228489	4740240	5664619	6888066
3327888	2180390	4579389	5804105	6872373

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: A = amostra; SRC = Substância de referência certificada.

A partir dos resultados das áreas dos picos cromatográficos, foram realizados cálculos para determinação da recuperação. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Valores obtidos no ensaio de exatidão do método para quantificação de espiramicina por CLAE.

	Amostra incorporada com SRC a 66,71 µg/mL	Amostra incorporada com SRC a 95,3 µg/mL	Amostra incorporada com SRC a 123,89 µg/mL
	99,74	97,43	101,09
% Recuperação	101,39	97,04	101,19
	94,91	100,98	100,85
% Recuperação média	98,7	98,5	101,0

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SRC = Substância de referência certificada.

O valor médio de recuperação de 99,4% encontra-se dentro da faixa aceitável de 98,0 a 102,0 %, nas concentrações baixa, média e alta, demonstrando exatidão do método.

6.3.4 Precisão

Primeiramente, a precisão foi avaliada por repetibilidade, sendo que, as análises foram realizadas pelo mesmo analista, sob as mesmas condições de operação e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.

Os resultados obtidos no estudo de precisão por repetibilidade estão demonstrados na Tabela 30.

Tabela 30 - Valores obtidos no estudo de precisão por repetibilidade do método analítico para quantificação de espiramicina I por CLAE.

Amostras (100 µg/mL)	Concentração de espiramicina I determinada (% em relação à quantidade declarada)
1	69,2
2	66,8
3	67,6
4	69,8
5	69,6
6	69,2
DPR % (n = 6)	1,8

Fonte: Da autora (2021).

Em seguida, para avaliar a precisão intermediária, o ensaio realizado anteriormente foi reproduzido em dia diferente com operador distinto. Os resultados obtidos no estudo de precisão intermediária estão demonstrados na Tabela 31.

Tabela 31 - Valores obtidos no estudo de precisão intermediária de método analítico para quantificação de espiramicina por CLAE.

Dia 2 – Analista 2 Amostras (100 µg/mL)	Concentração de espiramicina I determinada (% em relação à quantidade declarada)
7	67,0
8	67,3
9	66,6
10	65,7
11	65,2
12	65,7
DPR % (n = 6)	1,2
DPR % (n = 12)	2,4

Fonte: Da autora (2021).

O valor de desvio padrão relativo no ensaio de repetibilidade está dentro do limite recomendado de 2%. Já na precisão intermediária o valor excede menos de 0,5%, o que “difícilmente” implicará em algum problema na precisão do método.

6.3.5 Robustez

Os dados obtidos no ensaio de robustez e os parâmetros avaliados, a partir do teste proposto por Youden e Steiner (YOU DEN; STEINER, 1975), constam da Tabela 32.

Tabela 32 – Resultados obtidos a partir do teste proposto por Youden e Steiner (1975) para determinação de robustez do método de quantificação de espiramicina I em comprimidos, por CLAE.

Fatores	Condições experimentais								D.P. x $\sqrt{2}$ *
	1	2	3	4	5	6	7	8	
pH da fase móvel	A	a	A	a	A	a	A	a	
Proporção de MeOH (%)	B	B	b	b	b	b	B	B	
Lote da coluna	C	c	C	c	c	C	c	C	
Temp. do forno (°C)	D	d	d	D	D	d	d	D	
Fluxo (mL/min)	E	e	e	E	e	E	E	e	
Marca do metanol	F	F	f	f	F	f	f	F	
Sonificação (min)	G	G	g	G	g	G	g	g	
Recuperação (%)	61,82	61,90	64,22	62,03	62,00	64,25	62,62	62,00	1,46

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: D.P x $\sqrt{2}$ * = Desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de 2; Temp. = Temperatura.

Em seguida, após obter os dados de recuperação, os efeitos de cada nível foram calculados e estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 – Resultado da análise de efeitos obtidos a partir do teste de Youden e Steiner (1975), por CLAE.

Variável	Efeito
pH da fase móvel	0,12
Proporção de MeOH (%)	-1,12
Lote da coluna	0,93
Temperatura do forno (°C)	-1,28
Fluxo (mL/min)	0,90
Marca do metanol	-1,35
Tempo de sonificação (min)	-0,21

Fonte: Da autora (2021).

Segundo Youden e Steiner (1975), as variáveis em estudo que produzirem um efeito maior do que a raiz quadrada de dois multiplicada pelo desvio padrão entre os resultados ($DP \times \sqrt{2}$) influenciam significativamente na resposta analítica. Observando os resultados obtidos na Tabela 33, conclui-se que nenhum dos fatores estudados influem significativamente na resposta analítica. Diante disso, é possível afirmar que o método de análise é robusto para todas as variáveis consideradas.

6.3.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A partir das três curvas analíticas realizadas no ensaio de linearidade, pode-se obter os dados de inclinação (coeficiente angular) e intercepto (coeficiente angular), e estes estão demonstradas na Tabela 34.

Tabela 34 – Valores de coeficiente angular e coeficiente linear, obtidos a partir do ensaio de linearidade para quantificação de espiramicina I por CLAE.

DP residual da linha de regressão (σ)	Inclinação das curvas analíticas
16368,13	33276
	33252
	34070
	Média = 33532

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: DP = desvio padrão.

Utilizando a equação citada no item 5.4.7, o valor obtido para limite de detecção do método para quantificação de espiramicina em comprimidos foi de 1,61 $\mu\text{g/mL}$.

O limite de quantificação foi calculado a partir da equação citada no item 5.4.7, e o valor obtido para espiramicina em comprimidos foi de 4,88 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.7 Estabilidade das soluções

No estudo de estabilidade das soluções foi observado uma diferença menor que 0,52% nas áreas dos cromatogramas da espiramicina (TABELA 35) para solução amostra e padrão guardadas em refrigeração por 48 horas.

Table 35 – Resultados do estudo de estabilidade para amostra e padrão das soluções de espiramicina armazenadas a 4°C.

Solução	Tempo (h)			DPR (%)
	0	24	48	
	Área de espiramicina I (mVA)			
Padrão	3374945	3381867	3408449	0,52
Amostra	2250260	2234088	2229371	0,49

Fonte: Da autora (2021).

Além disso, o estudo de regressão (TABELA 36) mostrou que não houve significância ($p > 0,05$) entre as áreas, comprovando que as soluções são estáveis quando estocadas em refrigeração a 4°C por 48 horas.

Tabela 36 – Estudo de regressão para o padrão e amostra de comprimidos de espiramicina no ensaio de estabilidade de soluções.

Padrão					
	GL	SQ	MQ	F	F de Significância
Regressão	1	561259008	561259008	8,7126	0,20795
Residual	1	64419266,7	64419267		
Total	2	625678275			
Amostra					
	GL	SQ	MQ	F	F de Significância
Regressão	1	218175161	218175161	9,97623	0,1952
Residual	1	21869504	21869504		
Total	2	240044665			

Fonte: Da autora (2021).

6.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO

A princípio, foi realizado um levantamento bibliográfico de ensaios microbiológicos por difusão em ágar para espiramicina, contudo a literatura não apresenta muitos estudos deste ensaio para este fármaco. Em vista disso, os códigos oficiais como a USP, Farmacopeia Brasileira e Farmacopeia Europeia foram utilizadas como guia para o desenvolvimento da metodologia e o ICH, RDC nº 166 e trabalhos na literatura como guias de validação.

6.4.1 Desenvolvimento do ensaio microbiológico

Foram realizados alguns ensaios preliminares com a finalidade de se determinar qual seria a dosagem adequada para a realização da metodologia, qual concentração adequada de inóculo, qual meio de cultura adequado para método e, por fim, o tempo de incubação.

Primeiramente, foi testada uma faixa ampla de concentração de espiramicina a fim de definir as concentrações que tivessem o melhor resultado frente ao ensaio. As dosagens foram estabelecidas de forma que respeitassem a progressão geométrica entre

elas, para posterior cálculo da potência do fármaco. Na Tabela 37 segue a média dos valores dos halos de inibição de crescimento microbiano obtidos pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar para a escolha da dosagem.

Tabela 37 – Valores médios dos halos de inibição de crescimento microbiano obtidos em ensaio preliminar para determinação da dosagem.

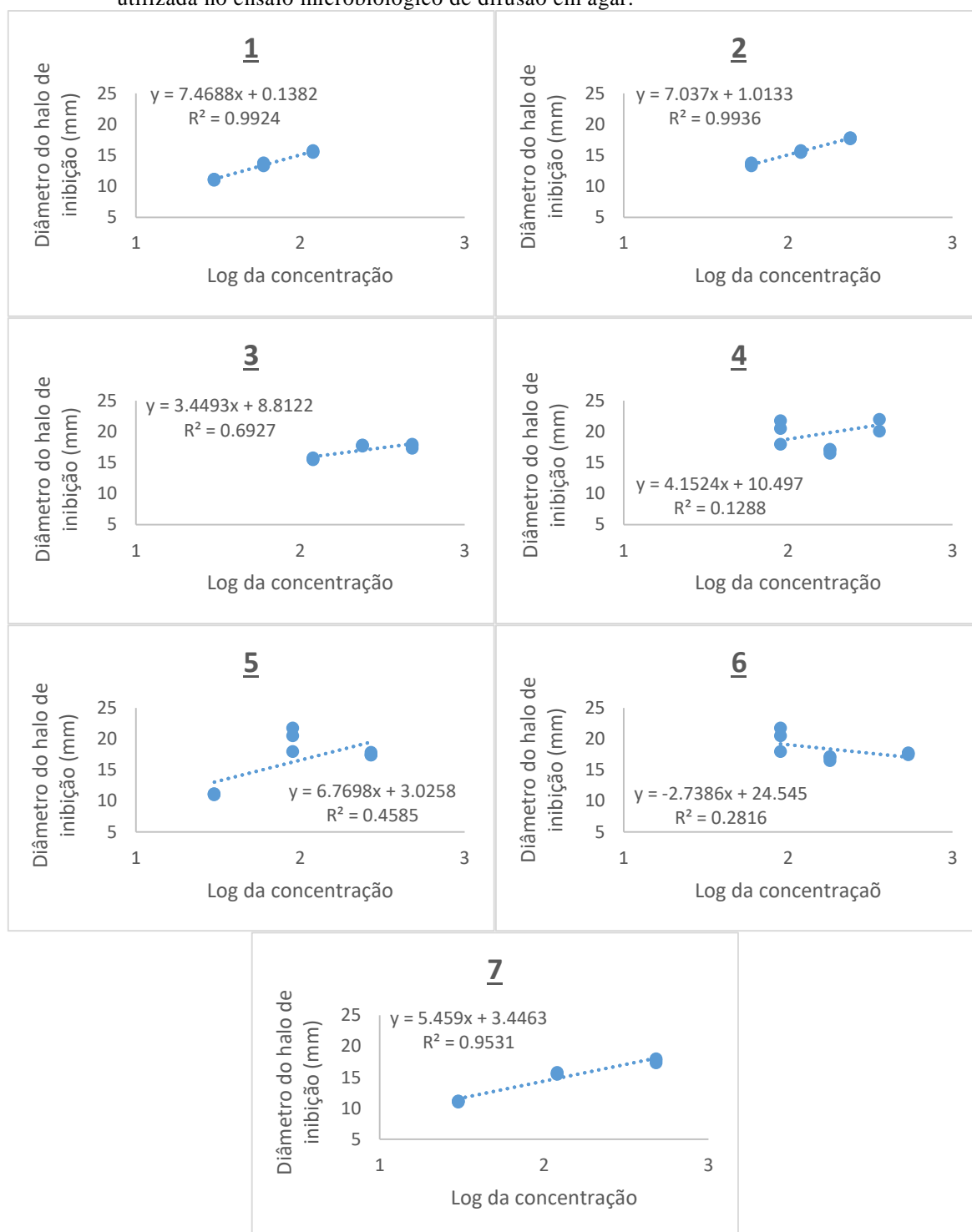
Concentração de espiramicina ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro do halo (mm)*
30	11,11
60	13,55
90	20,09
120	15,60
180	16,90
240	17,78
270	17,56
360	22,59
480	17,68
540	17,63

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: *Média de seis determinações.

Após a realização preliminar do ensaio microbiológico de difusão em ágar, foram plotadas curvas analíticas para avaliar a melhor combinação de dosagem, desde que se respeitasse a progressão geométrica entre as dosagens. Os gráficos e as concentrações combinadas estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Curvas analíticas realizadas para a determinação da concentração de espiramicina a ser utilizada no ensaio microbiológico de difusão em ágar.



Fonte: Da autora (2021).

Legenda: 1: Concentrações de 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$; 2: Concentrações de 60, 120 e 240 $\mu\text{g/mL}$; 3: Concentrações de 120, 240 e 480 $\mu\text{g/mL}$; 4: Concentrações de 90, 180 e 360 $\mu\text{g/mL}$; 5: Concentrações de 30, 90 e 270 $\mu\text{g/mL}$; 6: Concentrações de 90, 180 e 540 $\mu\text{g/mL}$; 7: Concentrações de 30, 120 e 480 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando os coeficientes de correlação obtidos, as concentrações de espiramicina que apresentaram os melhores resultados foram: 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$, com razão de 2 e $R^2=0,9924$; e 60, 120 e 240 $\mu\text{g/mL}$, com razão de 2 e $R^2=0,9936$. A escolha entre os dois resultados obtidos foi feita visando à utilização de uma menor dosagem, e devido a isso definiu-se as concentrações de trabalho em 30 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ e 120 $\mu\text{g/mL}$.

Como alternativa para o meio nº 11 farmacopeico (EP, 2008), foi testado o ágar triptona de soja, meio de cultura muito empregado em ensaios de rotinas em laboratórios de microbiologia. Dessa maneira, a partir da reativação de cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, estas foram inoculadas em placas de petri utilizando a técnica de isolamento com estrias múltiplas. Após o período de incubação de 24 horas, observou-se que houve crescimento microbiano, assim sugerindo que o meio utilizado no ensaio foi adequado.

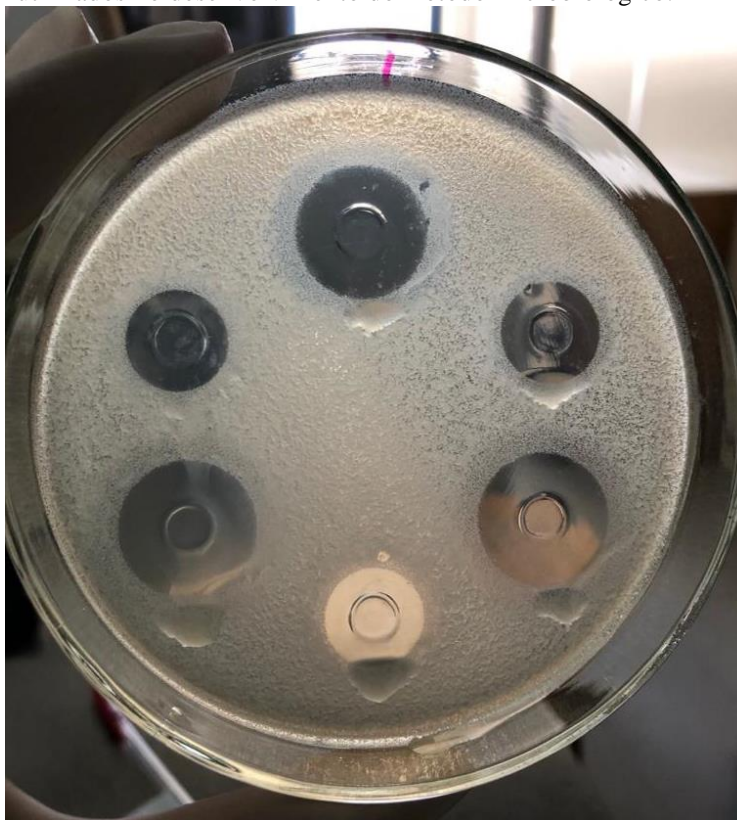
Ao realizar o ensaio por difusão em ágar, foi testada a concentração do inóculo a ser utilizada, e foi observado que os halos de inibição não apresentavam uniformidade e definição com inóculo a 2% (FIGURA 15). Dessa maneira, ficou definido o uso de 1 mL de inóculo em 100 mL de meio de cultura (1%).

Figura 15 – Teste realizado na concentração de inóculo a 2% para a determinação dos parâmetros a serem utilizados no desenvolvimento do método microbiológico.



Fonte: Da autora (2021).

Figura 16 – Teste realizado em um período de incubação de 16 horas para a determinação dos parâmetros a serem utilizados no desenvolvimento do método microbiológico.



Fonte: Da autora (2021).

A Farmacopeia Brasileira (2019) sugere para o ensaio microbiológico de difusão em ágar um período de incubação de 16 a 18 horas. Contudo, durante a realização dos ensaios observou-se que durante o período de 16 horas não havia completa difusão da solução de antibiótico no meio, visto que ao realizar a leitura do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano a solução escorria pela placa (FIGURA 16). Devido a isso, optou-se pelo período de 18 horas, onde era possível observar uma maior difusão da solução e melhor contorno dos halos formados.

A Figura 17 ilustra uma réplica do ensaio microbiológico de difusão em ágar utilizando as condições determinadas para o método, mostrando: a suscetibilidade do microrganismo às dosagens escolhidas, o crescimento uniforme no meio de cultura, a concentração de inóculo, e o período de incubação adequado.

Figura 17 – Ensaio microbiológico de difusão em ágar para a determinação dos parâmetros utilizados para o desenvolvimento do método.



Fonte: Da autora (2021).

Após a avaliação dos diversos parâmetros pré-estabelecidos no item 5.5.1 (TABELA 10), o doseamento microbiológico foi desenvolvido e validado com os parâmetros apresentados na Tabela 38.

Tabela 38 – Parâmetros utilizados no desenvolvimento e validação de espiramicina no ensaio microbiológico por difusão em ágar.

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Bacillus Subtilis</i> ATCC 6633
Meio de cultura	Ágar Triptona de Soja (TSA)
Solução diluente	Solução tampão fosfato pH 8,0
Concentração do inóculo (%)	1
Concentrações da solução padrão (µg/mL)	30,0; 60,0; 120,0
Temperatura de incubação (°C)	35 ± 2
Tempo de incubação (horas)	18

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: TSA = Tryptic Soy Agar.

6.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO

6.5.1 Seletividade

Os métodos microbiológicos são favoráveis pois os parâmetros medidos com essas técnicas e as propriedades do medicamento usado são os mesmos. De acordo com Hodges (2001), prováveis impurezas e substâncias relacionadas não interferem, mantendo a precisão do método analítico. À vista disso, esses ensaios permanecem, em geral, como padrão para anular dúvidas quanto a uma possível perda de atividade dos antibióticos (MAHMOUDI *et al.*, 2015).

O p-valor foi obtido a partir da comparação do diâmetro médio dos halos da solução padrão com o diâmetro médio dos halos da solução do padrão adicionado aos excipientes, utilizando o teste *t-student* ao nível de significância de 5%. Os resultados obtidos, a partir do ensaio, estão expressos na Tabela 39.

Tabela 39 – Valores médios dos diâmetros dos halos obtidos a partir do ensaio de seletividade e sua respectiva análise estatística.

Concentração (µg/mL)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		p-valor*
	Padrão	Padrão + excipientes	
30,0	9,18	9,59	0,95
	9,30	9,51	
	10,16	9,61	
60,0	10,99	10,73	0,36
	10,56	10,91	
	11,85	10,53	
120,0	13,02	12,00	0,06
	12,61	12,31	
	13,98	11,93	

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: *p-valor ao nível de significância de 5%.

Os dados obtidos para o ensaio de seletividade apresentaram valores adequados. Logo, o estudo sugere que não há interferência dos excipientes ($p > 0,05$) presentes na formulação e que o método desenvolvido é seletivo. Ademais, como relatado por Hodges (2001) e Mahmoudi *et al.* (2015) os excipientes e as prováveis impurezas não interferiram na capacidade do método de avaliar o analito.

6.5.2 Linearidade

Os resultados das médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos no estudo de linearidade, em cada ensaio, para as soluções em diferentes concentrações de espiramicina solução padrão estão apresentados na Tabela 40.

Tabela 40 - Valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição, obtidos no estudo de linearidade, para o ensaio microbiológico para espiramicina solução padrão.

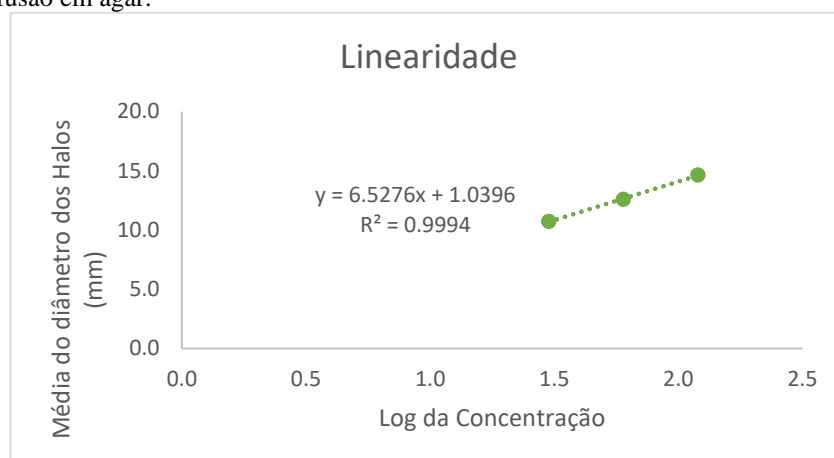
Diâmetro dos halos de inibição (mm) ^a						
	S3	DPR (%)	S2	DPR (%)	S1	DPR (%)
Ensaio 1	10,71		12,55		14,52	
	10,23	2,29	12,41	0,58	14,55	0,11
	10,48		12,51		14,54	
Diâmetro médio (Intradia) ^b	10,47		12,49		14,54	
Ensaio 2	10,48		12,31		14,27	
	10,48	0,77	12,31	0,93	14,40	0,51
	10,62		12,51		14,28	
Diâmetro médio (Intradia) ^b	10,53		12,38		14,32	
Ensaio 3	10,83		13,06		14,94	
	11,20	2,56	12,85	0,99	15,03	0,88
	11,39		12,83		15,20	
Diâmetro médio (Intradia) ^b	11,14		12,91		15,06	
Diâmetro médio (Interdias)	10,71		12,59		14,64	
DPR (Interdias)	3,48		2,08		2,31	

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: Sn = Standard (Padrão); ^a Média de seis determinações; ^b Média dos ensaios.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 40, construiu-se a curva analítica plotando o logaritmo da concentração ($\mu\text{g/mL}$) *versus* a média do diâmetro dos halos de inibição (mm). Para as concentrações de 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$, as zonas de inibição correspondentes foram de 10,71 mm (DPR = 3,48 %), 12,59 mm (DPR = 2,08 %) e 14,64 mm (DPR = 2,31 %). A equação da reta obtida foi $y = 6.5276x + 1.0396$, sendo x o logaritmo da concentração e y a média do diâmetro dos halos de inibição, conforme a Figura 18.

Figura 18 – Representação gráfica da resposta analítica em função do log da concentração do analito ($r^2 = 0,9994$) em estudo de linearidade para determinação de espiramicina em ensaio microbiológico por difusão em ágar.



Fonte: Da autora (2021).

Os resultados apresentados acima demonstram que é possível observar, visualmente, que o método segue uma tendência linear dentro da faixa de concentração analisada. O coeficiente de correlação ($r = 0,9997$) demonstra que há uma correlação entre as medidas dos halos de inibição do crescimento microbiano e o logaritmo das concentrações utilizadas.

Os dados obtidos no estudo de linearidade foram avaliados por meio do teste F, na análise da variância (ANOVA) da regressão.

Tabela 41 – Valores obtidos na análise de variância (ANOVA) para ensaio de linearidade do método para espiramicina (SQR), por difusão em ágar.

	GL	SQ	QM	F	F de Significância
Regressão	1	7,72245	7,72245	1603,277	0,015896
Residual	1	0,004817	0,004817		
Total	2	7,727267			

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: SQ = soma dos quadrados; GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; $*F_{\text{tabelado}} = 10,13$.

Conforme demonstrado na Tabela 41, o valor $F_{\text{calculado}}$ (1603,277) foi maior do que o valor de F_{tabelado} . Dessa maneira, rejeita-se a hipótese nula de que o coeficiente angular é estatisticamente igual à zero.

6.5.3 Precisão

A precisão do método foi determinada por meio de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) e expressa por valores de DPR (%) de uma série de medições. Os valores obtidos no ensaio estão representados na Tabela 42.

Tabela 42 – Valores de precisão intra e interdias do método microbiológico por difusão em ágar para forma farmacêutica comprimido contendo espiramicina.

Ensaio	Dia	Potência* (%)	DPR (%)
1		93,23	
2	1	98,15	2,62
3		96,60	
4		96,09	
5	2	98,90	1,67
6		96,09	
7		97,07	
8	3	95,35	1,72
9		93,78	
Interdias		96,14	1,93

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: *Média de 6 determinações.

Os resultados demonstraram valores de DPR adequados tanto nos ensaios intradia quanto interdias, indicando a precisão do método.

A precisão do método, por meio dos halos de inibição de crescimento, com os respectivos desvios padrões relativos dos resultados dos ensaios intradia e interdias estão apresentados, também, na Tabela 40 no item 6.5.2.

6.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada empregando a técnica do placebo contaminado. Os resultados das médias obtidas dos halos de inibição de crescimento microbiano foram aplicadas na equação da curva analítica preparada no mesmo dia do ensaio e a porcentagem de recuperação foi calculada por meio da equação descrita no item 5.4.3. Os ensaios foram realizados em dois

dias consecutivos, tendo sido feito um total de seis medições por dose em cada dia. A Tabela 43 apresenta os valores obtidos na determinação da exatidão.

Tabela 43 – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método microbiológico por difusão em ágar.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1			Dia 2		
	Halo de inibição (mm)	DPR (%)	Recuperação média (%)	Halo de inibição (mm)	DPR (%)	Recuperação média (%)
30,0	10.55	3,14	92,32	9.35	4,87	101,53
	9.78			10.76		
	10.65			10.49		
	10.13			9.89		
	10.08			10.02		
	10.19			10.01		
60,0	12.44	1,53	89,17	12.26	2,49	102,37
	12.15			12.28		
	12.02			12.78		
	12.12			11.93		
	12			12.15		
	11.91			12.59		
120,0	14.09	1,91	97,78	14.07	2,58	94,74
	14.29			13.99		
	14.24			13.93		
	14.31			14.3		
	14.17			14.49		
	14.86			14.9		

Fonte: Da autora (2021).

Os resultados obtidos, a partir dos cálculos, para o ensaio de exatidão apresentaram médias percentuais de recuperação de 96,93%; 95,77% e 96,26% para as concentrações de 30,0; 60,0 e 120,0, respectivamente. Logo, observa-se que o método indica exatidão adequada, pois os valores se encontram dentro do limite estabelecido de 70,0 a 100,0% (LEONARDI, 2019).

6.5.5 Determinação da potência do medicamento

Os resultados obtidos na determinação de espiramicina em comprimidos no ensaio microbiológico, calculados a partir da fórmula descrita por Hewitt (1977), estão demonstrados na Tabela 44.

Tabela 44 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de espiramicina pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar.

Valor rotulado (MUI)	Valor encontrado (MUI)	Teor (%)	DPR (%)
1,5	1,45	95,99	0,76
	1,46	97,03	
	1,45	95,40	

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: MUI = um milhão de unidades internacionais.

Os resultados de potência no ensaio tiveram teor médio de 96,14%, e com desvio padrão de 0,76% mostrando que o método é preciso e que a potência de espiramicina em comprimidos está dentro do intervalo de teor para ensaios microbiológicos.

6.6 RESULTADOS DE ANÁLISES DE AMOSTRAS COMERCIAIS PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Os resultados de aplicação dos métodos estão descritos nas Tabela 45 e 46 abaixo:

Tabela 45 – Resultado de teor obtido pelo método cromatográfico desenvolvido.

Método por CLAE	
Teor de espiramicina I (%)	72,60
DPR (%)	0,55

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 46 – Resultado de teor obtido pelo método microbiológico desenvolvido.

Método microbiológico	
Teor de espiramicinas I, II e III (%)	96,14
DPR (%)	0,76

Fonte: Da autora (2021).

A quantidade de espiramicina I por comprimido encontrada pelo método por CLAE = 326,71 mg (DP = 1,81 mg). Considerando que a quantidade declarada de espiramicina (I, II, III) é de 1,5 MUI e que, de acordo com Mahmoudi *et al.* (2016) 1,5 MUI de espiramicina comprimido é equivalente a 450 mg (1,0 IU corresponde à 0,3 µg), foi encontrado um teor de espiramicina I de 72,60% (DPR = 0,55%) em relação ao total de espiramicinas declaradas. Além disso, a farmacopeia europeia (2008), especifica que a soma das espiramicinas em matérias-primas deve ser no mínimo de 90,0% o que se comprova pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O planejamento fatorial 2^3 para otimização do método cromatográfico demonstrou melhoria no desempenho do método analítico, reduzindo o número de experimentos, gastos desnecessários de tempo e recurso financeiro trazendo benefícios positivos para análise de rotina.

A validação conduzida de acordo com a resolução RDC nº 166 de 2017, para o método cromatográfico mostrou seletividade frente aos excipientes da formulação, apresentando linearidade, além de precisão com valores de DPR inferiores a 2,5% e exatidão. O método se mostrou robusto para as condições aplicadas, apresentou baixos limites de LQ e LD, além de apresentar estabilidade nas soluções.

Os parâmetros estudados para validação do método cromatográfico atenderam aos conceitos sobre validação, comprovando sua aplicabilidade na análise de espiramicina I na forma farmacêutica comprimidos.

O método microbiológico por difusão em ágar foi desenvolvido e validade considerando ser uma opção de baixo custo e de fácil execução, além de ser facilmente integrado à rotina de laboratórios de controle de qualidade. Os materiais, como o meio de cultura, são facilmente disponíveis, uma vez que são amplamente empregados na rotina de ensaios microbiológicos.

O microrganismo utilizado, *Bacillus Subtilis* ATCC 6633, mostrou-se sensível ao antibiótico espiramicina e, também, aos meios de cultura empregados, formando halos de inibição de crescimento bem definidos e de fácil mensuração. Ademais, métodos biológicos apresentam uma vantagem pois o parâmetro medido e a atividade terapêutica do fármaco são os mesmos (PAIM *et al.*, 2010).

Os parâmetros avaliados para validar o método microbiológico mostraram linearidade, sendo satisfatório para um ensaio microbiológico que, segundo Silva (2012), possui conhecida variabilidade inerente. A precisão do método demonstrou ser satisfatória quando correlacionados os ensaios intra e interdias. Os resultados obtidos, analisando a precisão pelo desvio padrão relativo das médias dos halos de inibição, mostrou resultados diferentes entre as soluções de diferentes concentrações. Em vista disso, a quantificação de dois ou mais ensaios independentes podem ser estatisticamente semelhantes ainda que os valores dos halos no ensaio sejam significativamente diferentes. Ademais, o método indicou ser exato com valores médios recuperação dentro do estabelecido.

Em suma, foram desenvolvidos dois métodos para espiramicina em comprimidos. Um utilizando ensaio microbiológico e outro físico químico. Ambos métodos atenderam aos parâmetros necessários de validação, e podem ser utilizados para a rotina de laboratórios de controle de qualidade. Cada ensaio possui sua peculiaridade, logo é de escolha do laboratório qual atenderá suas necessidades e finalidade.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, H. H. *et al.* Spiramycin concentration in female pelvic tissues, determined by HPLC: a preliminary report. **J. Antimicrob. Chemother. B**, v. 22, p. 111-116, 1988.
- ALHAZMI, H. A. *et al.* A fast and validated reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of simvastatin, atorvastatin, telmisartan and irbesartan in bulk drugs and tablete formulations. **Sci Pharm.**, v.86, n. 1, p. 53-57, 2018.
- ALVAREZ-ELCORO, S.; YAO, J. D. Antimicrobial macrolides in clinical practice. *In*: Omura, S. (ed.). **Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice**. 2. ed. San Diego: Elsevier Science, 2002.
- ANDRADE-EIROA, A.; DIÉRVATE, P.; DAGAUTE, P. Improved optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixtures resolution in reversed-phase high-performance liquid chromatography by using factorial design and response surface methodology. **Talanta**, v. 81, p. 265-274, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada – RE nº 166, de 24 de julho de 2017, determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, nº 141, 24 de jul. de 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Bulário eletrônico. [Internet]. 2021. Disponibiliza informações sobre o medicamento Rovamicina. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=ROVAMICINA>> Acesso em: 04 mai. 2021.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, p. 2476-2481, 2009.
- ARAÚJO, P. W.; BRERETON, R. G. Experimental design II. Optimization. **TrAC, Trends in Anal. Chem.**, v. 15, n. 2, p. 63-70, 1996.
- AVCI, M. E. *et al.* Role of spiramycin in prevention of fetal toxoplasmosis. **J. of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 29, p. 2073-2076, 2015.
- BALAJI, J.; NISHA SHRI, C. Development and validation of RP-HPLC method for determination of thermal degradation impurity in macrolide immunosuppressant substance and drug product. **Research & Reviews: J. Drug Form. Develop. Prod.**, v. 3, n. 1, p. 14-19, 2016.
- BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F. I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine ad impurities in tablets using experimental design methodology. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 49, p. 1192-1202, 2009.

BARROS, E. *et al.* **Antimicrobianos: consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 591 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman. 2010. 414 p.

BENS, G. A.; CROMBEZ, E.; MOERLOOSE, P. D. Applications of a modified “isohydric solvent sys-tem” in hplc on silica gel for the analysis of the macrolide antibiotics turimycins and spiramycins. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 5, n. 8, p. 1449-1465, 1982.

BENS, G. A.; VAN DEN BOSSCHE, W.; DE MOERLOOSE, P. Separation and determination of components of spiramycin in bulk powders and in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 12, n. 5, p. 294–298, 1979.

BERGER-BÄCHI, B.; MCCALLUM, N. State of the knowledge of bacterial resistance. **Injury International Journal Care Injured**, v. 37, p. S20-S25, 2006.

BETINA, V. A systematic analysis of antibiotics using paper chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 15, n. C, p. 379-392, 1964.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BRAGA, Silmara Leôncio. **Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos**. 2018. 63f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 29 de abril de 2010, determina a publicação do “Programa de controle de resíduos e contaminantes em carnes, leite, mel, ovos e pescado - PNCRC/2010. **Diário Oficial da União** (DOU). 3 de maio de 2010. Seção 1, p. 27. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 14 out. 2018.

BREIER, A. R. *et al.* Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 29, n. 1, p. 957-962, 2002.

CALVO, A. *et al.* **Oral spiramycin formulations and method for preparing same**. United States Patent 5,403,594A, 1995.

CALCAGNILE, M. *et al.* Stimulatory Effects of Methyl- β -cyclodextrin on Spiramycin Production and Physical–Chemical Characterization of Nonhost@Guest Complexes. **ACS Omega**, v. 3, p. 2470–2478, 2018.

CARLHANT, D. *et al.* Solid phase extraction and HPLC determination of spiramycin in plasma and vitreous concentrations. **Biomedical Chromatography**, v. 3, n. 1, p. 1–4, 1989.

CHANG, X. *et al.* Determination of antibiotics in sewage from hospital, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1444-1450, 2010.

CHAMBERS, H. F.; MAC-DOUGALL, C. Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. *In*: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw Medical, 2011. p. 1529-1534.

CHEPKWONY, H. K. *et al.*. Development and validation of an reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of spiramycin and related substances. **Chromatographia**, v. 54, n. 1-2, p. 51-56, 2001.

CIVITAREALE, C. *et al.* Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feeding stuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 36, n. 2, p. 317-325, 2004.

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

COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “nascimento” da cromatografia. **Sci. Chrom.**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 7-20, 2009.

COSTA, I. N. *et al.* Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomyscallosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, London, v. 30, n. 10, p. 884-890, 2009.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.

CURBETE, M. M.; SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay for quantification of fusidic acid in a dermatological cream. **Talanta**. v. 153, p. 51-56, 2016.

DAFALE, N. A. *et al.* Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. **Anal. Methods**, v. 4, p. 2490-2498, 2012.

DECHENG, S. *et al.*. Simultaneous determination of antibiotics and amantadines in animal-derived feedstuffs by ultraperformance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1095, p. 183-190, 2018.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DINCEL, A.; BASCI, N. E. An experimental design approach to select the optimum LC conditions for the determination of local anaesthetics. **Chromatographia**. v. 66, p. S81-S85, 2007.

DING, J. *et al.* Determination of roxithromycin from plasma samples based on magnetic surface molecularly imprinted polymers followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometer. **J. Chrom. B.**, v. 1021, n. 1, p. 221-228, 2015.

DOW, J. *et al.* Automated high-performance liquid chromatographic determination of spiramycin by direct injection of plasma, using column-switching for sample clean-up. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 344, n. C, p. 275-283, 1985.

DRUGBANK. **Drugbank**: spiramycin, 2007. Disponível em:
<<https://go.drugbank.com/drugs/DB06145>>. Acesso em: 15 out. 2018.

DUBOIS, M. *et al.* Identification and quantification of live macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chrom. B: Biom. Sci.**, v. 753, p. 189-202, 2001.

ELKHOUDARY, M. M.; SALAM, R. A. A.; HADAD, G. M. Development and Optimization of HPLC Analysis of Metronidazole, Diloxanide, Spiramycin and Cliquinol in Pharmaceutical Dosage Forms Using Experimental Design. **J. Chrom. Sci.**, v. 54, n. 10, p. 1701-1712, 2016.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6. ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe, 2008. p. 2951-2952

ESMERINO, L.T. *et al.* Método microbiológico para a determinação de potência de antimicrobianos. **Ciência Biologia e Saúde, Ponta Grossa**, v.10, n.1, p. 53-60, 2004.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Primeiro suplemento, p. 432-438.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004.

FRYDMAN, A. M. *et al.* Pharmacokinetics of spiramycin in man. **J. Antim. Chemother B.**, v. 22, p. 93-103, 1988.

GARCÍA-MAYOR, M. A. *et al.* Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. **J. Chromatography A.**, v. 1122, n. 1-2, p. 76-83, 2006.

GARCÍA-MAYOR, M. A. *et al.* Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer for the determination of spiramycin in sheep milk. **Food Chemistry**, v. 221, p. 721-728, 2017.

GAVIN, J. J. Microbiological process report - analytical microbiology - III. Turbidimetric methods. **Applied Microbiology**, v. 5, p. 235-243, 1957b.

GENNARO, A. R. **Remington's pharmaceutical sciences**. 18. ed. Easton: Mack Publishing, 1990. p. 1207-1208.

GHARI, T.; KOBARFARDB, F.; MORTAZAVIA, S. A. Development of a simple RP-HPLC-UV method for determination of azithromycin in bulk and pharmaceutical dosage forms as an alternative to the USP method. **Iran. J. Pharm. Res.**, v. 12, p. 57-63, 2013.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511 p.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOMIS, D. B. *et al.* Determination of Spiramycin and Josamycin in Milk By HPLC and Fluorescence Detection. **J. Food Sci.**, v. 69, n. 5, p. 415-418, 2006.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Analysis of spiramycin by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n. 12, p. 2407-2411, 1999.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the Discovery and development of new agents. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2009.

GUPTA, V. *et al.* Development and validation of HPLC method - a review. **Interl. Res. J. Pharm. App. Sci.**, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

HARANG, V.; KARLSSON, A.; JOSEFSON, M. Liquid chromatography method development and optimization by statistical experimental design and chromatogram simulations. **Chromatographia**, v. 54, p. 703-709, 2001.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 898 p.

HEWITT, W. **Microbiological assay: an introduction to quantitative principles and evaluation**. California: Academic Press, 1977. 298 p.

_____. **Theory and application of microbiological assay**. California: Academic Press, 1989. 323 p.

_____. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. Florida: CRC Press, 2004. 260 p.

HODGES, N. A. Pharmaceutical applications of microbiological techniques. *In*: AULTON, M. E. (ed.). **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. London: Churchill Livingstone, 2001. p. 623-643.

HORIE, M. Determination of spiramycin components in pharmaceutical preparations by HPLC. **Bunseki kagaku**, v. 37, n. 11, p. 580-584, 1988.

HORIE, M. *et al.* Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatography A.**, v. 812, n. 1-2, p. 295-302, 1998.

HU, M.; HU, C. Q. Identification of the components of 16-membered macrolide antibiotics by LC/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, n. 1-2, p. 89-99, 2005.

THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Geneva: ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.

ICHIMURA, A. S. **Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por difusão em ágar para determinação da potência do fenticonazol creme vaginal**. 2013. 28f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 3. ed. Geneva: World Health Organization, 1979. p. 145-151.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro, 2020

IULIANI, P.; CARLUCCI, G.; MARRONE, A. Investigation of the HPLC response of NSAIDs by fractional experimental design and multivariate regression analysis. Response optimization and new retention parameters. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 51, p. 46-55, 2009.

JAMIL, C. R. P. *et al.* Development and validation of a microplate bioassay for nystatin using analytical quality by design (QbD) approach. **Latin Am. J. Pharmacy**, v. 35, n. 8, p. 1871-1876, 2016.

JANSEN, W. T. M. *et al.* Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. **Drug Resistance Updates**, v. 9, p. 123-133, 2006.

KANFER, I.; SKINNER, M. F.; WALKER, R. B. Analysis of macrolide antibiotics. **Journal of Chromatography A**, n. 812 n. 1-2, p. 255-286, 1998.

KATSIDZIRA R. M.; WESSELS, A.; AUCAMP, M. A novel RP-HPLC method for the detection and quantification of clarithromycin or spiramycin in bulk drug samples and dosage forms. **Intern. J. Pharm. and Pharm. Sci.**, v. 8, n. 12, p. 310-313, 2016.

KAVANAGH, F. W. **Analytical microbiology**. New York: Academic Press, 1963. 707 p.

KAVANAGH, F. W. **Analytical microbiology**. New York: Academic Press, 1972. cap. 3, p. 43-121.

KAVANAGH, F.; RAGHEB, H. S. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: considerations for assuring accuracy. **J. Assoc. Official Anal. Chem.**, v. 62, n. 4, p. 943-950, 1979.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists: 1**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 1108 p.

KOCHAKIAN, C. D. The development of spectrophotometry: fortuitous inventions for steroid biochemistry. **Trends Biochem. Sci.**, v. 9, n. 13, p. 359-362, 1988.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KOUSOLOS, C. *et al.* Validation of a fully automated high throughput liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for roxithromycin quantification in human plasma. Application to a bioequivalence study. **Biom. Chromatography**, v. 22, n. 1, p. 494-501, 2008.

KWIATKOWSKA, B.; MAŚLIŃSKA, M. Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, p. 1-7, 2012.

KWIECIEN, A.; KRZEK, J.; GADEK, M. Simultaneous identification and quantitative determination of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, spiramycin and troleandomycin by thin-layer chromatography and densitometry. **Acta Chromatographica**, v. 26, n. 4, p. 657-670, 2014.

LA ROCA, M. F. *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente compatíveis. **Sci. Chromatographia**, v.1, n. 2, 2009.

LEONARDI, E. Validação de métodos analíticos microbiológicos. **Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade (ICTQ)**, São Paulo, 28 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.ictq.com.br/industria-farmacautica/905-validacao-de-metodos-analiticos-microbiologicos>>. Acesso em: 07 abr. 2021.

LIEW, K. B.; PEH, K. K.; TAN, Y. T. F. RP-HPLC analytical method development and optimization for quantification of donepezil hydrochloride in orally disintegration tablet. **Pakistan J. Pharm. Sci.**, v. 26, n. 5, p. 961-966, 2013.

LIN, Q. *et al.* Improved liquid chromatographic method for quality control of spiramycin using superficially porous particles. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 149, p. 57-65, 2018.

LIU, L.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Liquid chromatography of spiramycin on poly(styrenedivinylbenzene). **Journal of Chromatography A**, v. 764, n. 1, p. 43-53, 1997.

LIU, L. *et al.* Interlaboratory study comparing the microbiological potency of spiramycins I, II and III. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, n. 1-2, p. 217-24, 1999.

LIU, H. *et al.* QuEChERS with magnetic hydrophilic–lipophilic balanced adsorbent and its application in multi-class veterinary residues in milk by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 81, n. 2, p. 265-275, 2018.

LIU, Q.; WAN, J.; CAO, X. Synthesis of core-shell molecularly imprinted polymers (MIP) for spiramycin I and their application in MIP chromatography. **Process Biochem.**, v. 70, p. 168-178, 2018.

LOFRANO, G. *et al.* Municipal wastewater spiramycin removal by conventional treatments and heterogeneous photocatalysis. **Science of the Total Environment**, v. 624, p. 461-469, 2018.

LOURENÇO, F. R. **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em ágar – proposta de delineamento experimental**. 2006. 200f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (ed.) **Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics**. 2. ed. 2014. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv#supplements>>. Acesso em: 20 Nov. 2019.

MAHER, H. M.; YOUSSEF, R. M. Development of validated chromatographic methods for the simultaneous determination of metronidazole and spiramycin in tablets. **Chromatographia**, v. 69, n. 3-4, p. 345-350, 2009.

MAHMOUDI, A. *et al.* Microbiological assay for the analysis of certain macrolides in pharmaceutical dosage forms. **Intern. J. Pharm.**, v. 491, n. 1, p. 285-291, 2015.

MAHMOUDI, A. *et al.* Quantification of three macrolide antibiotics in pharmaceutical lots by HPLC: development, validation and application to a simultaneous separation. **British J. Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 63-73, 2016.

MANFIO, L. M. *et al.* A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium. **Brazilian J. Pharm. Sci.**, v. 49, n. 4, p. 753-761, 2013.

MARTINS, Y. A.; SOUSA, R. S.; OLIVEIRA, C. L. C. G. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of thiamphenicol in soft capsules. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 16, p. 806-813, 2020.

MAYO CLINIC. **Toxoplasmosis: diagnosis & treatment**. 2020. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/toxoplasmosis/symptoms-causes/syc-20356249>>. Acesso em: 17 Sept. 2020.

MINETTO, L. **Antibióticos macrolídeos: determinação e identificação de metabólitos e subprodutos de degradação em efluente hospitalar**. 2013. 128f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013.

MONTGOMERY, D. C.; MYERS, R. H. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2. ed. New York: Wiley, 2002. 798 p.

MOURIER, P.; BRUN, A. Study of the metabolism of spiramycin in pig liver. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 704, n. 1-2, p. 197-205, 1997.

MOUROT, D. *et al.* Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of spiramycin. **Journal of Chromatography A**, v. 161, n. C, p. 386-388, 1978.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubchem compound summary for CID 5289394, Spiramycin. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spiramycin#section=Information-Sources>>
Acesso em: 17 Dec. 2019.

NEMUTLU, E. *et al.* Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone. **Talanta**, v. 80, p. 117-126, 2009.

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JORDÃO, E. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 327-329, 2002.

NOVAES, C. G. *et al.* Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - parte I: variáveis de processo. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017.

OMURA, S. *et al.* Fast liquid chromatography of macrolide antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 26, n. 12, p. 794-796, 1973.

PAIM, C. S. *et al.* Gemifloxacin mesylate stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. **Talanta**, v. 83, p. 1774-1779, 2010.

PENDELA, M. *et al.* Characterization of impurities in spiramycin by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 4, p. 599-613, 2007.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica ambiental. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 2008.

PETROPOULOS, A. D. *et al.* Time-resolved binding of azithromycin to escherichia coli ribosomes. **J. Molecular Biology**, v. 385, n. 4, p. 1179-1192, 2009.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 343 p.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 784 p.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2015. 432 p.

PINTO, T. J. A.; LOURENÇO, F. R. Comparison of three experimental designs employed in gentamicina microbiological assay through agar diffusion. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 559-566, 2009.

PIRES, F. **Preparação e avaliação de colunas capilares monolíticas à base de sílica modificadas com polidimetilsiloxano (PDMS) para uso em cromatografia líquida capilar**. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

POULSEN, S. M.; KOFOED, C.; VESTER, B. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. **J. Molecular Biology**, v. 304, p. 471-481, 2000.

RAMOS, R. R. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise sara de petróleo**. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RENARD, L. *et al.* Determination of spiramycin and neospiramycin in plasma and milk of lactating cows by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 657, n. 1, p. 219–226, 1994.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale: the extra pharmacopoeia**. 30. ed. Londres: The Pharmaceutical Press, 1993. p. 202-203.

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

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Rev Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2014.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London: **Royal Pharmaceutical Society of Great Britain**, 2009. 918 p.

ROZET, E. *et al.* Methodology for the validation of analytical methods involved in uniformity of dosage units tests. **Anal. Chim. Acta**, v. 760, p. 46-52, 2013.

SAGAN, C. *et al.* Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin I in human plasma, saliva and gingival crevicular fluid by LC–MS/MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.38, n. 2, p. 298-306, 2005.

SANDERS, P.; DELÉPINE, B. Confirmatory analysis for spiramycin residue in bovine muscle by liquid chromatography/particle beam mass spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**, v. 23, n. 6, p. 369-375, 1994.

SANTOS, O. M. M. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de finasterida cápsulas**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2011.

SILVA, C. R. *et al.* Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SILVA, L. M. **Doseamento e validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade de tigecilina em produto farmacêutico**. 2012. 186f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

SINAGRA, A. L. *et al.* The activity of azithromycin against *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* in the golden hamster model. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v. 40, n. 6, p. 627-630, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 1997. 800 p.

SOLANO, A. G. R. **Desenvolvimento de métodos microbiológicos para doseamento de gramicidina matéria-prima**. 2008. 261f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Azithromycin treatment modulates the extracellular signal-regulated kinase mediated pathway and inhibits inflammatory cytokines and chemokines in epithelial cells from infertile women with recurrent Chlamydia trachomatis infection. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 8, p. 545-554, 2011.

STEEL, H. C. *et al.* Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. **Mediators of Inflammation**, 2012. 17 p.

SUAREZ, G. David A. Garvin e as Oito Dimensões da Qualidade. **Quality Road**, Paraná, ago. 2015. Disponível em: < <https://qualityway.wordpress.com/2015/08/18/david-a-garvin-e-as-oito-dimensoes-da-qualidade-por-gregorio-suarez-parte-1/> >. Acesso em: 17 abr. 2020.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Handbook of analytical validation**. Flórida: CRC Press, 2012. 220 p.

TAPPIN, M. R. R. *et al.* Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in Carapa guianensis seed oil by experimental design. **J. Pharm. Biom. Anal.** v. 48, p. 1090-1095, 2008.

TAVARES, W. **Manual of antibiotics and chemotherapeutic anti-infectives**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. **Fifth general report on the activities of the European agency for the evaluation of medicinal products.** London: EMEA General Report, 1999.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TORAÑO, J. S.; GUCHELAAR, H. J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxythromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fluorescence detection. **J. Chromatography B**, v. 720, n. 1, p. 89-97, 2001.

TOKU-E. Spiramycin Product. [Internet]. Disponibiliza informações sobre compra do produto. Disponível em: < <https://www.toku-e.com/product/spiramycin/>>. Acesso em: 17 Dec. 2019.

UNITED STATES PHARMACOPEIA-NATIONAL FORMULARY (USP-NF). **USP40-NF35.** ed. Rockville: United States Pharmacopial Convention, 2017. 4 v.

VEIGA, M. D.; DE EULATE, J. A. Dissolution study of spiramycin: influence of agitation intensity and addition of several substances to the dissolution medium. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 110, n. 3, p. 223-229, 1994.

VINCENT, U. *et al.* Validation of analytical method for the determination of spiramycin, virginiamycin and tylosin in feeding-stuffs by thin-layer chromatography and bio-autography. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 4, p. 351-359, 2007.

VITAL, T. M. *et al.* Estudo comparativo de duas técnicas farmacopeicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina eritromicina, neomicina e gentamicina. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v. 40, n. 2, p. 219-227, 2004.

VOGT, F. G.; KORD, A. S. K. Development of quality-by-design analytical methods. **J. Pharm. Sci.**, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

WANG, J.; LEUNG, D. Determination of spiramycin and neospiramycin antibiotic residues in raw milk using LC/ESI-MS/MS and solid-phase extraction. **J. Sep. Sci.** v. 32, p. 681-688, 2009.

WANG, J. Analysis of macrolide antibiotics using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 50-92, 2009.

WATZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. **Sep. Sci. Technol.**, v. 9, n. 1, p. 225-244, 2008.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **List of antimicrobials of veterinary importance.** Paris, 2007. Disponível em: <
http://www.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobial.pdf>. Acesso em: 14 Oct. 2018.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC.** Washington: Association of Official Analytical Chemistry, 1975.

ZHOU, W. *et al.* Simultaneous determination of 16 macrolide antibiotics and 4 metabolites in milk by using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction (QuEChERS) and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 1061-1062, p. 411-420, 2017.