

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES
INJETÁVEIS DE AZTREONAM**

MESTRANDA: ANDRESSA LEME DE FIGUEIREDO
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES
INJETÁVEIS DE AZTREONAM**

ANDRESSA LEME DE FIGUEIREDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F475a Figueiredo, Andressa Leme de
Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de aztronam / Andressa Leme
de Figueiredo. – Araraquara, 2014.
141 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêutica

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Aztreonam. 2. Controle de qualidade. 3. Métodos analíticos. 4. Validação. I. Salgado,
Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Quero dedicar este trabalho aos meus queridos pais os quais me deram exemplos a serem seguidos, não deixaram de apoiar nos momentos difíceis, tanto emocionais como financeiros. Por certo foram o alicerce de minha vida e, com suas dificuldades não mediram esforços, muitas vezes privando os seus interesses para satisfazer os meus, tudo isso para que eu não sofresse a mínima consequência que o mundo muitas vezes prepara e que a gente para alçar o sucesso tem que enfrentar; todavia para que nossos sonhos fossem cobertos de êxito tivemos de abdicar algumas coisas, mas meus pais me ensinaram fazer a melhor escolha, por isso cheguei aqui hoje e, aprendi que nada na vida é impossível e tudo mostra que a honestidade e o respeito prevalecem, razão esta que devemos lutar pelos nossos ideais. Assim sou feliz e com muito orgulho os chamarei de papai e mamãe e esta oportunidade foram eles que me ensinaram desde meu nascimento até os dias de hoje. “Meus sinceros agradecimentos e meu muito obrigado e que Deus não deixe de protegê-los nas caminhadas durante suas vidas”.

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação, sinceridade e carinho que agradeço a todos que me proporcionaram direta ou indiretamente com a elaboração deste trabalho.

Em primeiro lugar quero agradecer a “Deus” pela coragem, perseverança e muita capacidade, para que pudesse desempenhar este trabalho.

Com todo amor e respeito, agradeço meus pais, Diobel e Silvana, por terem proporcionado tudo para que fosse possível atingir os objetivos almejados; porque sem o incentivo, apoio, companheirismo e desprendimento destes entes queridos, esta conquista não seria possível e por tudo isso serei eternamente grata.

À minha querida irmã, Mirella meus agradecimentos pela amizade e carinho que sempre teve comigo.

Aos meus grandes amigos e amados avôs; Alcides e Terezinha, pelo incentivo e carinho que não deixou me faltar e graças a eles tive ânimo para enfrentar as dificuldades que encontrei pela jornada.

À minha querida madrinha Jaqueline, pela confiança e amor para que eu enfrentasse os obstáculos durante a caminhada e não entrasse em desânimo durante a minha permanência nos estudos.

À minha estimável e querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Hérída Regina Nunes Salgado, por ter me concedido a oportunidade da realização deste trabalho, bem como sua confiança, incentivo, paciência e dedicação, também quero agradecer essa inesquecível amiga pelo acompanhamento nas minhas dificuldades durante minha estada e formação, que com sua perseverança, mestre em orientar, proporcionou-me entusiasmo para que eu concluísse o mestrado “MEU MUITO OBRIGADO”.

Aos meus queridos Prof.^a Dr.^a Cristiane Teixeira e Deny Munary do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, UNIFEB; tenho a agradecer por terem me ajudado nos meus dias difíceis e com todo carinho incentivaram para que eu seguisse meu caminho e concluíssem meus estudos e fico muito grata por tudo e peço a “Deus” que iluminem os vossos caminhos em suas funções como professores e digo mais “vocês são exemplos como pessoas a serem seguidos”.

Também desde já, quero agradecer aos demais professores do curso de Farmácia da UNIFEB e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo carinho que tiveram durante meus estudos, assim deixo meus sinceros agradecimentos, portanto, desde já meus parabéns a todos. Também quero deixar meus agradecimentos aos queridos funcionários os quais me trataram com respeito e tiveram a capacidade de compreender e entender as dificuldades dos alunos e tudo fazem para que tenham o máximo de conforto durante suas permanências na referida unidade de ensino.

À querida Maria de Fátima Rodrigues, meu muito obrigado, você foi muito importante, nos momentos difíceis que durante meu aprendizado teve muita paciência e não mediu esforços para que eu aprendesse o que era ensinado; portanto minha gratidão e reconhecimento e peço que “Deus” lhe pague por tudo de bom que me proporcionou.

Aos amigos “Kamila Rotolo, Ana Cláudia Depaoli, Fernanda Domingos, Andressa Franco, Julia Dassie, Junior Zanoello, Evandro Passos, Natália Maia, Luis Fernando Gentil, Nathália Nogueira, Thatiane Alonso, Bianca Santos, Marcela de Paula”, meus sinceros agradecimentos pela compreensão e pelo carinho durante minha caminhada; bem como não poderia deixar de agradecer meus colegas de laboratório “Ana Carolina Kogawa, Eliane Tótolli, Tahisa Pedroso, Lucas Chierentin, Lucélia Silva, Josilene Correa, Camila Tavares, Rudy Bonfilio, Flávia Carnavalli e Mariane Curbete” pela compreensão e carinho; meu eterno agradecimento e desde já “estou com saudades”.

Quero deixar meus agradecimentos ao Laboratório Farmacêutico União Química pela doação de aztreonam substância química de referência e amostra de “Uni aztrenam”.

Ao CNPq, CAPES e ao PADC-FCF-UNESP, agradeço pelo apoio financeiro concedido.

***“É a qualidade do nosso trabalho que
irá satisfazer Deus, não a quantidade”
(Mahatma Gandhi)***

***“Qualidade é o resultado de um ambiente
cultural cuidadosamente construído”
(Philip Crosby)***

RESUMO

O aztreonam é um antibiótico β -lactâmico, sintético, monocíclico, com atividade bactericida contra bactérias Gram negativas. Foi descoberto em 1978, sendo o primeiro antibiótico da família monobactâmica a ser terapêuticamente aprovado. Pode ser utilizado no tratamento de infecções do trato urinário, septicemia, meningite, infecções de pele, como feridas, úlceras, queimaduras, infecções intra-abdominais, tais como peritonite, endometrite, celulite pélvica e infecções respiratórias, como fibrose cística. Não é absorvido por via oral, apresenta meia-vida de 1-6 horas e biodisponibilidade de quase 100% por via intramuscular. Quanto ao mecanismo de ação, o aztreonam, assim como outros antibióticos β -lactâmicos, tem a capacidade de inibir o crescimento das bactérias ao interferir na síntese da parede celular. Apesar de ser uma substância bastante estudada com relação à sua atividade antimicrobiana, farmacocinética, farmacodinâmica e determinação em fluidos biológicos, há poucos estudos na literatura descrevendo o desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável. Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a análise de aztreonam na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, que apresentem menor impacto ambiental e que sejam mais práticos, seguros e econômicos que os métodos já descritos. O aztreonam substância química de referência e amostra foram analisados qualitativamente quanto às características organolépticas, peso médio, ponto de fusão, umidade, cinzas sulfatadas, cromatografia em camada delgada indicativo de estabilidade, espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos desenvolvidos foram validados segundo órgãos nacionais e internacionais. Determinou-se quantitativamente o aztreonam por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta a 292 nm, utilizando água como solvente com faixa de concentração linear de 26,0 a 72,0 $\mu\text{g/mL}$, exatidão de 100,9% e teor de 96,22%; ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, utilizando *Escherichia coli* com faixa de concentração de 5,0 a 320 $\mu\text{g/mL}$, exatidão de 99,95% e teor de 95,65%; cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta a 292 nm, fase móvel composta por água e etanol (70:30, v/v), pH 2,6 ajustado com ácido acético e faixa de concentração linear de 45,0 a 95,0 $\mu\text{g/mL}$, exatidão de 98,56% e teor de 95,39%; e espectrofotometria de absorção na região do infravermelho, com faixa de concentração de 1,0 a 3,5 mg/pastilha, exatidão de 101,6% e teor de 94,95%. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferenças entre si para nível de significância de 5%, demonstrando ser equivalentes para a quantificação de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

Palavras-chave: aztreonam, controle de qualidade, cromatografia líquida de alta eficiência, ensaio microbiológico, espectrofotometria, métodos analíticos, validação.

ABSTRACT

Aztreonam is a β -lactam antibiotic, synthetic, monocyclic with bactericidal activity against Gram-negative bacteria. It was discovered in 1978, and it was the first antibiotic of the monobactam family to be therapeutically approved. It can be used in the treatment of urinary tract infections, sepsis, meningitis, skin infections, such as wounds, ulcers, burns, intra-abdominal infections, such as peritonitis and cellulitis pelvic endometritis, and respiratory infections, such as cystic fibrosis. It is not absorbed orally and has a half-life of 1-6 hours and the bioavailability of almost 100% for intramuscularly administration. Regarding the mechanism of action, aztreonam, like other β -lactam antibiotics, has the ability to inhibit bacterial growth by interfering at a specific stage of the cell wall synthesis. Despite being a substance is highly studied and researched in relation to its antimicrobial activity, pharmacokinetics and pharmacodynamics, analytical methods in biological fluids, there are few studies in the literature regarding the development of analytical methodology for aztreonam lyophilized powder for injectable solution. Thus, this study aimed to develop new analytical methods for the analysis of aztreonam in lyophilized powder for injectable solution, which have the lowest impact on the environment as possible and that be more convenient, safer for operators and more economical than the analytical methodologies already described. Aztreonam chemical reference and sample were analyzed qualitatively about the organoleptic characteristics, weight, melting point, moisture, sulphated ash, thin layer chromatography indicative of stability, ultraviolet spectrophotometry, infrared spectrophotometry and high performance liquid chromatography. The developed methods were validated according national and international guidelines. It was determined quantitatively by ultraviolet spectrophotometry at 292 nm, using water as a solvent, with concentration range from 26.0 to 72.0 $\mu\text{g/mL}$, with an accuracy of 100.9% and content of 96.22%, microbiological assay by turbidimetric method, using *Escherichia coli*, with concentration range from 5.0 to 320 $\mu\text{g/mL}$, with accuracy of 99.95% and content of 95.65%, high performance liquid chromatography with ultraviolet detection at 292 nm, mobile phase composed by water and ethanol (70:30, v/v) adjusted to pH 2.6 with acetic acid and concentration range from 45.0 to 95.0 $\mu\text{g/mL}$, with accuracy of 98.56% and content of 95.39%, and infrared spectrophotometry, with concentration range from 1.0 to 3.5 mg/pellet, with accuracy of 101.6 % and content of 94.95%. The method development shows no statistical difference from each other for a significance level of 5%, proving to be equivalent to the quantification of aztreonam in lyophilized powder for injectable solution.

Keywords: aztreonam, quality control, high performance liquid chromatography, microbiological assay, spectrophotometry, analytical methods, validation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos gerais	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 Antibióticos β-lactâmicos	27
3.2 Monobactâmicos	28
3.3 Aztreonam	29
3.3.1 <i>Propriedades químicas</i>	29
3.3.2 <i>Propriedades farmacológicas</i>	31
3.3.3 <i>Mecanismo de ação</i>	31
3.3.4 <i>Espectro de ação e uso clínico</i>	32
3.4 Métodos de análise do aztreonam	32
3.5 Qualidade de medicamentos	36
3.6 Validação de métodos analíticos	37
3.7 Geração de resíduos e preservação ambiental	40
4. DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS	42
4.1 Descrição geral	43
4.1.1 <i>Substância química de referência (SQR)</i>	43
4.1.2 <i>Amostra da forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável</i>	43
5. ANÁLISE QUALITATIVA	44
5.1 Introdução	45
5.2 Características Organolépticas	45
5.2.1 <i>Material</i>	45
5.2.2 <i>Método</i>	45
5.2.3 <i>Resultados e discussão</i>	45
5.3 Determinação do Peso Médio	46
5.3.1 <i>Material</i>	46
5.3.2 <i>Método</i>	46
5.3.3 <i>Resultados e discussão</i>	48
5.4 Determinação do Ponto de Fusão	48
5.4.1 <i>Material</i>	48
5.4.2 <i>Método</i>	48
5.4.3 <i>Resultados e discussão</i>	49
5.5 Determinação da Umidade	50
5.5.1 <i>Material</i>	50
5.5.2 <i>Método</i>	50
5.5.3 <i>Resultados e discussão</i>	50

5.6 Determinação de Cinzas Sulfatadas	51
5.6.1 <i>Material</i>	52
5.6.2 <i>Método</i>	52
5.6.3 <i>Resultados e discussão</i>	52
5.7 Determinação da Solubilidade	53
5.7.1 <i>Material</i>	53
5.7.2 <i>Método</i>	53
5.7.3 <i>Resultados e discussão</i>	53
5.8 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	54
5.8.1 <i>Material</i>	54
5.8.2 <i>Método</i>	55
5.8.2.1 Desenvolvimento da CCD.....	55
5.8.2.2 Degradação acelerada.....	55
5.8.3 <i>Resultados e discussão</i>	56
5.8.3.1 Desenvolvimento da CCD.....	56
5.8.3.2 Degradação forçada.....	57
5.9 Espectrofotometria na região do Ultravioleta	60
5.9.1 <i>Material</i>	60
5.9.2 <i>Método</i>	60
5.9.3 <i>Resultados e discussão</i>	61
5.10 Espectrofotometria na região do Infravermelho	64
5.10.1 <i>Material</i>	64
5.10.2 <i>Método</i>	64
5.10.3 <i>Resultados e discussão</i>	64
5.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	66
5.11.1 <i>Material</i>	66
5.11.2 <i>Método</i>	66
5.11.3 <i>Resultados e discussão</i>	67
6. ANÁLISE QUANTITATIVA	71
6.1 Espectrofotometria na região do Ultravioleta	72
6.1.1 <i>Material</i>	72
6.1.2 <i>Método</i>	73
6.1.2.1 Preparo da solução de aztreonam SQR.....	73
6.1.2.2 Preparo da solução de aztreonam na amostra.....	73
6.1.2.3 Curva de Ringbom.....	73
6.1.2.4 Obtenção da curva analítica.....	73
6.1.2.5 Cálculo do teor de aztreonam na amostra.....	73
6.1.3 <i>Validação do método</i>	74
6.1.3.1 Linearidade.....	74
6.1.3.2 Especificidade e Seletividade.....	74

6.1.3.3	Precisão.....	74
6.1.3.4	Exatidão.....	75
6.1.3.5	Robustez.....	75
6.1.3.6	Limite de detecção.....	75
6.1.3.7	Limite de quantificação.....	76
6.1.4	<i>Resultados e discussão</i>	76
6.1.4.1	Curva de Ringbom.....	76
6.1.4.2	Obtenção da curva analítica.....	78
6.1.5	<i>Validação do método</i>	80
6.1.5.1	Linearidade.....	80
6.1.5.2	Especificidade e Seletividade.....	81
6.1.5.3	Precisão.....	81
6.1.5.4	Exatidão.....	82
6.1.5.5	Robustez.....	83
6.1.5.6	Limite de detecção e de quantificação.....	83
6.2	<i>Ensaio Microbiológico pelo Método Turbidimétrico</i>	84
6.2.1	<i>Material</i>	84
6.2.2	<i>Método</i>	85
6.2.2.1	Ensaio preliminares para estabelecimentos dos parâmetros analíticos.....	85
6.2.2.2	Preparo do meio de cultura.....	85
6.2.2.3	Preparo do inóculo.....	86
6.2.2.4	Preparo da solução de aztreonam SQR.....	86
6.2.2.5	Preparo da solução de aztreonam na amostra.....	86
6.2.2.6	Ensaio.....	86
6.2.2.7	Obtenção da curva analítica.....	87
6.2.2.8	Cálculo da potência de aztreonam na amostra.....	87
6.2.3	<i>Validação do método</i>	87
6.2.3.1	Linearidade.....	87
6.2.3.2	Especificidade e Seletividade.....	87
6.2.3.3	Precisão.....	88
6.2.3.4	Exatidão.....	88
6.2.3.5	Robustez.....	89
6.2.4	<i>Resultados e discussão</i>	89
6.2.4.1	Ensaio preliminares.....	89
6.2.4.2	Obtenção da curva analítica.....	90
6.2.5	<i>Validação do método</i>	92
6.2.5.1	Linearidade.....	92
6.2.5.2	Especificidade e Seletividade.....	93
6.2.5.3	Precisão.....	94
6.2.5.4	Exatidão.....	95

6.2.5.5 Robustez.....	95
6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	96
6.3.1 <i>Material</i>	97
6.3.2 <i>Método</i>	98
6.3.2.1 Condições analíticas.....	98
6.3.2.2 Preparo da fase móvel.....	98
6.3.2.3 Preparo da solução de aztreonam SQR.....	98
6.3.2.4 Preparo da solução de aztreonam na amostra.....	99
6.3.2.5 Obtenção da curva analítica.....	99
6.3.5.6 Cálculo do teor de aztreonam na amostra.....	99
6.3.3 <i>Validação do método</i>	99
6.3.3.1 Linearidade.....	99
6.3.3.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	99
6.3.3.3 Especificidade, Seletividade e estudos de degradação.....	101
6.3.3.4 Precisão.....	101
6.3.3.4 Exatidão.....	102
6.3.3.5 Robustez.....	102
6.3.3.6 Limite de detecção e de quantificação.....	102
6.3.4 <i>Resultados e discussão</i>	102
6.3.4.1 Obtenção da curva analítica.....	102
6.3.5 <i>Validação do método</i>	104
6.3.5.1 Linearidade.....	104
6.3.5.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	105
6.3.5.3 Especificidade, Seletividade e estudos de degradação.....	106
6.3.5.4 Precisão.....	109
6.3.5.5 Exatidão.....	110
6.3.5.6 Robustez.....	110
6.3.5.7 Limite de detecção e de quantificação.....	111
6.4 Espectrofotometria na região do Infravermelho.....	112
6.4.1 <i>Material</i>	113
6.4.2 <i>Método</i>	113
6.4.2.1 Preparo das pastilhas de aztreonam SQR.....	113
6.4.2.2 Preparo das pastilhas de aztreonam na amostra.....	113
6.4.2.3 Obtenção da curva analítica.....	114
6.4.2.4 Cálculo do teor de aztreonam na amostra.....	114
6.4.3 <i>Validação do método</i>	114
6.4.3.1 Linearidade.....	114
6.4.3.2 Especificidade e Seletividade.....	114
6.4.3.3 Precisão.....	114
6.4.3.4 Exatidão.....	115

6.4.3.5 Robustez.....	115
6.4.3.6 Limite de detecção e de quantificação.....	115
6.4.4 <i>Resultados e discussão</i>	115
6.4.4.1 Obtenção da curva analítica.....	116
6.4.5 <i>Validação do método</i>	117
6.4.5.1 Linearidade.....	117
6.4.5.2 Especificidade e Seletividade.....	118
6.4.5.3 Precisão.....	118
6.4.5.4 Exatidão.....	119
6.4.5.5 Robustez.....	119
6.4.5.6 Limite de detecção e de quantificação.....	120
7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS	121
8. DISCUSSÃO GERAL	125
9. CONCLUSÃO	128
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Estruturas químicas das moléculas azetidionona (A) e tiazolidina (B).....	27
Figura 3.2 Estruturas químicas básicas principais dos antimicrobianos β -lactâmicos.....	28
Figura 3.3 Estrutura química do aztreonam.....	30
Figura 3.4 Formas tautoméricas do aztreonam.....	30
Figura 5.1 Pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.....	45
Figura 5.2 Embalagem do Uni Aztrenam.....	46
Figura 5.3 Variação do peso médio de aztreonam injetável.....	48
Figura 5.4 Pó liofilizado para solução injetável de aztreonam antes e após a fusão.....	49
Figura 5.5 Cromatograma de solução de aztreonam SQR (P), amostra (A) e excipiente (E). Fase estacionária: sílica gel F_{254} . Fase móvel: metanol com pH 4,0 ajustado com ácido acético.....	56
Figura 5.6 Cromatogramas obtidos por CCD para as soluções da amostra de aztreonam degradadas nas condições ácida, básica, neutra, fotolítica e oxidativa nos tempos de 1, 6, 24, 48, 72 e 168 horas.....	58
Figura 5.7 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, utilizando metanol como solvente.....	61
Figura 5.8 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.....	62
Figura 5.9 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.....	62
Figura 5.10 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, utilizando tampão fosfato pH 8,0 como solvente.....	62
Figura 5.11 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, utilizando tampão fosfato pH 6,0 como solvente.....	63
Figura 5.12 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, utilizando água purificada como solvente.....	63
Figura 5.13 Espectro de absorção na região do infravermelho de aztreonam SQR (verde), amostra (preto) e excipiente (azul).....	65
Figura 5.14 Cromatograma obtido por CLAE para solução de aztreonam SQR (preto), amostra (azul) e excipiente (verde).....	69
Figura 6.1 Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofométrico na região do UV para aztreonam.....	78

Figura 6.2 Curva analítica da solução de aztreonam SQR pelo método espectrofométrico na região do UV a 292 nm, utilizando água purificada como solvente...	80
Figura 6.3 Espectro de absorção por espectrofotometria na região do ultravioleta, de solução de SQR (vermelho), amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e excipiente (azul), utilizando água purificada como solvente.....	81
Figura 6.4 Representação gráfica da curva analítica da solução de aztreonam SQR e amostra, em concentração de 5,0; 40,0 e 320,0 µg/mL, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	92
Figura 6.5 Representação de um equipamento de CLAE.....	99
Figura 6.6 Curva analítica da solução de aztreonam SQR pelo método cromatográfico, utilizando como fase móvel água:etanol (70:30 v/v) com pH 2,6 ajustado com ácido acético a 292 nm.....	104
Figura 6.7 Cromatograma obtido por CLAE para solução de aztreonam substância química de referência (preto), amostra (azul) e excipiente (verde).....	106
Figura 6.8 Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) após 48 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax® 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero e azul: tempo 48 horas.....	107
Figura 6.9 Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio básico (NaOH 0,01 M) após 48 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax® 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero e azul: tempo 168 horas.....	107
Figura 6.10 Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio neutro (fase móvel) após 48 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax® 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero e azul: tempo 168 horas.....	108
Figura 6.11 Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio oxidativo (peróxido de hidrogênio 3%) após 48 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax® 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero e azul: tempo 1 hora.....	108
Figura 6.12 Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação fotolítica (luz UVC 254 nm) após 48 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax® 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero, azul: tempo 168 horas.....	109
Figura 6.13 Espectro eletromagnético.....	112
Figura 6.14 Curva analítica da solução de aztreonam SQR pelo método de espectrofotometria no infravermelho.....	117
Figura 6.15 Espectro de absorção na região de infravermelho de aztreonam substância química de referência (verde), amostra (preto) e excipiente (azul).....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Métodos cromatográficos descritos na literatura para análise de aztreonam	34
Tabela 3.2 Métodos descritos na literatura para análise de aztreonam.....	35
Tabela 3.3 Parâmetros necessários para a validação.....	39
Tabela 5.1 Variação de peso de pós segundo a FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010).	46
Tabela 5.2 Peso médio de vinte unidades de frasco-ampola de aztreonam.....	47
Tabela 5.3 Valores do ponto de fusão obtidos para a SQR e amostra.....	49
Tabela 5.4 Teor de umidade do pó liofilizado para solução injetável de aztreonam determinado em analisador de umidade por infravermelho.....	51
Tabela 5.5 Teor de umidade do pó liofilizado para solução injetável de aztreonam determinado por análise gravimétrica.....	51
Tabela 5.6 Teor de cinzas sulfatadas do pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.....	52
Tabela 5.7 Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade.....	53
Tabela 5.8 Solubilidade do aztreonam em diferentes solventes a 25°C.....	54
Tabela 5.9 Análise por CCD da degradação acelerada de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.....	59
Tabela 5.10 Comprimento de onda e absorção de aztreonam na concentração de 40 µg/mL em diferentes solventes.....	61
Tabela 5.11 Bandas do espectro na região do infravermelho com as respectivas deformações.....	65
Tabela 5.12 Parâmetros cromatográficos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento do método por CLAE.....	67
Tabela 5.13 Resultados obtidos durante o desenvolvimento do método por CLAE para análise quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.....	68
Tabela 5.14 Parâmetros estabelecidos para a determinação de aztreonam pelo método de CLAE.....	69
Tabela 6.1 Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	75
Tabela 6.2 Valores obtidos na determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico na região do UV para aztreonam, utilizando água purificada como solvente a 292 nm.....	77
Tabela 6.3 Valores de absorvância determinados para a curva analítica de aztreonam SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água purificada como solvente a 292 nm	79
Tabela 6.4 Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	80
Tabela 6.5 Determinação do teor interdias e entre-analistas por espectrofotometria na	

região do UV.....	82
Tabela 6.6 Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	82
Tabela 6.7 Valores dos DRP% obtidos na avaliação da robustez do ensaio do método espectrofotométrico na região do UV.....	83
Tabela 6.8 Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	85
Tabela 6.9 Preparo das soluções para o teste de recuperação do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	89
Tabela 6.10 Parâmetros estabelecidos para a determinação do aztreonam em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico.....	89
Tabela 6.11 Valores de absorvância determinados para a curva analítica de aztreonam SQR pelo ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	91
Tabela 6.12 Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR e amostra, utilizando o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico	93
Tabela 6.13 Resultados da potência após a degradação de aztreonam na concentração de 40 µg/mL, obtidas do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	94
Tabela 6.14 Valores determinados de potência de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável na avaliação da precisão do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	94
Tabela 6.15 Valores do teste de recuperação do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	95
Tabela 6.16 Valores dos DPR% obtidos na avaliação da robustez do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	96
Tabela 6.17 Condições cromatográficas para a determinação de aztreonam pelo método de CLAE.....	98
Tabela 6.18 Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico.....	102
Tabela 6.19 Valores das áreas referentes ao pico de aztreonam SQR para a construção da curva analítica, utilizando como fase móvel água:etanol (70:30 v/v) com pH 2,6 ajustado com ácido acético a 292 nm.....	103
Tabela 6.20 Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR, utilizando o método por CLAE.....	104
Tabela 6.21 Análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de aztreonam pelo método por CLAE.....	105
Tabela 6.22 Resultados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável para avaliação da seletividade do método por CLAE.....	106

Tabela 6.23 Determinação do teor de aztreonam interdias e entre-analistas por CLAE.	110
Tabela 6.24 Determinação da exatidão do método analítico para análise de aztreonam por CLAE	110
Tabela 6.25 Valores dos DPR% obtidos na avaliação da robustez do método analítico para análise de aztreonam por CLAE.....	111
Tabela 6.26 Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método por espectrofotometria no infravermelho.....	115
Tabela 6.27 Valores de absorvância determinados para a construção da curva analítica de aztreonam SQR pelo método de espectrofotometria no infravermelho.....	116
Tabela 6.28 Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR, utilizando o método de espectrofotometria no infravermelho.....	117
Tabela 6.29 Determinação do teor interdias e entre-analistas por espectrofotometria no infravermelho.....	119
Tabela 6.30 Valores do teste de recuperação do método por espectrofotometria no infravermelho.....	119
Tabela 6.31 Valores dos DPR% obtidos na avaliação da robustez do método por espectrofotometria no infravermelho.....	120
Tabela 7.1 Avaliação comparativa da determinação do teor de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável utilizando os métodos propostos.....	122
Tabela 7.2 Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável pelos métodos propostos.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
A _s	Fator de assimetria
ASTM	<i>American Society for Testing and Material</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCMAS	<i>Codex Commitee on Cooperation for Accreditation</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCB	Denominação Comum Brasileira
DPR	Desvio Padrão Relativo
EA	<i>Cooperation for Accreditation</i>
ECN	<i>European Commitee for Normalization</i>
E.U.A.	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
FC	Fatores de cauda
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	Graus de Liberdade
GMPs	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HCl	Ácido clorídrico
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ILAC	<i>International Laboratory Accreditation Cooperation</i>
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure Applied Chemistry</i>
JIT	<i>Just in Time</i>
K	Fator de capacidade
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MIR	<i>Medium infrared</i>
MPR	<i>Material Requirements Planning</i>
N	Número de pratos
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPT	<i>Optimized Production Technology</i>
PBPs	Proteína de ligação à penicilina
PDCA	<i>Plan, Do, Check, Act</i>

QM	Quadrados médios
R	Coefficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R _f	Fator de retenção
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância Química de Referência
TFA	Ácido trifluoroacético
t _R	Tempo de retenção
t ₀	Tempo de retenção do composto não retido
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

1. INTRODUÇÃO

A qualidade e a eficácia dos medicamentos são, cada vez mais, motivo de preocupação e de milhares de pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Nas últimas décadas, após inúmeros episódios desastrosos envolvendo o uso de medicamentos e com a consciência dos riscos inerentes ao seu uso, a segurança destes produtos passou a ser questionada com maior rigor. Por tais razões, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados (LA ROCA et al., 2007), pois sem a garantia de que os medicamentos que a população irá receber atendam aos padrões de qualidade, segurança e eficácia necessários, qualquer serviço de saúde é evidentemente afetado (WHO, 2007). Assim, para se alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessário a implantação de um sistema de garantia da qualidade que incorpore as Boas Práticas de Fabricação, que são constituídas por um conjunto de ações, as quais têm o propósito de manter o controle técnico dos procedimentos envolvidos na produção. Em geral, essas ações se referem à definição sistemática e clara dos processos utilizados na produção, às facilidades necessárias, tais como espaço físico, equipamento apropriado, armazenamento, distribuição, pessoal qualificado e ao controle de qualidade (WHO, 2003).

Com a finalidade de garantir a qualidade de um processo e do produto final, deve-se realizar um conjunto de ensaios qualitativos e quantitativos, que assegurem a qualidade de todos os seus componentes, princípios ativos, embalagens, condições de armazenamento, produção e todo produto acabado (TAVARES, 2010). É fundamental que os laboratórios disponham de critérios para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2007). Para tanto, é extremamente necessário que se faça a validação dos métodos analíticos, ou seja, demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, comprovando a sua eficácia, segurança e confiabilidade perante os resultados esperados (BRASIL, 2003). Além disso, deve-se preocupar com os impactos que as atividades das indústrias podem causar sobre o meio ambiente. Para isso, existem algumas medidas que podem ser tomadas, entre elas, a substituição das técnicas analíticas que empreguem solventes orgânicos por outras que não os utilizem ou que minimizem seu uso (NOLASCO, TAVARES, BENDASSOLLI, 2006).

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Uma forte infraestrutura internacional de medições está sendo implementada e, verifica-se a necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes, para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Para atingir este processo de reconhecimento mútuo ao nível internacional, em que uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais, de certificação e de credenciamento devem ser observados. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e da documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (BARROS, 2002).

O aztreonam foi o primeiro antibiótico a partir da família monobactâmica a ser terapêuticamente aprovado. Foi descoberto em 1978, a partir de uma cepa de *Chromobacterium violaceum* em Nova Jersey (E.U.A.). Foi introduzido em 1987, na forma de injeções nos E.U.A. e é utilizado na maioria dos países no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas (FLOREY, 1988). É ativo contra inúmeras enterobactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., além de atuar contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (AXELROD et al., 1994; LOEB, 1993; PAPICH, 1995). Representa um importante grupo de antibióticos na medicina atual e têm recebido muita atenção clínica em virtude de sua eficácia no tratamento de diversas doenças, tais como infecções do trato urinário, infecções de pele, infecções intra-abdominais e infecções respiratórias (GIAMARELLOU et al., 1984; USP 36, 2013).

Apesar de ser altamente estudado e pesquisado no que concerne à atividade antimicrobiana, farmacocinética e farmacodinâmica, quanto à determinação de aztreonam, há poucas metodologias de análise padronizadas em compêndios oficiais e em periódicos de circulação internacional. Pesquisas envolvendo métodos analíticos, são de fundamental importância e altamente relevantes para otimizar sua análise na indústria e garantir a qualidade do produto já comercializado.

O desenvolvimento de novos métodos de análise ou mesmo a modificação de métodos existentes se faz necessário sempre que se perceba o uso desnecessário de materiais e solventes, desgaste de equipamento e geração excessiva de resíduos. Portanto, desenvolver e validar metodologias analíticas não nocivas ao meio ambiente para a determinação de aztreonam na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável é importante para garantir a sua segurança, qualidade e eficácia terapêutica, representando, desta forma, uma contribuição significativa para a comercialização de medicamentos confiáveis contendo este fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos gerais o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar análises qualitativas da amostra de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável através da avaliação das características organolépticas, peso médio, ponto de fusão, umidade, cinzas sulfatadas, solubilidade, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta, espectrofotometria na região do infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência.
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada para identificação e indicação de estabilidade de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.
- Desenvolver e validar metodologia de análise por espectrofotometria na região do ultravioleta para determinação quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.
- Desenvolver e validar metodologia de análise microbiológica pelo método turbidimétrico para determinação de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.
- Desenvolver e validar metodologia de análise por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável, avaliando a estabilidade frente à degradação ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica.
- Desenvolver e validar metodologia de análise por espectrofotometria na região do infravermelho para determinação quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.
- Comparar estatisticamente os métodos propostos.

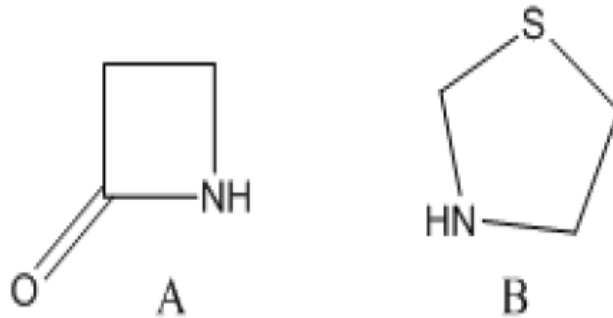
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos, há mais de 50 anos, vêm mostrando sua eficiência terapêutica e baixa toxicidade (KATZUNG, 2007). Em conjunto, constituem a mais ampla família de agentes antimicrobianos sendo amplamente usados na prática clínica (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

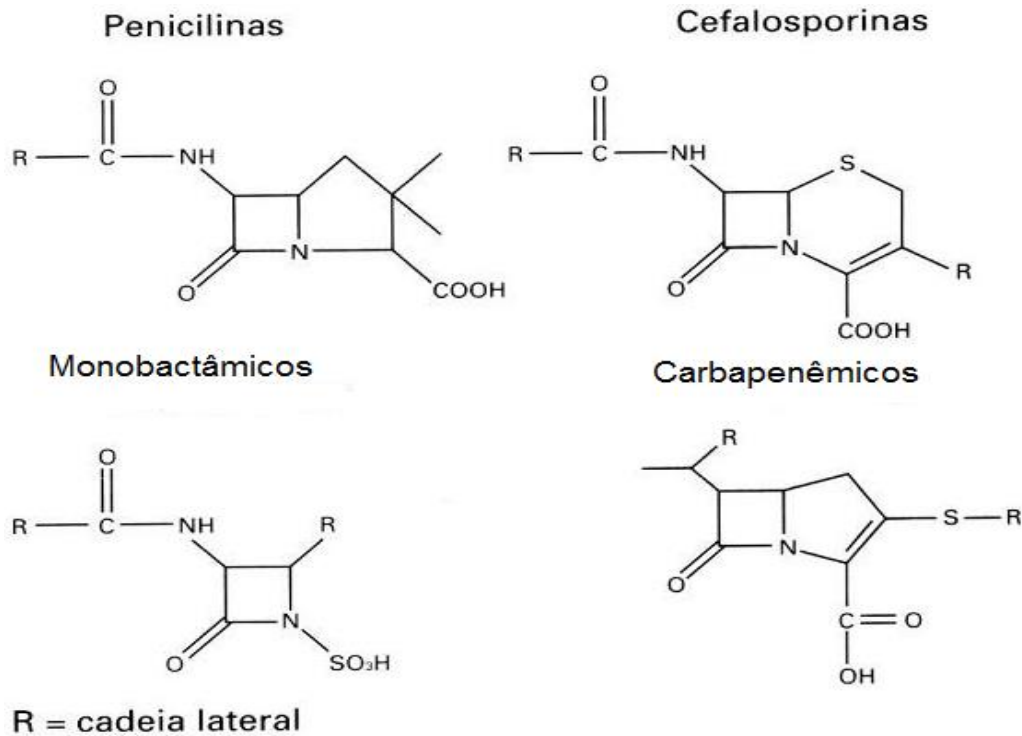
Estruturalmente, os β -lactâmicos são compostos derivados de azetidina-2-onas, que são anéis heterocíclicos de quatro lados com o nitrogênio como heteroátomo e um grupo carbonilo. Estes anéis, azetidina-2-onas, encontram-se geralmente condensados com um anel de tiazolidina (Figura 3.1), que são também anéis heterocíclicos que possuem além do azoto um átomo de enxofre como heteroátomo (NOGRADY e WEAVER, 2005; AMADOR, 2010).

Figura 3.1. Estruturas químicas das moléculas azetidina (A) e tiazolidina (B).



Fonte: AMADOR, 2010.

As principais classes de β -lactâmicos, atualmente disponíveis, podem apresentar quatro estruturas diferentes de anéis (Figura 3.2), tais como as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, permitindo, conseqüentemente, classificar este tipo de antibiótico quanto à sua estrutura (SOUSA, 2006; AMADOR, 2010). Ainda existe o grupo de inibidores das β -lactamases, que também possuem estrutura β -lactâmica (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

Figura 3.2. Estruturas químicas básicas principais dos antimicrobianos β -lactâmicos.

Fonte: WILLIAMS, 1999.

Ao longo dos últimos 60 anos, antibióticos β -lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas foram os mais amplamente utilizados, o que representa cerca de 60% de todos os antibióticos utilizados na medicina humana (MULVEY e SIMOR, 2009). No entanto, os relatos de reações adversas à penicilina e cefalosporinas são relativamente comuns (FRUMIN e GALLAGHER, 2009). Com a necessidade de se ampliar o espectro dos antimicrobianos em decorrência do aparecimento de cepas multirresistentes, na década de 1980 foram desenvolvidos os antibióticos carbapenêmicos e os monobactâmicos (ARIAS et al., 1998; RANG et al., 2007).

3.2 Monobactâmico

O termo monobactâmico foi dado por SYKES e colaboradores (1981a), para descrever um grupo de antibióticos monocíclicos pertencentes à classe dos β -lactâmicos, que foram isolados a partir de bactérias como *Chromobacterium*, *Agrobacterium* e *Flexibacter* (SYKES et al., 1981a; WELLS et al., 1982; SINGH et al., 1983; NEU, 1986). São caracterizados pela presença de um grupo $-\text{SO}_3$ ligado ao nitrogênio, podendo sofrer substituição da cadeia lateral, e conseqüentemente apresenta atividade contra uma variedade de micro-organismos (NEU, 1986; CASCIO et al., 1994).

Dentre os antibióticos monobactâmicos, o mais utilizado é o aztreonam, embora outros como tigemonam e o caromonam foram introduzidos no mercado com atividade principalmente contra bactérias Gram-negativas (ALVIN e NORD, 1995; ARIAS et al., 1998).

3.3 Aztreonam

O aztreonam é o primeiro antibiótico da família monobactâmica terapeuticamente aprovado. Foi descoberto em 1978, a partir de uma cepa de *Chromobacterium violaceum* em Nova Jersey (E.U.A). Foi introduzido em 1987, na forma de injeções nos E.U.A. e é utilizado na maioria dos países no tratamento de infecções contra bactérias Gram-negativas (FLOREY, 1988; LACY et al., 2011; ZOBELL et al., 2012; USP 36, 2013). Atualmente, foi introduzido na forma de inalação para pacientes com problemas respiratórios (ZEITLER et al., 2012). A formulação por via parenteral contém arginina para estabilizar o pH, enquanto a formulação por via aérea contém lisina, pois a arginina provocava a produção de óxido nítrico no pulmão e nos tecidos, causando inflamação das vias aéreas (PLOSKER, 2010; ZEITLER et al., 2012). É um antibiótico sintético monocíclico com atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas (GEORGOPAPADAKOU, SMITH, SYKES, 1982; TUNKEL e SCHELD, 1990; VINKS et al., 1996; BREWER e HELLINGER, 1991; GIBSON, RETSCH-BOGART, OERMANN, 2006; PLOSKER, 2010). São ativos contra inúmeras enterobactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., além de atuar contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (AXELROD et al., 1994; LOEB, 1993; PAPICH, 1995). Entretanto, não apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e patógenos anaeróbicos (SYKES, KOSTER, BONNER, 1988; KAPOOR e GATHWALA, 2004).

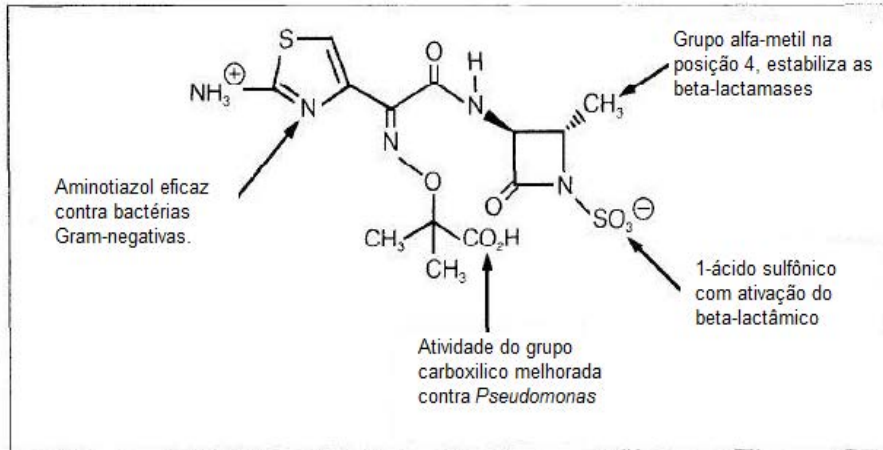
3.3.1 Propriedades químicas

O aztreonam é quimicamente denominado ácido propanoico, 2-[[[1-(2-amino-4-tiazolil)-2-[(2-metil-4-oxo-1-sulfo-3-azetidil)amino]-2-oxoetilideno]amino]oxi]-2-metil-[2S-[2 α ,3 β (Z)]]]. Possui registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS) número 78110-38-0 e Denominação Comum Brasileira (DCB) 01003. Apresenta-se como pó branco ou quase branco, com fórmula molecular C₁₃H₁₇N₅O₈S₂, peso molecular 435,43 g/mol e pH entre 4,5 e 7,5 (MARTINDALE, 1996; SRINIVAS et al., 1997; USP 36, 2013).

O aztreonam contém um grupamento de 1-ácido sulfônico, anexado ao nitrogênio do anel, sendo responsável em ativar o anel β -lactâmico, que posteriormente sofre uma reação com transpeptidases. O grupo carboxílico aumenta a atividade antimicrobiana e proporciona a estabilidade contra *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o aztreonam contém uma cadeia lateral 2-aminotiazol que contribui para a excelente atividade do agente contra bactérias Gram-negativas. Finalmente, a introdução do grupo alfa-metil na posição 4, estabiliza o aztreonam

contra hidrólise por enzimas β -lactamases, como mostra a Figura 3.3 (BONER e SYKES, 1984; NEU, 1990; ZEITLER et al., 2012).

Figura 3.3. Estrutura química do aztreonam.

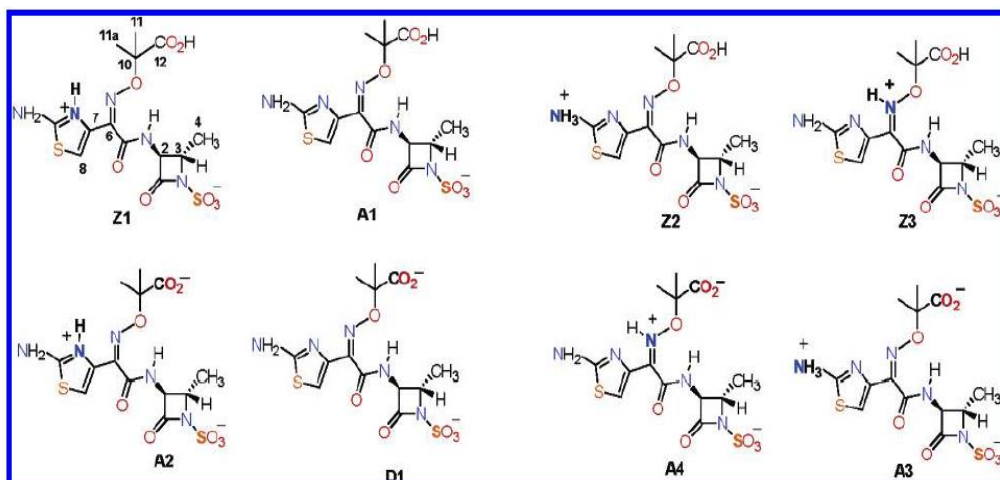


Fonte: NEU, 1990.

O pKa é um dos principais fatores físico-químicos que afeta a molécula do fármaco (LIVINGSTONE, 2003). O aztreonam apresenta o maior valor de pKa 4,34 ao átomo de N-tiazol seguido pelo valor de pKa para o grupo carboxila 2,70 (SYKES, KOSTER, BONNER, 1988; FLOREY, 1988).

A Figura 3.4 mostra algumas formas tautoméricas do aztreonam diferindo em seu estado de protonação do anel tiazol, o grupo carboxila e o grupo amino, que estão todos localizados na 4-acilamino cadeia lateral ligado ao núcleo. O produto químico corresponde às formas zwitteriônicas (Z1, Z2, Z3), aniônicas (A1-A4), ou dianiônicas (D1). A estrutura e as propriedades físicas foram atribuídas a quatro diferentes estados de protonação (Z1, Z2, A1, D1) (YOSHIMURA e NIKAIDO, 1985; SATAKE e NAKAE, 1990; DÍAZ, 2006).

Figura 3.4. Formas tautoméricas do aztreonam.



Fonte: DÍAZ et al., 2006.

3.3.2 Propriedades farmacológicas

O aztreonam não é absorvido pelo trato gastrointestinal e, portanto, só pode ser utilizado por via parenteral (SWABB, SUGERMAN, STERN, 1983). Após administração intramuscular, o pico de concentração sérica é alcançado dentro de uma hora (SWABB, 1985). Apresenta biodisponibilidade de quase 100%. A meia-vida é de 1-6 horas em adultos saudáveis e o volume de distribuição no estado estacionário é de 0,21L/kg (SWABB, SUGERMAN, MCKINSTRY, 1983; MARTINDALE, 1996; USP 36, 2013). A ligação às proteínas (albumina) em adultos é em média de 56% (NEU, 1990; MARTINDALE, 1996; USP 36, 2013). Aztreonam é distribuído para quase todos os tecidos e fluidos corporais, incluindo vesícula biliar, ossos, próstata, coração e músculos (SWABB, 1985; MARTINDALE, 1996; USP 36, 2013). A concentração de aztreonam que penetra no líquido cefalorraquidiano é quatro vezes maior quando as meninges estão inflamadas. O principal método de eliminação é através dos rins pela urina (DUMA et al., 1984; MARTINDALE 1996; USP 36, 2013).

Os efeitos adversos são semelhantes aos de outros antibióticos β -lactâmicos. Em geral, as reações adversas foram relatadas em menos de 7% dos pacientes e apenas 2% dos pacientes tiveram que interromper o tratamento (STILLE e GOLLISSEN, 1985; HENRY e BENDUSH, 1985). Devido à sua baixa imunogenicidade não apresenta casos de alergia cruzada com penicilinas ou cefalosporinas. Pode produzir, raramente, um ligeiro aumento da aminotransferase e da fosfatase alcalina e prolongar os tempos de coagulação. Erupção cutânea, com e sem eosinofilia, tem sido relatada em cerca de 1% dos pacientes (LIVERMORE e WILLIAMS, 1981; MIHINDU et al., 1983; MARTINDALE, 1996; DEGANI, CASS, VIEIRA, 2006; USP 36, 2013). Além disso, pode provocar flebite, diarreia, náuseas e vômitos (MARTINDALE, 1996; ZOBELL et al., 2012; USP 36, 2013). Apresenta uma baixa incidência de nefrotoxicidade (STUTMAN et al., 1986; CUZZOLIN et al., 1991; TAKEUCHI, TANIZAWA, MAYUMI, 2003).

3.3.3 Mecanismo de ação

O aztreonam apresenta um mecanismo de ação semelhante ao das penicilinas e cefalosporinas, inibindo a síntese da parede celular bacteriana em bactérias Gram-negativas através da ligação às proteínas, provocando a lise celular (GEORPOPAPADOKOU, SMITH, SYKES, 1982; PLOSKER, 2010). Este antibiótico apresenta elevada afinidade à proteína de ligação à penicilina (PBPs), encontrada em bactérias Gram-negativas. Porém, ele não se liga a proteínas encontradas em bactérias Gram-positivas ou anaeróbicas, representando o seu estreito espectro de ação (SYKES et al., 1981b; NEU e LABTHAVIKUL, 1990; NEU, 1990; BREWER e HELLINGER, 1991; PLOSKER, 2010, ZEITLER et al., 2012). O aztreonam não é hidrolisado pelas enzimas β -lactamases (MARTINDALE, 1996; CASTANHEIRA et al., 2004; SADER, et al., 2005; SANTORO et al., 2012). A combinação com outros antibióticos é fundamental para alargar o espectro e aumentar a potência terapêutica através de interações

sinérgicas (SYKES et al., 1981b; NEU e LABTHAVIKUL, 1990; NEU, 1990; BREWER, HELLINGER, 1991; PLOSKER, 2010).

3.3.4 Espectro de ação e uso clínico

O aztreonam é usado para tratar infecções do trato urinário, septicemia, meningite, infecções de pele, como feridas, úlceras e queimaduras, infecções intra-abdominais, tais como peritonite, endometrite e celulite pélvica causada por bactérias Gram-negativas (GIAMARELLOU et al., 1984) e infecções moderadas a graves das vias aéreas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (EMERSON et al., 2002; PETER et al., 2013). Em pacientes com infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, o aztreonam pode ser usado em combinação com outros antibióticos para proporcionar uma atividade contra todos os organismos sensíveis a este fármaco (GIAMARELLOU et al., 1984). Além disso, é eficaz contra infecções respiratórias, como fibrose cística e pode ser usado no tratamento de sepsia neonatal (STUTMAN et al., 1986; CUZZOLIN et al., 1991; TAKEUCHI, TANIZAWA, MAYUMI, 2003; PAXSON e PARADIS, 2010; WAINWRIGHT et al., 2011).

3.4 Métodos de análise do aztreonam

A farmacopeia americana (USP 36, 2013) descreve a quantificação de aztreonam em forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase móvel metanol e tampão fosfato monobásico de potássio (1:4), com pH 3,0 e comprimento de onda de 254 nm. Outras farmacopeias como a portuguesa (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005), brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), britânica (BP, 2010), europeia (EP, 2011) e japonesa (JP, 2011) não descrevem métodos analíticos para quantificação de aztreonam.

Na literatura há alguns métodos descritos para a determinação do aztreonam em matéria-prima ou em material biológico, utilizando CLAE (PILKIEWICK et al., 1983; SATTler, SCHRAMN, SWABB, 1985; FABRE, IBORK, LERNERS, 1992; RANADIVE et al., 1995; VINKS et al., 1996; SRINIVAS et al., 1997; ZAJAC et al., 2005). São também descritos métodos para detecção de produtos de degradação, com aplicação de complexo de inclusão de ciclodextrinas e glucose (LOFTSSON e ÓLAFSDÓTTIR, 1991), estudos de dissolução (DESAI et al., 1994), espectrofotometria na região do UV/Visível (FABRE, IBORK e LERNERS, 1992; MARTÍN, PÉREZ, LÓPES, 1992; MAHGOUB, 2002), colorimetria e absorção atômica (AMIN e ALY, 2000), estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (SWABB, 1985; BURGESS, PHARMD, KIMBERLY, 1999; SMITH et al., 2001; WONG et al., 2009; PAXSON e PARADIS, 2010), estudos de espectrometria de massas (UNGER, 1985), estudos de protonação (DÍAZ et al., 2006), testes de hipersensibilidade (KOCH et al., 1991; VEGA et al., 1991; PIMJENTO et al., 1998; PATRIARCA et al., 2008), análise microbiológica (PIELKIEWIC et al., 1983; EVANS et al., 1986; PARRY, 1990; RETSCH-BOGART et al., 2008; RETSCH-BOGART et al., 2009;

OERMANN et al., 2010; WAINWRIGHT et al., 2010; WAINWRIGHT et al., 2011; FRIEDLAND, et al., 2012; SANTORO, ROMÃO, CLEMENTINO, 2012). O aztreonam possui alguns compostos relacionados, provenientes provavelmente do processo de síntese (CIMARUSTI et al., 1983; BANFI et al., 1994).

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico e a espectroscopia na região do infravermelho para determinação de aztreonam não foram encontrados em nenhum compêndio oficial e na literatura internacional pesquisados. Existem diversos trabalhos descritos na literatura para análise de aztreonam como pode ser observado nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente, para métodos cromatográficos e outros métodos analíticos.

Tabela 3.1. Métodos cromatográficos descritos na literatura para análise de aztreonam.

Método	Comprimento de onda (nm)	Fase móvel	Fase estacionária	Amostra	Referência
CLAE-FR	293	Sulfato de hidrogênio tetrabutílamônio (pH 3,0) e acetonitrila (80:20)	Bondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm)	Soro e Urina (humano, macaco, rato e coelho)	PILKIEWICK et al., 1983
CLAE-FR	283	Tetrabutílamônio e acetoneitrila (85:15)	Bondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm)	Soro	SATTLER, SCHRAMN, SWABB, 1985
CLAE-FR	254	Tampão fosfato 0,05 M (pH 3,0) e metanol (80:20)	Lichrocart ^K (4 x 4 mm) embalada com Lichrosorb ^R RP 18 (7 µm)	Fármaco	FABRE, IBOR, LERNERS, 1992
CLAE-FR	254	Sulfato de hidrogênio tetrabutílamônio 0,005 M, pH 3,0 ajustado com fosfato dissódico e metanol (70:30)	Bondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm)	Fármaco	RANADIVE et al., 1995
CLAE-FR	292	Brometo de tetrabutílamônio 0,005 M numa solução de tampão de acetato 0,025 M e acetonitrila (pH 4,8) (80:20)	Chromosphere C ₁₈ (100 x 1 mm)	Fármaco	VINKS et al., 1996
CLAE-FR	252	Acetonitrila e água contendo 40 mM de fosfato de amônio e 6 mM de sulfato de hidrogênio tetrabutílamônio (pH 4,1 ajustado com 85% de ácido fosfórico) (17:83)	Zorbax R _x -C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	Plasma	SRINIVAS et al., 1997
CLAE-FR	270	Metanol e tampão fosfato pH 3,0 (1:4)	LiChrospher RP ₁₈ (250 x 4 mm)	Fármaco	ZAJAC et al., 2005
CLAE-FR	254	Metanol e tampão fosfato pH 3,0 (1:4)	(300 x 3,9 mm, 10 µm)	Fármaco	USP 36, 2013

CLAE-FR: cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

Tabela 3.2. Métodos descritos na literatura para análise de aztreonam

Método	Comprimento de onda (nm)	Solvente	Amostra	Referência
UV	254	Água destilada, pH 5,0 ajustado com hidróxido de sódio e ácido clorídrico	Fármaco	FABRE, IBORK, LERNERS, 1992
VIS	496	Hidroxilamina	Fármaco	MARTÍN, PÉREZ, LÓPEZ, 1992
UV	317	Ácido cérico	Fármaco	MAHGOUB, 2002
Difusão em Ágar	-	Tampão fosfato pH 6,0	Soro e Urina (humano, macaco, rato e coelho)	PILKIEWICK et al., 1983

UV: espectrofotometria na região do ultravioleta; VIS: espectrofotometria na região do visível.

3.5 Qualidade de medicamentos

Antes da Segunda Guerra Mundial, a ideia de qualidade era simplesmente a ausência de defeitos do produto final. Com a evolução na área industrial e o aprimoramento no setor farmacêutico, começou a exigir as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de medicamentos. Na década de 1960, surgiram sistemas importantes da qualidade dentre eles o PDCA (*Plan, Do, Check, Act*), a estratégia *benchmarking*, a metodologia dos seis sigmas, o *Just in Time* (JIT), o *Material Requirements Planning* (MPR), o *Optimized Production Technology* (OPT), o *brainstorming*, o diagrama de *Ishikawa*, o plano de ação 5W2H, entre outros (RIBEIRO, 2006; REBSAMEN, BOUCHEIX, FAYOL, 2010). Posteriormente, na década de 1970, foi estabelecido, além do controle de qualidade, o controle de processos (TAVARES, 2010). Atualmente, nos laboratórios e indústrias farmacêuticas, o Sistema de Qualidade engloba o Controle de Qualidade, Boas Práticas de Fabricação e o Controle Total da Qualidade, a fim de se idealizar, produzir, manter e assegurar as características em cada unidade do produto através de padrões ou níveis de qualidade (SANTORO, 1988; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

De acordo com a RDC nº17, de abril de 2010, o Controle de Qualidade pode ser definido como o conjunto de ensaios qualitativos e quantitativos realizados com o objetivo de avaliar matérias primas, produtos intermediários, produtos acabados, materiais de embalagem e verificar se apresentam conformidade com as especificações estabelecidas, detectando seus defeitos, desvios e erros (BRASIL, 2010), pois a presença de algum defeito pode causar alterações químicas, farmacológicas e toxicológicas (LA ROCA et al., 2007; CAZEDEY et al., 2011).

A qualidade de um produto pode ser considerada como um conjunto de características e propriedades que o torna satisfatório para o atendimento as necessidades dos consumidores. No caso de medicamentos, as características benéficas são a eficácia terapêutica e segurança, ao lado de características menos essenciais, tais como a beleza do produto e propriedades organolépticas agradáveis (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). Segundo a RDC nº17, a qualidade dos produtos é de responsabilidade do fabricante, que deve assegurar que tais produtos estejam adequados ao uso pretendido, cumpram com os requisitos estabelecidos em seu registro e não coloquem os consumidores em risco por não apresentarem segurança, qualidade ou eficácia adequada (BRASIL, 2010). Em vista disso, a avaliação da qualidade dos medicamentos representa uma etapa indispensável para a sua comercialização em condições adequadas, portanto, o controle de qualidade garante a confiabilidade do produto (PEIXOTO JUNIOR et al., 2005).

O controle de qualidade dentro de uma indústria envolve todos os setores, ou seja, os profissionais, os recursos e instalações visando sempre à qualidade final de seu produto, portanto, para que o controle de qualidade possa ter êxito em suas atividades, todos devem estar em adequabilidade com a sua função (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). Além disso, diante do cenário competitivo do setor brasileiro, destaca-se a adoção e implantação, por parte

da indústria, de Programas de Qualidade. Neste contexto, encontra-se a certificação da série *International Standard Organization (ISO) 9000*. Esta série abrange um conjunto de requisitos para a estruturação de um Sistema de Gestão da Qualidade (XAVIER, 1995).

A qualidade e a eficácia dos medicamentos são, cada vez mais, motivo de preocupação e de milhares de pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Mediante a estas razões, é de grande relevância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados (LA ROCA et al., 2007). Dentre os principais métodos analíticos utilizados destacam-se a espectroscopia de absorção no UV-Visível e infravermelho, fluorimetria, polarimetria, técnicas eletroanalíticas, absorção atômica, cromatografia líquida, cromatografia gasosa e outras técnicas cromatográficas acopladas a diversos sistemas de detecção. Além de todas as técnicas e suas derivações, o constante aprimoramento das técnicas existentes e o desenvolvimento de novas técnicas, facilitam as análises, mas exigem, cada vez mais, a capacitação e o treinamento específico e adequado dos profissionais do setor farmacêutico (GIL, 2007).

3.6 Validação de métodos analíticos

A palavra validação originou-se do latim *validus* que significa forte e sugere que algo deve ser provado que é verdadeiro e útil, sendo assim aceito como padrão (ARAÚJO, 2009). O primeiro registro do uso oficial do termo validação encontra-se no *Good Manufacturing Practices (GMPs)*, o qual foi publicado no *Food and Drug Administration (FDA)* em 1978, porém somente em 1980 recebeu a seguinte definição: “Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado” (MORETTO e SHIB, 2000). Em outras palavras, validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias primas que entram em sua composição (ATHAIDE, 2000; MORETTO e SHIB, 2000; EMANUELLI e SCANDIUZZI, 2000).

A validação dos métodos analíticos demonstra que o método é adequado para a proposta pretendida e é seguro ao ser executado (FDA, 2000; USP 36, 2013; INMETRO, 2011), através de um processo organizado, planejado e sistematicamente executado, o qual inclui o desenvolvimento do método analítico, estudos de pré-validação e, finalmente, a validação propriamente dita (BLIESNER, 2006). Desta maneira, deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Os principais e mais utilizados guias para validação de métodos analíticos de processos, principalmente para a área farmacêutica são: *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *American Society for Testing and Material (ASTM)*, *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS)*, *European Committee for Normalization (ECN)*,

Cooperation for Accreditation (EA), Food and Agricultural Organization (FAO), United States Food and Drug Administration (FDA), International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), Organização Mundial da Saúde (OMS), International Organization for Standardization (ISO), International Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC), United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonization (ICH), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (ARAUJO, 2009). A literatura possui um amplo número de guias para avaliação de desempenho de métodos analíticos, apresentando diferentes terminologias e formas de expressar resultados. Apesar destas variações, todas levam a um mesmo propósito (TAVENIERS, LOOSE, BOCKSTAELE, 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução n° 899, de 29 de maio de 2003, na qual apresenta os ensaios necessários para validação de um método analítico, que são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez e limite de quantificação e de detecção (BRASIL, 2003). A disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco operacional devem também ser considerados (LA ROCA et al., 2007). Além disso, para garantir a qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (RILEY e ROSANSKE, 1997).

Os métodos analíticos possuem suas variações e determinações, principalmente devido às diferentes necessidades de cada caso. Por esses motivos, os parâmetros foram divididos em quatro categorias, necessários para os diferentes propósitos de validação (Tabela 3.3), onde (USP 36, 2013):

Categoria I: Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

Categoria II: Testes limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matéria prima.

Categoria III: Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).

Categoria IV: Testes de identificação.

Tabela 3.3. Parâmetros necessários para a validação

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão: Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Não	Não
Precisão: Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessário a comprovação da precisão intermediária
Fonte: BRASIL, 2003.

A seguir está apresentada a descrição dos principais parâmetros de validação.

Especificidade: é a capacidade de uma metodologia analítica em avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que normalmente podem estar presentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005). A seletividade frequentemente é confundida com o termo especificidade. Para corrigir esta situação, a IUPAC sugere o uso de somente o termo seletividade, mas mesmo assim, órgãos reguladores ainda utilizam o termo especificidade (RIBANI et al., 2004).

Linearidade: trata-se da capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013).

Intervalo: é a faixa compreendida entre os limites de quantificação superior e inferior, para a qual tenham sido demonstrados níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013).

Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). As três formas mais comuns de expressar a precisão são: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 36, 2013).

Limite de detecção: é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições analíticas estabelecidas (BRASIL, 2003; USP 36, 2013).

Limite de quantificação: é a menor concentração de um analito que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão, sob condições experimentais definidas (BRASIL, 2003; TAVENIERS, LOOSE, BOCKSTAELE, 2004; ICH, 2005; USP 36, 2013).

Exatidão: é a medida que representa o grau de concordância entre a determinação de um analito (valor real ou encontrado) e seu padrão (valor verdadeiro) (BRASIL, 2003; TAVENIERS, LOOSE, BOCKSTAELE, 2004; ICH, 2005; USP 36, 2013). A forma de sua medida varia de acordo com o ensaio realizado. Os mais utilizados são: análise de fármacos, análise de formas farmacêuticas e análise de impurezas (BRASIL, 2003; USP 36, 2013).

Robustez: é o ensaio que mede a sensibilidade do método frente a variações das condições de análise definidas. Portanto, o método não pode ser afetado por pequenas e deliberadas modificações em seus parâmetros (USP 36, 2013).

A ICH (2005) estabelece como parte do processo de validação de sistemas cromatográficos o teste de conformidade do sistema. Trata-se de uma etapa essencial, pois assegura que os parâmetros cromatográficos selecionados para a análise estejam aptos a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis (PASCHOAL et al., 2008). Com este propósito, alguns parâmetros devem ser analisados a partir do pico cromatográfico, tais como o tempo de retenção (t_R), número de pratos (N), os fatores de cauda (FC), de assimetria (A_S) e de capacidade (k').

Tempo de retenção (t_R): representa o tempo gasto desde a injeção no sistema cromatográfico até a saída do ponto máximo do pico referente ao analito (PASCHOAL et al., 2008).

Número de pratos (N): é uma medida da eficiência da coluna cromatográfica (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010).

Fator de cauda (FC) e de assimetria (A_S): medem a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de um pico cromatográfico (FDA, 1994).

Fator de capacidade (k'): mede a localização do pico de interesse em relação ao tempo de retenção do composto não-retido (FDA, 1994).

O propósito da avaliação de resultados é extrair informações úteis e tirar conclusões sobre o processo de validação em geral, através da realização de uma compilação de um conjunto de dados com abordagem matemáticas e estatísticas (ARAUJO, 2009). Ferramentas como a análise de variância (ANOVA), o teste *t Student*, entre outros, são muito utilizados para dar fundamento científico-matemático aos resultados obtidos (LA ROCA et al., 2007).

3.7 Geração de resíduos e preservação ambiental

Constata-se que ao longo da história, o homem sempre utilizou os recursos naturais do planeta e gerou resíduos com pouquíssima preocupação, os recursos eram abundantes e a natureza aceitava sem reclamar os despejos realizados, já que o enfoque sempre foi “diluir e dispensar” (MOURA, 2002). Porém, com a industrialização, a destinação dos resíduos que sobram do processo produtivo, sejam eles sólidos, líquidos ou gasosos se tornou um dos problemas mais visíveis, pois o crescente volume desses resíduos quando mal administrados, tem provocado sérios e inúmeros problemas de ordem sanitária e estética, além dos riscos à saúde e ao meio ambiente (MAY, LUSTOSA, VINHA, 2003).

Diante deste contexto atual, em que há grande geração de resíduos industriais, destaca-se a urgente necessidade de alterações nos costumes e na cultura populacional, a fim de promover o desenvolvimento sustentável, de forma que o ecossistema seja agredido o mínimo possível (GONÇALVES, 2006). Assim, a política do desenvolvimento sustentável deve ser fundamentada em dois princípios: desenvolvimento econômico e proteção ambiental, de modo que os impactos desencadeados pela produção de resíduos industriais sejam minimizados (CAETANO, 2009). Por outro lado, a consolidação das leis ambientais e a participação da sociedade aumentam a atuação e o rigor dos órgãos ambientais federal, estadual e municipal, obrigando que as indústrias modifiquem as interações com o meio ambiente ou, então, ampliem seu quadro jurídico para enfrentar possíveis demandas no campo do direito ambiental. Para evitar esse tipo de situação, um expressivo número de indústrias já implantou, ou está implantando, treinamentos e auditorias internas para adequar suas atividades às exigências da norma internacional da série ISO 14.000 (SANSEVERINO, 2000).

A prevenção à poluição refere-se a qualquer prática que vise à redução e/ou eliminação, seja em volume, concentração ou toxicidade, das cargas poluentes na própria fonte geradora. Inclui modificações nos equipamentos, processos ou procedimentos, reformulação ou replanejamento de produtos e substituição de matérias primas e substâncias tóxicas que resultem na melhoria da qualidade ambiental (FIGUEIREDO, SANTOS, FERRARI, 2000; SANSEVERINO, 2000; NOLASCO, TAVARES, BENDASSOLLI, 2006).

A exigente opinião pública e a tendência ao consumo sustentável encontram-se cada vez mais em evidência e isto colabora para que cada dia mais as empresas se preocupem em reduzir os impactos da poluição que produzem, adotando ações ambientais (BORINELLI et al., 2010).

4. DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

4.1. Descrição geral

Nome genérico: Aztreonam

Nome químico: ácido propanoico, 2-[[[1-(2-amino-4-tiazolil)-2-[(2-metil-4-oxo-1-sulfo-3-azetidil)amino]-2-oxoetilideno]amino]oxi]-2-metil-[2S-[2 α ,3 β (Z)]]

Chemical Abstracts Service (CAS): 78110-38-0

Denominação Comum Brasileira (DCB): 01003

Fórmula química: C₁₃H₁₇N₅O₈S

Peso molecular: 435,43 g/mol

pKas: 2,70 e 4,34

pH: entre 4,5 a 7,5

Categoria: antibiótico

Família: monobactâmico

Comercialização no Brasil: O medicamento de referência é Azeus[®], fabricado pela Novafarma. Como medicamento similar são comercializados Azanem[®] (Biochimico), Uni Aztrenam[®] (União Química) e como medicamento genérico Aztreonam (Eurofarma).

Descrição física: Apresenta-se como pó branco ou quase branco, ligeiramente higroscópico, muito solúvel na água. Deve ser conservado em recipiente estéril, considerando que se destina à produção de formas farmacêuticas estéreis, em recipientes hermeticamente fechados.

4.1.1 Substância Química de Referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi o aztreonam, gentilmente cedido pelo Laboratório Farmacêutico União Química (Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil), identificada pelo lote 0900009674, com teor declarado de 99,2%.

4.1.2 Amostra da forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável

As amostras utilizadas neste trabalho foram frascos-ampola de pó liofilizado para solução injetável, na qual contém L-arginina, equivalente a 1,0 g de aztreonam, gentilmente doadas pelo Laboratório Farmacêutico União Química (Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil), sob o nome comercial de Uni Aztrenam[®] e identificado pelo lote de número 0908120. Diluente: Água Estéril para Injeção.

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1. Introdução

A análise criteriosa de um medicamento envolve inúmeras avaliações que incluem desde a análise visual mais subjetiva até o completo estudo de estabilidade. No controle de qualidade das formas farmacêuticas é necessária a realização de testes de identificação do fármaco, além da sua quantificação (CAZEDEY, 2012). Além disso, a qualidade na fabricação de medicamentos está diretamente relacionada com a promoção e manutenção da saúde. Assim, o não cumprimento dos critérios pode interferir nas características biofarmacêuticas, neste sentido, as técnicas de análise são essenciais para a segurança de medicamentos (PEDROSO e SALGADO, 2013a).

5.2. Características Organolépticas

5.2.1 Material

As características organolépticas foram determinadas na amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.

5.2.2. Método

A amostra foi observada quanto ao aspecto morfológico, cor e odor.

5.2.3. Resultados e discussão

A amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam apresentou-se sob a forma de pó fino inodoro de coloração branca, como mostra a Figura 5.1. A descrição é condizente com a preconizada pela literatura e pelo fabricante (USP 36, 2013). A embalagem do Uni Aztreonam[®] está representada na Figura 5.2.

Figura 5.1. Pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.

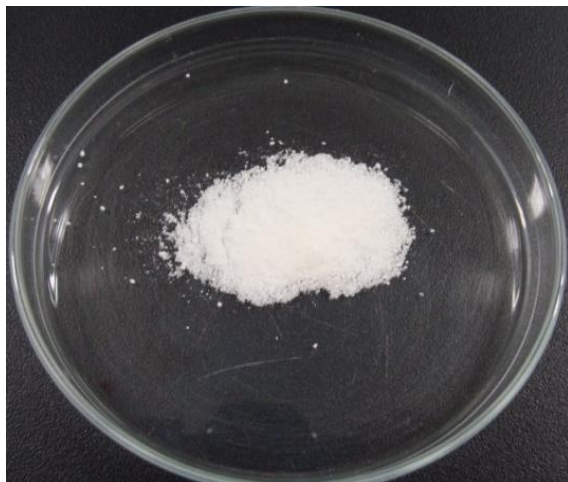


Figura 5.2. Embalagem do Uni Aztreonam.

5.3. Determinação do Peso Médio

A verificação da variação de peso das unidades de determinado lote de um produto farmacêutico é indicativo importante da homogeneidade e, conseqüentemente, da variação do teor da substância ativa (SAKR et al., 1972).

Na Tabela 5.1 são apresentados os limites de variação permitidos na Farmacopeia Brasileira, sendo admitidos não mais que duas unidades em desacordo com o estabelecido, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Tabela 5.1. Variação de peso de pós segundo a FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010).

Formas farmacêuticas em dose unitária	Peso médio	Limites de variação
Pós estéreis, pós liofilizados e pós para injetáveis	Mais que 40 mg ¹	± 10,0 %
Pós para reconstituição (uso oral)	Menos que 300 mg ou mais	± 7,5 %

¹Se o peso médio for de 40 mg ou menos, submeter ao teste de *Uniformidade de doses unitárias*.

5.3.1 Material

Para esta análise foram utilizadas amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

5.3.2 Método

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (2010). Foram pesados, individualmente, 20 unidades. O rótulo do recipiente foi retirado, e então foi aberto e pesado. Após a pesagem, o recipiente foi lavado utilizando água e em seguida etanol.

Os recipientes foram secos a 105°C por uma hora, esfriados em dessecador e submetidos à pesagem.

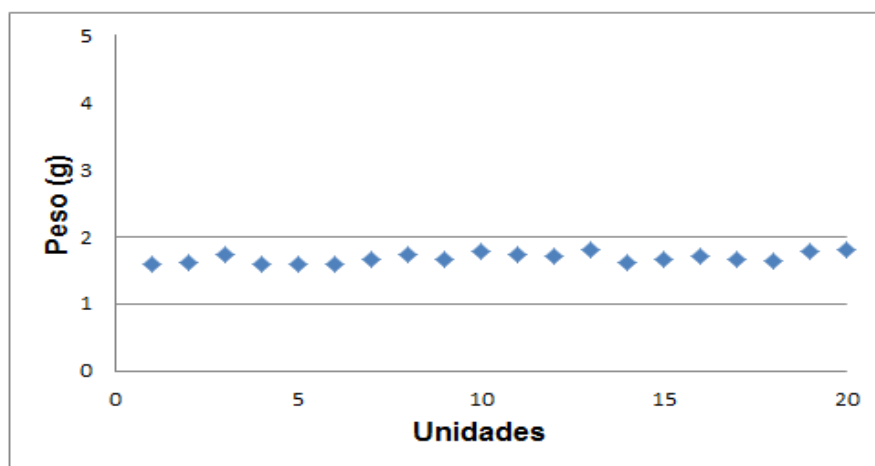
5.3.3 Resultados e discussão

A Tabela 5.2 apresenta o peso individual de 20 unidades com o desvio padrão relativo (DPR %). A Figura 5.3 apresenta o desvio encontrado para as unidades de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.

Tabela 5.2. Peso médio de vinte unidades de frasco-ampola de aztreonam.

Unidades	Recipiente cheio (g)	Recipiente vazio (g)	Diferença de peso (g)	Peso médio (g)	DPR (%)
1	17,7402	16,1370	1,6032		
2	18,0998	16,4803	1,6195		
3	18,1685	16,4396	1,7289		
4	17,9055	16,3039	1,6016		
5	17,8628	16,2739	1,5889		
6	18,0568	16,4567	1,6001		
7	18,0822	16,4248	1,6574		
8	18,0630	16,3197	1,7433		
9	18,0881	16,4199	1,6682		
10	18,0648	16,2918	1,7730	1,6861	4,24
11	18,0241	16,2813	1,7428		
12	18,1958	16,4803	1,7155		
13	18,0789	16,2698	1,8091		
14	17,9010	16,2790	1,6220		
15	18,0549	16,3996	1,6553		
16	18,0678	16,3631	1,7047		
17	18,0216	16,3578	1,6638		
18	17,9214	16,2752	1,6462		
19	18,0988	16,3222	1,7766		
20	18,0996	16,2983	1,8013		

A Figura 5.3 ilustra a variação das vinte unidades de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam.

Figura 5.3. Variação do peso médio de vinte ampolas de aztreonam injetável.

As variações de peso encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010). Neste caso, a variação permitida é $\pm 10,0\%$, entre o peso máximo 1,8547 g e peso mínimo 1,5175 g. O desvio padrão relativo apresentou valor de 4,24%, dentro das especificações.

5.4. Determinação do Ponto de Fusão

O ponto de fusão de uma substância é a temperatura na qual esta se encontra completamente fundida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). É importante tanto para a caracterização de compostos quanto para indicar pureza quando se compara com padrões de referência, pois a presença de impurezas mesmo que em pequenas quantidades pode alterar a faixa de fusão de um composto ou diminuir o seu ponto de fusão (GRAHAM, 1995). A simplicidade, rapidez e baixo custo do equipamento são algumas das vantagens da aplicação da medida do ponto de fusão (GIL et al., 2005).

5.4.1 Material

O ponto de fusão foi determinado na SQR e amostra, utilizando equipamento automático STUART Cientific SMP3. As amostras foram colocadas em tubos capilares de vidro com 1,6 mm de espessura e 75 mm de comprimento que foram introduzidos horizontalmente no equipamento.

5.4.2 Método

A SQR e amostra foram previamente dessecadas e introduzidas em tubos capilares de vidro com uma das extremidades seladas até cerca de 3,0 mm de altura. Colocou-se o tubo capilar no aparelho para determinação do ponto de fusão e iniciou-se o aquecimento a temperatura de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A temperatura na qual a amostra fundiu-se na parede do tubo em qualquer ponto, foi definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra tornou-

se completamente líquida, foi definida como o final da fusão ou o ponto de fusão (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). As determinações foram realizadas em triplicata.

5.4.3 Resultados e discussão

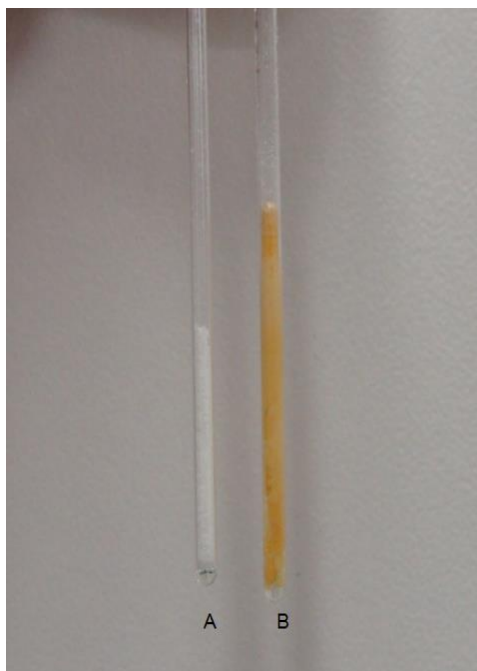
Como pode ser verificado na Tabela 5.3, o pó apresentou ponto de fusão em 200,7°C para SQR e 202,0°C para a amostra, com decomposição, evidenciada pela alteração da cor do composto e formação de bolhas (Figura 5.4). A mudança de cor apresentada pelo pó teve início em 196,0°C (branco-amarelo). O desvio padrão relativo apresentou valor dentro das especificações.

Tabela 5.3. Valores do ponto de fusão obtidos para a SQR e amostra.

	Faixa de fusão (°C)	Média	DPR (%) ¹
Substância de referência	202,2	200,7	0,94
	201,4		
	198,6		
Amostra	200,3	202,0	0,79
	203,4		
	202,3		

¹Desvio Padrão Relativo

Figura 5.4. Pó liofilizado para solução injetável de aztreonam antes (A) e após a fusão (B).



5.5. Determinação da Umidade

O ensaio de determinação da umidade tem como finalidade a determinação da quantidade de substância volátil de qualquer natureza presente na amostra. A expressão dessecação até peso constante significa que a secagem deve continuar até que duas pesagens seguidas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser realizada após uma hora de secagem adicional nas condições especificadas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

5.5.1 Material

A determinação da umidade da amostra em pó liofilizado para solução injetável de aztreonam foi realizada de acordo com a técnica para determinação da perda por dessecação, preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010), utilizando balança por infravermelho, modelo IV-2000 (Gehaka, São Paulo, Brasil).

5.5.2 Método

Neste ensaio, a amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam foi pesada em balança analítica (aproximadamente 1,0 g) e transferida para a balança por infravermelho, onde permaneceu por 1 hora a 105°C. A análise foi realizada em triplicata e em três dias diferentes.

Para confirmar o tempo que a amostra deve permanecer no analisador de umidade por infravermelho, foi realizada análise gravimétrica, também de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). Neste teste, a amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam foi pesada em pesa-filtro previamente dessecado nas mesmas condições de análise e tarado. Após a pesagem, o pesa-filtro foi levado à estufa modelo 702.780 (Quimis, São Paulo, Brasil) a 105°C, para a dessecação. O procedimento foi realizado em triplicata e o pesa-filtro contendo a amostra foi analisado de 30 em 30 minutos, até a constatação de peso constante. Após este procedimento, a perda em peso foi calculada em porcentagem.

5.5.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos pela técnica de perda por dessecação utilizando o analisador de umidade por infravermelho e análise gravimétrica estão apresentados na Tabela 5.4 e 5.5.

Tabela 5.4. Teor de umidade do pó liofilizado para solução injetável de aztreonam determinado em analisador de umidade por infravermelho.

Ensaio	Umidade (%) ¹	Média (%)	DPR (%) ²
1	3,1		
2	3,2	3,16	1,82
3	3,2		

¹Média de três determinações;

²Desvio Padrão Relativo.

Tabela 5.5. Teor de umidade do pó liofilizado para solução injetável de aztreonam determinado por análise gravimétrica.

Ensaio	Umidade (%) ¹	Média (%)	DPR (%) ²
1	2,1		
2	2,2	2,16	1,82
3	2,2		

¹Média de três determinações;

²Desvio Padrão Relativo.

O teor médio de umidade obtido pela análise gravimétrica foi de 2,16%, com DPR% de 1,82, inferior ao teor obtido com o método por analisador por infravermelho que foi de 3,16%, com DPR% de 1,82, portanto, foi confirmado que o tempo de 1 hora é suficiente para o teste.

Não existe descrito na literatura um valor máximo para o teor de umidade de amostras de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam. No entanto, a determinação da umidade é de extrema importância, uma vez que altas concentrações de umidade podem provocar a deterioração ou demonstrar a má conservação das matérias primas, além de induzir a erros de pesagens que poderão causar erros de cálculo de teor ou potência. Além disso, é importante ressaltar que as matérias primas devem ser armazenadas em frascos bem fechados, a fim de evitar a absorção de água pelo fármaco.

5.6. Determinação de Cinzas Sulfatadas

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico, conforme a técnica especificada. Em geral, o ensaio visa determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidos em substâncias orgânicas. Também se destina à determinação de componentes inorgânicos em misturas e da quantidade de impurezas contidas em substâncias inorgânicas termolábeis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a expressão incineração até peso constante significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após 15 minutos de incineração adicional nas condições específicas ($600 \pm 25^\circ\text{C}$).

5.6.1. Material

A determinação de cinzas sulfatadas da amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam foi realizada em forno mufla (Heraeus Instruments), de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010).

5.6.2. Método

Na determinação de cinzas sulfatadas, utilizou-se 1,0 g da amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam que foi exatamente pesado em cadinho de porcelana, previamente dessecado e tarado. Após este processo foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico e aquecido brandamente até carbonização e incinerado em forno mufla a 600°C durante 1 hora. Posteriormente, o cadinho foi esfriado em dessecador para atingir a temperatura ambiente e novamente pesado. A análise foi realizada em triplicata.

O cálculo foi realizado através da porcentagem de cinzas sulfatadas em relação à substância sob ensaio, utilizando a Equação 5.1:

$$\frac{P2-P1}{P3} \times 100 = \% \text{ cinzas sulfatadas} \quad \text{Equação 5.1}$$

Em que:

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (cadinho tarado);

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial.

5.6.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos pela técnica de determinação de cinzas sulfatadas estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Teor de cinzas sulfatadas do pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.

Ensaio	Cinzas sulfatadas (%)	Média (%)	DPR (%) ¹
1	0,20		
2	0,20	0,20	0,0
3	0,20		

¹Desvio Padrão Relativo

Não há descrição na literatura um valor máximo para o teor de cinzas sulfatadas em amostras de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam, porém, de acordo com o resultado obtido, verificou-se que se encontra aproximadamente igual aos valores considerados para muitos fármacos de natureza orgânica em suas respectivas monografias farmacopeicas.

5.7. Determinação da Solubilidade

Quando a Farmacopeia Brasileira (2010) se refere a partes, quer dizer que 1,0 g de um sólido é submetido à dissolução no número de mililitros do solvente estabelecido no número de partes, à temperatura de 25°C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). As solubilidades aproximadas apresentadas neste estudo estão designadas por termos descritivos cujos significados estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade.

Termo descritivo	Solvente
Muito solúvel	Menos de uma parte
Facilmente solúvel	1 a 10 partes
Solúvel	10 a 30 partes
Pouco solúvel	30 a 100 partes
Levemente solúvel	100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	1000 a 10000 partes
Insolúvel	mais de 10000 partes

5.7.1 Material

A solubilidade da amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam foi realizada com os seguintes solventes: acetato de etila (Synth, Diadema, Brasil), acetona (Synth, Diadema, Brasil), acetonitrila (J.T. Baker, México), ácido acético 0,1 M (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido clorídrico 0,1 M (Synth, Diadema, Brasil), água purificada (Millipore, Milford, MA, USA), butanol (Synth, Diadema, Brasil), clorofórmio (Synth, Diadema, Brasil), diclorometano (Synth, Diadema, Brasil), etanol (J.T. Baker, México), éter butílico (Quemis, Florianópolis, Brasil), hidróxido de sódio 0,1 M (Synth, Diadema, Brasil) e metanol (Synth, Diadema, Brasil). Todos os solventes foram de grau analítico.

5.7.2 Método

Foram pesados em balança analítica 100,0 mg de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam e transferidos para tubos de ensaio, acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, sob agitação até completa solubilização. O ensaio foi realizado a 25°C e a solubilidade indicada de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira (2010).

5.7.3 Resultados e discussão

A Tabela 5.8 apresenta os resultados obtidos no teste solubilidade para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam em diferentes solventes, de acordo com os critérios preconizados na Tabela 5.7.

Tabela 5.8. Solubilidade do aztreonam em diferentes solventes a 25°C.

Termo descritivo	Solvente
Acetato de etila	Insolúvel
Acetona	Insolúvel
Acetonitrila	Insolúvel
Ácido acético 0,1 M	Facilmente solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Facilmente solúvel
Água purificada	Facilmente solúvel
Butanol	Insolúvel
Clorofórmio	Insolúvel
Diclorometano	Insolúvel
Etanol	Levemente solúvel
Éter etílico	Insolúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	Facilmente solúvel
Metanol	Solúvel

O ensaio de solubilidade foi realizado com a finalidade de obter a caracterização da amostra qualitativamente através de sua polaridade e, ao mesmo tempo, utilizar este ensaio como preditivo na determinação do melhor sistema solvente para o desenvolvimento de teste quantitativo.

Na literatura consultada não foi encontrada solubilidade especificada para o pó liofilizado para solução injetável de aztreonam.

5.8. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1997; DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998). É uma técnica flexível através da qual podem-se identificar substâncias, impurezas e produtos de degradação. Apresenta-se como vantagens ser de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Esta técnica de identificação baseia-se na comparação de valores de R_f (índice de retenção de um composto) obtidos quando o fármaco é analisado juntamente com a substância de referência (WATSON, 2005).

5.8.1. Material

A CCD foi realizada com a SQR e amostra de pó liofilizado de solução injetável para aztreonam. Também foi realizada com o excipiente L-arginina. Utilizaram-se placas de sílica gel F_{254} (10 x 10 cm), com espessura de 0,25 mm (Kieselgel 60, Merck, Alemanha).

Os solventes utilizados foram: acetonitrila (J.T. Baker, México), ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha), água purificada (Millipore, Milford, MA, USA), butanol (Synth, Diadema,

Brasil), diclorometano (Synth, Diadema, Brasil), etanol (J.T. Baker, México) e metanol (Synth, Diadema, Brasil). Todos os solventes foram de grau analítico.

5.8.2 Método

5.8.2.1 Desenvolvimento da CCD

As placas utilizadas foram previamente ativadas em estufa a 105°C por 1 hora. Para o preparo das soluções da SQR, amostra e do excipiente, foram pesadas massas equivalentes a 20 mg. Em seguida, estas massas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL e seus volumes foram completados com metanol, obtendo-se soluções de 200 µg/mL. As pesagens foram realizadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

Foram testadas os seguintes sistemas de fases móveis:

Sistema 1: butanol : água purificada : ácido acético (80:25:15, v/v)

Sistema 2: diclorometano : metanol : acetonitrila (57:35:4, v/v)

Sistema 3: etanol : água purificada (80:20, v/v)

Sistema 4: etanol : água purificada : ácido acético (10:6:6, v/v)

Sistema 5: metanol com pH 4,0 ajustado com ácido acético

Para o ensaio, procedeu-se inicialmente a saturação da cuba com o sistema de fase móvel. As soluções preparadas no dia da análise foram aplicadas em quantidade de 10 µL diretamente na placa, com auxílio de microseringa de vidro (Hamilton, Nevada, E.U.A.). Após, a placa foi colocada na cuba saturada para eluição dos compostos.

Após a eluição, a placa foi retirada da cuba de vidro para secagem do solvente e posterior revelação das manchas. A placa foi revelada em câmara de luz UV (365 nm). Após, as manchas foram observadas quanto à forma, posição, tamanho e cor. Também foram determinados os fatores de retenção (R_f) referentes às manchas correspondentes à SQR, amostra e excipiente.

5.8.2.2 Degradação acelerada

Soluções de amostra de aztreonam (200 µg/mL) foram submetidas à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica, com objetivo de avaliar se o sistema cromatográfico escolhido é capaz de detectar a degradação do aztreonam na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável e revelar a presença de possíveis produtos de degradação.

A solução da amostra foi preparada em HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M para as hidrólises ácida e básica, respectivamente. As amostras foram submetidas a 60°C em banho de aquecimento. A degradação neutra foi realizada através da exposição da solução da amostra em banho de aquecimento à temperatura de 60°C. Para a degradação oxidativa, a solução da amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (p/v) e depois submetida ao banho de aquecimento à temperatura de 60°C. A fotodegradação foi induzida através da

exposição da solução da amostra à luz ultravioleta, utilizando câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UV (254 nm) 20 W.

Todas as amostras foram submetidas à análise por CCD com a fase móvel constituída por metanol com pH 4,0 ajustado com ácido acético nos tempos de 1, 6, 24, 48, 72 e 168 horas.

5.8.3 Resultados e discussão

5.8.3.1 Desenvolvimento da CCD

As fases móveis foram testadas de acordo com as características de polaridade e solubilidade do aztreonam. Apesar de diversos sistemas de fases móveis testados, apenas o **Sistema 5** permitiu a melhor eluição das soluções, apresentando um R_f satisfatório. Os demais sistemas apresentaram R_f insatisfatório (acima de 0,8) e/ou a presença de manchas não definidas.

As manchas detectadas para o aztreonam SQR e amostra foram compatíveis entre si quanto ao tamanho, R_f e cor. Além disso, foi comprovado que o excipiente não interfere na eluição da amostra, como pode ser visto na Figura 5.5.

Figura 5.5. Cromatograma de solução de aztreonam SQR (P), amostra (A) e excipiente (E).

Fase estacionária: sílica gel F_{254} . Fase móvel: metanol com pH 4,0 ajustado com ácido acético.



O resultado obtido sugere que o aztreonam SQR e amostra possuem a mesma identidade e em ambos não ocorre a presença de impurezas, pois não há o aparecimento de outras manchas, exceto as do fármaco em questão. O valor de R_f foi obtido através do quociente entre a distância de migração do fármaco e a distância percorrida pelo eluente, que foi de 0,68.

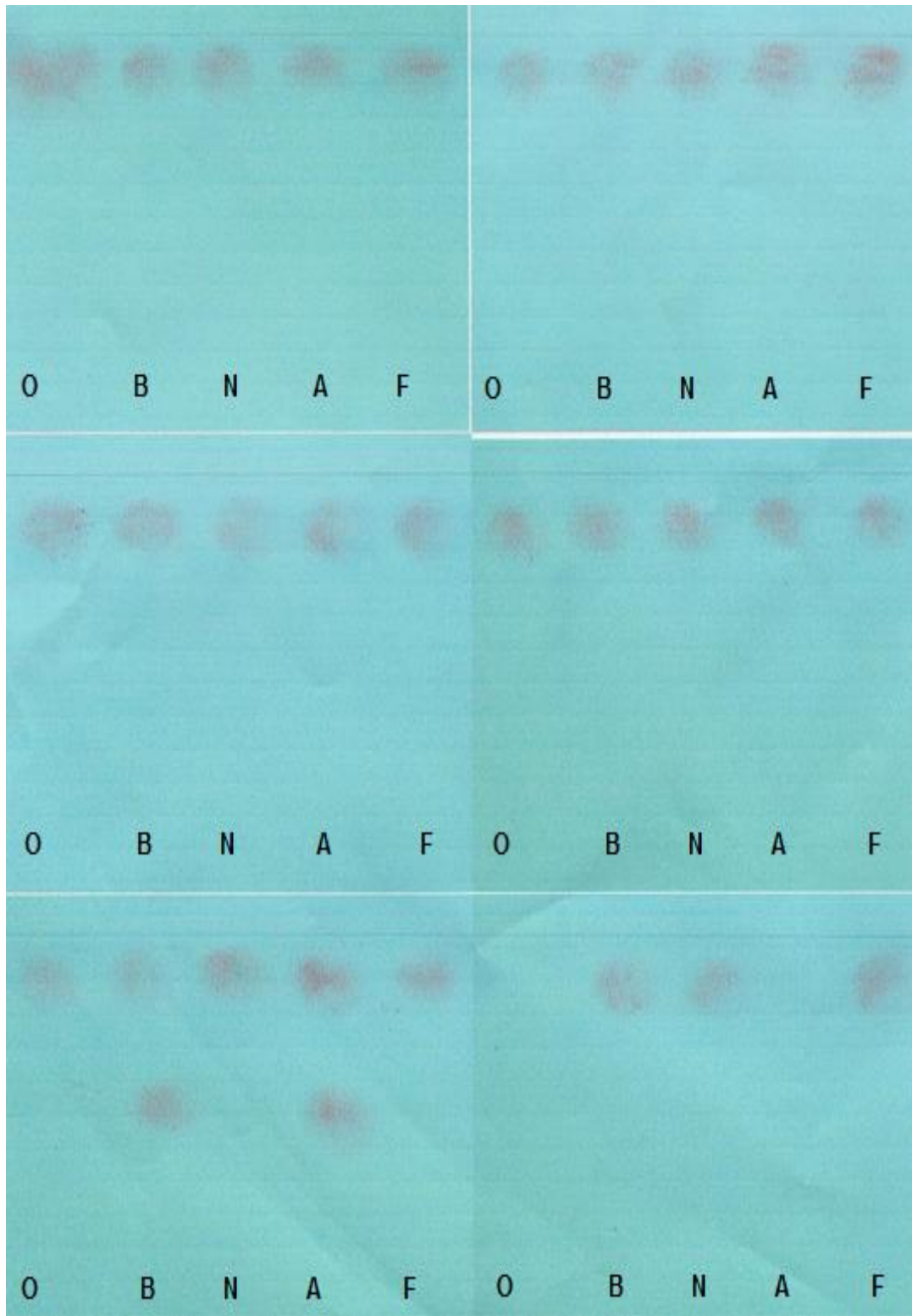
Embora a literatura descreva alguns métodos para identificação de aztreonam por CCD, estes métodos geralmente utilizam como fases móveis misturas de solventes

potencialmente tóxicos. O método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação do aztreonam na forma farmacêutica em estudo.

5.8.3.2 Degradação forçada

A Figura 5.6 mostra os perfis cromatográficos após revelação com luz UV (365 nm) para as soluções da amostra de aztreonam degradadas nas condições oxidativa (O), básica (B), neutra (N), ácida (A) e fotolítica (F) nos tempos de 1, 6, 24, 48 horas e 7 dias.

Figura 5.6. Cromatogramas obtidos por CCD para as soluções da amostra de aztreonam degradadas nas condições oxidativa (O), básica (B), neutra (N), ácida (A) e frotolítica (F) nos tempos de 1, 6, 24, 48 horas e 7 dias.



A Tabela 5.9 apresenta informações sobre a análise por CCD da degradação acelerada do aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

Tabela 5.9 Análise por CCD da degradação acelerada de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

Tempo (h)	Degradação ácida	Degradação básica	Degradação neutra	Degradação fotolítica	Degradação oxidativa
1	$R_f = 0,69$	$R_f = 0,61$	$R_f = 0,69$	$R_f = 0,69$	$R_f = 0,69$
6	Igual ao cromatograma de 1h	Igual ao cromatograma de 1h	Igual ao cromatograma de 1h	Igual ao cromatograma de 1h	Igual ao cromatograma de 1h
24	Mancha de baixa intensidade	Mancha de baixa intensidade	Igual ao cromatograma 1h	Mancha de baixa intensidade	Mancha de baixa intensidade
48	Mancha extra: $R_f = 0,47$	Mancha extra: $R_f = 0,47$	Mancha de baixa intensidade	Mancha de baixa intensidade	Degradação completa, pois não houve aparecimento da mancha.
168	Degradação completa, pois não houve aparecimento das manchas	Mancha de baixa intensidade	Mancha de baixa intensidade	Mancha de baixa intensidade	

Pela análise dos dados obtidos, foi possível observar que a solução da amostra foi mais estável em condições fotolítica e neutra e a máxima degradação foi observada pela condição oxidativa, na qual em 72 horas a mancha referente à amostra de aztreonam havia desaparecido, sugerindo degradação completa do fármaco. Para a degradação ácida e básica, uma mancha adicional foi detectada ($R_f = 0,47$). Os resultados mostraram a capacidade do método em indicar a estabilidade do fármaco, o qual pode ser aplicado para análise qualitativa de aztreonam na forma farmacêutica de pó para solução injetável em ensaios de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

5.9. Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do ultravioleta é um importante recurso utilizado na quantificação de substâncias, uma vez que está relacionada com a estrutura eletrônica da molécula. Baseia-se no fato de a absorvidade de um composto químico ser constante dependendo da intensidade da radiação incidente, concentração e caminho óptico, embora dependa de fatores como: estrutura molecular do composto, solvente, temperatura e comprimento da radiação (WATSON, 1999). É utilizada principalmente para a identificação de compostos químicos orgânicos incluindo fármacos, porém, é também largamente utilizada para o doseamento de fármacos (OHANNESIAN e STREETER, 2002). Além disso, é uma das técnicas mais empregadas, devido à simplicidade, rapidez, baixo custo, robustez, exatidão, facilidade e geração de menor quantidade de resíduos, para análise de diversos compostos orgânicos e, por isso, pode ser utilizada nas análises durante a produção e na rotina do controle de qualidade das indústrias farmacêuticas. Porém, esta técnica apresenta limitada seletividade (CARDOSO et al., 2006; AMIN, MOUSTAFA, EL-DOSOKY, 2008).

5.9.1 Material

Na espectrofotometria na região do ultravioleta foi utilizada SQR, amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e o excipiente L-arginina.

Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro KAYAK[®] XA, modelo HP 8453, com *software* Chemstation UV-VIS e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As leituras foram realizadas entre 200-400 nm.

Utilizaram-se como solvente água purificada (Millipore, Milford, MA, USA), metanol (Synth, Diadema, Brasil), ácido clorídrico 0,1 M (Synth, Diadema, Brasil), hidróxido de sódio 0,1 M (Synth, Diadema, Brasil). Os solventes utilizados foram de grau analítico.

5.9.2 Método

Pesaram-se analiticamente 20 mg de SQR, amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e do excipiente, os quais foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com água purificada, obtendo soluções com concentração final de 200 µg/mL. Uma alíquota de 2 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL para

obtenção de uma solução de concentração de 40 µg/mL e o volume foi completado com água purificada.

Foram preparadas soluções da SQR e amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam em água purificada, metanol, ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M e tampão fosfato pH 6,0 e 8,0.

5.9.3 Resultados e discussão

Na Tabela 5.10 são apresentados os valores de absorção e os comprimentos de onda determinados para a solução de SQR e amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam.

Tabela 5.10. Comprimento de onda e absorção da solução de aztreonam na concentração de 40 µg/mL em diferentes solventes.

Solvente	Comprimento de onda (nm)	Absorção
Metanol	294	0,3412
Ácido clorídrico 0,1 M	284	0,4931
Hidróxido de sódio 0,1 M	268	0,5239
Tampão fosfato pH 8,0	292	0,3877
Tampão fosfato pH 6,0	292	0,3853
Água purificada	292	0,3870

Nas Figuras 5.7 a 5.12 estão apresentados os espectros de SQR e amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam com concentração de 40 µg/mL nos diferentes solventes.

Figura 5.7. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam, utilizando metanol como solvente.

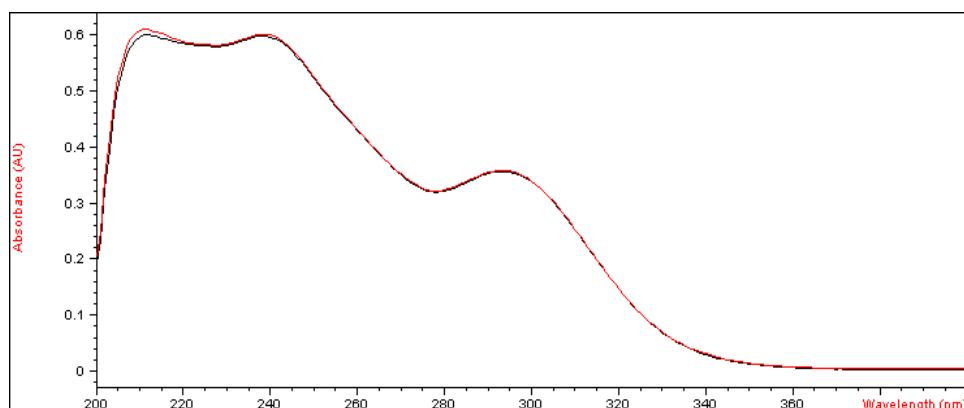


Figura 5.8. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

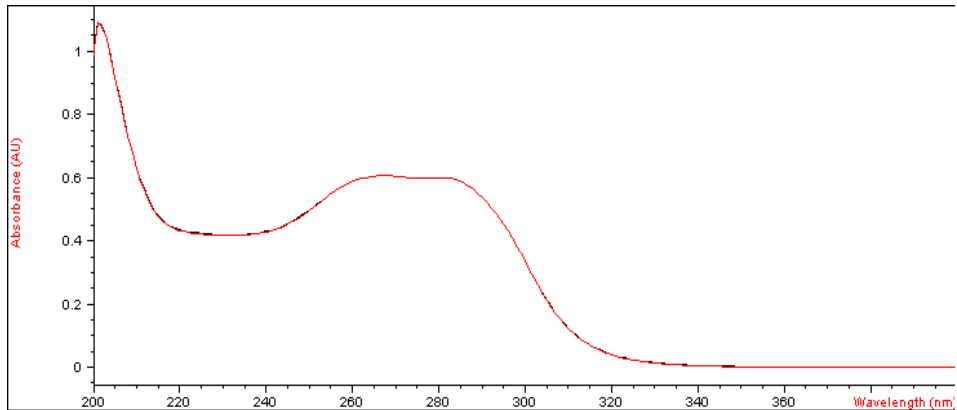


Figura 5.9. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente

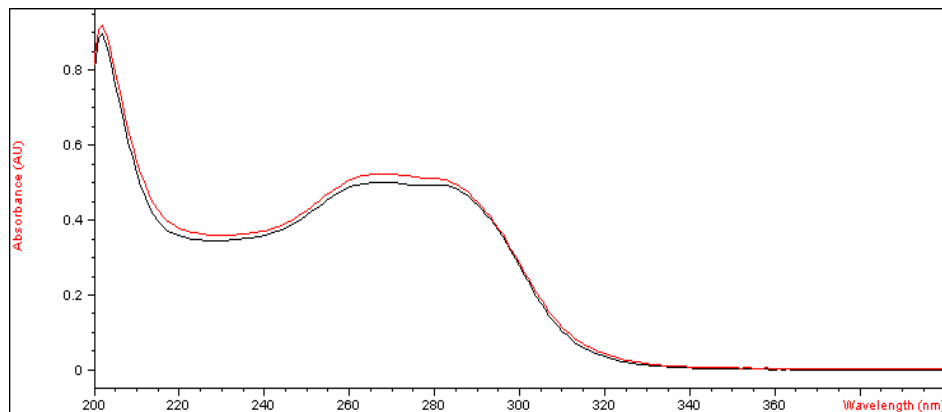


Figura 5.10. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam, utilizando tampão fosfato pH 8,0 como solvente.

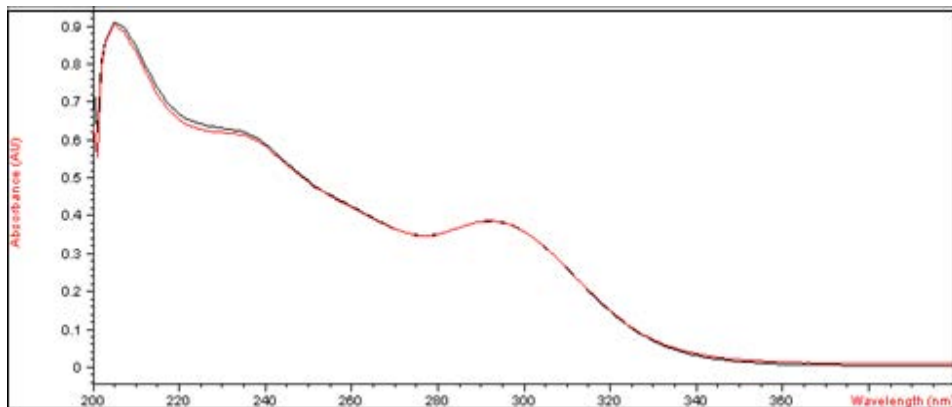


Figura 5.11. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de SQR (vermelho) e amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam, utilizando tampão fosfato pH 6,0 como solvente.

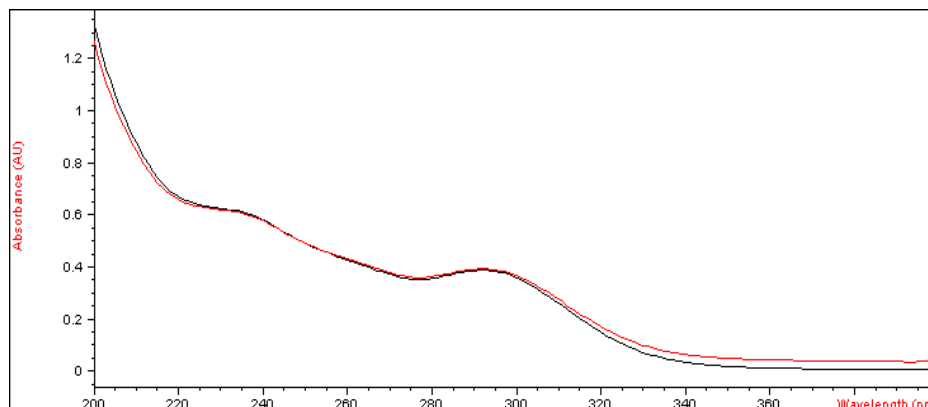
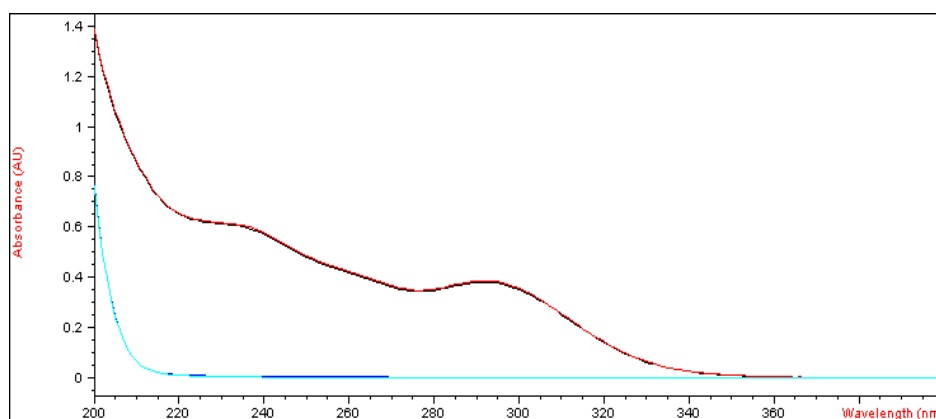


Figura 5.12. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de SQR (vermelho), amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e excipiente (azul), utilizando água purificada como solvente.



A absorção molecular na região do UV depende da estrutura eletrônica da molécula. Assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes no espectro (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

O fármaco em estudo mostrou-se solúvel em todos os solventes utilizados uma vez que não houve precipitação nos balões volumétricos após o preparo das soluções e estas mantiveram-se límpidas. Os espectros de absorção obtidos na análise da solução de SQR e amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam mostraram-se similares em todos os solventes utilizados. Além disso, o excipiente (L-arginina) não interfere na leitura, não apresentando absorção na região do ultravioleta, como mostra a Figura 5.12. Desta forma, na análise quantitativa, optou-se pela utilização da água purificada como solvente por possuir vantagens econômicas e ecológicas, tais como ser de fácil aquisição, baixo custo, fácil descarte e geração de pouca quantidade de resíduos. Os espectros de absorção para a SQR e amostra de pó liofilizado de preparações injetáveis de aztreonam mostraram máxima absorção em 292 nm.

5.10. Espectroscopia na região do Infravermelho

A espectrofotometria no infravermelho médio (MIR – *medium infrared*) é um ensaio de identificação por excelência sendo capaz de diferenciar substâncias com diferenças estruturais. Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante) a região compreendida entre 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio) é a mais empregada para fins de identificação de compostos (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010). Esta técnica é baseada nas vibrações dos átomos ou grupos de átomos, que podem ter amplitudes e velocidades diferentes, podendo assim, identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes na amostra (WATSON, 2005; PAVIA et al., 2010).

5.10.1 Material

A espectrometria na região do infravermelho foi realizada com a SQR, amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e com o excipiente L-arginina.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se equipamento Shimadzu (Kyoto, Japão) com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21. O brometo de potássio (KBr) utilizado para a confecção das pastilhas foi da marca Synth (São Paulo, Diadema, Brasil), de grau analítico.

A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500 cm^{-1} , com intervalos de 2 cm^{-1} .

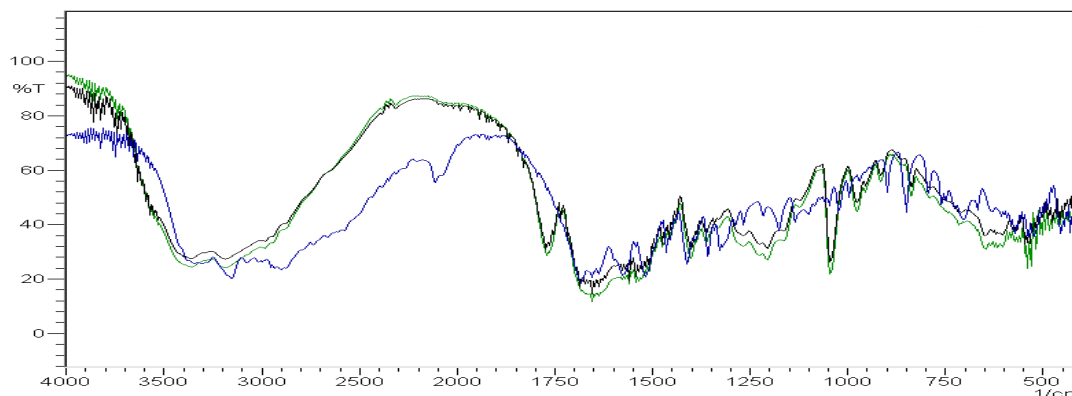
5.10.2 Método

O aztreonam SQR, amostra e excipiente foram exatamente pesados o equivalente a 2 mg (20 mg da diluição 1:10 em KBr) e homogeneizou-se com 148 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 150 mg. A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do *software IS solution*. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra de aztreonam e com o excipiente.

5.10.3 Resultados e discussão

Os espectros obtidos com aztreonam SQR, amostra e excipiente encontram-se sobrepostos e apresentados na Figura 5.13.

Figura 5.13. Espectro de absorção na região de infravermelho de aztreonam SQR (verde), amostra (preto) e excipiente (azul).



Os espectros obtidos com a SQR e amostra de pó para solução injetável de aztreonam apresentam as mesmas bandas de absorção, como apresentado na Tabela 5.11. Este é um forte indício da identidade desta substância e da ausência de impurezas e produtos de degradação, os quais apresentariam bandas diferentes (TOTOLI, 2013). Além disso, o excipiente (L-arginina) não interfere na leitura, não apresentando bandas de absorção iguais as do fármaco, como mostra a Figura 5.13.

Tabela 5.11. Bandas do espectro na região do infravermelho com as respectivas deformações.

Região de absorção (cm ⁻¹) ¹	Grupamento responsáveis
3600-3250	Deformação axial dos grupamentos N-H e O-H
3000-2800	Deformação axial dos grupamentos sp ³ C-H
1800-1750	Deformação axial do grupamento C=O
1600-1475	Deformação axial do anel benzênico
1350-1000	Deformação axial do grupamento C-N
1350-1175	Deformação axial do grupamento S=O

¹SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010.

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou picos de absorção característicos de funções presentes na estrutura química do aztreonam, demonstrando desta maneira os grupos funcionais presentes na molécula estudada.

A espectroscopia no infravermelho é um método de identificação de excelência no controle de qualidade de medicamentos. Os espectros na região do infravermelho para SQR e amostra de aztreonam foram praticamente idênticos, confirmando o propósito desta técnica, que é a identificação da molécula por comparação com um padrão de referência.

5.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência vem contribuindo de maneira significativa com a análise de medicamentos (RAMBLA-ALEGRE et al., 2011). É um método que se destaca por apresentar algumas propriedades especiais, tais como grande poder de resolução, alta velocidade de separação, capacidade de quantificação exata, permitindo ainda análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna. Além disso, possibilita o uso de uma ampla variedade de fases móveis e estacionárias, permitindo a análise de grande número de compostos (JEFFERY et al., 1992).

Este método é utilizado em várias áreas da ciência, com destaque para o acompanhamento de sínteses, em pesticidas, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, entre muitas outras aplicações (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

5.11.1 Material

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com SQR, amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e com o excipiente L-arginina.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, U.S.A.), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 μ L (Rheodyne Breeze, CA, E.U.A.), equipado com *software* Empower. A separação cromatográfica foi realizada através de condições isocráticas e coluna Agilent Zorbax C₁₈, 5 μ m, 4,6 x 250 mm (Agilent, Santa Clara, CA, E.U.A.).

Os seguintes equipamentos também foram utilizados: balança analítica, modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça) e ultra-som (Unique, Indaiatuba, Brasil).

Para as fases móveis, os solventes utilizados foram: acetonitrila (J.T. Baker, Xelostoc, México), ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol (J.T. Baker, Xelostoc, México) e metanol (J.T. Baker, Xelostoc, México). Todos os solventes foram de grau HPLC. Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água purificada (Milli-Q, Millipore, E.U.A.).

5.11.2 Método

Pesaram-se analiticamente 20 mg de SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e do excipiente, os quais foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com fase móvel, para obtenção de solução com concentração final de 200 μ g/mL. As soluções foram filtradas em membrana com poro de 0,45 μ m e 13 mm de diâmetro.

As fases móveis foram filtradas sob vácuo e desgaseificadas em ultra-som durante 30 minutos. Após a estabilização do sistema cromatográfico, 20 μ L das soluções foram injetadas no cromatógrafo e analisadas no comprimento de onda de 292 nm. A identificação foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e pelo perfil cromatográfico.

Ensaio preliminares foram realizados com o objetivo de encontrar condições favoráveis para a quantificação do aztreonam em pó para solução injetável, bem como melhorar a assimetria do pico e reduzir os danos para a coluna cromatográfica e a geração de resíduos (TOTOLI, 2013). Desta forma, a Tabela 5.12 apresenta os parâmetros que foram testados.

Tabela 5.12. Parâmetros cromatográficos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento do método por CLAE.

Parâmetros	Descrição
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 150 mm
	Agilent Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 250 mm
Vazão (mL/min)	0,5
	0,8
Fase móvel	1,0
	água:metanol (60:40, v/v)
	água:metanol (60:40, v/v) pH 3,1 ajustado com ácido acético
	água:metanol (70:30, v/v) pH 2,6 ajustado com ácido acético
	água:metanol (60:40, v/v) pH 3,8 ajustado com TFA ¹
	água: acetonitrila (60:40, v/v)
	água:acetonitrila (60:40, v/v) pH 3,8 ajustado com ácido acético
água: etanol (60:40, v/v) pH 3,1 ajustado com ácido acético	
água:etanol (70:30, v/v) pH 2,6 ajustado com ácido acético	

¹TFA: ácido trifluoroacético

5.11.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos com os diversos parâmetros testados estão apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Resultados obtidos durante o desenvolvimento do método por CLAE para análise qualitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

Parâmetros	Descrições
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 150 mm, não demonstrou adequada separação dos picos.
Vazão (mL/min)	Vazão de 0,8 e 1,0 mL/min fez com que os tempos de retenção aparecessem próximo ao volume morto, tornando o seu uso inadequado.
Fase móvel	água:metanol (60:40, v/v): pico largo em 5,9 minutos; água:metanol (60:40, v/v) pH 3,1 ajustado com ácido acético: pico com cauda em 6,1 minutos; água:metanol (70:30, v/v) pH 2,5 ajustado com ácido acético: pico satisfatório em 4,1 minutos; água:metanol (60:40, v/v) pH 3,8 ajustado com TFA: pico com cauda em 5,5 minutos; água: acetonitrila (60:40, v/v): pico largo em 3,7 minutos; água:acetonitrila (60:40, v/v) pH 3,8 ajustado com ácido acético: pico largo em 5,6 minutos; água: etanol (60:40, v/v) pH 3,1 ajustado com ácido acético: pico com cauda em 4,9 minutos; água:etanol (70:30, v/v) pH 2,6 ajustado com ácido acético: pico satisfatório em 4,9 minutos.

A CLAE é descrita na literatura para a análise de aztreonam em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos. No entanto, a maioria das fases móveis sugeridas na literatura envolve a utilização de soluções-tampão em sua composição, o que configura em uma desvantagem do método, pois os sais que compõem estas soluções tendem a adsorverem-se na coluna, podendo causar entupimentos e diminuir sua vida útil. Desta forma, optou-se por uma fase móvel que não utiliza soluções-tampão em sua constituição, formada por água:etanol (70:30 v/v) com pH 2,6 ajustada com ácido acético, apresentando uma excelente otimização do método, pois com esta fase móvel minimiza-se os possíveis danos à coluna cromatográfica que a presença de soluções-tampão poderia causar. A fase móvel escolhida ainda possui outra vantagem, que é o fato de utilizar etanol em sua composição em vez de solventes mais comumente empregados, tais como metanol e acetonitrila, o qual é menos tóxico para os operadores, de fácil descarte e ainda possui custo reduzido (RIBEIRO et al., 2004). Esta fase móvel também foi escolhida devido ao curto tempo de retenção do fármaco, em 4,9 minutos, aproximadamente.

O uso de etanol e água como fase móvel, há algum tempo, não era muito utilizado pelo fato de aumentar a viscosidade do sistema e, conseqüentemente, a pressão de trabalho. No entanto, os equipamentos modernos suportam pressões muito mais elevadas, o que torna viável o seu uso (RIBEIRO et al., 2004). Além disso, estudos mostram que misturas de etanol e água apresentam boas propriedades cromatográficas quando usadas com colunas de fase reversa C₈ e C₁₈ (MIYABE, TAKEUCHI, TEZUCA, 1999; RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2004).

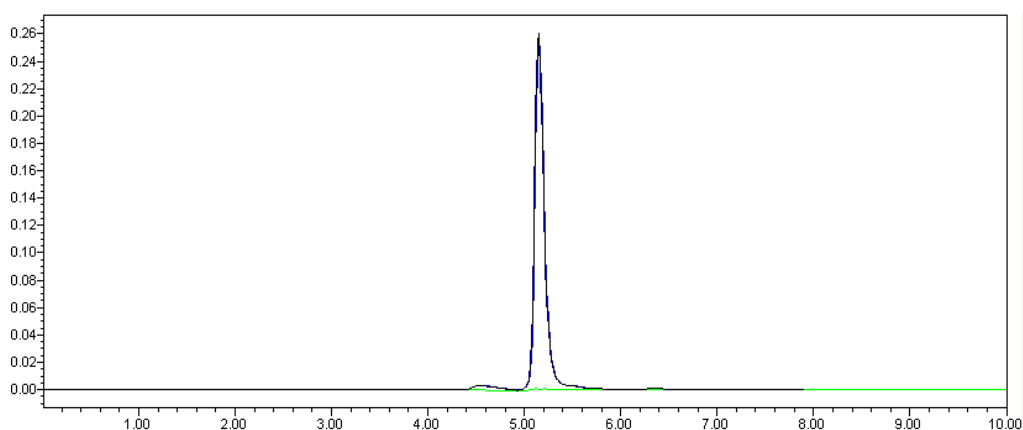
A partir dos resultados obtidos com as diferentes colunas analíticas, fases móveis e vazões foi possível estabelecer os parâmetros ideais para a realização do método. Estas condições estão apresentadas na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Parâmetros estabelecidos para a determinação de aztreonam pelo método de CLAE.

Parâmetros	Descrições
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 250 mm
Vazão (mL/min)	0,5
Fase móvel	água:etanol (70:30, v/v) pH 2,6 ajustado com ácido acético
Deteção	292 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25°C ± 2°C
Tempo de retenção	4,9 minutos

Os cromatogramas obtidos com aztreonam SQR, amostra e excipiente encontram-se sobrepostos e apresentados na Figura 5.14.

Figura 5.14. Sobreposições dos cromatogramas obtidos por CLAE para solução de aztreonam SQR (preto), amostra (azul) e excipiente (verde).



As fases móveis foram testadas de acordo com as características de polaridade e solubilidade do aztreonam. Entre as diversas fases móveis testadas, água:etanol (70:30, v/v)

pH 2,6 ajustado com ácido acético foi escolhida, pois sua composição é simples e utiliza reagentes menos tóxicos e de baixo custo.

Os cromatogramas obtidos com a SQR e amostra de pó para solução injetável de aztreonam apresentam os mesmos perfis cromatográficos. Este é um forte indício da identidade desta substância e da ausência de impurezas e produtos de degradação, os quais apresentariam picos diferentes. Além disso, o excipiente (L-arginina) não interfere na leitura, não apresentando pico igual do fármaco, como mostra a Figura 5.14.

6.1 Espectrofotometria na região do Ultravioleta

A espectrofotometria na região do ultravioleta é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se a equação 6.1:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Equação 6.1}$$

Em que:

A = absorvância;

I_0 = intensidade da radiação monocromática que incide na amostra;

I = intensidade da radiação que emerge da amostra.

ε = absortividade molar;

b = distância percorrida pelo feixe através da amostra;

c = concentração (mol/L) da espécie absorvente (HARRIS, 2001; VOGEL, 2002; ROCHA e TEIXEIRA, 2004, PEDROSO e SALGADO, 2013b).

O desenvolvimento de métodos quantitativos empregando a espectrofotometria de absorção na região do UV é baseado na capacidade de absortividade de um sistema é diretamente proporcional à concentração de soluto (Lei de Lambert-Beer) (ROCHA e TEIXEIRA, 2004). A Lei de Lambert-Beer explica que há uma relação exponencial entre a transmissão de luz através de uma substância e a concentração da substância, assim como também entre a transmissão e a longitude do corpo que a luz atravessa (EWING, 2001).

A análise por espectrofotometria na região do UV é uma técnica amplamente utilizada para quantificar diversos fármacos, porque é barata, simples e não requer preparação da amostra demorada e complexa. Além disso, produz quantidades muito baixas de resíduos e solventes, sendo um aspecto importante nas análises laboratoriais de rotina (BONFILIO, ARAÚJO, SALGADO, 2011; FIORENTINO e SALGADO, 2011; SILVA, ALMEIDA, SALGADO, 2012).

6.1.1 Material

A espectrofotometria na região do UV foi realizada com a SQR e amostra para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam, descritas no Capítulo 4.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis SHIMADZU, modelo mini-1240, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foi utilizado como solvente água purificada (Millipore, Milford, MA, E.U.A.)

6.1.2 Método

6.1.2.1 Preparo da solução de aztreonam SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 20,0 mg de aztreonam SQR previamente dessecada e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada. Levou-se ao ultrassom por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração final de 200 µg/mL de aztreonam SQR.

6.1.2.2 Preparo da solução de aztreonam na amostra

O conteúdo de 20 frascos contendo 1 g de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras, pesou-se o equivalente a 20 mg de aztreonam previamente dessecada e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada. Levou-se ao ultrassom por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração final de 200 µg/mL.

6.1.2.3 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada a fim de estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta apresenta linearidade. A partir da solução estoque, descrita na seção 6.1.2.2, alíquotas crescentes foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados para 10 mL com água purificada, obtendo-se soluções com concentrações de 1 a 200 µg/mL. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda de máxima absorção, 292 nm, utilizando o solvente água purificada como branco.

6.1.2.4 Obtenção da curva analítica

Após a obtenção da curva de Ringbom, determinou-se a faixa de concentração que obedece a lei de Lambert-Beer. Para obtenção da curva analítica, foram transferidas alíquotas de 1,35; 1,80; 2,25; 2,70; 3,15; 3,60 mL da solução descrita na seção 6.1.2.1 para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, obtendo-se soluções com concentrações finais de 27, 36, 45, 54, 63 e 72 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 292 nm, utilizando água purificada como branco e as curvas foram obtidas em três dias diferentes.

6.1.2.5 Cálculo do teor de aztreonam na amostra

A concentração de aztreonam na amostra foi calculada pela Equação 6.2 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 6.3.

$$C_a = A_a \times \frac{C_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Equação 6.2

Em que:

C_a = concentração da amostra;

A_a = absorção absoluta da amostra;

C_{SQR} = concentração da SQR;

A_{SQR} = absorção absoluta da SQR;

$$C_a\% = C_a \times \frac{100}{C_t}$$

Equação 6.3

Em que:

$C_a\%$ = concentração percentual da amostra;

C_a = concentração da amostra;

C_t = concentração teórica de aztreonam na amostra.

6.1.3 Validação do método

Os parâmetros foram determinados de acordo com a literatura (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2007; BONFILIO, ARAÚJO, SALGADO, 2011).

6.1.3.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita na seção 6.1.2.4 foram analisados para obtenção da equação da reta através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

6.1.3.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade foi comprovada pela comparação da resposta obtida para o fármaco na ausência do excipiente (SQR), na presença do excipiente (amostra) e com o excipiente (BRASIL, 2003).

6.1.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da análise de sete réplicas de aztreonam SQR com concentração de 45 µg/mL, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista. O desvio padrão relativo (DPR %) entre as análises foi calculado. A precisão intermediária (interdias e entre analistas) foi avaliada através da realização de determinações de aztreonam na amostra em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados.

6.1.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). Sendo cada nível de concentração preparado em triplicata. A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.

	Volume adicionado de amostra (200 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de SQR (200 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
A	1,3	-	26
R1	1,3	0,5	36
R2	1,3	0,95	45
R3	1,3	1,4	54
SQR	-	1,3	26

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 6.4, determinada pela *Association of Oficial Analytical Chemists* (AOAC, 2002):

$$R\% = \left[\frac{(C_f - C_u)}{C_s} \right] \times 100 \quad \text{Equação 6.4}$$

Em que:

C_f = concentração da solução amostra adicionada de padrão (SQR);

C_u = concentração da amostra;

C_s = concentração teórica da SQR adicionada.

6.1.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de modificação nos parâmetros estabelecidos, tais como: comprimento de onda, equipamento e temperatura. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.1.3.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi estimado a partir das três curvas analíticas obtidas utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto com eixo y e a média das inclinações das curvas analíticas (Equação 6.5) (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

$$LD = \frac{3.3\sigma}{IC} \quad \text{Equação 6.5}$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto;

IC = média das inclinações das curvas analíticas.

6.1.3.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto com eixo y e a média das inclinações das curvas analíticas (Equação 6.6) (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

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

Equação 6.6

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto;

IC = média das inclinações das curvas analíticas.

6.1.4 Resultados e discussão

As técnicas espectrofotométricas têm aumentado consideravelmente nos últimos anos por causa da sua importância na análise farmacêutica para a determinação de fármacos (GOMES e SALGADO, 2005). São utilizadas para análise de diferentes classes de fármacos e medicamentos sejam na forma de matéria prima, formulações farmacêuticas e em amostras biológicas uma vez que permite a determinação de parâmetros como quantificação da substância em análise, constante de equilíbrio e velocidade de reação (ROCHA e TEIXEIRA, 2004; AMIN, MOUSTAFA, EL-DOSOKY, 2008).

As características do espectro de absorção na região do UV da SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam em água purificada foram discutidas na análise qualitativa deste trabalho (Capítulo 5, seção 5.9).

6.1.4.1 Curva de Ringbom

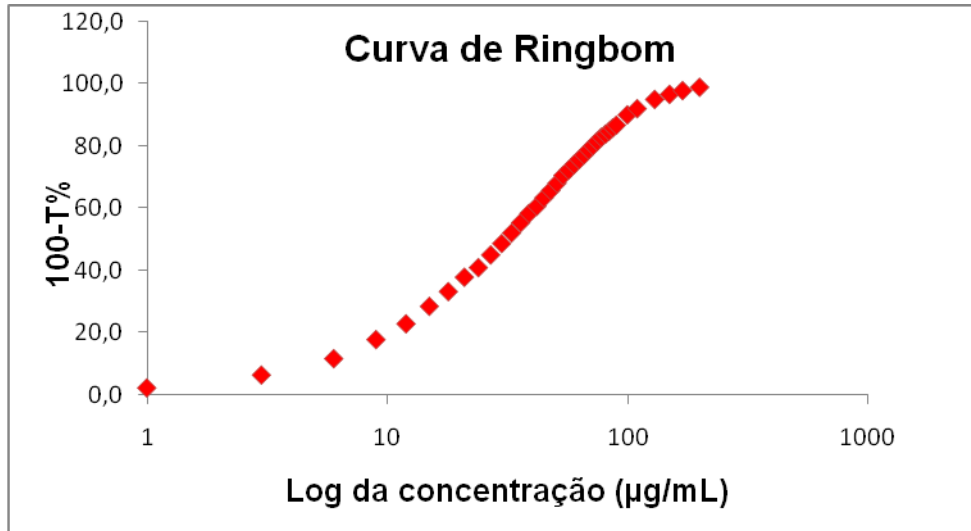
Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta para o aztreonam, são mostrados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2. Valores obtidos na determinação da curva de Ringbom para o método espectrofométrico na região do UV para aztreonam, utilizando água como solvente e comprimento de onda de 292 nm.

	Concentração (µg/mL)	Absorvância	100-T%
1	1	0,0110	2,5010
2	3	0,0298	6,6316
3	6	0,0549	11,8748
4	9	0,0861	17,9837
5	12	0,1138	23,0515
6	15	0,1466	28,6490
7	18	0,1763	33,3654
8	21	0,2074	37,9703
9	24	0,2296	41,0614
10	27	0,2605	45,1091
11	30	0,2905	48,7729
12	33	0,3201	52,1480
13	36	0,3513	55,4651
14	39	0,3813	58,4377
15	42	0,4060	60,7355
16	45	0,4371	63,4489
17	48	0,4656	65,7705
18	51	0,4960	68,0846
19	54	0,5314	70,5829
20	57	0,5579	72,3242
21	60	0,5864	74,0821
22	63	0,6140	75,6780
23	66	0,6412	77,1545
24	69	0,6730	78,7676
25	72	0,7019	80,1345
26	75	0,7329	81,5031
27	78	0,7648	82,8130
28	81	0,7904	83,7968
29	84	0,8171	84,7630
30	87	0,8492	85,8486
31	90	0,8771	86,7291
32	100	1,0011	90,0253
33	110	1,0978	92,0164
34	130	1,2974	94,9580
35	150	1,4678	96,5944
36	170	1,6581	97,8026
37	200	1,9448	98,8645

A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de transmitância e de concentração em escala logarítmica conforme demonstrado na Figura 6.1.

Figura 6.1. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para aztreonam.



A curva de Ringbom determinou a faixa linear escolhida para validar o método, a qual foi entre 27 a 72 µg/mL.

6.1.4.2 Obtenção da curva analítica

A Tabela 6.3 apresenta os valores de absorvância obtidos na construção da curva analítica para aztreonam SQR, utilizando água purificada como solvente.

Tabela 6.3. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de aztreonam SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água purificada como solvente a 292 nm.

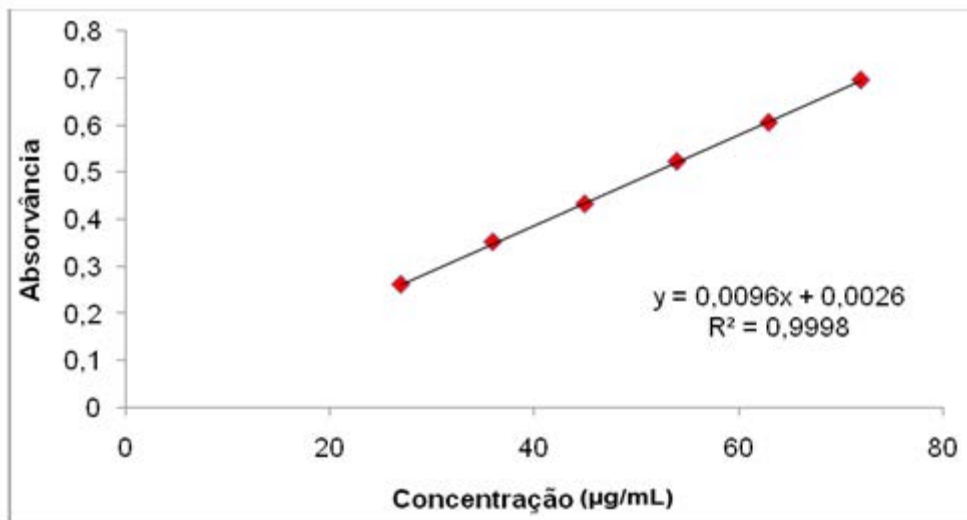
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Absorvância média \pm e.p.m. ¹	DPR (%) ²
27	0,2624	0,2648 \pm 0,0012	0,87
	0,2654		
	0,2666		
36	0,3440	0,3521 \pm 0,0041	1,77
	0,3556		
	0,3568		
45	0,4243	0,4331 \pm 0,0045	1,55
	0,4360		
	0,4389		
54	0,5134	0,5235 \pm 0,0052	1,51
	0,5260		
	0,5310		
63	0,5964	0,6065 \pm 0,0051	1,29
	0,6101		
	0,6131		
72	0,6848	0,6969 \pm 0,0051	1,12
	0,7013		
	0,7047		

¹erro padrão médio

²desvio padrão relativo

A curva analítica de aztreonam SQR (Figura 6.2) foi construída com as médias dos valores de absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

Figura 6.2. Curva analítica da solução de aztreonam SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 292 nm, utilizando água purificada como solvente.



Os resultados apresentados na Tabela 6.3 e Figura 6.2 demonstraram que o método possui linearidade na faixa de concentração de 27 a 72 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9998, o que mostra a adequada linearidade do método. A equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi $y=0,0096x + 0,0026$, em que x é a concentração em µg/mL e y é a absorção no UV.

6.1.5 Validação do método

6.1.5.1 Linearidade

A análise de variância (ANOVA) calculada para os dados da curva analítica de aztreonam é mostrada na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.

Fontes de variação	GL ¹	SQ ²	Variância	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre doses	5	0,39381	0,07876	1060,11*	3,11
Regressão linear	1	0,39378	0,39378	5300,16*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,00003	0,00000	0,10	3,26
Resíduo	12	0,00089	0,00007	-	-
Total	17	0,39470	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

¹GL = graus de liberdade

²SQ = soma dos quadrados

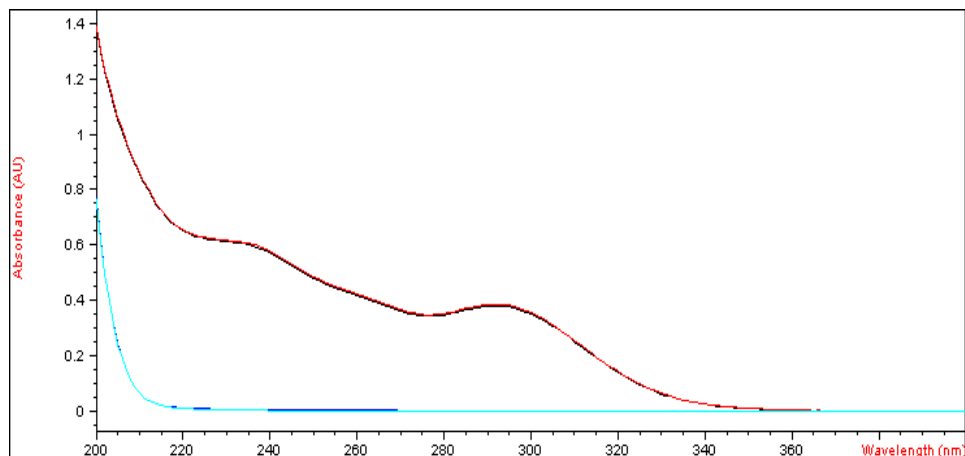
A análise estatística dos resultados das áreas obtidas na construção da curva analítica foi verificada pela análise de variância, mostrando que o método apresentou regressão linear

significativa, visto que o F calculado (5300,16) foi superior ao F tabelado (4,75) para este requisito. Além disso, a análise estatística também mostrou que não houve desvio significativo da linearidade, já que o F calculado (0,10) foi menor que o F tabelado (3,26), a um nível de significância de 5%.

6.1.5.2 Especificidade e Seletividade

A Figura 6.3 apresenta a sobreposição dos espectros obtidos com a SQR, amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e excipiente (L-arginina). Os espectros de absorção são semelhantes e o excipiente presente na amostra não interfere na absorção, comprovando a especificidade do método espectrofotométrico na região do UV.

Figura 6.3. Espectro de absorção por espectrofotometria na região do UV, de solução de SQR (vermelho), amostra (preto) de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam e excipiente (azul), utilizando água purificada como solvente.



6.1.5.3 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intradia) e forneceu DPR% de 0,20% para sete réplicas da solução de aztreonam SQR na concentração de 45 µg/mL, preparadas individualmente.

A precisão intermediária (interdias) foi realizada em três dias consecutivos, obtendo-se valores de DPR% de 0,70%. Também foi avaliada a precisão entre-analistas, obtendo-se DPR% de 0,19%. O teor foi calculado e está apresentado na Tabela 6.5.

Tabela 6.5. Determinação do teor interdias e entre-analistas por espectrofotometria na região do UV.

Resposta analítica				
		Teor (%)	Teor médio (%)	DPR¹ (%)
Precisão intermediária	Dia 1	96,90		
	Dia 2	96,21	96,22	0,70
	Dia 3	95,55		
	Analista 1	97,41	97,54	0,19
	Analista 2	97,68		

¹desvio padrão relativo

As médias dos teores estão próximas, estando os desvios dentro do permitido, comprovando a precisão do método (FDA, 2000; BRASIL, 2003; USP 36, 2013). Além disso, o teor obtido em três dias consecutivos pelo mesmo analista e, em um mesmo dia por analistas diferentes, foi de 96,22% e 97,52% com DPR de 0,70 e 0,19%, respectivamente. Os valores de teor encontrados estão dentro do permitido que é de 90 a 105% (USP 36, 2013), demonstrando que o método proposto é apropriado para quantificar o fármaco.

6.1.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação através da análise em três níveis de concentrações pré-estabelecidas. Os valores encontrados no teste de recuperação para o aztreonam utilizando espectrofotometria na região do UV estão na Tabela 6.6.

Tabela 6.6. Valores do teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.

	Aztreonam SQR adicionado (µg/mL)	Aztreonam SQR encontrado (µg/mL)¹	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	36	36,47	101,3	
R2	45	45,45	101,0	100,9
R3	54	54,22	100,4	

¹cada valor é a média de três determinações

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição do padrão, obtendo-se a recuperação média de 100,9%, comprovando a exatidão do método proposto, pois os valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

6.1.5.5 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação no comprimento de onda, equipamento e temperatura. Os DPR% obtidos após estas modificações estão apresentada na Tabela 6.7.

Tabela 6.7. Valores dos DPR obtidos na avaliação da robustez do ensaio do método espectrofotométrico na região do UV.

Variável	Faixa investigada	DPR ¹ (%)
Comprimento de onda	290 nm	0,83
	292 nm	
	294 nm	
Temperatura	18°C	0,02
	26°C	
Equipamento	Shimadzu mini-1240	0,17
	Shimadzu 1800	

¹Desvio padrão relativo

A robustez do método apresentou valores de DPR abaixo de 5,0%, comprovando que pequenas modificações nestes parâmetros não influenciam de maneira significativa a análise do fármaco. Portanto, o método por espectrofotometria de absorção na região do UV apresentou-se robusto.

6.1.5.6 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as Equações 6.5 e 6.6, respectivamente, e os valores encontrados foram 0,42 µg/mL e 1,28 µg/mL, respectivamente.

O limite de detecção foi calculado com o objetivo de se conhecer qual o menor valor de concentração do fármaco que pode ser detectado pelo método espectrofotométrico proposto, com razoável certeza estatística, mas não necessariamente quantificado. O limite de quantificação é a menor concentração do fármaco na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (FDA, 1994; ICH, 2005; LA ROCA et al., 2007). Diante dos resultados encontrados para LQ e LD, os valores encontrados são satisfatórios, uma vez que a menor concentração utilizada para a obtenção da curva analítica foi de 27 µg/mL, e a concentração utilizada para realizar o doseamento foi de 45 µg/mL, estando bem acima dos valores de LD e LQ.

Portanto, fica provado que o método espectrofotométrico de absorção na região do UV para quantificação do aztreonam é adequado e atende todos os requisitos exigidos pelos

órgãos oficiais (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005; SOUZA, JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2007; BONFILIO, ARAÚJO, SALGADO, 2011).

6.2 Ensaio Microbiológico pelo Método Turbidimétrico

Os ensaios microbiológicos para quantificação da atividade de antibióticos são métodos que exigem o emprego de uma avaliação comparativa frente a uma SQR (KAVANAGH, 1972; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). A alta variabilidade do ensaio microbiológico torna imprescindível a utilização de delineamentos experimentais adequados e da análise estatística dos resultados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os ensaios microbiológicos são utilizados para eliminar dúvidas quanto à perda de atividade, não demonstradas pelos métodos químicos e físico-químicos. Particularmente, estes ensaios aplicam-se àqueles antibióticos de origem biológica, que podem conter misturas de substâncias, com efeitos compatíveis, sinérgicos ou antagônicos (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; MORENO, SALGADO, 2007; USP 36, 2013).

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em solução uniforme do antimicrobiano, em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco (ESMERINO et al., 2004; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Entre as vantagens da utilização desta técnica comparadas a outro método microbiológico destacam-se: a rapidez, facilidade operacional, medida objetiva da resposta, não interferência das características de difusão, além da exatidão. As desvantagens incluem a necessidade de equipamento para a leitura da resposta e ausência de contaminação grosseira ou coloração da amostra que interfira na leitura fotométrica (KAVANAGH, 1963; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

6.2.1 Material

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico foi realizado com SQR e amostra para pó liofilizado de solução injetável de aztreonam descritas no Capítulo 4.

Para os testes preliminares, foram usados os seguintes meios de cultura: caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck, Alemanha) e caldo Casoy (Acumedia, Lasing, E.U.A.). Formaldeído (Quemis, Florianópolis, Brasil) foi usado para interromper o crescimento dos micro-organismos. A água purificada foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore, E.U.A.). Para o preparo das soluções tampão fosfato de potássio pH 6,0 e pH 8,0 foram utilizados fosfato de potássio dibásico (Vetec, Rocha, Brasil) e monobásico (Vetec, Rocha, Brasil).

Os meios de cultura foram esterilizados antes do uso em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Luferco, São Paulo, Brasil). Na incubação dos micro-organismos utilizou-se aparelho incubador Shaker, modelo MA420 (Marcom, São Paulo, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás, São Paulo, Brasil). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro Beckman, modelo DU 530 (Beckman Coulter, CA, E.U.A.).

Também foram usados os seguintes materiais: tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro por 150 mm de altura; micropipetador (Digipet, Paraná, Brasil); balança analítica, modelo H10 (Mettler Toledo, Suíça) e balança semi-analítica, modelo B160 (Micronal, São Paulo, Brasil).

6.2.2 Método

6.2.2.1 Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a quantificação de aztreonam, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas, verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, solução diluente, concentração do inóculo e do fármaco, conforme descrito na Tabela 6.8.

Tabela 6.8. Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

Parâmetros	Descrição
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Micro-organismo	<i>Salmonella</i> ATCC 19196
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 IAL 1098
Meio de cultura	Caldo BHI
	Caldo casoy
	Água purificada
Solução diluente	Solução tampão pH 6,0
	Solução tampão pH 8,0
Concentração do inóculo	1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10%
	2,0; 4,0; 8,0 µg/mL
	16,0; 32,0; 64,0 µg/mL
Concentração de aztreonam	6,4; 32,0; 160,0 µg/mL
	5,0; 20,0; 80,0 µg/mL
	20,0; 80,0; 320,0 µg/mL
	5,0; 40,0, 320,0 µg/mL

6.2.2.2 Preparo do meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultura ágar Casoy para a manutenção da cepa do micro-organismo e caldo Casoy para preparo, padronização do inóculo e realização do ensaio. O meio de cultura foi preparado conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento, distribuídos nos tubos de ensaio (10 mL/tubo) e esterilizados em autoclave por 15 minutos à 121° C em 1 atm.

6.2.2.3 Preparo do inóculo

O micro-organismo teste *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393, mantido em ágar Casoy inclinado em tubo de ensaio foi inoculado com auxílio de alça de platina para caldo Casoy e mantido, para o seu crescimento, em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Em seguida, o inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 580 nm, para transmitância de $25\% \pm 2\%$. O inóculo padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

6.2.2.4 Preparo da solução de aztreonam SQR

Foram pesados 50 mg de aztreonam SQR, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 0,1; 1,28 e 6,4 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das soluções com concentrações de 5,0; 40,0 e 320,0 $\mu\text{g/mL}$.

6.2.2.5 Preparo da solução de aztreonam na amostra

O conteúdo de 20 frascos-ampolas contendo 1 g de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam foi adicionado a um recipiente adequado e homogeneizado. Desta mistura, pesou-se o equivalente a 50 mg de aztreonam, que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,1; 1,28 e 6,4 mL para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das soluções com concentrações de 5,0; 40,0 e 320,0 $\mu\text{g/mL}$.

6.2.2.6 Ensaio

Para a realização do ensaio microbiológico, procedeu-se a adição de 200 μL das soluções de SQR e amostra nos tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Casoy estéril. Em seguida, adicionou-se 0,6 mL do inóculo padronizado. Desta forma, foram utilizados 20 tubos de ensaio em retas paralelas 3 x 3, sendo três tubos para cada concentração da SQR e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração da SQR e da amostra foram feitas três réplicas.

Os tubos de ensaio foram incubados em banho de aquecimento a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com agitador orbital, por 4 horas. Após o período de incubação, em todos os tubos foram adicionados 500 μL de solução de formaldeído 12%, a fim de interromper o crescimento bacteriano. Posteriormente, o espectrofotômetro foi zerado pelo tubo de ensaio contendo o controle negativo e as leituras de absorvância foram efetuadas no comprimento de onda de 530 nm.

Em cada ensaio, os resultados foram analisados estatisticamente e a potência foi calculada.

6.2.2.7 Obtenção da curva analítica

Para a construção da curva analítica, utilizou-se o delineamento 3 x 3 como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração em função da média das absorvâncias de cada uma das concentrações da SQR. Foram realizadas três curvas, em três dias diferentes.

6.2.2.8 Cálculo da potência de aztreonam na amostra

A potência do medicamento foi calculada pela Equação de Hewitt (2004), a qual está descrita na Equação 6.8. A equação utiliza as médias das leituras de absorvância dos tubos de ensaio obtidas com as três concentrações da SQR e da amostra, nos 18 tubos analisados em cada ensaio.

$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100$ $M = \frac{F}{b}$ $b = \frac{E}{I}$	Equação 6.8
---	--------------------

Em que:

I = logaritmo da razão das doses;

$F = 1/3[(A_1 + A_2 + A_3) - (P_1 + P_2 + P_3)]$

$E = 1/4 [(A_3 + P_3) - (A_1 + P_1)]$

6.2.3 Validação do método

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013).

6.2.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela obtenção de três curvas analíticas, em três dias diferentes. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada pela análise de variância (ANOVA).

6.2.3.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade foi comprovada utilizando solução do excipiente, para verificar sua interferência na resposta do fármaco. Além disso, foi verificada quanto à presença de produtos de degradação, submetendo a amostra em condição acelerada de degradação.

Soluções de amostra de aztreonam (40 µg/mL) foram submetidas à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra e fotolítica. A solução da amostra foi preparada em HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M para as hidrólises ácida e básica, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 60°C em banho. A degradação neutra foi realizada através da exposição da solução da amostra à temperatura de 60°C. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução da amostra à luz ultravioleta, utilizando uma câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm) com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

Desta maneira, a especificidade do método foi estabelecida através do resultado da potência nos tempos de 1, 6, 24 e 48 horas.

6.2.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da leitura de sete réplicas de aztreonam SQR, na concentração de 40 µg/mL, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista. O desvio padrão relativo (DPR%) entre as análises foi calculado. A precisão intermediária (interdias e entre analistas) foi avaliada através da realização de determinações da potência de aztreonam na amostra de pó liofilizado de soluções injetáveis em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.2.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada empregando o ensaio de recuperação, utilizando o método de adição da SQR (ICH, 2005). O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis R1, R2 e R3, de SQR às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata e a porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta forma, foi possível avaliar a exatidão do método em determinar a potência de amostras com concentrações pré-estabelecidas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 6.9.

Tabela 6.9. Preparo das soluções para o teste de recuperação do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

	Volume adicionado de amostra (500 µg/mL) (µL)	Volume adicionado de SQR (500 µg/mL) (µL)	Concentração teórica final (µg/mL) ¹
A	480	-	24
R1	480	160	32
R2	480	320	40
R3	480	480	48
SQR	-	480	24

¹valor é a média de três determinações

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 6.4, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) e descrita na seção 6.1.3.4.

6.2.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de modificações nas condições experimentais estabelecidas, tais como: comprimento de onda (525 e 535), volume do inóculo (9,5 mL e 10,5 mL) e tempo de incubação (3h55 min e 4h05 min). Foram realizadas determinações da potência de aztreonam na amostra de pó liofilizado para solução injetável nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.2.4 Resultados e discussão

6.2.4.1 Ensaios preliminares

De acordo com os resultados obtidos nos testes preliminares, foram estabelecidos os parâmetros para o desenvolvimento e validação do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico (Tabela 6.10).

Tabela 6.10. Parâmetros estabelecidos para a determinação do aztreonam em pó liofilizado de solução injetável do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393
Meios de cultura	Caldo casoy
Solução diluente	Água
Concentração do inóculo	6%
Concentrações SQR de aztreonam	5,0; 40,0 e 320,0 µg/mL

Na determinação dos parâmetros para a padronização do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, foram testados os micro-organismos Gram-negativos presentes no laboratório, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Escherichia coli*. No entanto, foi possível notar que a *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou crescimento uniforme nos caldos nutrientes testados, formando colônias em forma de aglomerados ao invés de turvar o meio. Este fato tornou inviável a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro de maneira precisa e confiável. Em relação à *Salmonella*, não foi verificada linearidade adequada, ou seja, não houve correlação apropriada entre as concentrações do antibiótico. Portanto, optou-se pela *Escherichia coli*, pois o crescimento foi homogêneo e mostrou resultados reprodutíveis e adequados.

Em relação aos meios de cultura testados, os caldos BHI e Casoy apresentaram resultados satisfatórios. Então, foi escolhido o caldo Casoy para a realização deste ensaio. Quanto às soluções diluentes testadas, água, soluções-tampão pH 6,0 e pH 8,0, apresentaram resultados parecidos. Assim, optou-se pelo uso da água devido à praticidade de seu uso e economia do material necessário para o preparo das soluções-tampão. Dentre as várias concentrações de inóculo testadas, a concentração de 6% apresentou os melhores resultados, devido ao crescimento adequado do micro-organismo. Foram selecionadas as concentrações de 5,0; 40,0 e 320,0 µg/mL com razão de 8, pois apresentaram melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010), enquanto as concentrações com razão menor não mostravam linearidade satisfatória.

6.2.4.2 Obtenção da curva analítica

Os resultados dos valores de absorvância obtidos para a construção da curva analítica para aztreonam SQR, utilizando água como solvente estão apresentados na Tabela 6.11.

Tabela 6.11. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de aztreonam SQR, pelo ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

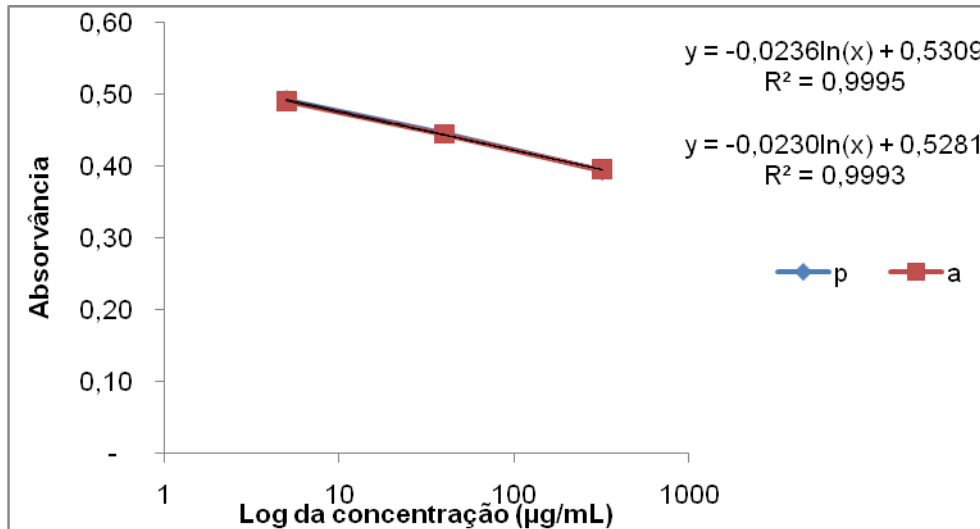
	Concentração (µg/mL)	Absorvância ¹	Absorvância média	DPR (%) ²
P ₁	5,0	0,495	0,492	0,48
		0,490		
		0,492		
P ₂	40,0	0,443	0,445	0,99
		0,450		
		0,442		
P ₃	320,0	0,398	0,394	1,06
		0,390		
		0,394		
A ₁	5,0	0,492	0,491	0,22
		0,490		
		0,448		
A ₂	40,0	0,440	0,445	1,01
		0,447		
		0,396		
A ₃	320,0	0,391	0,395	0,90
		0,398		
		0,398		

¹cada valor é a média de três determinações;

²DPR (%) = desvio padrão relativo.

As curvas analíticas de aztreonam SQR e de amostra (Figura 6.4) foram construídas com as médias dos valores de absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

Figura 6.4. Representação gráfica da curva analítica da solução de aztreonam SQR e amostra, em concentração de 5,0; 40,0 e 320,0 µg/mL, no ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.



A equação da reta, determinada através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados são: $y = -0,0236\ln(x) + 0,5309$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9995, para aztreonam SQR e $y = -0,0230\ln(x) + 0,5281$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9993, para a amostra.

6.2.5 Validação do método

6.2.5.1 Linearidade

A análise de variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) para ensaio 3 x 3 foi calculada para os dados da curva analítica de aztreonam SQR e amostra (Tabela 6.12).

Tabela 6.12. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR e amostra, utilizando o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

Fontes de variação	GL ¹	SQ ²	QM ³	F _{calculado}	F _{tabelado}
Preparação	1	0,0000	0,0000	0,04	4,96
Regressão	1	0,0282	0,0282	2039,99*	4,96
Paralelismo	1	0,0000	0,0000	0,42	4,96
Quadrático	1	0,0000	0,0000	1,19	4,96
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,00	4,96
Entre doses	5	0,03	0,01	408,33*	3,33
Entre tubos	2	0,00	0,00	0,51	4,10
Entro (erro)	10	0,00	0,00	-	-
Total	17	0,03	-	-	-

*Significativo para p<5%

¹GL = graus de liberdade

²SQ = soma dos quadrados

³QM = quadrados médios

A linearidade do método foi comprovada pelos componentes de paralelismo, coeficiente de correlação e análise de variância dos dados da curva analítica. A análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de correlação são 0,9995 e 0,9993, para aztreonam SQR e amostra, respectivamente, valores próximos da unidade, os quais são excelentes tratando-se de um ensaio biológico. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra.

6.2.5.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade do método proposto demonstram que não existe interferência do excipiente, pois este não apresenta resposta frente ao micro-organismo. Além disso, foi verificada quanto à presença de produtos de degradação, submetendo a amostra em condições acelerada de degradação. A Tabela 6.13 apresenta os valores, em porcentagem, das perdas das potências da amostra a partir das respectivas condições de degradação.

Tabela 6.13. Resultado da potência após degradação de aztreonam na concentração de 40 µg/mL, obtidas do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

Tempo (h)	Degradação Ácida (%)	Degradação Básica (%)	Degradação Neutra (%)	Degradação Fitolítica (%)
1	100,49	89,24	100,87	100,46
6	100,24	70,31	100,24	100,92
24	94,42	-	99,53	100,73
48	77,26	-	99,35	98,84

Para a análise dos dados obtidos, é possível observar que a solução da amostra foi mais estável em condições fitolítica e neutra e a máxima degradação foi observada pela condição básica, na qual em 1 hora o fármaco apresentou perda da potência (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Para a degradação ácida, a perda da potência aconteceu em tempo inferior a 48 horas. Os resultados mostraram a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto, o qual pode ser aplicado para análise quantitativa de aztreonam na forma farmacêutica de pó para solução injetável em ensaios microbiológicos pelo método turbidimétrico.

6.2.5.3 Precisão

A precisão do método foi determinada por meio de três parâmetros: repetibilidade (intradia), precisão intermediária (interdias e entre analistas). Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR%. A repetibilidade (intradia), na qual a concentração de 40,0 µg/mL de aztreonam SQR foi repetida sete vezes, forneceu DPR% de 1,87%. A precisão intermediária (interdias) foi realizada em três dias consecutivos e entre-analistas. As potências encontradas estão apresentadas na Tabela 6.14.

Tabela 6.14. Valores determinados de potência de aztreonam em pó para solução injetável na avaliação da precisão do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

		Resposta analítica		
		Potência (%)	Potência média (%)	DPR ¹ (%)
Precisão intermediária	Dia 1	95,19		
	Dia 2	96,36	95,65	0,65
	Dia 3	95,40		
	Analista 1	95,58	96,05	0,69
	Analista 2	96,52		

¹DPR = desvio padrão relativo

Os testes de repetibilidade e precisão intermediária demonstraram DPR% satisfatórios, pois os valores se encontram abaixo de 5%, estabelecidos pela RE nº 899 (BRASIL, 2003),

validando assim a precisão do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico. Além disso, as potências obtidas em três dias consecutivos pelo mesmo analista e, em um mesmo dia por analistas diferentes, foram de 95,65% e 96,05% com DPR de 0,65 e 0,69%, respectivamente, as quais estão dentro do permitido que é de 90 a 105% (USP 36, 2013).

6.2.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação. A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 6.4, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002), descrita na seção 6.1.3.4 e os valores estão apresentados na Tabela 6.15.

Tabela 6.15. Valores do teste de recuperação do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

	Aztreonam SQR adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Aztreonam SQR encontrado ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%) ²
R1	32	31,92	99,75		1,03
R2	40	39,93	99,82	99,95	0,45
R3	48	48,14	100,29		0,48

¹cada valor é a média de três determinações;

²DPR (%) = desvio padrão relativo.

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição do padrão, obtendo-se a recuperação média de 99,95%, comprovando a capacidade do método em determinar teores pré-definidos de maneira exata.

6.2.5.5 Robustez

A robustez foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos pela variação no comprimento de onda (525 e 535 nm), volume do caldo (9,5 e 105 mL) e tempo de incubação (3h55 minutos e 4h05 minutos). Os valores dos DPR% obtidos após estas modificações são apresentados na Tabela 6.16.

Tabela 6.16. Valores dos DPR% obtidos na avaliação da robustez do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

Variável	Faixa investigada	DPR ¹ (%)
Comprimento de onda	525 nm	1,31
	530 nm	
	535 nm	
Volume do caldo nutriente	9,5 mL	0,24
	10 mL	
	10,5 mL	
Tempo de incubação	3h55 minutos	0,90
	4h	
	4h05 minutos	

¹DPR = desvio padrão relativo

A robustez do método apresentou valores de DPR% abaixo de 5%, comprovando que pode haver pequenas modificações nestes parâmetros sem influenciar de maneira significativa a análise do fármaco. Portanto, o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico é robusto.

Os parâmetros propostos para a validação do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico mostrou-se linear, específico, seletivo, preciso, exato e robusto, atendendo a todas as exigências para a adequada quantificação de aztreonam em pó para solução injetável, podendo ser utilizado com segurança nas análises de rotina do controle de qualidade.

6.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação de uma mistura, realizada pela distribuição dos componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo, fase estacionária (sólida) e a fase móvel (líquida). A separação ocorre por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, resultando em migrações diferenciais destes componentes (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998; USP 36, 2013; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Há dois principais modos de separação em CLAE: fase normal e fase reversa. A fase normal é composta por uma fase estacionária mais polar (com grupos amina, nitrila, ciano ou diol) do que a fase móvel. A fase móvel é constituída por solventes orgânicos, sem adição de água, tornando-se mais cara, exceto quando utilizada para separação de compostos iônicos (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010) e o principal mecanismo de separação é a adsorção, no qual ocorre o acúmulo de uma substância sobre uma superfície. A fase reversa consiste na utilização de uma fase estacionária de menor polaridade (octil, octadecil, silano, fenil, etc) e uma fase móvel de maior polaridade. O principal mecanismo de separação é a partição, que é

baseada nas diferentes afinidades que os componentes da amostra apresentam pela fase móvel e fase estacionária, portanto, os componentes mais solúveis na fase estacionária são retidos e, os menos solúveis são transportados com maior velocidade pela fase móvel (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; LANÇAS, 2009). Esta fase apresenta várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel, facilidade de empregar eluição por gradiente, maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridade, massas molares e funcionalidades químicas (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

A CLAE em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHL et al., 2002). Esta técnica analítica está sendo utilizada em várias áreas da ciência, com destaque para o acompanhamento de síntese, em análises de pesticidas, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998), porque possibilita obter dados qualitativos e quantitativos de amostras de ampla variedade de polaridade em uma única corrida, diversos modos de detecção que podem aumentar a especificidade e a informação sobre o teor, além de ser aceita com confiabilidade pelas agências regulatórias (KARCHER et al., 2005).

As principais vantagens da CLAE são: alta eficiência através de picos estreitos e bem definidos, alta resolução, análises rápidas, baixos limites de detecção, versatilidade, mecanização, excelente reprodutibilidade e repetibilidade e obtenção de resultados qualitativos e quantitativos confiáveis. Esta técnica ainda pode ser melhorada com a capacidade de ser incorporada a outros sistemas de detecção como o detector de fluorescência e o espectrômetro de massas. A CLAE possui algumas limitações, tais como o custo da instrumentação e da operação, alto consumo de solventes e necessidade de profissionais capacitados (HARRIS, 2005; COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Com o objetivo de aperfeiçoar o sistema, melhorando a constituição da fase móvel, diminuir o desgaste da coluna, tempo de análise, gasto de reagentes e, principalmente, minimizar a geração de resíduos, desenvolveu-se um novo método analítico para quantificação de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável por CLAE, utilizando como fase móvel uma mistura de água e etanol, com pH 2,6 ajustado com ácido acético.

6.3.1 Material

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com aztreonam SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, E.U.A.), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 μ L (Rheodyne Breeze, CA, E.U.A.), equipado com

software Empower. A separação cromatográfica foi realizada através de condições isocráticas de fase reversa em coluna Agilent Zorbax C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm (Agilent, Santa Clara, CA, E.U.A.).

Os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica, modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça); micropipetador (Digipet, PR, Brasil), ultra-som USC2800A (Unique, Indaiatuba, Brasil).

Para as fases móveis, os solventes utilizados foram: água purificada Milli-Q (Millipore, U.S.A.), ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol (J.T. Baker, Xelostoc, México). Todos os solventes foram de grau analítico. Para os estudos de degradação forçada, foram utilizados os seguintes solventes: ácido acético glacial (Quemis, Florianópolis, Brasil), solução de hidróxido de sódio 0,1 M (Synth, Diadema, Brasil) e solução de peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Brasil) 3%. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, E.U.A.).

6.3.2 Método

6.3.2.1 Condições analíticas

Após o desenvolvimento da metodologia foi definido as condições cromatográficas para a análise por CLAE (Tabela 6.17)

Tabela 6.17. Condições cromatográficas para a determinação de aztreonam pelo método de CLAE.

Parâmetros	Descrições
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 250 mm
Vazão (mL/min)	0,5
Fase móvel	água:etanol (70:30, v/v) pH 2,6 ajustado com ácido acético
Deteccção	292 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25°C ± 2°C
Tempo de retenção	4,9 minutos

6.3.2.2 Preparo da fase móvel

Para a fase móvel, foram preparadas soluções aquosas de água purificada e etanol, com pH 2,6 ajustado com ácido acético. A fase móvel foi filtrada e desgaseificada durante 30 minutos em ultrasom.

6.3.2.3 Preparo da solução de aztreonam SQR

Foram pesados analiticamente 10 mg de aztreonam SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões

volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com as concentrações finais requeridas, as quais foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.3.2.4 Preparo da solução de aztreonam na amostra

O conteúdo de 20 frascos-ampolas contendo 1 g de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam foi adicionado a um recipiente adequado e homogeneizado; a partir deste *pool* de amostras pesou-se o equivalente a 10 mg de aztreonam e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução com concentração de 100 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com as concentrações finais requeridas, as quais foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.3.2.5 Obtenção da curva analítica

Para a realização da curva analítica, foram pesadas massas equivalentes a 10 mg de aztreonam SQR, depois transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com fase móvel, para obtenção da concentração de 100 µg/mL. Alíquotas de 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, e os volumes foram completados com fase móvel, para obtenção das concentrações de 45, 55, 65, 75, 85 e 95 µg/mL de aztreonam SQR. Cada concentração foi preparada em triplicata e submetida à filtração antes das injeções.

6.3.2.6 Cálculo do teor de aztreonam na amostra

A concentração de aztreonam na amostra foi calculada pela Equação 6.2 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 6.3, ambas descritas na seção 6.1.2.5.

6.3.3 Validação do método

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007; BONFILIO et al., 2012; USP 36, 2013). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, especificidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

6.3.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio do cálculo da regressão linear, através dos mínimos quadrados e ANOVA. Foram utilizadas seis concentrações de aztreonam SQR (45, 55, 65, 75, 85 e 95 µg/mL). As curvas analíticas foram preparadas e analisadas durante três dias.

6.3.3.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Para verificação do desempenho do sistema cromatográfico selecionado, foram preparadas e injetadas seis soluções de aztreonam SQR na concentração de 75 µg/mL. Após

esta etapa, foram calculados os seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_R), área do pico, números de pratos (N), fatores de cauda (FC), de assimetria (A_s) e de capacidade (k'). Além disso, foram calculados e analisados os valores de DPR% para cada parâmetro.

Os valores de t_R e área do pico cromatográfico foram fornecidos pelo *software* do equipamento de CLAE utilizado.

O número de pratos (N) é definido como uma medida da eficiência da coluna cromatográfica e é calculado pela Equação 6.9 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JP, 2011; USP 36, 2013).

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Equação 6.9}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção da substância analisada (em minutos);

W_b = largura do pico à meia altura, medido a partir de sua base

Os fatores de cauda (FC) e de assimetria (A_s) foram calculados segundo as Equações 6.10 e 6.11, respectivamente, sendo A_s calculado a 10% da altura do pico e FC calculado a 5% desta altura.

$$FC = \frac{(a+b)}{2f} \quad \text{Equação 6.10}$$

$$A_s = \frac{b}{a} \quad \text{Equação 6.11}$$

Em que:

a e b = distâncias entre o sinal máximo do pico até as linhas verticais e perpendiculares à linha de base que interceptam o traço a 10% de sua altura;

f = distância entre o sinal máximo do pico até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a 5% de sua altura.

O fator de capacidade (k') é a medida da posição de interesse relativo ao volume morto (composto não retido) (FDA, 1994; USP 36, 2013), por sua vez, calculado através da Equação 6.12.

$$K = \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right) \quad \text{Equação 6.12}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção;

t_0 = tempo de retenção do composto não retido (volume morto).

As equações foram baseadas em informações das seguintes fontes: COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006 e PASCHOAL et al., 2008.

6.3.3.3 Especificidade, Seletividade e estudos de degradação

A especificidade é a habilidade de um método analítico medir a presença do analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005). Um método analítico que produz resposta para um único analito é um método específico, enquanto que, um método que produz respostas para diferentes analitos, mas que consegue identificar a resposta de um composto na presença de outros, é um método seletivo (INMETRO, 2007).

A especificidade e seletividade foram comprovadas por meio de solução do excipiente, para verificar se houve interferência na resposta do fármaco. Além disso, foi verificado a capacidade indicadora de estabilidade, submetendo a solução da amostra (75 µg/mL) à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica, para avaliar a interferência na quantificação de aztreonam (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A solução da amostra foi preparada em HCl 0,1 M e NaOH 0,01 M na hidrólise ácida e básica, respectivamente. Optou-se por utilizar NaOH 0,01 M, pois quando o fármaco era submetido ao NaOH 0,1 M, ele degradava rapidamente. As amostras foram aquecidas a 60°C em banho, resfriadas e neutralizadas. A degradação neutra foi realizada através da exposição da solução da amostra à temperatura de 60°C em banho. Para a degradação oxidativa, a solução da amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (p/v) e depois submetida à temperatura de 60°C. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução da amostra à luz ultravioleta, utilizando uma câmara espelhada (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W. Desta maneira, a especificidade do método foi estabelecida através do resultado do teor nos tempos de 1, 6, 24, 48, 72 e 168 horas.

6.3.3.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois requisitos: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da análise de sete injeções de aztreonam SQR na concentração de 75 µg/mL, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista. O desvio padrão relativo (DPR %) entre as análises foi calculado. A precisão intermediária (interdias e entre analistas) foi avaliada através da realização do doseamento da amostra em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados.

6.3.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de aztreonam SQR foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. O teste de recuperação foi realizado em três níveis R1, R2 e R3. O ensaio foi realizado em triplicata e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 6.18.

Tabela 6.18. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico.

	Aztreonam amostra (µg/mL) (mL)	Aztreonam SQR (µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
A	2,25	-	45
R1	2,25	0,75	60
R2	2,25	1,50	75
R3	2,25	2,25	90
SQR	-	2,25	45

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 6.4, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) e descrita na seção 6.1.3.4.

6.3.3.6 Robustez

Para a avaliação da robustez, os seguintes parâmetros foram variados individualmente: marca do etanol, vazão, comprimento de onda, temperatura, volume de injeção, coluna e preparação da solução. Para isso, foram realizados doseamentos de aztreonam na amostra de pó liofilizado para solução injetável nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.3.3.7 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, conforme as Equações 6.5 e 6.6, descritas nas seções 6.1.3.6 e 6.1.3.7, respectivamente.

6.3.4 Resultados e discussão

As características do cromatograma da SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável foram discutidas na análise qualitativa deste trabalho (Capítulo 5, seção 5.11).

6.3.4.1 Obtenção da curva analítica

A Tabela 6.19 apresenta os valores das áreas obtidas na construção da curva analítica para aztreonam SQR utilizando o método cromatográfico.

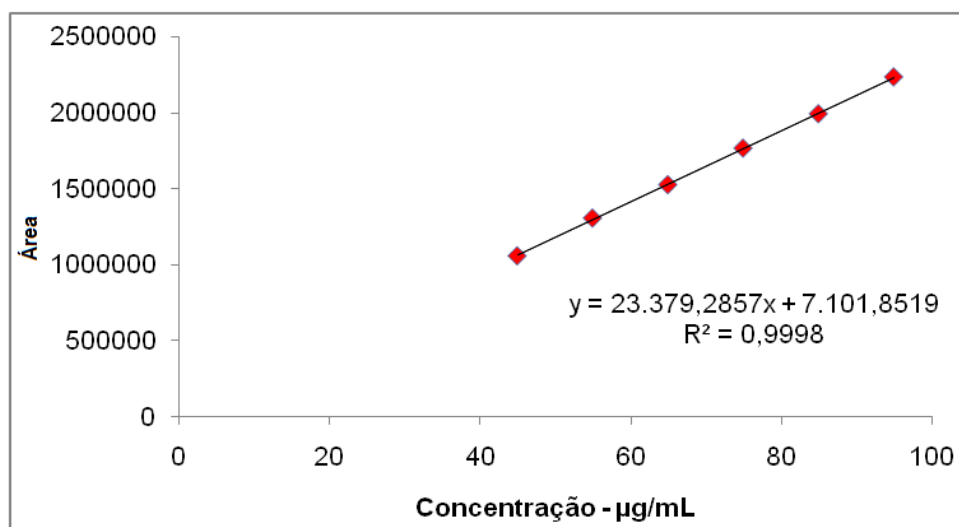
Tabela 6.19. Valores das áreas referentes ao pico de aztreonam SQR para a construção da curva analítica, utilizando como fase móvel água:etanol (70:30 v/v) com pH 2,6 ajustado com ácido acético a 292 nm.

Concentração (µg/mL)	Área	Área média	DPR ¹ (%)
	1053831		
45	1056056	1054371	1,02
	1053225		
	1312699		
55	1291591	1302369	0,81
	1302817		
	1523634		
65	1513341	1522752	0,84
	1531282		
	1757104		
75	1750181	1762611	1,25
	1780548		
	1990549		
85	1982008	1988589	1,09
	1993210		
	2223701		
95	2233366	2231217	0,97
	2236585		

¹ desvio padrão relativo

A curva analítica de aztreonam SQR (Figura 6.6) foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas.

Figura 6.6. Curva analítica da solução de aztreonam SQR pelo método cromatográfico, utilizando como fase móvel água:etanol (70:30 v/v) com pH 2,6 ajustado com ácido acético a 292 nm.



Os resultados apresentados na Tabela 6.20 e Figura 6.6 demonstraram que o método possui linearidade na faixa de concentração de 45 a 95 µg/mL, com coeficiente de correlação (r) de 0,9998, valor muito próximo à unidade, o que mostra a linearidade do método. A equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi $y = 23.379,2857x + 7.101,8519$.

6.3.5 Validação do método

6.3.5.1 Linearidade

A análise de variância (ANOVA) calculada para os dados da curva analítica de aztreonam é mostrada na Tabela 6.22.

Tabela 6.20. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR, utilizando o método por CLAE.

Fontes de variação	GL ¹	SQ ²	Variância	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre doses	5	2,9786E+12	5,9571422E+11	361,04*	3,10
Regressão linear	1	2,9782E+12	2,9781551E+12	1804,95*	4,74
Desvio de linearidade	4	4,1601E+08	1,0400237E+08	0,06	3,25
Resíduo	12	1,9800E+10	1,6499890E+09	-	-
Total	17	2,9984E+12	-	-	-

*Significativo para p<5%

¹GL = graus de liberdade

²SQ = soma dos quadrados

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 45 a 95 µg/mL, com coeficiente de correlação (r) de 0,9998. A análise estatística dos resultados das áreas obtidas na

construção da curva analítica foi verificada pela análise de variância, mostrando que o método apresentou regressão linear significativa, visto que o F calculado (1804,95) foi superior ao F tabelado (4,74) para este requisito. Além disso, a análise estatística também mostrou que não houve desvio significativo da linearidade, já que o F calculado (0,06) foi menor que o F tabelado (3,25), a um nível de significância de 5%.

6.3.5.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi analisada pelos seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_R), área do pico, número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC) e de assimetria (A_s). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.21.

Tabela 6.21. Análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de aztreonam pelo método por CLAE.

	Fator de assimetria	Fator de cauda	Número de pratos	Tempo de retenção	Fator de capacidade	Área
	0,50	0,50	3536,29	5,053	2,272	1759589
	0,50	0,50	3461,11	4,999	2,238	1744211
	0,50	0,50	3459,73	4,998	2,237	1735456
	0,50	0,50	3463,88	5,001	2,239	1741344
	0,50	0,50	3473,58	5,008	2,284	1741856
	0,50	0,50	3459,73	4,998	2,247	1742060
Média	0,50	0,50	3475,72	5,013	2,253	1744086
DPR¹ %	0,00	0,00	0,87	0,61	0,89	0,47

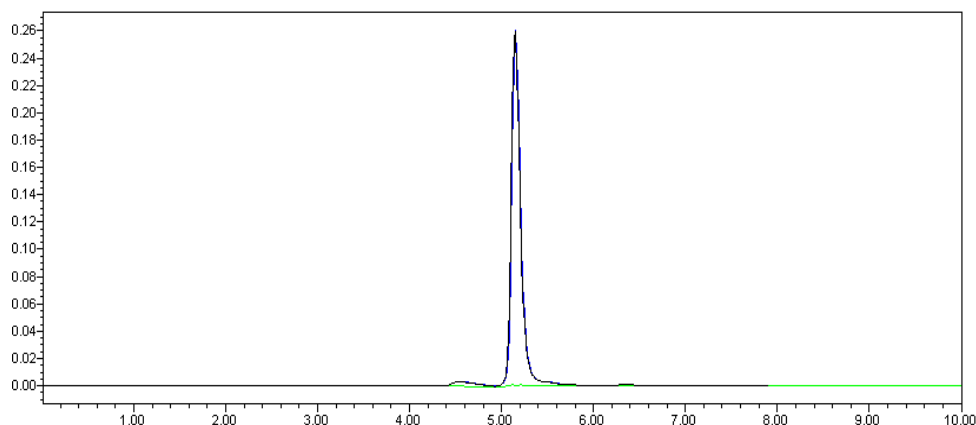
¹Desvio Padrão relativo

O teste de adequabilidade visa demonstrar que o sistema é adequado para as análises pretendidas, e mostraram que os parâmetros cromatográficos escolhidos são capazes de fornecer resultados com precisão e exatidão confiáveis, visto que o número de pratos foi superior a 2000 e os valores médios dos fatores de assimetria e de cauda estiveram abaixo do valor limite de 2,0. Além disso, o valor médio calculado para o fator da capacidade também se mostrou apropriado, acima de 2,0. Do mesmo modo, foi verificada precisão adequada entre os valores de tempo de retenção e de área dos picos cromatográficos, cujos desvios padrão relativos percentuais (DPR %) se encontram abaixo de 2%, que é o recomendado para testes de conformidade do sistema (FDA, 1994).

6.3.5.3 Especificidade, Seletividade e estudos de degradação

A Figura 6.7 apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos com a SQR, amostra de pó liofilizado para soluções injetáveis de aztreonam e excipiente (L-arginina). Os cromatogramas são semelhantes, demonstrando que o excipiente presente na amostra não interfere na absorção, e, portanto comprova a especificidade do método cromatográfico.

Figura 6.7. Cromatograma obtido por CLAE para solução de aztreonam SQR (preto), amostra (azul) e excipiente (verde).



O estudo de degradação forçada da amostra de aztreonam em pó liofilizado de solução injetável foi realizado para verificar as propriedades indicadoras de estabilidade do método proposto. A Tabela 6.22 apresenta os dados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra. As Figuras 6.8, 6.9, 6.10, 6.11 e 6.12 apresentam os cromatogramas obtidos com as degradações ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica, respectivamente.

Tabela 6.22. Resultados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável para avaliação da seletividade do método por CLAE.

	Ácida	Básica	Neutra	Oxidativa	Fotolítica
	48 horas:	168 horas:	168 horas:	1 hora:	168 horas:
Perda (%)	14,86	0,82	19,04	18,02	1,53
Pico adicional (minutos)	4,3	Não observado	5,5	4,5	Não observado

Figura 6.8. Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) após 48 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero; azul: tempo 48 horas.

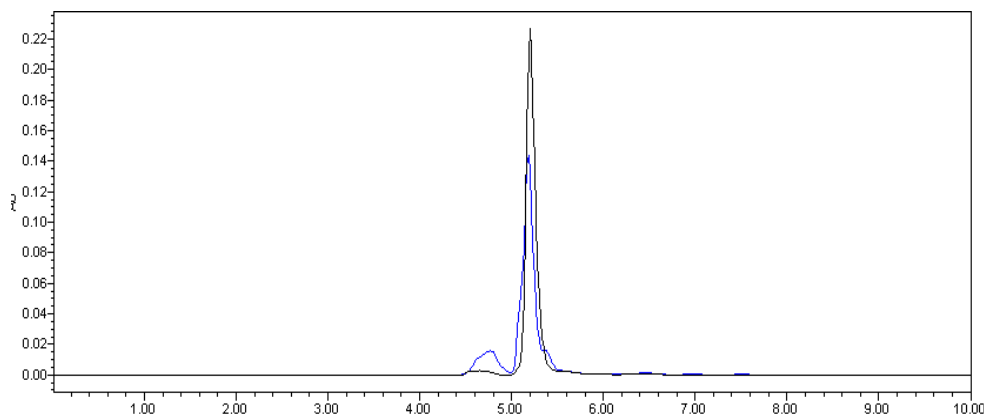


Figura 6.9. Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio básico (NaOH 0,01 M) após 168 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero; azul: tempo 168 horas.

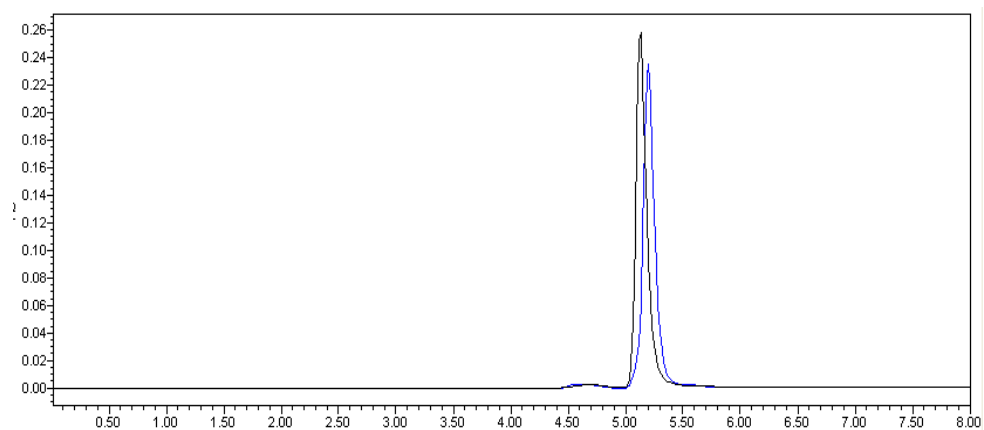


Figura 6.10. Cromatograma da amostra de atreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio neutro (fase móvel) após 168 horas a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero; azul: tempo 168 horas.

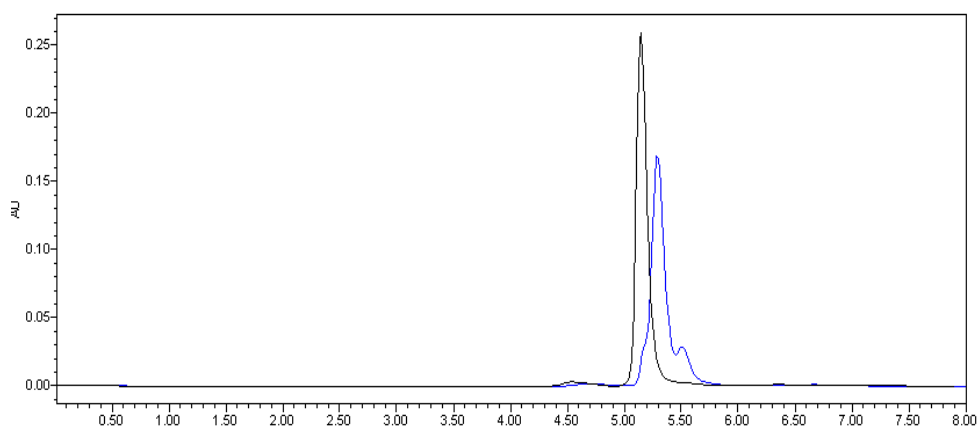


Figura 6.11. Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação em meio oxidativa (peróxido de hidrogênio 3%) após 1 hora a 60°C. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero; azul: tempo 1 hora.

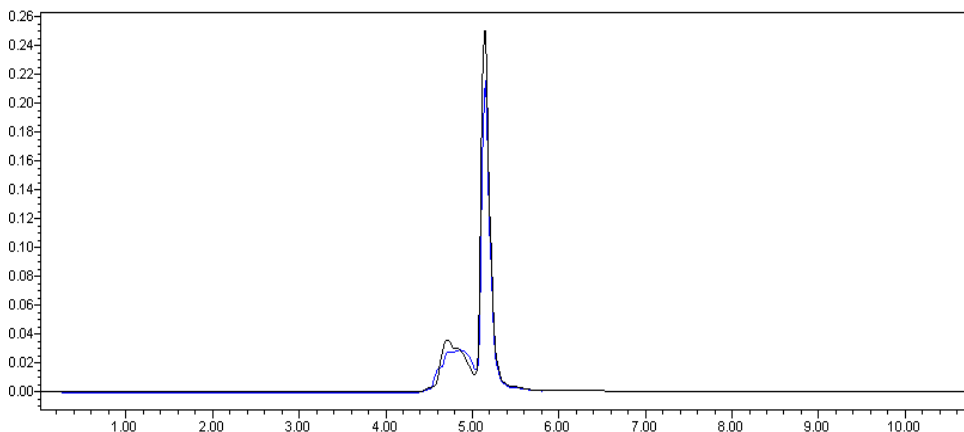
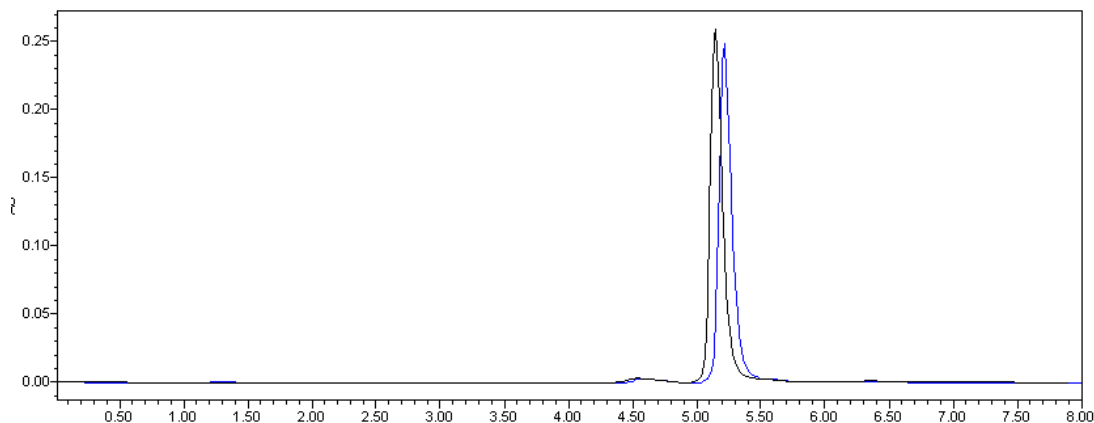


Figura 6.12. Cromatograma da amostra de aztreonam (75 µg/mL) submetido à degradação fotolítica (luz UVC 254 nm) após 168 horas. Fase móvel: água:etanol (70:30 v/v), com pH 2,6 ajustado com ácido acético. Fase estacionária: Agilent Zorbax 250 x 4,6 mm; 5 µm). Preto: tempo zero; azul: tempo 168 horas.



O estudo de degradação forçada da amostra de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável mostrou que em todas as condições às quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de aztreonam e formação de novos picos nos cromatogramas das condições ácida, neutra e oxidativa. A amostra foi mais estável em condição básica e fotolítica, não apresentando perda de teor e nem aparecimento de novos picos. A maior degradação foi observada na condição oxidativa, com perda do teor em apenas 1 hora de aquecimento. Na degradação ácida e neutra, houve perda de 14,86% e 19,04%, respectivamente, com aparecimento de novos picos. Desta forma, este estudo mostrou que o método possui adequada seletividade, visto que foi possível quantificar o aztreonam mesmo na presença de seus produtos de degradação. Além disso, este estudo demonstrou a aplicabilidade do método para a indicação de estabilidade do fármaco.

6.3.5.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: repetibilidade, precisão intermediária interdia e entre analista. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR%. A repetibilidade forneceu um valor de DPR% de 0,55% para sete réplicas de aztreonam SQR na concentração de 75 µg/mL, preparadas individualmente. Os valores de DPR% apresentados pelos parâmetros da precisão intermediária interdia e entre analista foram de 0,30% e 1,31%, respectivamente. Os teores encontrados estão apresentados na Tabela 6.23.

Tabela 6.23. Determinação do teor de aztreonam interdias e entre-analistas por CLAE.

Resposta analítica				
		Teor (%)	Teor médio (%)	DPR¹ (%)
Precisão intermediária	Dia 1	95,57		
	Dia 2	95,06	95,39	0,30
	Dia 3	95,56		
	Analista 1	94,56	93,69	1,31
	Analista 2	92,82		

¹desvio padrão relativo

O método proposto demonstrou ser apropriado para quantificar o fármaco, pois as médias de teores encontrados foram próximas, estando os desvios abaixo de 5%, comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003; FDA, 2000; USP 36, 2013).

6.3.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 6.24.

Tabela 6.24. Determinação da exatidão do método analítico para análise de aztreonam por CLAE.

	Aztreonam SQR adicionado (µg/mL)	Aztreonam SQR encontrado (µg/mL)¹	Recuperação (%)	DPR² (%)	Recuperação média (%)
R1	60	58,98	98,3	0,50	
R2	75	74,14	98,8	0,87	98,56
R3	90	88,80	98,6	1,23	

¹cada valor é a média de três determinações;

²DPR = desvio padrão relativo.

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição do padrão, obtendo-se a recuperação média de 98,56%, comprovando a exatidão do método proposto, pois os valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

6.3.5.6 Robustez

A robustez do método foi determinada por meio de modificações nos parâmetros, tais como: marca do etanol, vazão, temperatura, comprimento de onda, volume de injeção, coluna e preparação da solução. Na execução de análises sob os parâmetros alterados, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme mostra a Tabela 6.25.

Tabela 6.25. Valores dos DPR% obtidos na avaliação da robustez do método analítico para análise de aztreonam por CLAE.

Variável	Faixa investigada	DPR ¹ (%)
Marca do etanol	J.T. Baker	0,07
	Tedia	
Vazão (mL/min)	0,48	0,24
	0,50	
	0,52	
Temperatura	18°C	0,23
	26°C	
Comprimento de onda (nm)	290	0,11
	292	
	294	
Volume de injeção (µL)	18	0,21
	20	
	22	
Coluna	Agilent	0,37
	Waters	
Preparação da amostra	Água purificada	0,83
	Fase móvel	

¹ desvio padrão relativo

Os valores de DPR% se mostraram abaixo de 5,0%, comprovando que pequenas modificações nestes parâmetros não influenciam de maneira significativa a análise do fármaco.

6.3.5.7 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados de acordo com as Equações 6.5 e 6.6, respectivamente, e os valores encontrados foram 1,58 e 4,80 µg/mL, respectivamente. Estes valores indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade aztreonam em pó liofilizado para solução injetável

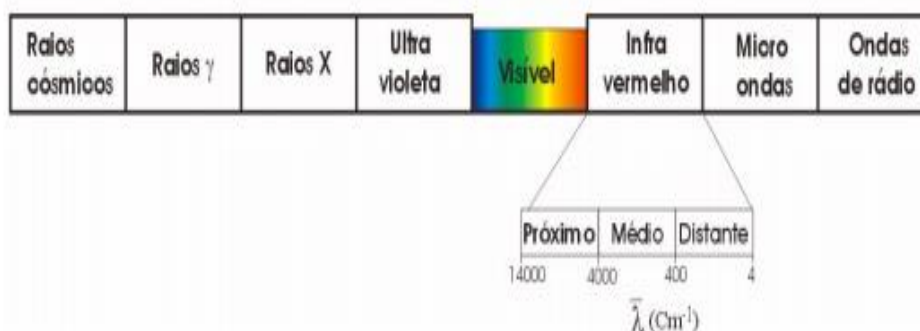
O método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de métodos cromatográficos (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007; USP 36, 2013; BONFILIO et al., 2012). Além disso, apresenta vantagens em relação aos encontrados na literatura, uma vez que não emprega tampões na fase móvel, a vazão utilizada

é menor e a fase móvel é muito simples. Assim, foi capaz de quantificar aztreonam em pó liofilizado para solução injetável, além de ser capaz de avaliar sua estabilidade, podendo ser uma alternativa mais prática, econômica e ambientalmente favorável para análises de rotina de controle de qualidade deste fármaco.

6.4. Espectrofotometria na região do Infravermelho

A região visível do espectro eletromagnético compreendida em comprimentos de onda de 10^{-5} m é a radiação visível ao olho humano, que é contínua e policromática. Outros sistemas de detecção podem revelar radiações mais distantes que a região visível, estas radiações são classificadas como: raios- γ (10^{-11} m), raios-X (10^{-9} m), raios ultravioleta (UV- 10^{-7} m), infravermelho (próximo- 10^{-4} , médio- 10^{-3} e distante- 10^{-2} m), micro-ondas (10^{-1} m) e ondas de rádio (10^3 m), como mostra a Figura 6.13 (STUART, GEORGE, McINTYRE, 1998). Das três regiões do infravermelho, a região vibracional do infravermelho médio, é a mais utilizada para fins de identificação de compostos (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010).

Figura 6.13. Espectro eletromagnético.



Fonte: SOUZA e JUNQUEIRA, 2005.

A espectrofotometria no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das moléculas possuem frequências vibracionais naturais, as quais correspondem a níveis energéticos ou vibracionais da molécula (PAVIA et al., 2010). É uma técnica de análise bastante rápida e não invasiva que se baseia na observação das vibrações de moléculas que são excitadas por um feixe de radiação na zona do infravermelho. Através do exame da luz transmitida é possível verificar quanta energia foi absorvida em cada comprimento de onda (JEFFERY et al., 1992; CORDELLA et al., 2002; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

A espectrofotometria no infravermelho tem sido adotada como uma ferramenta analítica em várias áreas, tendo superado, em vários casos, os métodos tradicionais. As principais razões para a sua grande aceitação são a rapidez com que as amostras podem ser

caracterizadas quase sem manipulação e a flexibilidade do equipamento (BLANCO e VILLARROYA, 2002). Além disso, apresenta outras vantagens em relação a outros métodos físico-químicos, pois não é necessário o estágio de extração da amostra e é apropriado para fármacos com problema de solubilidade, pois podem ser preparados na forma de pó. Desta forma, economiza-se tempo de análise e custos com solventes e membranas (MORENO, SALGADO, 2012). Além disso, pode ser realizada com qualquer amostra em qualquer estado (STUART, 2004), fornece precisão comparável a outros métodos, auxilia na detecção de falsificação e impurezas (FAROUK, MOUSSA, AZZAZY, 2011) e não utiliza solventes orgânicos, não gerando resíduos. Com isso, proporciona uma economia para as indústrias, pois diminui a quantidade de efluentes e proporciona benefícios para o meio ambiente (TOTOLI, 2013).

6.4.1 Material

A espectrofotometria na região do infravermelho foi realizada com SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam descritas no Capítulo 4. O brometo de potássio (KBr) utilizado para a confecção das pastilhas foi da marca Synth (Diadema, São Paulo, Brasil), de grau analítico. Antes da utilização, o KBr foi dessecado a 105 °C até peso constante em estuda modelo 702.780 (Quimis, São Paulo, Brasil).

As análises foram realizadas em equipamento de infravermelho Shimadzu (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500 cm^{-1} , com intervalo de 2 cm^{-1} . Após a obtenção dos espectros e com o auxílio do *software* IR solution, a análise quantitativa foi realizada na região espectral compreendida entre 1760-1750 cm^{-1} , referente à banda da carbonila da molécula do aztreonam, que teve sua altura analisada em termos de absorvância.

6.4.2 Método

6.4.2.1 Preparo das pastilhas de aztreonam SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 5 mg de aztreonam SQR (50 mg da diluição 1:10 em KBr) e homogeneizou-se devidamente com 100 mg de brometo de potássio. Após confeccionou-se a pastilha com massa total de 150 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.4.2.2 Preparo das pastilhas de aztreonam na amostra

O conteúdo de 20 frascos-ampolas contendo 1 g de pó liofilizado para solução injetável de aztreonam foi adicionado a um recipiente adequado e homogeneizado; a partir deste *pool* de amostras pesou-se o equivalente a 5 mg de aztreonam (50 mg da diluição 1:10 em KBr) e homogeneizou-se devidamente com 100 mg de brometo de potássio. Após confeccionou-se a pastilha com massa total de 150 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.4.2.3 Obtenção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica, foram pesadas massas equivalentes a 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 mg de aztreonam SQR (previamente diluída em brometo de potássio a 1:10, p/p) que foram diluídas em quantidades suficientes de brometo de potássio para a obtenção de pastilhas com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados até a obtenção de uma mistura homogênea, para em seguida ser comprimida em prensa mecânica durante 15 minutos. Cada concentração foi preparada em triplicata e as curvas foram obtidas em três dias diferentes.

6.4.2.4 Cálculo do teor de aztreonam na amostra

A concentração de aztreonam na amostra foi calculada pela Equação 6.2 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 6.3, ambas descritas na seção 6.1.2.5.

6.4.3 Validação do método

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, especificidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

6.4.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela obtenção de três curvas analíticas, em três dias diferentes, cada uma com seis concentrações de aztreonam SQR, no intervalo de 1,0 a 3,5 mg/pastilha. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada pela análise de variância (ANOVA).

6.4.3.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade é a habilidade de um método analítico medir o analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005), a qual foi comprovada pela comparação da resposta obtida para o fármaco na ausência do excipiente (SQR), na presença do excipiente (amostra) e com o excipiente (BRASIL, 2003).

6.4.3.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da análise de sete réplicas de aztreonam SQR na concentração de 2,5 mg/pastilha, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista. A precisão intermediária (interdias e entre analistas) foi avaliada através da realização do doseamento da amostra em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.4.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de quantidade conhecida da SQR à quantidade conhecida de amostra (ICH, 2005). O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração 80% (R1), 100% (R2) e 120% (R3) em relação à concentração de trabalho (2,5 mg/pastilha), sendo cada nível de concentração preparado em triplicata. As amostras foram preparadas conforme apresentados na Tabela 6.26.

Tabela 6.26. Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método por espectrofotometria no infravermelho.

	Aztreonam amostra (mg) ¹	Aztreonam SQR (mg) ¹	Quantidade de KBr (mg) ²	Concentração teórica final (mg/pastilha)
A	1,5	-	135	1,5
R1	1,5	0,5	130	2,0
R2	1,5	1,0	125	2,5
R3	1,5	1,5	120	3,0
SQR	-	1,5	135	1,5

¹diluição 1:10, p/p em KBr;

²quantidade suficiente para o preparo de pastilhas com massa total de 150 mg.

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 6.4, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) e descrita na seção 6.1.3.4.

6.4.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada com a finalidade de determinar a variabilidade dos resultados das análises realizadas após pequenas variações em seus parâmetros de trabalho. Os seguintes parâmetros foram variados individualmente: marca do brometo de potássio, tempo de compressão das pastilhas e temperatura do ambiente. Os valores foram avaliados quanto ao DPR% entre os doseamentos.

6.4.3.6 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, conforme as Equações 6.5 e 6.6, descritas nas seções 6.1.3.6 e 6.1.3.7, respectivamente.

6.4.4 Resultados e discussão

A substituição de metodologias analíticas que empregam solventes orgânicos por outras que não os utilizem é uma medida que pode ser tomada para diminuir os impactos das

atividades sobre o meio ambiente, buscando alternativas para reduzir, prevenir ou eliminar a geração de resíduos químicos nos processos de rotina (NOLASCO, TAVARES, BENDASSOLLI, 2006).

As características do espectro de absorção na região do infravermelho da SQR e amostra de pó liofilizado de solução injetável foram discutidas na análise qualitativa deste trabalho (Capítulo 5, seção 5.10).

6.4.4.1 Obtenção da curva analítica

A Tabela 6.27 apresenta os valores de absorvância obtidos na construção da curva analítica para aztreonam SQR, utilizando o método de espectrofotometria no infravermelho.

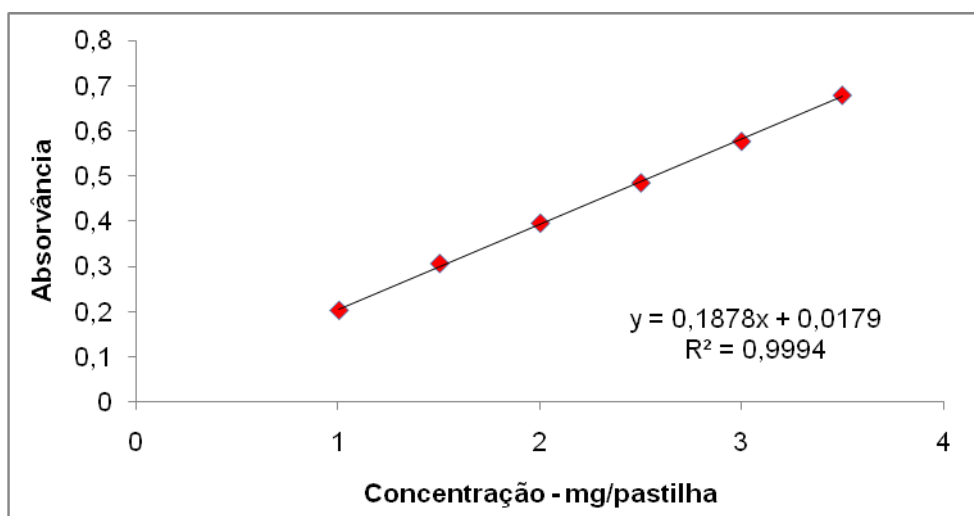
Tabela 6.27. Valores de absorvância determinados para a construção da curva analítica de aztreonam SQR pelo método de espectrofotometria no infravermelho.

Concentração (mg/pastilha)	Absorvância	Absorvância média	DPR ¹ (%)
1,0	0,2030	0,2019	0,89
	0,2000		
	0,2027		
1,5	0,3063	0,3058	1,86
	0,3057		
	0,3053		
2,0	0,3937	0,3952	1,82
	0,3963		
	0,3957		
2,5	0,4880	0,4847	1,76
	0,4810		
	0,4850		
3,0	0,5773	0,5767	1,51
	0,5790		
	0,5737		
3,5	0,6867	0,6789	1,18
	0,6740		
	0,6760		

¹desvio padrão relativo

A curva analítica de aztreonam SQR (Figura 6.14) em concentração de 1,0 a 3,5 mg/pastilha foi construída com as médias dos valores de absorvância de três curvas analíticas.

Figura 6.14. Curva analítica da solução de aztreonam SQR pelo método de espectrofotometria no infravermelho.



Os resultados apresentados na Tabela 6.28 e Figura 6.14 demonstraram que o método possui linearidade na faixa de concentração de 1,0 a 3,5 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação de 0,9994, valor muito próximo à unidade, o que mostra a linearidade do método. A equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi $y = 0,1878x + 0,0179$.

6.4.5 Validação do método

6.4.5.1 Linearidade

A análise de variância (ANOVA) calculada para os dados da curva analítica de aztreonam é mostrada na Tabela 6.28.

Tabela 6.28. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de aztreonam SQR, utilizando o método de espectrofotometria no infravermelho.

Fontes de variação	GL ¹	SQ ²	Variância	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre doses	5	4,6337E-01	9,2673436E-02	7833,15*	3,11
Regressão linear	1	4,5821E-01	4,5820599E-01	39163,22*	4,75
Desvio de linearidade	4	5,1612E-03	1,2902964E-03	0,63	3,26
Resíduo	12	1,4197E-04	1,1830926E-05	-	-
Total	17	4,6351E-01	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

¹GL = graus de liberdade

²SQ = soma dos quadrados

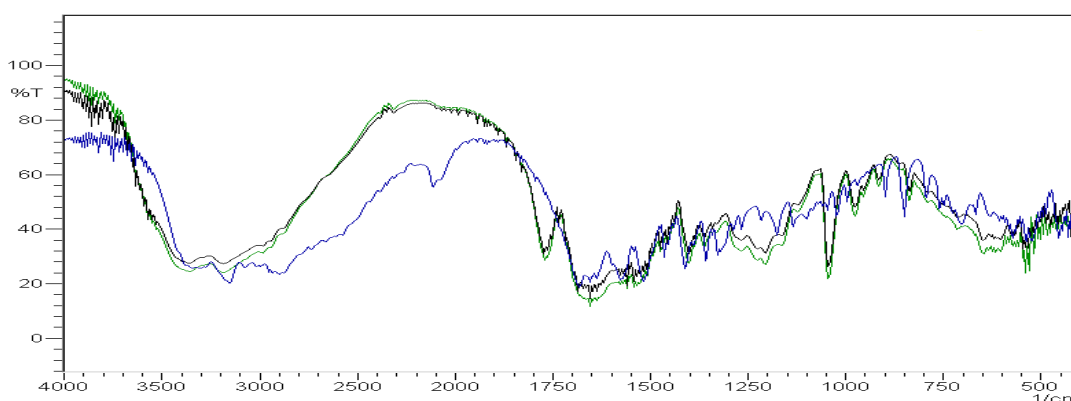
A análise estatística dos resultados das áreas obtidas na construção da curva analítica foi verificada pela análise de variância, mostrando que o método apresentou regressão linear significativa, visto que o F calculado (39163,22) foi superior ao F tabelado (4,75) para este requisito. Além disso, a análise estatística também mostrou que não houve desvio significativo

da linearidade, já que o F calculado (0,63) foi menor que o F tabelado (3,26), a um nível de significância de 5%.

6.4.5.2 Especificidade e Seletividade

A Figura 6.15 apresenta a sobreposição dos espectros obtidos com aztreonam SQR, amostra de pó liofilizado para soluções injetáveis e seu excipiente (L-arginina). Os espectros de absorção são semelhantes, demonstrando que o excipiente presente na amostra não interfere na absorção, e, portanto comprova a especificidade do método espectrofotométrico na região do infravermelho.

Figura 6.15. Espectro de absorção na região de infravermelho de aztreonam substância química de referência (verde), amostra (preto) e excipiente (azul).



6.4.5.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: repetibilidade, precisão intermediária interdia e entre analista. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR%. A repetibilidade forneceu um valor de DPR% de 1,74% para sete réplicas de aztreonam SQR na concentração de 2,5 mg/pastilha, preparadas individualmente. Os valores de DPR % apresentados pelos parâmetros da precisão intermediária interdia e entre analista foram de 0,63% e 0,42%, respectivamente. O teor foi calculado e está apresentado na Tabela 6.29.

Tabela 6.29. Determinação do teor interdias e entre-analistas por espectrofotometria no infravermelho.

		Resposta analítica		
		Teor (%)	Teor médio (%)	DPR ¹ (%)
Precisão intermediária	Dia 1	95,02		
	Dia 2	94,32	94,95	0,63
	Dia 3	95,53		
	Analista 1	90,67	90,94	0,42
	Analista 2	91,21		

¹ desvio padrão relativo

As médias de teor estão próximas, estando os desvios abaixo de 5%, comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003; FDA, 2000; USP 36, 2013). Os valores de teor estão dentro do permitido que é de 90 a 105% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), demonstrando que o método proposto é apropriado para quantificar o fármaco.

6.4.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração. Os valores encontrados utilizando espectrofotometria na região do infravermelho estão na Tabela 6.30.

Tabela 6.30. Valores do teste de recuperação do método por espectrofotometria no infravermelho.

	Aztreonam SQR adicionado (mg/pastilha)	Aztreonam SQR encontrado (mg/pastilha)¹	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	2,0	2,02	101,0	
R2	2,5	2,47	98,8	101,6
R3	3,0	3,15	105,0	

¹cada valor é a média de três determinações

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição do padrão, obtendo-se a recuperação média de 101,6%, comprovando a exatidão do método proposto, pois os valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005; FDA, 2000).

6.4.5.5 Robustez

A robustez do método foi determinada por meio de modificações, individualmente, nos seguintes parâmetros: marca do brometo de potássio, tempo de compressão das pastilhas e temperatura. Os resultados do DPR% da robustez são mostrados na Tabela 6.31.

Tabela 6.31. Valores do DPR da avaliação da robustez do método por espectrofotometria no infravermelho.

Variável	Faixa investigada	DPR ¹ (%)
Marca de KBr	Synth	1,60
	Shimadzu	
Tempo de compressão das pastilhas	10 minutos	0,48
	15 minutos	
	20 minutos	
Temperatura	18°C	0,64
	26°C	

¹desvio padrão relativo

Os valores de DPR% se mostraram abaixo de 5,0%, comprovando que pode haver pequenas modificações nestes parâmetros sem influenciar de maneira significativa a análise do fármaco.

6.4.5.6 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as Equações 6.9 e 6.10, respectivamente, e os valores encontrados foram 0,049 e 0,15 mg/pastilha, respectivamente. Diante dos resultados encontrados para LQ e LD, os valores encontrados são satisfatórios, uma vez que a menor concentração utilizada para a obtenção da curva analítica foi de 1,0 mg/pastilha, e a concentração utilizada para realizar o doseamento foi de 2,5 mg/pastilha, estando bem acima dos valores de LD e LQ, indicando a confiabilidade do método para detectar e quantificar o aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

Portanto, fica provado que o método por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho para quantificação do aztreonam é adequado e atende todos os requisitos exigidos pelos órgãos oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013). Além disso, é uma alternativa ambientalmente favorável em análises de rotina do controle de qualidades deste fármaco.

7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS

A comparação entre os métodos analíticos é frequentemente necessária para determinar se a variabilidade dos procedimentos é analiticamente significativa. Estes ensaios de comparação devem prover dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP 36, 2013). Desta forma, com o objetivo de estabelecer a comparação entre os métodos propostos neste trabalho (espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta; ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria de absorção na região do infravermelho) para a determinação quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável foi realizada análise estatística dos teores médios de aztreonam obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA), considerando nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de aztreonam pelos métodos propostos encontram-se na Tabela 7.1. A análise estatística destes valores experimentais obtidos para o doseamento de aztreonam pelos diferentes métodos propostos encontra-se na Tabela 7.2.

Tabela 7.1. Avaliação comparativa da determinação do teor de aztreonam em pó liofilizado de solução injetável utilizando os métodos propostos.

Parâmetros	Método			
	UV ¹	MICRO ²	CLAE ³	IV ⁴
	96,90	95,19	95,57	95,02
Teor (%)	96,21	96,36	95,06	94,32
	95,50	95,40	95,56	95,53
Teor médio (%)	96,22	95,65	95,39	94,95

¹ UV: método por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta ;

² MICRO: ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico;

³ CLAE: método por cromatografia líquida de alta eficiência;

⁴ IV: método por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

Tabela 7.2. Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável pelos métodos propostos.

Fontes de variação	GL ¹	SQ ²	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre grupos	3	2,502958333	0,834319444	2,56	4,06
Dentro dos grupos	8	2,597733333	0,324716667	-	-
Total	11	5,100691667	-	-	-

*Significativo para p<5%

¹GL = graus de liberdade

²SQ = soma dos quadrados

Os resultados obtidos através da análise de variância (ANOVA) demonstram não haver diferença significativa entre os métodos propostos para os doseamentos, em um nível de significância de 5%, já que o valor de F calculado (2,56) se apresentou inferior ao valor de F tabelado (4,06). Desta forma, os métodos validados são equivalentes, ou seja, o resultado

comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

Todos os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamentos oficiais (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007; USP 36, 2013), e apesar de demonstrarem resultados estatisticamente semelhantes em relação ao doseamento de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável, cada método possui características próprias.

O método por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta por ser simples, apresentar fácil execução e de custo reduzido é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicado para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação de substância ativa de medicamentos. No entanto, não é uma técnica específica para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação (CARDOSO et al., 2006; AMIN, MOUSTAFA, EL-DOSOKY, 2008).

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico fornece informações importantes quanto à potência do fármaco frente aos micro-organismos testados. Além disso, são utilizados para eliminar dúvidas quanto à perda de atividade, não demonstradas pelos métodos químicos e físico-químicos, tornando necessária sua aplicação para antimicrobianos (MORENO, SALGADO, 2007). É uma técnica que não utiliza solventes orgânicos, é rápida em relação ao método por difusão em ágar, apresenta facilidade operacional, medida objetiva da resposta, não tem interferência das características de difusão, além da exatidão. No entanto, este método apresenta necessidade de equipamento para a leitura da resposta e ausência de contaminação grosseira ou coloração da amostra que interfira na leitura fotométrica (KAVANAGH, 1963; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, JP, 2011).

O método CLAE é seletivo, apresenta excelente reprodutibilidade e repetibilidade, obtenção de resultados qualitativos e quantitativos confiáveis, alta resolução, análises rápidas e é adequado para determinação de produtos de degradação e impurezas na matriz analisada. Porém, possui algumas limitações, tais como o custo da instrumentação e da operação, alto consumo de solventes, que tornam a manutenção da técnica elevada, fonte de contaminação operacional e ambiental e necessidade de profissionais capacitados (HARRIS, 2005; COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

O método por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho, por sua vez, não necessita do uso de solventes orgânicos, pode ser realizada com qualquer amostra em qualquer estado (STUART, 2004), fornece precisão comparável a outros métodos, auxilia na detecção de falsificação e de impurezas (FAROUK, MOUSSA, AZZAZY, 2011), é apropriado para fármacos com problema de solubilidade e apresenta menor tempo de análise (MORENO, SALGADO, 2012). Porém, apresenta problemas quanto à umidade do ambiente, além de requerer equipamento de elevado custo.

O desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade de fármacos e medicamentos envolve a confiabilidade dos resultados, que é alcançada a partir da validação dos métodos.

8. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados é de extrema importância, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem causar grandes problemas, tanto para a saúde da população, quanto financeiros para a indústria farmacêutica. Desta maneira, a etapa de validação é importante para garantir a confiabilidade na qualidade de fármacos e medicamentos, já que assegura a confiabilidade dos dados gerados (LA ROCA et al., 2007).

Neste trabalho, o aztreonam foi o fármaco escolhido para os estudos químico-farmacêuticos pelo fato de ser um antibiótico que necessita de desenvolvimento de metodologias otimizadas, visando às características de qualidade e custo para laboratórios farmacêuticos, considerando a minimização do uso de solventes orgânicos ou a utilização de solventes menos tóxicos, além de métodos mais práticos, econômicos e rápidos, tendo em vista buscar métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina.

Os métodos propostos para análise qualitativa de aztreonam são relativamente simples. Métodos gerais aplicados a medicamentos, tais como características físicas, peso médio, ponto de fusão, teor de umidade, teor de cinzas sulfatadas, solubilidade, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta, espectroscopia na região do infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados para a caracterização da substância química de referência e amostra de aztreonam, sendo possível estabelecer parâmetros para identificação deste fármaco em produtos farmacêuticos. Além disso, foi desenvolvido um método indicativo de estabilidade por cromatografia em camada delgada, empregando fase móvel simples e capaz de separar os produtos de degradação.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados quatro métodos analíticos: espectrofotometria na região do ultravioleta, ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do infravermelho. A validação foi realizada de acordo com a literatura (FDA, 1994; FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2007; BONFÍLIO et al., 2012; USP 36, 2013), os quais indicam os parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método analítico.

Com base na validação dos métodos analíticos quantitativos, foi possível verificar que todos eles apresentaram linearidade adequada, com coeficiente de correlação (r) superiores a 0,999, o que foi confirmado através da análise de variância dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas. Além disso, mostraram-se específicos, uma vez que não houve interferência do excipiente presente na amostra de pó liofilizado de solução injetável de aztreonam. O método CLAE mostrou ser indicativo de estabilidade, uma vez que foi capaz de separar o fármaco de seus produtos de degradação, gerados a partir de degradação ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica.

Com relação aos valores encontrados para a precisão dos quatro métodos foram considerados adequados, pois todos apresentaram DPR% inferiores a 5,0%. Os valores encontrados para a exatidão, com percentagens de recuperação próximas a 100%, foram considerados satisfatórios. No atributo da robustez, pode-se verificar que, independente do método, não ocorreram grandes variações quando se alterou algum parâmetro analítico.

O aztreonam em pó liofilizado para solução injetável é descrito na Farmacopeia Americana (USP 36, 2013) e possui especificações para o seu teor entre 90,0 – 105,0%. Assim, os métodos desenvolvidos e validados foram adequados, demonstrando que as amostras analisadas encontram-se de acordo com o preconizado, comprovando boa qualidade e segurança de consumo.

Como pode ser observado, é importante o uso de diferentes técnicas para estudos de degradação, uma vez que a cromatografia foi mais específica e permitiu a observação dos produtos de degradação formados.

No desenvolvimento dos métodos analíticos propostos neste trabalho, houve a preocupação de minimizar a utilização de solventes orgânicos ou desenvolver técnicas que não os utilizem, já que esta é uma estratégia cada vez mais adotada pelos laboratórios químicos e farmacêuticos com o objetivo de minimizar os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente.

As técnicas propostas neste trabalho foram analisadas comparativamente por análises estatísticas e foi encontrado que não há diferença significativa entre os métodos para um nível de significância de 5%. Desta forma, pode-se afirmar que os métodos espectrofotométricos UV e Infravermelho, microbiológicos e cromatográficos forneceram resultados satisfatórios para todos os atributos da validação. Assim sendo, este trabalho permitiu o desenvolvimento e a validação de quatro métodos analíticos intercambiáveis para a quantificação de aztreonam em pó liofilizado para solução injetável.

9. CONCLUSÃO

As análises qualitativas foram determinadas satisfatoriamente através das análises de características físicas, peso médio, ponto de fusão, teor de umidade, teor de cinzas sulfatadas, solubilidade, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta, espectroscopia na região do infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência, permitindo a caracterização e identificação do fármaco no produto farmacêutico.

O método por cromatografia em camada delgada, além de ser adequado para a identificação do fármaco no produto farmacêutico, ainda possibilitou a separação e detecção de produtos de degradação, mostrando sua capacidade indicativa de estabilidade.

As análises quantitativas permitiram desenvolver e validar alguns métodos analíticos para determinação de aztreonam em pó liofilizado de solução injetável, tais como espectrofotometria na região do ultravioleta, ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia na região do infravermelho. Os métodos analíticos mostraram-se lineares, específicos, precisos, exatos e robustos, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre eles.

O método por espectrofotometria na região do ultravioleta mostrou-se adequado para a quantificação do fármaco em estudo na faixa de concentração de 27,0 a 72,0 µg/mL, no comprimento de onda de 292 nm, apresentando a vantagem de utilizar a água purificada como solvente, permitindo a utilização de solvente não tóxico, assim gerando menos resíduos.

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico apresentou parâmetros de validação satisfatório na faixa de concentração de 5,0 a 320,0 µg/mL, utilizando o microrganismo *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393 e se mostrou adequado para a determinação da potência de aztreonam no produto farmacêutico. Além disso, possui a vantagem de não utilizar solventes orgânicos em suas análises e exigir equipamento de custo reduzido em relação aos outros métodos validados.

Quanto ao método de cromatografia líquida de alta eficiência, a utilização do etanol e a ausência de soluções tampão na composição da fase móvel se mostraram alternativas vantajosas. A faixa de concentração foi de 45,0 a 95,0 µg/mL, a 292 nm, empregando água:etanol (70:30 v/v), pH 2,6 ajustado com ácido acético como fase móvel. Além disso, permitiu a separação de produtos de degradação.

O método espectrofotométrico na região do infravermelho se mostrou adequado para a quantificação do fármaco em estudo na faixa de concentração de 1,0 a 3,5,0 mg/pastilha, apresentando as vantagens de ser um método rápido e que não utiliza solventes orgânicos em suas análises, podendo ser uma alternativa econômica e ambientalmente favorável.

Pode-se concluir, enfim, que os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste trabalho mostraram-se apropriados para a quantificação do aztreonam em pó liofilizado de solução injetável, podendo ser utilizados na rotina do controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, pois uma rigorosa validação de métodos analíticos fornece dados confiáveis que são fundamentais para a eficácia terapêutica e segurança destes produtos, evitando que os pacientes consumam medicamentos com a qualidade comprometida.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIN, G.; NORD, C.E. Adverse effects of monobactams and carbapenems. **Drug Safety Journal** v.12, n. 5, p.305-313, 1995.
- AMADOR, M.P.P. Pesquisa e caracterização molecular de β -lactamases em bactérias isoladas de alimentos prontos-a-comer. Tese (Doutorado) – Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, 2010.
- AMIN, A.S.; ALY, H.M. Utilization of colorimetric and atomic absorption spectrometric determination of aztreonam through ion pair complex formation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.205, p.35-41, 2000.
- AMIN, A.S.; MOUSTAFA, M.E.; EL-DOSOKY, R.M.S. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in dosage forms and biological fluids using ion-pair complex formation. **Analytical Letters**, v.41, p.837-852, 2008.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Gaithersburg: AOAC, 2002, v.1, p. xx.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.877, n.23, p.2224-2234, 2009.
- ARIAS, E.R.; TORRES, M.L.H.; MUGUERCIÁ, H.L.; VALDÉS, D.L.; PÉREZ, D.L. Carbanémicos y monobactámicos. **Acta Medica**, v.8, p.66-70, 1998.
- ATHAIDE, A. Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos. **Controle de Contaminação**, p.16-22, 2000.
- AXELROD, J.; DALY, J.S.; BARZA, M.; BAKER, A.S. Antibacterials. In: ALBERT D.M.; JAKOBIEC, F.A. **Principles and practice of ophthalmology – Basic sciences**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. p.940-961.
- BANFI, L.; CASCIO, G.; GUANTI, G.; MANGHISI, E.; NARISANO, E.; RIVA, R. Enantiospecific and diastereoselective synthesis of cis monobactams through electrophilic amination of chiral3-hydroxyesters. **Tetrahedron**, v.50, p.11967-11982, 1994.
- BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.
- BLANCO, M.; VILLAROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **Analytical Chemistry**, v.21, p.240-250, 2002.
- BLIESNER, D.M. **Validating chromatographic methods**: practical guide. Hoboken: John Wiley, 2006. p.285.
- BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of na UVderivative spectrophotometric method for determination of gimepiride in tablets. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 292-299, 2011.
- BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Analytical Chemistry**, v.42, n.1, p.87-100, 2012.
- BONNER, D.P.; SYKES, R.B. Structure activity relationships among the monobactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.14, p.313-327, 1984.
- BORINELLI, B.; COLTRO, F.L.Z.; MORIYA, I.; SANTOS, L.M.L. Regulação ambiental e consumo sustentável: uma discussão a partir da percepção dos consumidores de Londrina – PR. **Revista Capital Científico**, v.8, p. 77-91, 2010.

- BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2010. v.1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº17, de abril de 2010. Dispões sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 abr. 2010.
- BREWER, N.S.; HELLINGER, W.C. The monobactams. **Mayo Clinic Proceedings**, v.66, p.1152-1157, 1991.
- BURGESS, D. S.; PHARM, KIMBERLY, k., et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam administered by continuous intravenous infusion. **Clinical Therapeutics**, v.21, 1999.
- CAETANO, N. Análise da viabilidade econômico-financeira de uma Unidade de resíduos industriais não perigosos em Portugal. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Gestão no Departamento de Finanças, ISCTE Business School – Instituto Universitário de Lisboa, 2009.
- CARDOSO, S.G.; ROLIM, C.M.B.; ESCARRONE, A.L.; IEGGLI, C.V.S. CAVALETT, C.; OLIVEIRA, D.C.; LORETTO, E.S.; SCHMITT, G.C.; CARLOSSO, I.P.; CÂMERA, K.; BAJERSKI, L.; MALESUIK, M.D.; BÖER, T. M. Determinação quantitativa de tenoxicam em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.2, p.262-266, 2006.
- CASCIO, L. B. G. et al. Enantiospecific and diastereo selective synthesis of cis monobactams through electrophilic amination of chiral 3-hydroxyesters. **T&aludron**, v.50, n.41, p.11967-11982, 1994.
- CASTANHEIRA M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHIMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4654-4661, 2004.
- CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; CARG, S.; SALGADO, H.R.N. A validated stability-indicating LC method for orbifloxacin in the presence of degradation products. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, n.3, p.176-181, 2011.
- CAZEDEY, E.C.L. Análise química farmacêutica e estudos de estabilidade e de dissolução de comprimidos de orbifloxacino. 232p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.
- CIMARUSTI, C. M.; BONNER, D.P.; BREUER, H.; CHANG, H. W.; FRITZ, A. W.; FLOYD, D. M. KISSICK, T.P., et al. 4-alkylateal monobactams: chiral synthesis and antibacterial activity. **Tetrahedron**, v.39, p.2577-2589, 1983.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1997. 279 p.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 453 p.
- CORDELLA, C.; MOUSSA, I.; MARTELI, A.C.; SBIRRAZZUOLI, N.; LIZZANI-CUVELIER, L. Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique oriented perspectives. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.1751-1764, 2002.

- CUZZOLIN, L.; FANOS, V.; ZAMBRERI, D.; PADOVANI, E.M.; BENONI, G. Pharmacokinetics and renal tolerance of aztreonam in premature infants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.1726-1728, 1991.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, p.21-25, 1998.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, p.18-25, 2006.
- DESAI, D.S.; RUBITSKI, B.A.; BERGUM, J.S.; VARIA, S.A. Effects of various formulation factors on dissolution stability of aztreonam, hydrochlorothiazide, and sorivudine capsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v.110, p.249-255, 1994.
- DÍAZ, N.; SORDO, T.L.; SUÁREZ, D.; MÉNDEZ, R.; VILLACORTA, J.M.; SIMÓN, L.; RICO, M.; JIMÉNEZ, M.A. Assessing the protonation state of drug molecules: The case of aztreonam. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.3235-3243, 2006.
- DUMA, R.J.; BERRY, A.L.; SMITH, S.M., et al. Penetration of aztreonam into cerebrospinal fluid of patients with and without inflamed meninges. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.26, p.730-733, 1984.
- EMANUELLI, T.; SCANDIUZZI, M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul. Anais, p.57, 2000.
- EMERSON J.; ROSENFELD, M.; MCNAMARA, S.; RAMSEY, B.; GIBSON, R.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v.34, p.91-100, 2002.
- EP. EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011. v.2.
- ESMERINO, L.A.; PEREIRA, A.V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D.M.; TALACIMON, E.A.; SCHELESKY, M.E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, p.53-60, 2004.
- EVANS, D.T.P., et al. Treatment of uncomplicated gonorrhoea with single dose aztreonam. **Genitourin Medicine**, v.62, p.318-320, 1986.
- EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo, Edgar Blücher, 2001.
- FABRE, H.; IBORK, H.; LERNERS, D.A. Photodegradation kinetics under UV light of aztreonam solutions. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v.10, p.645-650, 1992.
- FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Brasília, 2010.
- FARMACOPEIA portuguesa. 8 ed. Lisboa: Inframed, 2005.
- FAROUK, F.; MOUSSA, B.A.; AZZAZY, H.M.E-S. Fourier transform infrared spectroscopy for in-process inspection, counterfeit detection and quality control of anti-diabetic drugs. **Spectroscopy**, v.26, p.297-309, 2011.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of chromatographic methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1994.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000. **Analytical Procedures and methods validation**. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drug/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/usm122858.pdf>>. Acesso em 20 agosto 2013.

FIGUEIREDO, M.G; SANTOS, M. S.; FERRARI, L. R. Estação de Tratamento de Efluentes das Indústrias Têxteis: otimização através da implantação de medidas de prevenção à poluição. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, 2000.

FIORENTINO, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a UV-spectrophotometric method for determination of flucloxacillin sodium in capsules. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, p.268-276, 2011.

FLOREY, K. **Analytical Profiles of Drugs Substances**. New York: Academic Press, v.17, p.1-39, 1988.

FRIEDLAND, H. D., et al. CANVAS 1 and 2: Analysis of clinical response at day 3 in two phase 3 trials of ceftaroline fosamil versus vancomycin plus aztreonam in treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.2231-2236, 2012.

FRUMIN, J.; GALLAGHER, J.C. Allergic cross-sensitivity between penicillin, carbapenem and monobactam antibiotics: what are the chances? **Ann Pharmacotherapy**, v.43, p.304-315, 2009.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; SMITH, S.A.; SYKES, R.B. Mode of action of aztreonam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.21, p.950-956, 1982.

GIAMARELLOU, H.; GALANAKIS, N.; DOUZINAS, E.; et al. Evaluation of aztreonam in difficult to treat infections with prolonged post-treatment follow up. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.26, p.245-249, 1984.

GIBSON, R.L.; RETSCH-BOGART, G.Z.; OERMANN, C.; et al. Microbiology, safety, and pharmacokinetics of aztreonam lysinate for inhalation in patients with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v.41, n.7, p. 656-665, 2006.

GIL, E.S.; ORLANDO, R.M.; MATIAS, R.; SERRANO, S.H.P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: UNICAMP, 2005. 438p

GIL, E.S., org. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. 485p.

GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Validation of UV spectrophotometric Method for determination of lomefloxacin in pharmaceutical dosage form. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24, n.3, p.406-408, 2005.

GONÇALVES, J.C.S. Arquitetura sustentável: uma integração entre ambiente, projeto e tecnologia em experiências de pesquisa, prática e ensino. **Revista Ambiente Construído**, Porto Alegre, v.6, p.51-81, 2006.

GRAHAM, P.L. **Pharmaceutical Chemistry—An Introduction to Medicinal Chemistry**, British Library, 1995, p.201-202.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. p.435-448.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativas**. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2005. 876p.

HENRY, S.A.; BENDUSH, C.B. Aztreonam: worldwide overview of the treatment of patients with gram-negative infections. **American Journal of Medicine**, v.78, p.57-64, 1985.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2004. p.18-21.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION OF TECHNICAL

REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)), Geneva, Switzerland, 2005.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO INDUSTRIAL). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008, 2007.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO INDUSTRIAL). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008, 2011.

JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel**: Análise química quantitativa. Rio de Janeiro: LTC Livro Técnicos e Científicos, 1992.

JP. The Japanese Pharmacopoeia, 16. ed. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2011.

KAPOOR, S.; GATHWALA, G. Aztreonam. **Indian Pediatrics**, v.41, p.359–364, 2004.

KARCHER, B.D.; DAVIES, M.L.; DELANEY, E.J.; VENIT, J.J. A 21st Century HPLC workflow for process R&D. **JALA**, p.381-393, 2005.

KATZUNG, B. G. **Basic and Clinical Pharmacology**. 10 ed. New York: Mc Graw Hill, 2007, p.726-733.

KAVANAGH, F. **Elements of photometric assaying**. In: KAVANAGH, F. Analytical microbiology. New York: Academic Press, 1963. cap. 4, p.141-217.

KAVANAGH, F. **Photometric assaying**. In: KAVANAGH, F. Analytical microbiology volume II. New York: Academic Press, 1972. cap. 3, p. 43-121.

KOCH C., et al. Retrospective clinical study of hypersensitivity reactions to aztreonam and six other beta-lactam antibiotics in cystic fibrosis patients receiving multiple treatment courses. **Reviews of Infectious Diseases**, v.13, p.S608-S611, 1991.

LACY, C.F.; ARMSTRONG, L.L.; GOLDMAN, M.P.; LANCE, L.L. **Drug information handbook**. 2011.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna (HPLC / CLAE)**. Campinas: Átomo, 2009. p.184-215.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LIVERMORE, D.M.; WILLIAMS, J.D. In vitro activity of the monobactam, SQ 26,776, against gram-negative bacteria and its stability to their beta-lactamases. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v.8, p.29-37, 1981.

LIVINGSTONE, D.J. Theoretical property predictions. **Currents Topics in Medicinal Chemistry**, v.3, p.1171-1192, 2003.

LOEB, S. **Physician's drug handbook**. 5 ed. Springhouse: Springhouse Corporation, 1993, p.820.

LOFTSSON, T.; ÓLAFSDÓTTIR, B.J. Cyclodextrin-accelerated degradation of β -lactam antibiotics in aqueous solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.67, p.R5-R7, 1991.

MAHGOUB, H. Spectrophotometric and fluorimetric determination of aztreonam in bulk and dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, p.767-774, 2002.

MARTÍN, M.I.G.; PÉREZ, C.G.; LÓPEZ, M.A.B. Batch and flow injection spectrophotometric determination of aztreonam. **Analyst**, v.117, p.1789-1792, 1992.

MARTINDALE. The Extra Pharmacopoeia. 31 ed. London: The Royal Pharmaceutical Society, 1996, p.176-177.

MAY, P; LUSTOSA, M.C.; VINHA, V. **Economia do Meio Ambiente**. Rio de Janeiro: Campus, 2003.

MIHINDU, J.C.; SCHELD, W.M.; BOLTON, N.D.; SPYKER, D.A.; SWABB, E.A.; BOLTON, W.K. Pharmacokinetics of aztreonam in patients with various degrees of renal dysfunction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.24, p.252-261, 1983.

MIYABE, K.; TAKEUCHI, S.; TEZUKA, Y. Adsorption characteristics in reversed-phase liquid chromatography using ethanol/water mixed solvent. **Adsorption**, v. 5, p. 15-24, 1999.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **Journal of AOAC International**, v.90, p.1379-1382, 2007.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in power for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v.2, p.6-11, 2012.

MORETTO, L.D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology**, v.4, p.4-48, 2000.

MOURA, L.A.A. **Qualidade e Gestão Industrial**. São Paulo: Juarez de Oliveira, 2002.

MULVEY, M.R.; SIMOR A.E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? **CMAJ** **180**, p.408-415, 2009.

NEU, H.C. β -Lactam antibiotics: structural relationships affecting in vitro activity and pharmacologic properties. **Reviews of Infectious Diseases**, v.8, p.S237-S259, 1986.

NEU, H.C. Aztreonam activity, pharmacology, and clinical uses. **American Journal of Medicine**, v.88, p.2-6, 1990.

NEU, H.C.; LABTHAVIKUL, P. In vitro activity and beta-lactamase stability of a monobactam, SQ 26,917, compared with those of aztreonam and other agents. **American Journal of Medicine** v.23, p.2S-6S, 1990.

NOGRADY, T.; WEAVER, D.F. Medicinal Chemistry. **A molecular and biochemical approach**. New York: Oxford University Press, 2005.

NOLASCO, F.R.; TAVARES, G.A.; BENDASSOLLI, J.A. Implantação de programas de gerenciamento de resíduos químicos laboratoriais em universidades: análise crítica e recomendações. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.11, p.118-124, 2006.

OERMANN, C.M., et al. An 18-month study, AIR-CF3, of the safety and improvement in pulmonary function and respiratory symptoms with repeated courses of aztreonam for inhalation solution in patients with cystic fibrosis and airway *Pseudomonas aeruginosa*. **Pediatric Pulmonology**, v.45, p.1121-1134, 2010.

OHANNESIAN, L.; STREETER, A. J. **Handbook of pharmaceutical analysis**. New York: Marcel Dekker, 2002. p.87-149, 187-224.

PAPICH M.G. Antimicrobial drugs. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. v.1, p.272-274.

- PARRY, M.F. Aztreonam susceptibility testing. **The American Journal of Medicine**, v.88, p.3C-11S, 1990.
- PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Química Nova**, v.31, p.1190-1198, 2008.
- PATRIARCA, G., et al. Tolerability of aztreonam in patients with IgE-mediated hypersensitivity to beta-lactams. **International Journal Immunopathology and Pharmacology**, v.21, p.375-379, 2008.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p.17-99.
- PAXSON, J.A.; PARADIS, M.R. Pharmacokinetics of aztreonam after intravenous administration in foals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.34, p.92-94, 2010.
- PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of cefazolin sodium by UV-spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, v.3, n.1, p.11-20, 2013a.
- PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Methods for quantitative analysis of cefazolin sodium raw material and pharmaceutical product. **Physical Chemistry**, v.3, n.2, p.29-38, 2013b.
- PEIXOTO JUNIOR, M.M.; SANTOS, A.F.J.; SANTOS, C.A.; CAETITE, E.J. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.47, p.69-73, 2005.
- PETER, J.; et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.187, p.680-689, 2013.
- PILKIEWICK, F.G.; REMSBURG, B.J.; FISHER, S.M.; SYKES, R.B. High-pressure liquid chromatographic analysis of aztreonam in serum and urine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, p. 852-856, 1983.
- PIMJENTO, A.P., et al. Aztreonam and ceftazidime: evidence of in vivo cross allergenicity. **Allergy**, v.53, p.624-625, 1998.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.3-4, 16-23.
- PLOSKER, G.L. Aztreonam lysine for inhalation solution in cystic fibrosis. **Drugs**, v.70, n.14, p.1843-1855, 2010.
- RAMBLA-ALEGRE, M.; MARTÍ-CENTELLES, R.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulfate/propanol mobile phases and direct injection. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.4972-4981, 2011.
- RANADIVE, S.A.; PIPKIN, J.D.; VARIA, S.A.; CHANG, N.H.; BARRY, E.P.; PORUBCAN, M.; UNGER, S.E.; MCCORMICK, J.J. Formation, isolation and identification of oligomers of aztreonam. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.281-291, 1995.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale: Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.665-666.
- REBSAMEN, M.; BOUCHEIX, J.M.; FAYOL, M. Quality control in the optical industry: From a Work analysis of lens inspection to a training programme, an experimental case study. **Applied Ergonomics**, v.41, p.150-160, 2010.

- RETSCH-BOGART, G. Z., et al. A phase 2 study of aztreonam lysine for inhalation to treat patients with cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Pediatric Pulmonology**, v.43, p.47-58, 2008.
- RETSCH-BOGART, G.Z., et al. Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway *Pseudomonas* in cystic fibrosis. **Chest**, v.135, p.1223-1232, 2009.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, R.V.L.; GRESPAN, C.B.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; BRUNS, R.E. Optimization through factorial planning of the use of ethanol:water as a mobile phase for reversed phase HPLC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.22, p.52-54, 1999.
- RIBEIRO, R.L.V.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.300-306, 2004.
- RIBEIRO, H. **A Bíblia dos 5S, da implantação à excelência**. Salvador: Casa da Qualidade, 2006.
- RILEY, C.M.; ROSANSKE, T.W. MicroAnalytica. **Analytica Chimica Acta**, n.338, p.362, 1997.
- ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.
- SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.1, p.73-76, 2005.
- SAKR, A.M.; KASSEN, A.A.; AZIZ, S.A.A.; SHALABY, A.H. Factors affecting physical Standards of tablets. **Manufacturing Chemistry and Aerosol News**, v.23, n.11, p.38-44, 1972.
- SANSEVERINO, A.M. Síntese orgânica limpa. **Química Nova**, v.23, p.102-107, 2000.
- SANTORO, M.I.R.M.S. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1988. 121p.
- SANTORO, D.O.; ROMÃO, C.M.C.A.; CLEMENTINO, M.M. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. **International Journal of Environmental Health Research**, v.22, n.6, p.560-570, 2012.
- SANTORO, D.A., et al. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. **International Journal of Environmental Health Research**, v.22, p.560-570, 2012.
- SATAKE, S.E.Y.; NAKAE, T. Diffusion of β -lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.34, p.685-690, 1990.
- SATTLER, F. R., SCHRAMM, M., SWABB, E.A. Safety of aztreonam and SQ 26,992 in elderly patients with renal insufficiency. **Reviews of Infections Diseases**, v. 7, p. S622-S627, 1985.
- SILVA, L.M.; ALMEIDA, A.E.; SALGADO, H.R.N. Thermal analysis and validation of UV and Visible spectrophotometric methods for the determination of new antibiotic tigecycline in pharmaceutical product. **Advances in Analytical Chemistry**, v.2, n.1, p.10-15, 2012.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. p.70-122.

SINGH, P.D.; JOHNSON, J.H.; WARD, P.C.; WELLS, J.S.; TREJO, W.H.; SYKES, R.B. SQ 28,332, a new monobactam produced by a *Flexibacter* sp. Taxonomy fermentation isolation structure determination and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v.36, p.1245-1251, 1983.

SMITH, P.F.; BALLOW, C.H.; BOOKER, B.M.; FORREST, A.; SCHENTAG, J.J.. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam and tobramycin in hospitalized patients. **Clinical Therapeutics**, v.33, 2001.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. New Jersey: Wiley, 2010. 912p.

SOUSA, J.C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2006.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.C. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.25-35, 2005.

SRINIVAS, N.R.; PAPP, E.A.; SHAH, V.R.; SHYU, W.C. A simple HPLC assay, with ultraviolet detection, for determination of a monobactam antibiotic. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.20, n.7, p.1091-1101, 1997.

STILLE, W.; GOLLISSEN, J. Clinical experience with aztreonam in Germany and Austria. The Journal of **Infectious Diseases**, v. 7, p.825-830, 1985.

STUART, B.; GEORGE, B.; McINTYRE, P. **Modern infrared spectroscopy**. New York: CRC Press LLC, 1998. cap. 1, p. 1-17.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, Ltd., 2004.

STUTMAN, H.R.; CHARTRAND, S.A.; TOLENTINO, T.; FRIEDHOFF, L.; MARKS, M.I. Aztreonam therapy for serious gram-negative infections in children. **American Journal of Diseases of Children**, v.140, p.1147-1151, 1986.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.27, p.116-129, 2009.

SWABB, E.A.; SUGERMAN, A.A.; STERN, M. Oral bioavailability of the monobactam aztreonam (SQ 26,776) in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.23, p.548-550, 1983.

SWABB, E.A.; SUGERMAN, A. A.; MCKINSTRY, D.N. Multiple-dose pharmacokinetics of the monobactam azthreonam (SQ 26,776) in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.23, p.125-132, 1983.

SWABB, E.A. Review of the clinical pharmacology of the monobactam antibiotic aztreonam. **American Journal of Medicine**, v.78, p.11-18, 1985.

SYKES, R.B.; CIMARUSTI, C.M.; BONNER, D.P.; BUSH, K.; FLOYD, D.M.; GEORGOPADAKOU, N.K.; KOSTER, W.H.; LIU, W.C.; PARKER, W.L.; PRINCIPE, P.A.; RATHNUM, M.L.; SLUSARCHYK, W.A.; TREJO, W.H.; WELLS, J.S. Monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. **Nature**, v.291, p.489-491, 1981a.

SYKES, R.B.; BORNER, D.P.; BUSH, K, GEORGOPADAKOU, N.H.; WELLS, J.S. Monobactams monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.8, p.1, 1981b.

SYKES, R.B.; KOSTER, W.H.; BONNER, D.P. The new monobactams: chemistry and biology. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 113-119, 1988.

TAKEUCHI, M.; TANIZAWA, A.; MAYUMI, M. Piperacillin plus aztreonam for treatment of neutropenic fever. **Pediatrics International**, v. 45, p.307–310, 2003.

TAVARES, V.F. Determinação quantitativa de gemifloxacino por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. 2010, 96p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

TAVENIERS, I.; LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.23, p.535-551, 2004.

TONHL, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.; COLLINS, C.H. 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.

TOTOLI, E.G. Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de ampicilina sódica. 2013. 152 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

TUNKEL, A.R.; SCHELD, W.M. Clinical pharmacology of antibiotics: Aztreonam. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.11, p.486-494, 1990.

USP. UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 36th ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention. 2013.

UNGER, S. E. Isomer differentiation in fast atom bombardment mass spectrometry/mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v.66, p.195-208, 1985.

VEGA J.M., et al. Tolerance to aztreonam in patients allergic to beta-lactam antibiotics. **Allergy**, v.46, p.196-202, 1991.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 351-354.

VINKS, A.A.T.M.M., et al. Stability of aztreonam in a portable pump reservoir used for home intravenous antibiotic treatment (HIVAT). **Pharmacy World and Science** v.38, p.74-77, 1996.

XAVIER, G.G. Avaliação de programas de qualidade mediante implantação da ISO 9000. **Gestão & Produção**, v.2, p.162-172, 1995.

ZAJAC, M.; JELINSKA, A.; CIELECKA-PIONTEK, J.; OSZCZAPOWICZ, I. Stability of aztreonam in AZACTAM. **II Farmaco**, v.60, p.599-603, 2005.

ZEITLER, K.; SALVAS, B.; STEVENS, V.; BROWN, J. Aztreonam lysine for inhalation: New formulation of an old antibiotic. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.69, p.107-115, 2012.

ZOBELL, J.T.; et al. Optimization of anti-pseudomonal antibiotics for cystic fibrosis pulmonary exacerbations: I. aztreonam and carbapenems. **Pediatric Pulmonology**, v.47, p.1147–1158, 2012.

WAINWRIGHT, C., et al. A double-blind, multinational, randomized, placebo-controlled trial evaluating aztreonam for inhalation solution (AZLI) in patients with cystic fibrosis (CF), mild lung disease and *P. aeruginosa* (PA). **Journal of Cystic Fibrosis**, v.9, p.S22, 2010.

WAINWRIGHT, C.E.; QUITTNER, A.L.; GELLER, D.E.; NAKAMURA, C.; WOOLDRIDGE, J.L.; GIBSON, R.L.; LEWIS, S.; MONTGOMERY, A.B. Aztreonam for inhalation solution (AZLI) in

patients with cystic fibrosis, mild lung impairment, and *P. aeruginosa*. **Journal of Cystic Fibrosis**, v.10, p.234–242, 2011.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis**. London: Churchill Livingstone, 1999. p. 75-96, 237-276.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis**: a textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. 2. ed. London: Churchill Livingstone, 2005.

WELLS, J.S.; TREJO, W.H.; PRINCIPE, P.A.; BUSH, K.; GEORGOPADAKOU, N.; BONNER, D.P.; SYKES, R.B. EM 5400, a family of monobactam antibiotics produced by *Agrobacterium radiobacter*. I. Taxonomy, fermentation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v.35, p.295-299, 1982.

WHO – World Health Organization. **Quality Assurance of Pharmaceuticals**: A compendium of guidelines and related materials. v. 2, Good Manufacturing Practices and Inspections. 2. ed. Geneva, 2007.

WHO – World Health Organization. **Good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products**. 2003. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 29 maio 2013.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p.S3-S7, 1999.

WONG, S.L.; SÖRGEL, F.; KINZIG, M.; GOLDBERG, M.R.; KITT, M.M.; BARRIERE, S.L. Lack of pharmacokinetic drug interactions following concomitant administration of telavancin with aztreonam or piperacillin/tazobactam in healthy participants. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v.49, p.816-823, 2009.

YOSHIMURA, F.; NIKAIDO, H. Diffusion of β -lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.2, p.84-92, 1985.