

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANILO FERNANDO RODRIGUES

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO DE
CEFEPIMA EM PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

Processo FAPESP n° 2013/20017-5

Processo FAPESP (BEPE) n° 2015/01551-6

ARARAQUARA - SP

2017

DANILO FERNANDO RODRIGUES

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO DE
CEFEPIMA EM PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

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

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R696a

Rodrigues, Danilo Fernando

Análise químico-farmacêutica de cloridrato de cefepima em pó liofilizado para solução injetável / Danilo Fernando Rodrigues. – Araraquara, 2017.
298 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Hérica Regina Nunes Salgado.

1. CLAE. 2. Cloridrato de cefepima. 3. Controle de qualidade. 4. Ensaio microbiológico.
5. Espectrofotometria. 6. Estabilidade. 7. Métodos analíticos. 8. Produtos de degradação.
9. Validação. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

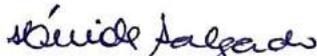
DANILO FERNANDO RODRIGUES

“ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO DE CEFEPIMA EM PÓ LIOFILIZADO
PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL”

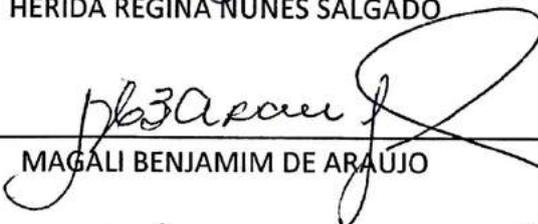
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 19 de maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA



HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO



MAGALI BENJAMIM DE ARAUJO



SELMA GUTIERREZ ANTONIO



MARLUS CHORILLI



JÉAN LEANDRO DOS SANTOS

*Dedico este trabalho à minha esposa,
Carla Rodrigues, que tanto me ajudou em
todos os momentos desta jornada e aos meus
pais por apoiarem e acreditarem sempre, pois
com Deus nada é impossível!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus* e à *Nossa Senhora Aparecida* pela oportunidade de aprimoramento profissional e pessoal que pude obter ao longo deste período, por me concederem saúde, sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar;

À minha amada esposa *Carla Rodrigues* pelo apoio incondicional e constante incentivo, respeito e paciência por toda esta jornada, sem você tudo seria mais difícil;

Aos meus pais *Oswaldo* e *Marilda* que sempre primaram pela minha educação, agradeço por me oferecerem a oportunidade de estudar, me apoiando, incentivando e fazendo crescer cada dia mais, sou eternamente grato pelos vossos ensinamentos;

Aos meus queridos irmãos *Renan* e *Cristiane* por todo apoio e incentivo;

À minha avó *Maria* pelas orações e pensamentos positivos enviados;

Agradeço aos meus cunhados *Antonio* e *Klares*, e às minhas cunhadas *Kamila*, *Rosiane* e *Priscilla* por todo apoio e amizade;

Aos meus amados sobrinhos *Thiago*, *Maria Clara*, *Loise* e *Manuela* agradeço por toda alegria e carinho;

Aos meus sogros *Clarismino* e *Celia* que, apesar da distância, sempre estiveram presentes me apoiando e incentivando durante esta jornada;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. *Hérida Regina Nunes Salgado* agradeço imensamente pela oportunidade de desenvolver este projeto juntos, pois sua competência científica e todo acompanhamento do trabalho, disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos, assim como pelas críticas, correções e sugestões feitas durante a orientação foram essenciais para o meu crescimento profissional;

Ao Prof. Dr. *Demian Rocha Ifa* “meu caro”, a gratidão é a memória do coração...

Agradeço pela valiosa contribuição e pela acolhida em seu laboratório no Canadá, por acreditar e ajudar na concretização deste projeto, pela parceria e amizade que vai além do lado profissional e por todo conhecimento compartilhado. Serei eternamente grato a você por tudo que fez por mim e pela minha esposa neste período;

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade, *Caroline Magnani, Mariane Curbete, Lívia Consortti, Felipe Fernandes, Ana Carolina Kogawa, Josilene Corrêa, Bianca de Marco, Mariana Teixeira, Camila Tavares, Rúbia Sversut e Ketylin Migliato* agradeço pelo acolhimento, por compartilhar vários momentos, pela amizade e conhecimento trocados durante a realização deste trabalho; em especial sou grato às minhas amigas *Eliane Tótoli* e *Tahisa Pedroso* pelo companheirismo, encorajamento e por estarem sempre presentes nesta jornada.

À técnica do Laboratório de Controle de Qualidade *Maria de Fátima Rodrigues Moreti* agradeço pela amizade, carinho e apoio durante estes anos de trabalho;

Ao meu amigo *Rogério* por ser um dos grandes incentivadores, por compartilhar os conhecimentos acadêmicos, profissionais e pessoais, pela parceria de sempre e por todos momentos vivenciados no Brasil e no Canadá juntamente com sua esposa *Taisa* e seu filho *Pedro*, por toda amizade e carinho prestados conosco;

Aos meus colegas *Amin, Rachel, Consuelo* e *Michelle* do Laboratório do Prof. Dr. *Demian Ifa*, o qual tive o prazer em conhecê-los no meu doutorado-sanduíche, agradeço pelos direcionamentos, pelas trocas de experiências e pelo auxílio técnico no manuseio do espectrômetro de massas.

À Prof.^a Dr.^a *Tais Maria Bauab* (FCFAr-UNESP) e ao Prof. Dr. *Álvaro José dos Santos Neto* (IQSC-USP) pela valiosa contribuição no meu exame de qualificação, tornando este trabalho melhor;

Agradeço aos membros da banca da defesa, Prof^a. Dr^a. *Magali Benjamim de Araújo* (FCF-UNIFAL), Prof^a. Dr^a. *Selma Gutierrez Antonio* (IQAr-UNESP), Prof. Dr. *Marlus Chorilli* (FCFAR-UNESP) e Prof. Dr. *Jean Leandro dos Santos* (FCFAR-UNESP), pela disponibilidade em contribuir e em tornar este trabalho ainda melhor;

À Coordenadora da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Prof^a. Dr^a. *Rosemeire Pietro*, agradeço pelos ensinamentos ministrados durante esta jornada;

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação da FCFAR, *Cláudia, Daniela, Aniele e Christiane* pela atenção prestada em todos os anos e dedicação aos alunos da pós-graduação;

Aos funcionários da biblioteca da FCFAR, por todo apoio prestado durante estes anos, em especial a *Maria Irani*, pelas correções das referências do trabalho e pela confecção da ficha catalográfica;

À indústria farmacêutica *ABL – Antibióticos do Brasil Ltda.* (Cosmópolis - SP) pela gentil doação de cloridrato de cefepima substância química de referência e amostras (genérico) e do adjuvante L-arginina para utilização no desenvolvimento do projeto, somos gratos pela parceria e auxílio;

À *CAPES* e à *PROPG*, agradeço pelo apoio financeiro concedido;

Agradeço em especial à *FAPESP* (Processo n° 2013/20017-5) por todo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa *BEPE* da *FAPESP* (Processo n° 2015/01551-6) que me proporcionou a oportunidade de realizar o doutorado-sanduíche em Toronto no Canadá;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - FCFAR/UNESP.

“Lembremo-nos sempre: somente quando se é capaz de compartilhar é que se enriquece de verdade; tudo aquilo que se compartilha se multiplica!”

Papa Francisco



RESUMO

RESUMO

O surgimento de micro-organismos resistentes a um grande número de antimicrobianos clinicamente aprovados vem sendo cada vez mais frequente, o que limita as opções para o tratamento das infecções bacterianas. Como estratégia, fármacos com elevadas atividades antimicrobianas encontram-se em evidência. Destaca-se uma classe de antimicrobianos, a das cefalosporinas, tendo como quarta geração a cefepima (CEF), um produto semi-sintético que apresenta atividade contra várias bactérias Gram-positivas (ex. *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina) e Gram-negativas (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) aeróbias. Seu mecanismo de ação é similar ao dos outros β -lactâmicos, ou seja, inibe a síntese da parede celular bacteriana, ligando-se a uma ou mais proteínas de ligação das penicilinas (*penicillin-binding proteins* - *PBPs*). Nesse contexto, pesquisas inovadoras envolvendo métodos analíticos são de fundamental importância e altamente relevantes para otimizar sua análise na indústria e garantir a qualidade do produto já comercializado. Análises qualitativas foram utilizadas e desenvolvidas durante o trabalho, a fim de promover a identificação do fármaco. Nesta pesquisa também foram desenvolvidos e validados métodos para quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Dentre eles, o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico foi validado utilizando a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, sendo linear na faixa de 36,0 a 81,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, onde apresentou potência de 102,46% e exatidão de 99,92%. O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi validado utilizando como fase móvel somente água purificada e etanol (45:55, v/v), no comprimento de onda (λ) de 258 nm, apresentando faixa linear de 10 a 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tempo de retenção (t_R) igual a 4,99 minutos. O doseamento apresentado por CLAE foi de 106,31% e a exatidão obteve um valor de 100,08%. Ensaios por espectrofotometria com absorção nas regiões do ultravioleta (UV) e do visível (VIS) tiveram seus parâmetros validados para a quantificação de CEF, empregando água purificada como solvente nos comprimentos de onda de 258 e 740 nm, respectivamente. O método por UV apresentou linearidade na faixa de 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com teor de 103,81% e exatidão de 100,80%. O método no VIS foi desenvolvido em escala miniaturizada, diminuindo o uso de materiais e solventes, bem como o tempo de preparo das análises. A linearidade do método no VIS foi apresentada na faixa de 15 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o valor de teor obtido foi de 104,26%. Por fim, outro método desenvolvido e validado foi por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV), o qual não utilizou solventes orgânicos para os ensaios, característica importante na redução de resíduos. O teor de CEF obtido pelo método de IV foi de 103,86%, dentro da faixa linear apresentada nas concentrações de 0,2 a 0,6 mg/pastilha de brometo de potássio (KBr) e com valor resultante da exatidão de 100,83%. Análises de variância (ANOVA) foram realizadas para os métodos validados, comprovando a segurança e a confiabilidade dos resultados obtidos. Análises de espectrometria de massas foram realizadas para detectar possíveis produtos após a degradação de CEF. Estudos de estabilidade de curta e longa duração de CEF em pó liofilizado também foram realizados, resultando em perdas nas porcentagens dos teores, ficando dentro do limite descrito na literatura. Assim, todos os métodos desenvolvidos e validados neste trabalho são voltados à química verde e recomendados para o controle de qualidade de CEF em formulação farmacêutica.

Palavras-chave: CLAE. Cloridrato de cefepima. Controle de qualidade. Ensaio microbiológico. Espectrofotometria. Estabilidade. Métodos analíticos. Produtos de degradação. Validação.



ABSTRACT

ABSTRACT

The emergence of resistant microorganisms to a large number of clinically approved antimicrobials has been increasingly used, which limits the options for the treatment of bacterial infections. As a strategy, drugs with high antimicrobial activities are in evidence. Stands out a class of antimicrobial, the cephalosporins, having as fourth generation cefepime (CEF), a semi-synthetic product which has activity against various Gram-positive bacteria (e.g. oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*) aerobic. Its mechanism of action is similar to other β -lactams, that mean, inhibits bacterial cell wall synthesis by binding to one or more penicillin-binding proteins - PBPs. In this context, innovative research involving analytical methods present fundamental importance and it is highly relevant to optimize its analysis in routine pharmaceutical industry and ensure quality of product already marketed. Qualitative analyzes were developed and used during work in order to promote the identification of the drug. In this research were also developed and validated methods for the quantification of CEF in lyophilised powder for solution for injection. Among them, microbiological test by turbidimetric method was validated using *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain, being linear in the range from 36.0 to 81.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, which has potency of 102.46% and 99.92% accuracy. The method using high performance liquid chromatography (HPLC) was performed using as mobile phase only purified water and ethanol (45:55, v/v) at a wavelength (λ) of 258 nm, showed the linear range in 10 to 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and retention time (t_R) equal to 4.99 minutes. The determination shown by HPLC was 106.31% and the accuracy obtained a value of 100.08%. Assays by spectrophotometry with absorption in the regions of ultraviolet (UV) and of visible (VIS) had their validated parameters to quantification CEF using purified water as solvent in the wavelengths of 258 and 740 nm, respectively. The method by UV showed linearity in the range of 10 to 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, with content of 103.81% and accuracy of 100.80%. The VIS method was developed on miniaturized scale, reducing the use of materials and solvents, as well as the time of prepare of the analyzes. The linearity of the VIS method was presented in the range of 15 to 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and the content value obtained was of 104.26%. Lastly, another method was developed and validated by spectrophotometry with absorption in the region of infrared (IR), which did not use organic solvents for the analysis, important feature in reducing residues. The CEF content obtained by the IR method was 103.86%, within the linear range shown in concentrations of 0.2 to 0.6 mg/pellet of potassium bromide (KBr) and with value resulting of accuracy of 100.83%. Analysis of variance (ANOVA) were performed for validated methods, proving the safety and reliability of the results obtained. Analyses of mass spectrometry were performed to detect possible products after CEF degradation. The accelerated and long term stability studies of CEF in lyophilized powder also were performed, decreasing the percentages of the contents, but in according with the limit described in the literature. Thus, all the methods developed and validated in this work are turned on green chemistry and recommended for the quality control of CEF in pharmaceutical formulation.

Keywords: Analytical methods. Cefepime hydrochloride. Degradation products. HPLC. Microbiological assay. Quality control. Spectrophotometry. Stability. Validation.



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Núcleo penicilina (a), cefalosporina (b) e cefamicina (c).....	52
Figura 2-	Estrutura química do cloridrato de cefepima (CAS 123171-59-5).....	53
Figura 3-	Variação do peso médio de vinte unidades de frascos-ampola de cefepima.....	88
Figura 4-	Ponto de fusão de CEF pó liofilizado para solução injetável antes (A) e após a fusão (B).....	90
Figura 5-	Perfil cromatográfico obtido de solução aquosa de CEF SQR e CEF amostra na concentração de 2,0 mg/mL. (a) Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. $R_f = 0,53$. (b) Fase móvel: metanol : água (60:40, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. $R_f = 0,40$. (P = SQR; A = amostra).....	94
Figura 6-	Perfil cromatográfico obtido de solução aquosa de CEF SQR e CEF amostra na concentração de 2,0 mg/mL e solução de excipiente. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. (P = SQR; A = amostra; E = excipiente).....	95
Figura 7-	Perfil cromatográfico obtido nas análises de degradação acelerada do CEF amostra em tempos de 0 h; 0,5 h; 1,5 h; 3 h; 24 h e 48 h. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. CEF = Amostra; F = Fotolítica (luz UVC 254 nm); N = Neutra (água, 60 °C); A = Ácida (HCl 0,1 M, 60 °C); B = Alcalina (NaOH 0,1 M, 60 °C); O = Oxidativa (H ₂ O ₂ 3%, 60 °C).....	98
Figura 8-	Sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta das soluções aquosas de CEF SQR 16 µg/mL (vermelho), CEF amostra 16 µg/mL (preto) e L-arginina 11,6 µg/mL (azul). (λ : 200-400 nm).....	101
Figura 9-	Comparação dos espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta utilizando soluções de CEF amostra a 16 µg/mL preparadas com: (A) água; (B) tampão fosfato de potássio pH 6,0; (C) tampão fosfato de potássio pH 7,2; (D) tampão fosfato de potássio pH 8,0; (E) metanol; (F) etanol; (G) ácido clorídrico 0,1 M; (H) hidróxido de sódio 0,001 M. (λ : 200-400 nm).....	102
Figura 10-	Sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do VIS das soluções aquosas de CEF SQR 30 µg/mL (vermelho), CEF amostra 30 µg/mL (preto) e L-arginina 21,75 µg/mL (azul). (λ : 400-800 nm).....	108
Figura 11-	Espectro de absorção obtido na região do infravermelho de CEF SQR 0,4 mg/pastilha de KBr.....	111
Figura 12-	Espectro de absorção obtido na região do infravermelho de CEF amostra 0,4 mg/pastilha de KBr.....	111

Figura 13-	Sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do infravermelho em pastilhas de KBr de CEF SQR 0,4 mg/pastilha (vermelho), CEF amostra 0,4 mg/pastilha (preto) e L-arginina 0,29 mg/pastilha (azul).....	112
Figura 14-	Cromatogramas obtidos por CLAE para soluções de CEF SQR e CEF amostra (40 µg/mL) sobrepostos. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). Vazão: 0,5 mL/min. Comprimento de onda: 258 nm. Tempo de retenção: 4,99 minutos.....	116
Figura 15-	Espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta das soluções aquosas de CEF SQR 16 µg/mL (vermelho), CEF amostra 16 µg/mL (preto) e L-arginina 11,6 µg/mL (azul) sobrepostos. (λ: 200-400 nm).....	125
Figura 16-	Curva de Ringbom preparada para análise de CEF SQR através do método de espectrofotometria com absorção na região do ultravioleta. (λ: 258 nm).....	127
Figura 17-	Curva analítica do método de espectrofotometria na região do ultravioleta para análise de CEF. (λ: 258 nm).....	129
Figura 18-	Ensaio realizado pelo método de espectrofotometria na região do VIS..	137
Figura 19-	Microplaca após a realização dos ensaios para a validação do método por espectrofotometria no VIS, utilizando as soluções aquosas de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina.....	143
Figura 20-	Espectros de absorção obtidos na região do VIS das soluções aquosas de CEF SQR 30 µg/mL (vermelho), CEF amostra 30 µg/mL (preto) e L-arginina 21,75 µg/mL (azul) sobrepostos. (λ: 400-800 nm).....	143
Figura 21-	Curva de Ringbom preparada para análise de CEF SQR através do método de espectrofotometria com absorção na região do VIS. (λ: 740 nm).....	145
Figura 22-	Curva analítica do método de espectrofotometria na região do VIS para análise de CEF. (λ: 740 nm).....	147
Figura 23-	Espectros do CEF amostra (30 µg/mL) submetido às degradações ácida (HCl 0,1 M), alcalina (NaOH 0,001 M), neutra (água) e oxidativa (H ₂ O ₂ 0,05%) após 6 horas a 60 °C e fotolítica (luz UVC 254 nm) após 6 horas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A) Preto: CEF amostra em tempo zero. B) Azul: fotolítica; Vermelho: neutra; Verde claro: ácida; Roxo: alcalina; Verde escuro: oxidativa; todas em 6 horas de degradação. (λ: 400-800 nm).....	149

Figura 24-	Etapas do método de espectrofotometria de absorção no infravermelho...	156
Figura 25-	Espectro de absorção obtido por espectrofotometria de infravermelho de CEF SQR 0,4 mg em pastilha de KBr com a região espectral selecionada para quantificação de CEF absorvida a $1815-1745\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao grupo carbonila C=O do anel β -lactâmico.....	165
Figura 26-	Curva analítica do método de espectrofotometria de infravermelho para análise de CEF.....	167
Figura 27-	Avaliação da seletividade através da sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do infravermelho em pastilhas de KBr de CEF SQR 0,4 mg/pastilha (vermelho), CEF amostra 0,4 mg/pastilha (preto) e L-arginina 0,29 mg/pastilha (azul).....	168
Figura 28-	Espectros de CEF amostra (0,4 mg/pastilha) submetida à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ após 2 horas de análise. A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 2 horas.....	170
Figura 29-	Espectros de CEF amostra (0,4 mg/pastilha) submetida à temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ após 2 horas de análise. A) Preto: tempo zero; B) Verde: tempo 2 horas.....	170
Figura 30-	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 do nível inferior comparando os efeitos calculados das variáveis e suas interações aos critérios de referência na avaliação do parâmetro de robustez do método por espectrofotometria de infravermelho para determinação de CEF.....	175
Figura 31-	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 do nível superior comparando os efeitos calculados das variáveis e suas interações aos critérios de referência na avaliação do parâmetro de robustez do método por espectrofotometria de infravermelho para determinação de CEF.....	175
Figura 32-	Medidas relacionadas à determinação da assimetria do pico cromatográfico (A_s), calculada pela Equação 4.....	184
Figura 33-	Cromatograma de CEF SQR ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C_{18} Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; $5\text{ }\mu\text{m}$). Vazão: 0,5 mL/min. Comprimento de onda: 258 nm. Tempo de retenção: 4,99 minutos.....	191
Figura 34-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE das soluções de CEF SQR e CEF amostra ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$). Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C_{18} Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; $5\text{ }\mu\text{m}$). Vazão: 0,5 mL/min. Comprimento de onda: 258 nm. Tempo de retenção: 4,99 minutos.....	191

Figura 35-	Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação ácida (HCl 0,1 M) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.....	193
Figura 36-	Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação alcalina (NaOH 0,001 M) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.....	194
Figura 37-	Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação neutra (água) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.....	194
Figura 38-	Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação fotolítica (luz UVC 254 nm) após 6 horas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.....	195
Figura 39-	Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação oxidativa (H ₂ O ₂ 0,05%) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.....	195
Figura 40-	Curva analítica de CEF SQR obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	197
Figura 41-	Etapas para o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	209
Figura 42-	Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico desenvolvido e validado para a determinação da potência de CEF realizado nas concentrações de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL. C-: Controle negativo; C+: Controle positivo.....	213
Figura 43-	Curvas analíticas das soluções de CEF SQR e CEF amostra, em concentrações de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL obtidas pelo método turbidimétrico. P : Padrão; A : Amostra.....	214
Figura 44-	Análise de espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI-MS).....	225
Figura 45-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF SQR (40 µg/mL).	225
Figura 46-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL).....	226

Figura 47-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de L-arginina (29 µg/mL).....	226
Figura 48-	Estrutura química do excipiente L-arginina (CAS 74-79-3).....	227
Figura 49-	Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS do íon precursor de m/z 481 [CEF+H] ⁺	227
Figura 50-	Impureza derivada da degradação do CEF. NMP: <i>N</i> -metilpirrolidona.....	228
Figura 51-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação ácida (HCl 0,1 <i>M</i>) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: HCl 0,1 <i>M</i>	231
Figura 52-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação alcalina (NaOH 0,001 <i>M</i>) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: NaOH 0,001 <i>M</i>	232
Figura 53-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação neutra (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: água purificada.....	233
Figura 54-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação fotolítica (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a temperatura ambiente. Branco: água purificada.....	234
Figura 55-	Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação oxidativa (H ₂ O ₂ 0,05%) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: H ₂ O ₂ 0,05%.....	235
Figura 56-	Análise de espectrometria de massas com ionização por <i>Paper Spray</i> (PSI-MS).....	244
Figura 57-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF SQR (2 mg/mL)..	245
Figura 58-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL).....	245
Figura 59-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de L-arginina (1,45 mg/mL).....	246
Figura 60-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação ácida (HCl 0,1 <i>M</i>) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: HCl 0,1 <i>M</i>	248

Figura 61-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação alcalina (NaOH 0,001 M) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: NaOH 0,001 M.....	249
Figura 62-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação neutra (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: água purificada.....	250
Figura 63-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação fotolítica (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a temperatura ambiente. Branco: água purificada.....	251
Figura 64-	Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação oxidativa (H ₂ O ₂ 0,05%) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: H ₂ O ₂ 0,05%.....	252
Figura 65-	Avaliação da cor apresentada por CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável obtidas no estudo de estabilidade. CD: Curta duração; LD: Longa duração.....	261
Figura 66-	Teores de CEF amostra em pó para solução injetável dos estudos de estabilidade de curta e longa duração obtidos por CLAE e ensaio microbiológico por turbidimetria. CD: Curta duração; LD: Longa duração.....	263



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica.....	57
Tabela 2-	Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas.....	69
Tabela 3-	Análises qualitativas apresentadas nos compêndios oficiais para CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	75
Tabela 4-	Análises quantitativas apresentadas nos compêndios oficiais para CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	76
Tabela 5-	Peso médio de vinte unidades de frascos-ampola de cefepima.....	87
Tabela 6-	Valores obtidos do ponto de fusão de CEF SQR e CEF amostra.....	89
Tabela 7-	Teor de umidade da CEF pó liofilizado para solução injetável determinado por analisador de umidade por infravermelho.....	91
Tabela 8-	Estudo de degradação acelerada de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável por CCD.....	97
Tabela 9-	Alterações dos parâmetros utilizados por Patel e colaboradores (2011) na validação do método espectrofotométrico com absorção na região do VIS.....	105
Tabela 10-	Picos obtidos no espectro de absorção na região do infravermelho de CEF SQR.....	112
Tabela 11-	Determinação da curva de Ringbom de CEF por espectrofotometria no ultravioleta.....	120
Tabela 12-	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico com absorção na região do ultravioleta.....	123
Tabela 13-	Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método por espectrofotometria com absorção na região do ultravioleta.....	124
Tabela 14-	Curva de Ringbom preparada para análise de CEF através do método de espectrofotometria com absorção na região do ultravioleta (λ : 258 nm)...	126
Tabela 15-	Doseamento obtido por espectrofotometria na região do ultravioleta para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	128
Tabela 16-	Valores das absorvâncias referentes à análise de CEF SQR para a construção da curva analítica do método de espectrofotometria de ultravioleta (λ : 258 nm).....	129

Tabela 17-	Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados utilizando o método de espectrofotometria na região do ultravioleta na obtenção da curva analítica de CEF SQR.....	130
Tabela 18-	Precisão interdias e entre analistas do método analítico para análise de CEF por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	131
Tabela 19-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias do método de ultravioleta.....	131
Tabela 20-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas do método de ultravioleta.	131
Tabela 21-	Determinação da exatidão do método analítico para análise de CEF por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	132
Tabela 22-	Valores apresentados para a determinação da robustez no método de espectrofotometria na região do ultravioleta.....	133
Tabela 23-	Volumes de cada solução utilizados nos ensaios quantitativos para a análise de CEF por espectrofotometria no VIS.....	137
Tabela 24-	Determinação da curva de Ringbom de CEF por espectrofotometria no VIS.....	138
Tabela 25-	Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método por espectrofotometria com absorção na região do VIS.....	142
Tabela 26-	Curva de Ringbom preparada para análise de CEF através do método de espectrofotometria com absorção na região do VIS (λ : 740 nm).....	144
Tabela 27-	Valores das absorvâncias referentes à análise de CEF SQR para a construção da curva analítica do método de espectrofotometria no VIS (λ : 740 nm).....	146
Tabela 28-	Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados utilizando o método de espectrofotometria na região do VIS na obtenção da curva analítica de CEF SQR.....	147
Tabela 29-	Teor obtido por espectrofotometria na região do VIS para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	148
Tabela 30-	Precisão interdias e entre analistas do método analítico para análise de CEF por espectrofotometria na região do VIS.....	150
Tabela 31-	Análise de variância (ANOVA) para precisão interdias do método de espectrofotometria no VIS.....	150
Tabela 32-	Análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas do método de espectrofotometria no VIS.....	150

Tabela 33-	Determinação da exatidão do método por espectrofotometria na região do VIS através da comparação de métodos.....	151
Tabela 34-	Análise de variância (ANOVA) para a exatidão do método de espectrofotometria no VIS por comparação de métodos.....	151
Tabela 35-	Teores apresentados para a determinação da robustez no método de espectrofotometria na região do VIS.....	152
Tabela 36-	Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método por espectrofotometria de infravermelho para determinação de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	160
Tabela 37-	Condições alteradas do parâmetro da robustez do método por espectrofotometria de infravermelho realizadas através dos planejamentos fatoriais 2^3 para os níveis superiores e inferiores.....	160
Tabela 38-	Matriz de planejamento de ensaios para as variações realizadas com o nível inferior (-1) do parâmetro de robustez pelo método de espectrofotometria de infravermelho.....	161
Tabela 39-	Matriz de planejamento de ensaios para as variações realizadas com o nível superior (1) do parâmetro de robustez pelo método de espectrofotometria de infravermelho.....	161
Tabela 40-	Elaboração dos coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^3 .	163
Tabela 41-	Doseamento obtido por espectrofotometria de infravermelho desenvolvido para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	166
Tabela 42-	Valores das absorvâncias referentes à análise de CEF SQR para a construção da curva analítica do método de espectrofotometria de infravermelho.....	166
Tabela 43-	Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados utilizando o método de espectrofotometria de infravermelho na obtenção da curva analítica de CEF SQR.....	167
Tabela 44-	Precisão interdias e entre analistas do método de espectrofotometria de infravermelho para análise de CEF.....	171
Tabela 45-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias do método de espectrofotometria de infravermelho de CEF.....	172
Tabela 46-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas do método de espectrofotometria de infravermelho de CEF.....	172

Tabela 47-	Determinação da exatidão do método de espectrofotometria de infravermelho para análise de CEF.....	173
Tabela 48-	Valores dos efeitos obtidos por meio dos coeficientes de contraste dos planejamentos fatoriais 2^3 dos níveis inferiores e superiores utilizando as médias das absorvâncias dos ensaios.....	174
Tabela 49-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para robustez do método de espectrofotometria de infravermelho do planejamento 2^3 realizado para o nível inferior.....	176
Tabela 50-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para robustez do método de espectrofotometria de infravermelho do planejamento 2^3 realizado para o nível superior.....	176
Tabela 51-	Condições cromatográficas testadas para o desenvolvimento de método por CLAE para quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	181
Tabela 52-	Parâmetros estabelecidos para o método de CLAE nas análises de CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	181
Tabela 53-	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método por CLAE.....	187
Tabela 54-	Avaliação da robustez utilizando o planejamento experimental de Plackett-Burman.....	188
Tabela 55-	Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método de CLAE...	188
Tabela 56-	Teores obtidos por sistema cromatográfico desenvolvido para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	192
Tabela 57-	Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	192
Tabela 58-	Valores das áreas referentes ao pico de CEF SQR para a construção da curva analítica de CLAE.....	196
Tabela 59-	Análise de variância dos valores de área determinados utilizando o método por CLAE na obtenção da curva analítica de CEF SQR.....	197
Tabela 60-	Precisão interdias e entre analistas do método analítico para determinação de CEF por CLAE.....	198
Tabela 61-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias.....	199

Tabela 62-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas.....	199
Tabela 63-	Determinação da exatidão do método analítico para análise de CEF por CLAE.....	199
Tabela 64-	Teores de cada variação obtidos no teste de Plackett-Burman.....	200
Tabela 65-	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	205
Tabela 66-	Parâmetros padronizados para ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico na avaliação de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	206
Tabela 67-	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método microbiológico por turbidimetria.....	211
Tabela 68-	Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método microbiológico turbidimétrico.....	212
Tabela 69-	Valores das absorvâncias de CEF SQR e CEF amostra para a determinação da curva analítica pelo método turbidimétrico.....	214
Tabela 70-	Análise estatística de variância das absorvâncias obtidas nas curvas analíticas do CEF pelo método turbidimétrico.....	215
Tabela 71-	Avaliação da precisão intermediária pelo método turbidimétrico para quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	216
Tabela 72-	Determinação da exatidão para análise de CEF por método turbidimétrico.....	216
Tabela 73-	Valores apresentados para a determinação da robustez no método microbiológico turbidimétrico.....	217
Tabela 74-	Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição ácida.....	236
Tabela 75-	Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição alcalina.....	237
Tabela 76-	Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição neutra.....	237
Tabela 77-	Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS de CEF para a condição fotolítica.....	238

Tabela 78-	Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS de CEF para a condição oxidativa.....	238
Tabela 79-	Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição ácida.....	253
Tabela 80-	Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição alcalina.....	254
Tabela 81-	Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição neutra.....	255
Tabela 82-	Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS de CEF para a condição fotolítica.....	255
Tabela 83-	Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS de CEF para a condição oxidativa.....	256
Tabela 84-	pH e teores de CEF em pó liofilizado para solução injetável apresentados nos estudos de estabilidade de curta e longa duração obtidos por CLAE e ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	262
Tabela 85-	Teores médios obtidos pelos métodos validados para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	266
Tabela 86-	Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) entre os métodos utilizados na quantificação de CEF pó liofilizado para solução injetável.....	267
Tabela 87-	Análise comparativa pelo teste de Tukey dos teores médios obtidos pelos métodos validados para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	267



LISTA DE EQUAÇÕES



LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1-	Cálculo de desvio padrão relativo (DPR).....	79
Equação 2-	Cálculo de Lambert-Beer para obtenção da absorvância.....	118
Equação 3-	Cálculo da concentração de CEF em pó liofilizado para solução injetável...	121
Equação 4-	Valor percentual de CEF nas amostras.....	121
Equação 5-	Porcentagem de CEF recuperada na exatidão.....	124
Equação 6-	Limite de detecção.....	125
Equação 7-	Limite de quantificação.....	125
Equação 8-	Cálculo do efeito de referência para o parâmetro da robustez do método de infravermelho.....	162
Equação 9-	Cálculo do efeito médio para cada fator avaliado na robustez do método de infravermelho.....	164
Equação 10-	Assimetria do pico cromatográfico.....	184
Equação 11-	Fator de retenção do pico cromatográfico.....	185
Equação 12-	Número de pratos do pico cromatográfico.....	185
Equação 13-	Avaliação do efeito das alterações nos parâmetros de robustez por Plackett-Burman.....	189
Equação 14-	Cálculo da potência de CEF em pó liofilizado para solução injetável.....	210



LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

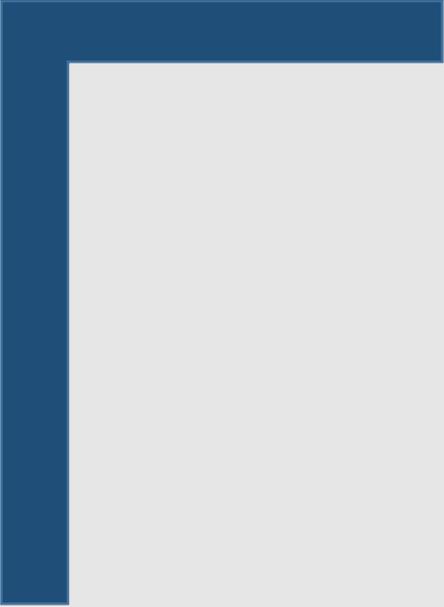
Quadro 1- Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	78
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Proposta para a fragmentação CID do íon de m/z 481, atribuído à cefepima $[CEF+H]^+$	229
Esquema 2-	Proposta dos produtos de degradação formados a partir da molécula de CEF (m/z 481) exposta nas condições ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa obtidos por ESI(+)-MS.....	240



LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS



LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

amu	Unidades de massa atômica (<i>atomic mass unit</i>)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
As	Fator de assimetria
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Atmosfera (pressão)
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
BV	Balão volumétrico
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CEF	Cloridrato de cefepima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQ	Controle de qualidade
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EM	Espectrometria de massas
e.p.m.	Erro padrão da média
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>)
FC	Fator de cauda
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F_{cal}	Valor de F calculado
F_{tab}	Valor de F tabelado
FM	Fase móvel
GL	Graus de liberdade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>

IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IV	Infravermelho
k	Fator de retenção
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
N	Número de pratos
QM	Quadrados médios
PBPs	Proteínas de ligação das penicilinas (<i>Penicillin-Binding Proteins</i>)
psi	<i>Pounds per Square Inch</i> (pressão)
PSI-MS	Espectrometria de massas com ionização por <i>paper spray</i> (<i>Paper spray ionization mass spectrometry</i>)
r	Coefficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R_f	Fator de retenção
rpm	Rotação por minuto
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
t_R	Tempo de retenção
t_{tab}	Valor de <i>t</i> tabelado
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
λ_{max}	Comprimento de onda máximo absorvido



SUMÁRIO



SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	21
LISTA DE EQUAÇÕES	28
LISTA DE QUADROS.....	30
LISTA DE ESQUEMAS	32
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. OBJETIVOS.....	49
2.1. Objetivos gerais.....	49
2.2. Objetivos específicos.....	49
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	51
3.1. Cefalosporinas.....	51
3.2. Cloridrato de cefepima.....	53
3.3. Métodos analíticos.....	54
3.4. Validação de métodos analíticos.....	77
4. ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO	82
4.1. Substância química de referência (SQR)	83
4.2. Forma farmacêutica.....	83
4.3. Diluentes da forma farmacêutica.....	83
5. ANÁLISE QUALITATIVA	85
5.1. Características físicas	85
5.1.1. Método.....	85
5.1.2. Resultados e discussão	85
5.2. Determinação do peso médio	85
5.2.1. Material.....	85
5.2.2. Método.....	86
5.2.3. Resultados e discussão	86
5.3. Determinação do ponto de fusão	88
5.3.1. Material.....	89
5.3.2. Método.....	89
5.3.3. Resultados e discussão	89

5.4. Determinação da umidade.....	90
5.4.1. Material.....	90
5.4.2. Método.....	91
5.4.3. Resultados e discussão	91
5.5. Cromatografia em camada delgada (CCD)	92
5.5.1. Material.....	92
5.5.2. Método.....	92
5.5.2.1. Degradação acelerada.....	93
5.5.3. Resultados e discussão	94
5.5.3.1. Degradação acelerada.....	96
5.6. Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível.....	99
5.6.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta	99
5.6.1.1. Material	99
5.6.1.2. Método.	100
5.6.1.2.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	100
5.6.1.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável	100
5.6.1.2.3. Preparo da solução de L-arginina	101
5.6.1.3. Resultados e discussão.....	101
5.6.2. Espectrofotometria na região do visível.....	104
5.6.2.1. Material	106
5.6.2.2. Método.	106
5.6.2.2.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	106
5.6.2.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável	107
5.6.2.2.3. Preparo da solução de L-arginina	107
5.6.2.2.4. Preparo da solução de carbonato de sódio 10%	107
5.6.2.2.5. Procedimento do método.....	107
5.6.2.3. Resultados e discussão.....	108
5.7. Espectrofotometria na região do infravermelho.....	109
5.7.1. Material.....	109
5.7.2. Método.....	110
5.7.2.1. Preparo das pastilhas de CEF SQR e CEF amostra	110
5.7.2.2. Preparo da pastilha de L-arginina	110
5.7.3. Resultados e discussão	110

5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	114
5.8.1. Material.....	114
5.8.2. Método.....	114
5.8.2.1. Preparo da solução de CEF SQR	114
5.8.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	115
5.8.2.3. Preparo da fase móvel.....	115
5.8.3. Resultados e discussão	115
6. ANÁLISE QUANTITATIVA	118
6.1. Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível.....	118
6.1.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	118
6.1.1.1. Material	119
6.1.1.2. Método	119
6.1.1.2.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	119
6.1.1.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável	119
6.1.1.3. Curva de Ringbom	120
6.1.1.4. Obtenção da curva analítica	121
6.1.1.5. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável.....	121
6.1.1.6. Validação do método desenvolvido para espectrofotometria na região do ultravioleta	122
6.1.1.6.1. Linearidade	122
6.1.1.6.2. Precisão	122
6.1.1.6.2.1. Repetibilidade (intradia).....	122
6.1.1.6.2.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)	122
6.1.1.6.3. Exatidão.....	123
6.1.1.6.4. Robustez.....	124
6.1.1.6.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	124
6.1.1.7. Resultados	125
6.1.1.7.1. Curva de Ringbom.....	126
6.1.1.7.2. Linearidade.....	127
6.1.1.7.3. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável.....	130
6.1.1.7.4. Precisão	130
6.1.1.7.5. Exatidão.....	132
6.1.1.7.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	132

6.1.1.7.7. Robustez	132
6.1.1.8. Discussão	133
6.1.2. Espectrofotometria na região do visível	134
6.1.2.1. Material	135
6.1.2.2. Método	136
6.1.2.2.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	136
6.1.2.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável	136
6.1.2.2.3. Procedimento do método.....	136
6.1.2.3. Curva de Ringbom	138
6.1.2.4. Obtenção da curva analítica	139
6.1.2.5. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável.....	139
6.1.2.6. Validação do método desenvolvido para espectrofotometria na região do visível	139
6.1.2.6.1. Linearidade	139
6.1.2.6.2. Seletividade	139
6.1.2.6.3. Precisão	140
6.1.2.6.3.1. Repetibilidade (intradia)	140
6.1.2.6.3.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)	140
6.1.2.6.4. Exatidão.....	141
6.1.2.6.5. Robustez.....	141
6.1.2.6.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	142
6.1.2.7. Resultados	142
6.1.2.7.1. Curva de Ringbom.....	144
6.1.2.7.2. Linearidade	145
6.1.2.7.3. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável.....	148
6.1.2.7.4. Seletividade	148
6.1.2.7.5. Precisão	149
6.1.2.7.6. Exatidão.....	151
6.1.2.7.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	152
6.1.2.7.8. Robustez	152
6.1.2.8. Discussão	152
6.2. Espectrofotometria na região do infravermelho.....	155
6.2.1. Material.....	155
6.2.2. Método.....	156

6.2.2.1. Preparo das pastilha de CEF SQR.....	157
6.2.2.2. Preparo da pastilha de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	157
6.2.2.3. Preparo da pastilha de L-arginina	157
6.2.3. Obtenção da curva analítica.....	157
6.2.4. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável	158
6.2.5. Validação do método de infravermelho.....	158
6.2.5.1. Linearidade.....	158
6.2.5.2. Seletividade.....	158
6.2.5.3. Precisão.....	159
6.2.5.3.1. Repetibilidade (intradia).....	159
6.2.5.3.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)	159
6.2.5.4. Exatidão	159
6.2.5.5. Robustez.....	160
6.2.5.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	164
6.2.6. Resultados.....	164
6.2.6.1. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável	165
6.2.6.2. Linearidade.....	166
6.2.6.3. Seletividade.....	168
6.2.6.4. Precisão.....	171
6.2.6.5. Exatidão	172
6.2.6.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	173
6.2.6.7. Robustez.....	173
6.2.7. Discussão	176
6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	179
6.3.1. Material.....	179
6.3.2. Método.....	180
6.3.2.1. Preparo da solução de CEF SQR	182
6.3.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	182
6.3.2.3. Preparo da fase móvel.....	182
6.3.3. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável	182
6.3.4. Validação do método desenvolvido para CLAE.....	183
6.3.4.1. Linearidade.....	183
6.3.4.2. Conformidade do sistema (<i>System suitability</i>).....	183

6.3.4.3. Seletividade.....	185
6.3.4.4. Precisão.....	186
6.3.4.4.1. Repetibilidade (intradia).....	186
6.3.4.4.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas).....	186
6.3.4.5. Exatidão.....	186
6.3.4.6. Robustez.....	187
6.3.4.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	189
6.3.5. Resultados.....	190
6.3.5.1. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável.....	192
6.3.5.2. Conformidade do sistema (<i>System suitability</i>).....	192
6.3.5.3. Seletividade.....	193
6.3.5.4. Linearidade.....	196
6.3.5.5. Precisão.....	198
6.3.5.6. Exatidão.....	199
6.3.5.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	200
6.3.5.8. Robustez.....	200
6.3.6. Discussão.....	201
6.4. Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....	204
6.4.1. Ensaio preliminares para o estabelecimento dos parâmetros analíticos.....	205
6.4.2. Execução do ensaio.....	206
6.4.3. Material.....	206
6.4.4. Método.....	207
6.4.4.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	207
6.4.4.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	207
6.4.4.3. Preparo do meio de cultura.....	207
6.4.4.4. Preparo do inóculo.....	208
6.4.4.5. Ensaio.....	208
6.4.4.6. Obtenção da curva analítica.....	209
6.4.4.7. Determinação da potência de cloridrato de cefepima.....	210
6.4.4.8. Validação do método.....	210
6.4.4.8.1. Linearidade.....	210
6.4.4.8.2. Precisão.....	210
6.4.4.8.3. Exatidão.....	211
6.4.4.8.4. Robustez.....	211

6.4.5. Resultados.....	212
6.4.5.1. Linearidade.....	213
6.4.5.2. Precisão.....	215
6.4.5.3. Exatidão.....	216
6.4.5.4. Robustez.....	216
6.4.6. Discussão.....	217
7. TRATAMENTO DE RESÍDUOS	220
8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM).....	222
8.1. Espectrometria de massas com ionização por <i>Electrospray</i> (ESI-MS).....	222
8.1.1. Material.....	222
8.1.2. Método.....	223
8.1.2.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	223
8.1.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	223
8.1.2.3. Preparo da solução de L-arginina.....	223
8.1.2.4. Identificação das massas do CEF pela técnica de ESI-MS.....	223
8.1.2.5. Degradação acelerada.....	224
8.1.3. Resultados.....	224
8.1.3.1. Fragmentação de segunda ordem (MS/MS) da molécula de CEF.....	227
8.1.3.2. Degradação acelerada pela técnica de ESI-MS.....	230
8.2. Espectrometria de massas com ionização por <i>Paper Spray</i> (PSI-MS).....	241
8.2.1. Material.....	242
8.2.2. Método.....	242
8.2.2.1. Preparo da solução de CEF SQR.....	242
8.2.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.....	242
8.2.2.3. Preparo da solução de L-arginina.....	243
8.2.2.4. Identificação das massas de CEF pela técnica de PSI-MS.....	243
8.2.2.5. Degradação acelerada.....	243
8.2.3. Resultados.....	244
8.2.3.1. Degradação acelerada pela técnica de PSI-MS.....	247
8.3. Discussão das técnicas ESI-MS e PSI-MS.....	257
9. ESTUDOS DE ESTABILIDADE	259
9.1. Material e método.....	259

9.2. Resultados e discussão	260
10. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS	266
10.1. Resultados e discussão	266
11. CONCLUSÕES.....	271
12. REFERÊNCIAS.....	274



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas a resistência a antimicrobianos desencadeou uma crise de proporção global. Cada vez mais os micro-organismos encontram-se resistentes a um vasto número de antimicrobianos clinicamente aprovados e estão se espalhando com facilidade entre os continentes. Esse fenômeno representa uma ameaça à saúde pública, já que limita as opções para o tratamento das infecções bacterianas (SILVEIRA et al., 2006; WRIGHT, 2011). Ao lado disso, existem poucos novos agentes antimicrobianos surgindo no mercado (WRIGHT, 2011; BLAIR et al., 2015). Desta maneira, o desenvolvimento de novos fármacos, com a capacidade de contornar esses mecanismos de resistência, representa importante avanço na prática clínica.

Como estratégia no combate aos micro-organismos resistentes, fármacos com elevada atividade antimicrobiana e mecanismos de ação com uma maior potência encontram-se em evidência. Neste contexto, destaca-se uma classe de antimicrobianos, a das cefalosporinas, sendo que a sua quarta geração possui a cefepima. As cefalosporinas são antibióticos β -lactâmicos isoladas de espécies *Cephalosporium* ou preparadas semi-sinteticamente (ELKADY; ABBAS, 2011), nesse caso a cefepima trata-se de um produto semi-sintético, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias (SWEETMAN, 2009; EL-RABBAT et al., 2012).

A necessidade de se demonstrar a qualidade das análises químicas utilizadas pela indústria farmacêutica é fundamental durante e depois da fabricação de medicamentos, visto que dados analíticos não confiáveis podem gerar grandes problemas, entre eles, danos à saúde da população e prejuízos financeiros irrecuperáveis (LA ROCA et al., 2007). Com isso, a etapa da validação de métodos analíticos é indispensável, pois apresenta impacto direto sobre a qualidade desses dados.

É de suma importância para garantir a qualidade do produto final que o controle de qualidade na indústria farmacêutica aprimore seus métodos para identificação do teor de substância ativa e o estudo das características físicas e químicas do fármaco. Deste modo, o desenvolvimento de métodos para análise de cefepima em produtos farmacêuticos é essencial para garantir a eficácia e segurança deste medicamento. Soma-se a isso, o fato de se tratar de um medicamento cuja monografia não está inserida nas farmacopeias do Brasil (2010) e seu suplemento (2016), da Argentina (2009), da Espanha (2005) e de Portugal (2005), e por terem sido encontrados poucos artigos referentes a métodos analíticos para o controle de qualidade e estudos de estabilidade para a forma farmacêutica (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005;

RFE, 2005; FARMACOPEA ARGENTINA, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2016).

Dessa forma, métodos analíticos necessitam ser desenvolvidos, validados e aprimorados para tal finalidade. Além disso, é extremamente importante investigar a estabilidade deste fármaco, bem como a presença ou formação de produtos de degradação, através de estudos de estabilidade das formulações. Assim sendo, este trabalho busca gerar informações relevantes para fortalecer o conhecimento científico e tecnológico.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa de cefepima em pó liofilizado para preparações injetáveis.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar análises qualitativas da amostra de cefepima em pó liofilizado para solução injetável através dos métodos tradicionais de controle de qualidade: características físicas; ponto de fusão; cromatografia em camada delgada (CCD); espectrofotometria nas regiões do ultravioleta (UV), visível (VIS) e infravermelho (IV).
- Desenvolver e validar métodos analíticos para análise da cefepima em pó liofilizado para solução injetável empregando a espectrofotometria nas regiões do UV, do VIS e do IV médio, o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV).
- Comparar estatisticamente os métodos propostos.
- Realizar estudo de estabilidade de curta e longa duração da amostra de cefepima.
- Propor os possíveis produtos formados a partir da degradação forçada da cefepima por espectrometria de massas (EM).



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cefalosporinas

O surgimento das cefalosporinas teve início em pesquisas realizadas pelo professor Giuseppe Brotzu, no ano de 1948, após o isolamento do micro-organismo *Cephalosporium acremonium* nas águas do mar próximas a uma saída de esgoto da costa da Sardenha, dando origem à primeira fonte das cefalosporinas. Os estudos realizados constataram que o crescimento *in vitro* de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi inibido, através dos filtrados não tratados de cultura deste fungo, indicando a produção de substâncias inibidoras (MARSHALL; BLAIR, 1999; ASBEL; LEVISON, 2000; AL-MOMANI, 2001; MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SAMANIDOU; HAPESHI; PAPADOYANNIS, 2003; EL-SHABOURY et al., 2007; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

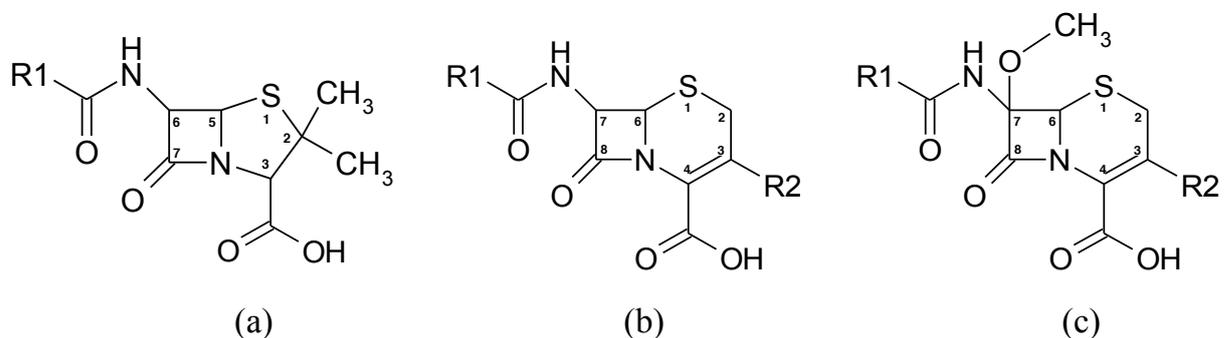
Anos mais tarde, observou-se que nos meios líquidos onde o fungo era cultivado foram encontrados três antibióticos distintos, sendo denominados de cefalosporinas P, N e C. Logo após, foi isolado o ácido 7-aminocefalosporânico, o núcleo ativo da cefalosporina C, percebendo-se que quando adicionava cadeias laterais a esta estrutura, tornava-se possível a produção de compostos semi-sintéticos dotados de atividade antibacteriana muito maior do que a da substância original (ASBEL; LEVISON, 2000; AL-MOMANI, 2001; MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SAMANIDOU; HAPESHI; PAPADOYANNIS, 2003; EL-SHABOURY et al., 2007; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As cefalosporinas são antimicrobianos β -lactâmicos de ampla utilização, da mesma forma que as penicilinas. Juntas essas classes constituem o maior grupo de antimicrobianos disponíveis. A penicilina e a cefalosporina surgiram nas décadas de 1940 e 1960, respectivamente, sendo altamente comercializadas e com grande importância terapêutica (OHMORI et al., 2011).

Existem algumas características que destacam a classe das cefalosporinas, como largo espectro de atividade antimicrobiana, nível de toxicidade baixo e perfil farmacocinético favorável. Em muitos casos esta é a classe de antimicrobianos de primeira escolha, sendo altamente empregada na prática clínica com indicação para diversos tratamentos como pneumonia, meningite, septicemia e infecções da pele e tecidos moles (MARSHALL; BLAIR, 1999; CHAN; CHAN; FRENCH, 1986; SALGADO, TOZO, 2007; MORENO, SALGADO, 2010; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A incorporação de diferentes substituintes nas cadeias laterais R1 e/ou R2 do núcleo das cefalosporinas, proporciona ao fármaco alterações em suas propriedades. Quando se trata de substituições na posição 7 do anel β -lactâmico a atividade antimicrobiana é modificada, já se ocorrerem na posição 3 do anel diidrotiazina alterações no metabolismo e nas propriedades farmacocinéticas do fármaco são observadas (ASBEL; LEVISON, 2000; MOHAMED et al., 2008; RANG et al., 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). As cefamicinas são antimicrobianos que possuem um grupo metóxi na posição 7 do anel β -lactâmico no núcleo do ácido 7-aminocefalosporânico, diferindo somente neste aspecto para os núcleos das cefalosporinas, conforme apresentados na Figura 1.

Figura 1- Núcleo penicilina (a), cefalosporina (b) e cefamicina (c).



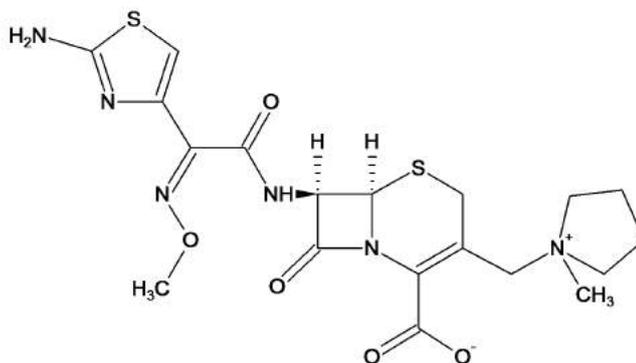
Fonte: Adaptada de BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012.

A classificação das cefalosporinas é realizada pela sua estrutura química, farmacologia clínica, resistência às β -lactamases ou espectro de atividade, sendo comumente utilizado o sistema de classificação por geração (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001). Após a síntese de ceftarolina e ceftobiprole, a classificação das cefalosporinas já se encontra na quinta geração (REYGAERT, 2011; JACQUELINE, TATTEVIN, 2012), sendo que para cada síntese nova realizada ocorrem importantes modificações nas características, como o aumento do espectro de atividade antimicrobiana entre bactérias Gram-negativas, diminuição da atividade frente às Gram-positivas e aumento progressivo na resistência às β -lactamases, quando comparadas da primeira à quinta geração (ASBEL; LEVISON, 2000; EL-SHABOURY et al., 2007; KUSABA, 2009).

3.2. Cloridrato de cefepima

O antimicrobiano cefepima de fórmula molecular $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2$ é um produto semi-sintético, da classe das cefalosporinas de quarta geração, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias (SWEETMAN, 2009; EL-RABBAT et al., 2012). A amostra em pó estéril e liofilizado para solução injetável é formada através de uma mistura de cloridrato de cefepima e L-arginina, na qual a L-arginina é adicionada para controlar o pH da solução reconstituída entre 4,0 e 6,0 (LIU; SANDERLAND, 2004a). Na Figura 2 é apresentada a estrutura química da cefepima.

Figura 2- Estrutura química da cefepima (CAS 88040-23-7).



Fonte: RODRIGUES; SALGADO, 2016.

O mecanismo de ação da cefepima é similar ao dos outros β -lactâmicos, ou seja, inibe a síntese da parede celular bacteriana. Devido à sua estrutura química, este fármaco é o único que contém um grupo de amônio quaternário carregado positivamente na posição C-3, gerando um “zwitterion”, que facilita a penetração pela membrana externa mais rapidamente que outras cefalosporinas. Dessa forma, liga-se a uma ou mais proteínas de ligação das penicilinas (*Penicillin-Binding Proteins* - *PBPs*), que estão situadas na face externa da membrana citoplasmática, e conseqüentemente, inibe a etapa final da transpeptidação do peptidoglicano havendo lise osmótica, impedindo assim a síntese da parede celular (MARTIN; KAYE, 2004, MAXCEF[®], 2013).

Esta cefalosporina de quarta geração atinge uma maior concentração nas células bacterianas sofrendo pouca ação de suas enzimas no espaço periplasmático. Além disso, possui na posição C-7 um grupo 2-aminotiazolilacetamida, que aumenta a sua resistência à degradação

por várias β -lactamases. A cefepima tem substituído muitas indicações do antimicrobiano ceftazidima (MARTIN; KAYE, 2004; SINGH, 2004).

Apresenta amplo espectro com excelente atividade contra bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Haemophilus influenzae*, *Proteus* sp., *Moraxella* sp., *Shigella* sp.) e alguns cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* sp.) (SANDERS; TENNEY; KESSLER, 1996; DIEKEMA et al., 1999). Quando comparada com cefalosporinas de terceira geração, a cefepima apresenta maior atividade contra organismos Gram-negativos e Gram-positivos (KUMAR et al., 2010). A indicação deste antimicrobiano é voltada para o tratamento de infecções do trato urinário, trato respiratório inferior, da pele e estruturas cutâneas, intra-abdominais, ginecológicas, assim como para septicemia, neutropenia febril e também para a profilaxia cirúrgica em pacientes submetidos à cirurgia intra-abdominal (MAXCEF[®], 2013).

O nome comercial da cefepima é Maxcef[®], o qual é comercializado no Brasil e na Argentina pelo Laboratório Farmacêutico Bristol-Myers Squibb. Na Austrália, Áustria, Canadá, Alemanha e nos Estados Unidos é comercializado com o nome de Maxipime[®], também pelo Laboratório Farmacêutico Bristol-Myers Squibb (SWEETMAN, 2009), que foi o detentor da patente do fármaco até 2007. O produto é vendido na apresentação de cartucho com 1 frasco-ampola contendo 500 mg, 1 g ou 2 g de cefepima/frasco para aplicação intravenosa (IV), para aplicação intramuscular (IM) a apresentação é de 500 mg ou 1 g, em ambos (IV ou IM) possuem aproximadamente 725 mg de L-arginina por grama de cefepima na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável (MAXCEF[®], 2013).

Sua posologia é recomendada por via intravenosa, através de infusão lenta (30 minutos), em dose de 1 g a cada 12 horas para infecções leves a moderadas, 2 g a cada 12 horas para infecções graves e 2 g a cada 8 horas para neutropenia febril (CHEATHAM et al., 2011). A meia-vida sérica deste fármaco é de aproximadamente 2 horas e cerca de 85% da dose administrada é recuperada na urina (BURGESS; HASTINGS; HARDIN, 2000; MAXCEF[®], 2013).

3.3. Métodos analíticos

A prospecção de novos métodos analíticos, o aperfeiçoamento e a validação dos métodos já existentes trazem inúmeros benefícios para a indústria farmacêutica, com a finalidade de economia tanto em custos quanto ao tempo de análise, fornecendo métodos mais simples e adequados para as análises de rotina do controle de qualidade.

Apesar de ser altamente estudada e pesquisada no que concerne à atividade antimicrobiana, farmacocinética e farmacodinâmica, quanto à determinação de cefepima e produtos de degradação, há poucos métodos de análise padronizados em compêndios oficiais e em periódicos de circulação internacional; dentre elas, destacam-se análises de identificação e/ou quantificação pelos métodos de: cromatografia em camada delgada (CCD) (DĄBROWSKA et al., 2015); espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e visível (VIS) (RÓDENAS et al., 1995; EVAGELOU; TSANTILI-KAKOULIDOU; KOUPPARIS, 2003; SUJITH; ABRAHAM; DIVAKAR, 2010; PATEL et al., 2011; ELAZAZY; SHALABY, 2012; EL-RABBAT et al., 2012; NANDA et al., 2012; RAMBABU; JYOTHIRMAYEE; NAGARAJU, 2012; CHAFLE, 2013; SINGH et al., 2013; PATEL CHAHANA; PATEL HARSHA; PATEL CHHAGANBHAI, 2013; HOSNY, 2014; BHATT et al., 2015; PAPANNA; KRISHNEGOWDA; NAGARAJA, 2015); eletroforese capilar (LIU; SUNDERLAND, 2004a; LIU; SUNDERLAND, 2004b; PRASANNA et al., 2010; ZHU; ZHANG; HU, 2010); infravermelho (BUGAY; NEWMAN; FINDLAY, 1996; ZHANG; FENG; HU, 2008; EL-RABBAT et al., 2012; ABDEL-FATTAH et al., 2013; FERDOUS et al., 2015; MOSTAFA et al., 2015) e potenciometria (EVAGELOU; TSANTILI-KAKOULIDOU; KOUPPARIS, 2003). Estudos de estabilidade e de produtos de degradação ou impurezas presentes na formulação realizados com cloridrato de cefepima também foram reportados em menores quantidades nos bancos de dados (RABOUAN-GUYON et al., 1997; FUBARA; NOTARI, 1998; USLU; OZKAN; ZUMAN, 2004; LIU; SUNDERLAND, 2004b; NOLIN; LAMBERT; OWENS JR, 2006; CHONG; HU, 2008; SUBRAMANIAN et al., 2009; JAGADEESH KUMAR et al., 2010; PRASANNA et al., 2010; KHAN; IQBAL; KHATTAK, 2012; ABDEL-FATTAH et al., 2013; BEHIN; PUNITHA; KRISHNAN, 2013; PAGE; STEVENSON; POWELL, 2014; DĄBROWSKA et al., 2015; MOSTAFA et al., 2015; SMITH et al., 2015).

Análises microbiológicas foram descritas em artigos científicos, sendo na maior parte análises por microdiluição em caldo, diluição em ágar e disco-difusão em ágar, com intuito de avaliação de CIM (Concentração Inibitória Mínima), dosagem em tecidos e secreções ou para parâmetros farmacocinéticos de matrizes biológicas (PAPAGORAS et al., 2003; VEDEL, 2005; SADER; FRITSCHER; JONES, 2006; SOUZA et al., 2006; GOUDAH et al., 2006; PETRIKKOS et al., 2006; ABD EL-ATY et al., 2007; MIRSALEHIAN et al., 2010; WAGNER et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011; JABALAMELI et al., 2012; LAMY et al., 2012; EL-HEWAITY, 2014), por outro lado, para o método turbidimétrico não foi localizado nenhum artigo.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta alto desempenho nas análises de quantificação e separação de compostos, além de ser sofisticada e uma das mais utilizadas atualmente. Apesar dessas propriedades, métodos cromatográficos com menor tempo de análise, acessíveis, custos reduzidos, que utilizem menores quantidades de solventes orgânicos e tóxicos, apresentando segurança ao analista e gerando menores quantidades de resíduos não afetando o meio ambiente, são assuntos que vêm se destacando mundialmente.

Na literatura foram encontrados vários métodos de CLAE para análise de CEF, apresentados cronologicamente nas Tabelas 1 e 2. A monografia com as análises de cloridrato de cefepima também foi localizada nos compêndios oficiais que descrevem este antimicrobiano na forma farmacêutica, sendo expostos na Tabela 3 e 4 (JP, 2011; USP 37, 2014). As Farmacopeias Britânica (2012) e Europeia (2011) descrevem somente monografias para o ingrediente farmacêutico ativo (IFA) (EP, 2011; BP, 2012). Grande parte dos métodos encontrados para a quantificação de CEF é para análises em matrizes biológicas, as quais utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos e tóxicos para os operadores e para o meio ambiente. Este fato vem ao encontro dos objetivos iniciais deste trabalho com a preocupação de desenvolver métodos analíticos ambientalmente favoráveis. Além disso, alguns métodos apresentaram-se complexos para a realização, necessitando de pré-tratamento do fármaco e de equipamentos modernos, o que, conseqüentemente, aumentam os custos da análise.

Tabela 1- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Supelcosil™ ABZ+ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Tampão fosfato monopotássico 20 mM : acetonitrila (94:6, v/v) ajuste de pH 2,0 com ácido ortofosfórico concentrado	UV 263	Soro humano	1,0	2,81	BREILH et al., 1999
Nova-Pak® C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 4 µm)	Ácido 1-octanossulfônico sal sódico 0,0023 M : acetonitrila (86:14, v/v) ajuste de pH 2,3 com ácido fosfórico 85%	UV 280	Soro humano	1,0	~ 10	BONAPACE et al., 1999
Partisil™ 5 ODS-3 C ₁₈ (100 x 4,6 mm; 5 µm)	Metanol : dodecil sulfato de sódio 0,01 M (ajuste de pH 3,0 com ácido acético glacial) : tetrahydrofurano : ácido tricloroacético 5% : ácido fosfórico 2,49 M (49,7:40,4:5,3:3,9:0,7, v/v/v/v/v)	UV 280	Urina humana	2,8	~ 10	BONAPACE et al., 1999
Hypersil™ BDS C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna (10 x 4,0 mm)	Metanol : tampão fosfato monossódico 0,025 M (13:87, v/v) ajuste de pH 3,0 com ácido ortofosfórico 25%	UV 270	Plasma humano e fluido vítreo	1,0	4,80	VALASSIS; PARISSI-POULOU; MACHERAS, 1999
Hypersil™ BDS C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna (20 x 4,6 mm) a 40 °C	Acetonitrila : acetato de amônio 0,05 M e 4% de ácido acético glacial (2,8:97,2, v/v) ajuste de pH 4,0 com hidróxido de sódio	UV 254	Plasma humano	1,0	4,40	CALAHORRA et al., 1999

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Nova-Pak® C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 4 μm) e Guard-Pak (4 μm)	Ácido octanossulfônico 0,0023 mol/L : acetonitrila (86:14, v/v) ajuste de pH 2,3 com ácido fosfórico 85%	ND*	Soro humano	1,0	ND*	BURGESS; HASTINGS; HARDIN, 2000
Polaris® C ₁₈ -A (150 x 4,6 mm; 5 μm)	Água : metanol : acetato de sódio 0,2 M : ácido acético 0,2 M (84,6:10:3,2:2,2, v/v/v/v)	UV 257	Soro de cães (recém-nascidos e adultos)	1,0	ND*	GARDNER; PAPICH, 2001
LiChrosorb® RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	Metanol : tampão fosfato monossódico 100 mM pH 3,0 (13:87, v/v)	UV 270	Fluido biliar de rato	1,0	5,6	CHANG et al., 2001a
LiChrosorb® RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	Metanol : tampão fosfato monossódico 100 mM pH 3,0 (13:87, v/v)	UV 270	Sangue e cérebro de rato	1,0	ND*	CHANG et al., 2001b
Hypersil™ com Nucleosil® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm) com pré-coluna com Hypersil™ ODS (15 x 4,6 mm; 5 μm) a 35 °C	Acetonitrila : acetato de amônio pH 4,0 (10:90, v/v para plasma; 12:88, v/v para urina ou fluido de diálise)	UV 280	Plasma, urina e fluido de diálise humano	1,0	Plasma: 3,9 ± 0,2 Urina e fluido de diálise: 3,5 ± 0,04	CHERTI et al., 2001

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Supelcosil™ ABZ+	ND*	UV 263	Soro e parênquima pulmonar humano	ND*	ND*	BREILH et al., 2001
Hichrom® C ₁₈ (7 x 4,6 mm; 3,5 µm)	Acetonitrila : acetato de amônio 20 mM (7:93, v/v) ajuste de pH 4,0 com ácido acético glacial	UV 254	Soro e vítreo humano	1,0	1,8 – 2,2	ARAS et al., 2002
Supelco® LC ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Borato de sódio 0,2 M (ajuste de pH 6,8 com hidróxido de sódio) : metanol (92:8, v/v)	UV 260	Plasma humano	1,0	6,06 ± 0,20	BUGNON et al., 2002
Atlantis dC ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Metanol : dihidrogeno fosfato 0,01 M pH 3,0 (15:85, v/v)	^a	Plasma humano	0,7	10,2	KIM et al., 2003
X-terra® RP-18	Tampão acetato de sódio 10 mM (pH 5,0) : acetonitrila (95:5, v/v)	UV 258	Soro humano	1,0	ND*	BARIRIAN et al., 2003
LiChrospher® 100 RP-18 (250 x 4,0 mm; 5 µm) com pré-coluna (10 x 4,0 mm)	Gradiente: A: Acetonitrila; B: tampão ácido fosfórico 0,1 M / hidróxido de sódio pH 3,0 e C: <i>n</i> -octilamina 0,01 M ajuste de pH 3,0 com ácido fosfórico (v/v/v) - 8% A : 46% B : 46% C 0 min 8% A : 46% B : 46% C 4 min 36% A : 32% B : 32% C 6 min 36% A : 32% B : 32% C 10 min 8% A : 46% B : 46% C 12 min	UV/VIS 0-3 min 350 3-5 min 259 5-8 min 350 8-9,5 min 278 9,5-10 min 350	Urina humana	1,3	4,03	OCAÑA GONZÁLEZ et al., 2004

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
μ Bondapak TM C ₁₈ (300 x 3,9 mm; 10 μ m)	Tampão acetato : acetonitrila (95:5, v/v) ajuste de pH 4,0 com ácido acético glacial	DAD 280	Plasma e dialisado ultrafiltrado de humano	2,0	6,85	ISLA et al., 2005
Inertsil [®] ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	Acetonitrila : acetato de amônio 20 mM pH 4,0 (10:90, v/v)	UV 254	Plasma e fluido cérebro espinhal humano	^a	~ 6,0	SHEN et al., 2005
LiChrospher [®] 100 RP- ₁₈ (250 x 4,0 mm; 5 μ m) com pré-coluna (10 x 4,0 mm)	Gradiente: A: Acetonitrila; B: tampão ácido fosfórico 0,1 M / hidróxido de sódio pH 3,0 e C: <i>n</i> -octilamina 0,01 M ajuste de pH 3,0 com ácido fosfórico (v/v/v) - 8% A : 46% B : 46% C 0 min 40% A : 30% B : 30% C 10 min 40% A : 30% B : 30% C 12 min 8% A : 46% B : 46% C 15 min	DAD 256	Urina humana	1,0	4,9	OCAÑA GONZÁLEZ; CALLEJÓN MOCHÓN; BARRAGÁN DE LA ROSA, 2005
LiChrospher [®] 100 RP- ₁₈ (250 x 4,0 mm; 5 μ m)	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) : metanol (75:25, v/v)	UV 256	Soro, urina e fluido cérebro espinhal humano	Soro e urina: 1,0 Fluido cérebro espinhal: 0,5	2,8 para vazão de 1,0 mL/min ND* para vazão de 0,5 mL/min	JIMÉNEZ PALACIOS et al., 2005

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Detecção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
^a	Água : acetonitrila : acetato de sódio 0,2 M : ácido acético 0,2 M (84,6:10:3,2:2,2, v/v/v/v) pH 5,1	UV 257	Soro de ovelha	1,5	5,01	PATEL; MODY; TRADA, 2006
Symmetry [®] shield RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Metanol : acetato de amônio 20 mM (13:87, v/v)	UV 254	Soro humano	1,0	6,82	CHEN; ZHANG, 2006
Zorbax [®] ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Água : acetonitrila : acetato de sódio 0,2 M : ácido acético 0,2 M (84,6:10:3,2:2,2, v/v/v/v) pH 5,1	UV 257	Soro de bezerros	1,5	5,0	PATEL; BHAVSAR; THAKER, 2006
Shim-pack [®] ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Tampão fosfato 0,025 M (pH 3,0) : acetonitrila (89:11, v/v)	UV 270	Plasma humano	1,0	^a	HU et al., 2007
Phenomenex [®] ODS3 C ₁₈ (200 x 4,6 mm; 5 µm) e Thermo [™] C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila : acetato de amônio 20 mM (10:90, v/v) ajuste de pH 4,0 com ácido acético glacial	UV 254	Plasma e fluido cérebro espinhal humano	1,0	ND*	WANG et al., 2007
Kromasil [®] C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Água : metanol : acetonitrila (91:5:4, v/v/v)	UV 254	Plasma humano	1,0	^a	XIA et al., 2007

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
µBondasphere C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 5 µm) a 40 °C	Tampão acetato de amônio 20 mM (pH 4,0) : acetonitrila (93:7, v/v)	UV 270	Plasma e fluido peritoneal humano	1,0	ND*	IKAWA et al., 2007
Supelcosil™ LC-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna C ₁₈	Tampão acetato 0,075 M (pH 5,0) : acetonitrila (92:8, v/v)	UV 230	Plasma humano	0,8	9,3	VERA LÓPEZ et al., 2007
HyperClone™ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Água bidestilada : metanol (1:1, v/v)	UV 260	Leite e soro de rato	1,0	ND*	LING; ALCORN, 2008
Diamonsil® C ₁₈	Acetato de amônio 20 mM (ajuste de pH 5,0 com ácido acético) : acetonitrila (90:10, v/v)	UV 254	Plasma humano	1,0	^a	DUAN; XIA; GUO, 2008
Onyx™ monolithic C ₁₈ (200 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna Onyx™ C ₁₈ (50 x 4,6 mm)	Gradiente: A: Fosfato de potássio dibásico 10 mM (ajuste de pH 7,0 com ácido fosfórico concentrado) e B: metanol 80% A : 20% B (v/v) 0 min e mantido por 3 min 10% A : 90% B (v/v) 4 min e mantido por 2 min 80% A : 20% B (v/v) 7 min	UV 254	Plasma e fluido de diálise humano	1,0	~ 3,4	FARTHING et al., 2008

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
μBondasphere C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 5 μm) a 40 °C	Tampão acetato de amônio 20 mM (pH 4,0) : acetonitrila (93:7, v/v)	UV 270	Plasma e fluido peritoneal humano	1,0	ND*	HIGUCHI et al., 2008
Symmetry® C ₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm) com pré-coluna (20 x 4,6 mm) a 25 °C	Gradiente: A: Acetonitrila e B: tampão fosfato 5% A : 95% B (v/v) 0 min e mantido por 5 min 50% A : 50% B (v/v) 20 min e mantido por 1 min 5% A : 95% B (v/v) 5 min	UV 200 - 400	Plasma humano	1,0	13,0	DENOOZ; CHARLIER, 2008
Zorbax® ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm)	Água : acetonitrila : acetato de sódio 0,2 M : ácido acético 0,2 M (84,6:10:3,2:2,2, v/v/v/v) pH 5,1	UV 257	Soro de cabra	1,5	5,0	PATANI et al., 2008
Zorbax® SB-C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 μm) com pré-coluna (12,5 x 4,6 mm; 5 μm)	Acetonitrila : acetato de amônio 30 mmol/L pH 4,0 (6:94, v/v)	UV 254	Plasma humano	1,0	^a	CHEN et al., 2009
ND*	Acetonitrila : acetato de amônio 30 mmol/L (5:95, v/v) pH 7,0	UV 280	Plasma humano	1,7	ND*	IBRAHIM et al., 2009

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
XTerra [®] C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna Phenomenex [®] (4 x 3,0 mm; 5 µm) a 32 °C	Gradiente: A: Tampão fosfato 40 mM (pH 3,2) e B: metanol 82% A : 18% B (v/v) 0-5 min; 55% A : 45% B (v/v) 5-15 min; 45% A : 55% B (v/v) 15-16 min e mantido até 21 min; 82% A : 18% B (v/v) 21-22 min	DAD 260	Plasma e fluido amniótico fetal humano	0,85	~ 5,3	NEMUTLU et al., 2009
LiChroCART Superspher [®] 100 RP-18 (125 x 4,0 mm; 5 µm) com pré-coluna C ₁₈ (4 x 4 mm) a 40 °C	1-octanossulfonato de sódio 5 mM (ajuste de pH 3,0 com ácido sulfúrico 2,5 M) : acetonitrila (79:21, v/v)	DAD 254	Soro e plasma de humano	1,0	1,72	DELATTRE et al., 2010
Hypersil [™] C ₁₈ ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila : hidróxido de tetrabutylamônio (TBAH) (20:80, v/v) em pH 5,0 (ácido ortofosfórico)	UV 230	Plasma humano	1,5	2,133 ± 0,02	SIDDIQUI et al., 2010
Aqua [™] RP-C ₁₈ ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna Waters C ₁₈	Metanol : tampão acetato 60 mM (18:82, v/v) contendo 4 x 10 ⁻⁵ M de Hg ₂ (NO ₃) ₂ e ajuste de pH 3,5 com ácido acético glacial	UV 263	Plasma e leite de cabra	1,0	8,82	EL-RABBAT et al., 2010

Continua na próxima página

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Detecção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Supelco [®] LC ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Borato 0,2 M : metanol (93:7, v/v)	UV 260	Plasma humano	ND*	ND*	CHAPUIS et al., 2010
Zorbax [®] 300-SCX (50 x 2,1 mm; 5 µm)	A: Tampão formiato de amônio 25 mM (ajuste de pH 2,79 com ácido fórmico) : acetonitrila (95:5, v/v) B: Combinação de 500 mM de formiato de amônio (pH 2,79) a fase móvel A (70:30, v/v) De 5% B a 90% B (v) 0-1 min e mantido por 0,5 min 100% B (v) 1,6 min e mantido por 0,4 min De 100% B a 5% B (v) 2,0 min e mantido por 1,5 min	MS-ESI <i>m/z</i> 481,0 → 86,2	Plasma de rato	0,5	~ 1,57	BU et al., 2010
XBridge [™] C ₁₈ (30 x 4,6 mm; 2,5 µm)	ND*	DAD ND*	Plasma humano	ND*	ND*	ROBERTS et al., 2010
Atlantis [®] T3 (150 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna Atlantis [®] T3 (20 x 4,6 mm; 5 µm)	Gradiente: A: ácido fosfórico 10 mM (ajuste de pH 2,0 com ácido clorídrico) e B: acetonitrila (v/v) De 93% - 81% A : 7% - 19% B (v/v) 6 min De 81% - 51% A : 19% - 49% B (v) 6-16 min	UV 230	Plasma humano	2,0	2,3	VERDIER et al., 2011

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Unison ODS UK- C ₁₈ (50 x 2,0 mm; 3 µm) a 30 °C	Gradiente: A: Formiato de amônio 10 mM contendo 0,1% de ácido fórmico e B: metanol contendo 0,1% de ácido fórmico 95% A : 5% B (v/v) 0-0,5 min 30% A : 70% B (v/v) 0,5-4,5 min 30% A : 70% B (v/v) 4,5-8 min	LC-MS/MS MRM: m/z 480,9 > 85,9	Soro humano	0,3	ND*	OHMORI et al., 2011
Onyx™ monolithic C ₁₈ (50 x 4,6 mm)	ND*	UV 295	Soro humano	ND*	ND*	CHEATHAM et al., 2011
Phenomenex® Luna® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 40 °C	Acetato de amônio 25 mM (ajuste de pH 4,0 com ácido acético glacial) : acetonitrila com metanol 50:50, v/v (86:14, v/v)	UV 257	Aditivo nutricional total (TNA)	0,9	5,4	IQBAL et al., 2012
ELITE Hypersil™ BDS C ₁₈ a 30 °C	Metanol : tampão fosfato (20:80, v/v)	UV 257	Plasma humano	1,0	^a	PENG; ZHANG; GUO, 2012
OmniSpher™ C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Gradiente: A: Água contendo 10 mM de K ₂ HPO ₄ e B: metanol 80% A : 20% B (v/v) 0-3 min 10% A : 90% B (v/v) 2 min 80% A : 20% B (v/v) 7 min	UV 254	Leite humano	1,0	ND*	BARBOSA et al., 2012

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Detecção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Thermo™ ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	Água : acetonitrila : acetato de sódio 0,2 M : ácido acético 0,2 M (84,6:10:3,2:2,2, v/v/v/v) pH 5,1	UV 257	Soro de cabra	1,5	ND*	PATEL et al., 2012a
Thermo™ ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	Água : acetonitrila : acetato de sódio 0,2 M : ácido acético 0,2 M (84,6:10:3,2:2,2, v/v/v/v) pH 5,1	UV 257	Soro de ovelha	1,5	ND*	PATEL et al., 2012b
Acquity® HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) com pré-coluna Acquity® BEH C ₁₈ (5 x 2,1 mm; 1,7 µm) a 40 °C	Gradiente: A: Tampão acetato de amônio / ácido acético 1 mM : Acetonitrila (95:5, v/v) B: Acetonitrila (v) 100% A 0-1 min; Aumento linear de B até 21% 1-2 min 99% B 3 min 100% A 4 min	UPLC-MS/MS MRM: m/z 481,1 > 323,7	Plasma humano	0,6	ND*	COLIN et al., 2013
YMC® ODS AQ (250 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna Phenomenex® C ₁₈ (4 x 3 mm) a 35 °C	Gradiente: A: Acetonitrila e B: tampão fosfato 0,05 M pH 3,8 8% A : 92% B (v/v) 0 min 10,3% A : 89,7% B (v/v) 0-7 min 22% A : 78% B (v/v) 7-7,1 min e mantido até 12 min 30% A : 70% B (v/v) 12-12,1 min 35% A : 65% B (v/v) 12,1-15 min e mantido até 18 min 8% A : 92% B (v/v) 18-18,1 min e mantido até 21 min	DAD 260	Soro humano	1,2	6,22	WOLFF et al., 2013

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito

Tabela 1 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em matriz biológica

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Matriz (es)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Shim-pack [®] C ₁₈ (50 x 2,0 mm; 2 µm) com pré-coluna Phenomenex [®] C ₁₈ (4 x 3 mm; 5 µm) a 30 °C	Gradiente: A: Tampão fosfato 40 mM (pH 3,2) e B: metanol 94% A : 6% B (v/v) 0-2,3 min 80% A : 20% B (v/v) 2,3-2,4 min e mantido até 5,0 min 94% A : 6% B (v/v) 5,0-5,1 min	DAD 260	Plasma de mulheres grávidas e não grávidas	0,3	~ 2,8	DOĞAN et al., 2013
Thermo [™] C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila : acetato de amônio 20 mM ajuste de pH 4,0 com ácido acético glacial (10:90, v/v)	UV 254	Plasma e fluido cérebro espinhal humano	1,0	ND*	HUANG et al., 2014
Kromasil [®] C ₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Ácido pentano sulfônico 0,02% (pH 3,0) : acetonitrila (63:47, v/v)	UV 219	Plasma humano	1,5	ND*	DHARUMAN; VASUDEVAN, 2014
Acquity [®] C ₁₈ (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) a 30 °C	Gradiente: A: metanol e B: ácido fórmico 0,01% 20% A : 80% B (v/v) 0 min e aumento linear para 100% A em 3,5 min e mantido por 1,0 min e retorno para as condições iniciais em 0,5 min 50% A : 50% B (v/v) 6,0 min	UPLC-MS/MS MRM: m/z 481,4 > 396,3	Urina, soro, fluido cérebro espinhal e aspirado brônquico humano	0,3	0,93 - 1,02	CAZORLA-REYES et al., 2014

*ND: Dado não descrito

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Brownlee-Perkin Elmer [®] Phenyl (100 x 4,6 mm; 5 µm)	Água : acetonitrila (94,5:5,5, v/v) contendo ácido pentano sulfônico 0,015 M; ajuste de pH 3,4 com ácido acético glacial e depois pH 4,0 com hidróxido de potássio 45%	UV 280	1,5	6,9	MADDOX; STEWART, 1999
LiChrosorb [®] ODS RP-18 (250 x 4 mm; 10 µm)	A: água : acetonitrila (75:25, v/v) pH ajustado com ácido fosfórico em valores entre 2 a 6 B: acetonitrila e tampão universal (10:90, v/v). Tampão Universal: volumes iguais de ácido fosfórico 0,1 M, ácido acético 0,1 M, e ácido bórico 0,1 M. pH ajustado com ácido fosfórico em valores entre 2,5 e 7,5	UV 300	1,0	ND*	PISTOS; TSANTILI-KAKOULIDOU; KOUPPARIS, 2003
C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila 0,015 M : pentanossulfonato de sódio (9:91, v/v) (pH 4,0)	UV 258	0,8	^a	YAN et al., 2004
C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	A: dihidrogeno fosfato de amônio 0,005 M : acetonitrila (93:7, v/v) B: dihidrogeno fosfato de amônio 0,005 M : acetonitrila (70:30, v/v)	UV 257	^a	^a	WANG, 2005
Lichrosorb [®] RP-18 ODS (250 x 4 mm; 10 µm)	Metanol : tampão fosfato 100 mM (20:80, v/v) (pH 3,0)	UV 260	ND*	ND*	KOUFOPOULOU, et al. 2006

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 2 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
μ Bondapak™ C ₁₈ (300 x 3,9 mm; 10 μ m)	Água : acetonitrila (94,5:5,5, v/v) contendo 0,015 M de ácido pentanossulfônico e ajuste de pH 4,0 com ácido acético glacial	UV 280	1,5	6,9	NOLIN; LAMBERT; OWENS JR, 2006
Hypersil™ ODS	Acetonitrila : pentanossulfonato de sódio	UV 215	1,0	^a	GUO; YUE, 2006
Kromasil® C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	Pentanossulfonato de sódio : acetonitrila (96:4, v/v)	UV 254	1,0	^a	ZHANG et al., 2008
C ₁₈ ^a	Pentanossulfonato de sódio (pH 3,4 com ácido acético glacial, e em seguida ajuste do pH 4,0 com 0,1 M hidróxido de sódio) (950:50, v/v)	^a	^a	^a	TIEGANG, 2009
Eclipse® XDB-C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m) com pré-coluna Zorbax® SB-C ₁₈ (12,5 x 4,6 mm; 5 μ m)	Metanol : acetato de sódio 0,02 M (30:70, v/v)	UV 260	1,0	6 - 8,5	JIANG; WANG; JI, 2010
Hypersil™ C ₁₈ ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	Acetonitrila : hidróxido de tetrabutilamônio (TBAH) (20:80, v/v) em pH 5,0 (ácido ortofosfórico)	UV 230	1,5	2,133 \pm 0,02	SIDDIQUI et al., 2010

Continua na próxima página; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 2 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Metanol : água (70:30, v/v)	UV 250	0,8	^a	JANE; PRASHANT; SUBRAHMANYAM, 2010
XTerra [®] MS C ₁₈ (150 x 2,1 mm; 5 µm) HILIC - Click β-CD (150 x 2,1 mm; 5 µm) e Atlantis [®] Silica (100 x 2,1 mm; 5 µm) a 30 °C	Gradiente: A: formiato de amônio 10 mM (pH 6,8) e B: acetonitrila : formiato de amônio 100 mM (90:10, v/v) em pH 6,8 (v/v) - 90% A : 60% B em 20 min 100% A : 70% B em 15 min, 70% B em 10 min 88% A : 65% B em 20 min, 65% B em 10 min 100% A : 75% B em 20 min, 75% B em 10 min	UV 254	0,2	ND*	LIU et al., 2011
µBondapak [®] C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 10 µm)	Fosfato de potássio monobásico (50 mM, pH 4,6) : acetonitrila (80:20, v/v)	UV 254	1,0	4,66	ELKADY; ABBAS, 2011
Gemini [®] RP-C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) com pré-coluna a 25 °C	Tampão acético (0,015 M sal de ácido sulfônico 1-pentano sódio levado para pH 3,4 com ácido acético glacial e, em seguida, para pH 4,0 com 45% hidróxido de potássio) : acetonitrila (940:60, v/v) (pH 4,0)	UV 254	1,5	10,990	KODYM et al., 2011

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 2 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Sephadex [®] G-10 (400 x 13,0 mm)	A: Tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) B: Água	UV 254	1,0	^a	NING; YIJUN, 2011
L1 (300 x 3,9 mm; 5 µm)	1-pentanossulfonato de sódio em pH 3,4 (ácido acético glacial) e, em seguida, para pH 4,0 (hidróxido de potássio) : acetonitrila (94:6, v/v)	UV 254	2,0	4,940	SINGH; SHAH; BHARTI, 2011
C ₁₈ (250 x 25 mm, 25 µm)	Água : acetonitrila (90:10, v/v)	UV 212	1,0	6,23	VIMAL, 2012
Hypersil [™] C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5µm) a 20 ± 1 °C	Água : acetonitrila (94:6, v/v) contendo 1-pentanossulfonato de sódio (2,88 mg/mL) em pH 3,4 (ácido acético glacial)	UV 254	1,5	4,705	KHAN; IQBAL; KHATTAK, 2012
C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	Água : acetonitrila (90:10, v/v)	UV 255	1,0	ND*	TORRES et al., 2012

Continua na próxima página; *ND: Dado não descrito; ^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Tabela 2 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
Symmetry [®] C ₁₈ (75 x 4,61 mm; 3,5 µm) a 35 °C	Gradiente: A: Tampão : acetonitrila (850:150, v/v) e B: Tampão : acetonitrila (250:750, v/v) Tampão: 13,2 mL de solução aquosa a 40% de hidróxido de tetrabutylamônio (TBAH) em 4000 mL água purificada em pH 6,8 (ácido ortofosfórico) 100% A : 0% B (v/v) 0 min 100% A : 0% B (v/v) 6 min 85% A : 15% B (v/v) 18 min 60% A : 40% B (v/v) 40 min 100% A : 0% B (v/v) 45 min 100% A : 0% B (v/v) 50 min	UV 215 - 254	1,0	0,95	TRIVEDI; KSHTRI; PATEL, 2013
Inertsil [®] ODS 3V (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Gradiente: A: 0,08 M de acetato de amônio em 1000 mL de água com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico diluído e B: água : acetonitrila (50:50, v/v) 80% A : 20% B (v/v) 0 min 50% A : 50% B (v/v) 3 min 30% A : 70% B (v/v) 5 min 30% A : 70% B (v/v) 10 min 80% A : 20% B (v/v) 11 min 80% A : 20% B (v/v) 15 min	UV 220	0,8	3,722	NEELIMA et al., 2013

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefepima em formas farmacêuticas

Coluna	Fase Móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	Referência
PrincetonSPHER-100 C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Tampão fosfato monopotássico 25 mM (pH 6,2) : acetonitrila (94:6, v/v)	UV 210	1,0	9,973	TAMBOLI; PATIL, 2013
Symmetry [®] ODS C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Tampão fosfato monopotássico (3,4 g em 1000 mL de água; pH 2,4) : metanol : acetonitrila (90:5:5, v/v/v)	DAD 260	1,1	2,241	SUNITHA et al., 2013
Sunfire [™] C ₁₈ (50 x 4,6 mm; 5 µm) a 30 °C	Tampão fosfato monopotássico 0,02 M : acetonitrila (95:5, v/v) pH 3,0	UV 220	0,8	2,243	BHAVANA et al., 2013
Inertsil [®] ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Tampão fosfato monopotássico 25 mM (pH 3,0) : acetonitrila (60:40, v/v)	UV 226	1,0	3,140	MARRAPU et al., 2013

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3- Análises qualitativas apresentadas nos compêndios oficiais para CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Testes Farmacopeicos Qualitativos		
Característica	Identificação	Referências
<p>Aspecto: Pó branco a amarelado claro.</p> <p>Solubilidade: Facilmente solúvel em água e metanol, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter.</p> <p>pH: Solução a 10% em água - pH de 4,0 a 6,0.</p>	<p>A. Teste colorimétrico utilizando as soluções de cloreto de hidroxilamônio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e cloreto férrico (III)</p> <p>B. Espectrofotometria de absorção no UV-VIS</p>	<p>JP, 2011</p>
<p>Aspecto: Branco ou quase branco, cristalino, sólido não higroscópico.</p> <p>Solubilidade: Facilmente solúvel em água.</p>	<p>A. Cromatografia em camada delgada</p>	<p>USP 37, 2014</p>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4- Análises quantitativas apresentadas nos compêndios oficiais para CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Testes Farmacopeicos Quantitativos					
Método	Coluna	Fase Móvel	Condições	Sistema de detecção (nm)	Referências
CLAE	C ₁₈ (300 x 3,9 mm; 10 µm)	Acetonitrila : Solução A (50:950) v/v Solução A: 1-pentanossulfato de sódio (261 g em 100 mL) para pH 3,4 com ácido acético, depois pH ajustado para 4,0 com hidróxido de potássio (13 g em 20 mL).	Vazão: Ajustar a vazão de modo que o tempo de retenção da cefepima seja cerca de 8 min Injeção: 10 µL Temperatura: 40 °C	UV 254	JP, 2011
CLAE	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Solução A: 0,68 mg/mL de fosfato de potássio monobásico em água. Solução B: Acetonitrila : Solução A (1:9, v/v), ajuste de pH 5,0 com 2% de ácido fosfórico ou 2% de hidróxido de potássio. Solução C: Acetonitrila : Solução A (1:1, v/v), ajuste de pH 5,0 com 2% de ácido fosfórico ou 2% de hidróxido de potássio. Gradiente: 100% B : 0% C - 0 min 100% B : 0% C - 10 min 50% B : 50% C - 30 min 50% B : 50% C - 35 min 100% B : 0% C - 36 min 100% B : 0% C - 45 min	Vazão: 1 mL/min Injeção: 10 µL	UV 254	USP 37, 2014

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pesquisas envolvendo métodos analíticos são fundamentais e altamente relevantes para otimizar e inovar sua análise na indústria, bem como garantir a qualidade do produto já comercializado.

Os métodos reportados da literatura apresentam formas distintas para análise de CEF, no entanto para que possam ser empregados para este propósito devem-se considerar os pontos positivos e os negativos de sua viabilidade. Todavia, determinados métodos demonstraram ser pouco seletivos, complexos, demorados, sendo alguns de alto investimento para as análises.

A Farmacopeia Americana 37^a ed. (USP 37, 2014) e a Japonesa 16^a ed. (JP, 2011) descrevem, pelo método de CLAE, a quantificação de cloridrato de cefepima na forma pura (IFA) e em produtos farmacêuticos, utilizando fases móveis com soluções tamponantes e acetonitrila apresentadas na Tabela 4. Por outro lado, a Farmacopeia Britânica (BP, 2012) descreve também a quantificação por CLAE, mas somente para o IFA do cloridrato de cefepima e utiliza como fase móvel acetonitrila: diidrogenofosfato de potássio, hidróxido de potássio, pH 5,0, pouco similar aos outros dois compêndios. Dessa maneira, o desenvolvimento de novos métodos analíticos ou mesmo a otimização de métodos existentes, como neste caso, se faz necessário sempre que se perceba o uso desnecessário de materiais e solventes, desgaste de equipamentos, solventes tóxicos e geração excessiva de resíduos.

3.4. Validação de métodos analíticos

A validação de método analítico é um aspecto primordial da garantia da qualidade analítica e vem se destacando na literatura, devido apresentar parâmetros associados à adequabilidade do método para o qual foi pretendido (FDA, 2000; BARROS, 2002; RIBANI, 2004; ICH, 2005; USP 37, 2014). Neste contexto, deve ser um processo sistematicamente planejado, organizado e executado, envolvendo o desenvolvimento, estudos de pré-validação e, por fim, a validação do método (BLIESNER, 2006).

Os guias utilizados para a validação, tais como, ICH, ISO, ANVISA, INMETRO e USP 37 descrevem que a validação de um método analítico é parte fundamental para que o produto tenha assegurada a sua qualidade (ISO, 1999; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP 37, 2014). Na Resolução RE nº 899 é apresentado o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, o qual descreve que a validação por meio de estudos experimentais assegure a confiabilidade dos resultados, através de exigências das aplicações analíticas (BRASIL, 2003). Deste modo, o método deve apresentar seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e exatidão adequadas à análise.

Os métodos analíticos podem ser classificados em quatro categorias, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003; USP 37, 2014):

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

Categoria II: Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

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

Categoria IV: Testes de identificação.

Para cada categoria de métodos analíticos é exigido um conjunto de testes, conforme descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Sim	Não
	Intermediária	**	**	**	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 necessária a comprovação da precisão intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003.

Os parâmetros da validação são apresentados abaixo de acordo com a Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003):

Especificidade e Seletividade: O método é específico ou seletivo quando possui capacidade de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e elementos da matriz.

Linearidade: A linearidade representa a capacidade de um método analítico em demonstrar que seus resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa especificada.

Precisão: A precisão de um método é representada através da proximidade dos resultados obtidos em análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. Existem três maneiras para se avaliar a precisão, sendo pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Na repetibilidade a sua determinação é realizada por meio de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. Por outro lado, a reprodutibilidade de um método é avaliada em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão expressa como resultado o desvio padrão relativo - DPR, apresentado na Equação 1.

$$DPR = \frac{DP}{Média} \times 100$$

Equação 1

Em que:

DP = Desvio Padrão

Média = média dos valores obtidos

Limite de detecção: Através das condições experimentais estabelecidas, o limite de detecção não consegue quantificar, mas detecta a menor quantidade do analito presente em uma amostra.

Limite de quantificação: Através das condições experimentais estabelecidas, o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis.

Exatidão: A exatidão de um método é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão pode ser calculada de várias formas, dependendo do objetivo da análise, que poderá ser: análise de fármacos, análise de formas farmacêuticas e análise de impurezas.

Robustez: É a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Os dados obtidos após um processo de validação devem ser avaliados através de análises estatísticas. Trata-se de ferramentas essenciais que geram fundamentos científico-matemáticos aos resultados obtidos, dentre elas se pode citar a análise de variância (ANOVA) e o teste *t Student* (LA ROCA et al., 2007).

No processo de validação analítica, os estudos estatísticos dos dados gerados são de suma importância, garantindo a conformidade com as exigências regulatórias e evitando falsas conclusões nos estudos realizados.

Apesar da comprovada eficácia e segurança no seu uso, a cefepima, até o momento, possui apenas um método de análise padronizado em compêndios oficiais. Destaca-se a importância e a repercussão deste estudo na obtenção de métodos simples, atuais e inovadores, uma vez que não são encontrados em compêndios oficiais. Desta forma, para garantir que os métodos desenvolvidos atendam às exigências das aplicações analíticas, foram realizadas as validações, com a determinação de parâmetros como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014). Os resultados obtidos, utilizando os métodos propostos, foram comparados entre si estatisticamente, através de análise de variância (ANOVA).



ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO



4. ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO

Nome genérico: Cloridrato de cefepima

Nome químico: 1-[[[(6R,7R)-7-[2-(2-amino-4-tiazolil)-gioxilamida]-2-carboxi-8-oxo-5-tiozabicyclo [4.2.0] oct-2-en-3-il]metil]-1-metilpirrolidina cloreto, 72-(Z)-(O-metiloxima), monoclórídato, monoidratado

Fórmula química: C₁₉H₂₅ClN₆O₅S₂·HCl·H₂O

Massas moleculares da cefepima e do cloridrato de cefepima: 480,56 g/mol e 571,50 g/mol, respectivamente.

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco, não higroscópico; é facilmente solúvel em água e metanol, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter (JP, 2011; USP 37, 2014).

Categoria: Antimicrobiano

Classe: Cefalosporina de quarta geração

pH: De 4 a 6.

pKa: Os valores de pKa de CEF foram citados na literatura, sendo para pKa ácido 1,3 e 1,5 e para alcalino 3,1; 3,2; 3,03 e 3,36 (PISTOS; TSANTILI-KAKOULIDOU; KOUPPARIS, 2003). Outros trabalhos citam para pKa ácido o valor 1,12 e para alcalino 3,07 (MRESTANI et al., 1998; EVAGELOU; TSANTILI-KAKOULIDOU; KOUPPARIS, 2003; KOUFOPOULOU et al., 2006).

Comercialização de cefepima no Brasil: No Brasil o CEF é comercializado como cloridrato de cefepima (genérico) pelos Laboratórios AB Farmoquímica, Antibióticos do Brasil Ltda (ABL), Aurobindo Pharma, Eurofarma, Novafarma e Ranbaxy, Cefepen[®] pelo Laboratório Cellofarm, Cemax[®] pelo Laboratório BioChimico, Clocef[®] pelo Laboratório Teuto, Maxcef[®]

pelo Laboratório Bristol-Myers Squibb e Unifepim[®] pelo Laboratório União Química (SWEETMAN, 2009).

Comercialização de cefepima no mundo: *África do Sul:* Maxipime[®]; *Alemanha:* Maxipime[®]; *Argentina:* Cefimen-K[®]; Maxcef[®]; Rivepime[®]; *Austrália:* Maxipime[®]; *Áustria:* Maxipime[®]; *Bélgica:* Maxipime[®]; *Canadá:* Maxipime[®]; *Chile:* Maxipime[®]; *Dinamarca:* Maxipime[®]; *Espanha:* Maxipime[®]; *EUA:* Maxipime[®]; *Filipinas:* Cepimax[®]; *Finlândia:* Maxipime[®]; *França:* Axepim[®]; *Grécia:* Anticipim[®]; Gencef[®]; Maxinject[®]; Maxipime[®]; Verapime[®]; Zefipime[®]; *Hong Kong:* Maxipime[®]; *Hungria:* Maxipime[®]; *Índia:* Biopime[®]; Ceficad[®]; Forpar[®]; *Indonésia:* Exepime[®]; Maxicef[®]; Maxipime[®]; Procepim[®]; Sandocef[®]; *Irlanda:* Maxipime[®]; *Israel:* Maxcef[®]; *Itália:* Cepim[®]; Cepimex[®]; Maxipime[®]; *Malásia:* Maxipime[®]; *México:* Maxipime[®]; *Nova Zelândia:* Maxipime[®]; *Polônia:* Maxipime[®]; *Portugal:* Maxipime[®]; *República Tcheca:* Maxipime[®]; *Rússia:* Maxipime[®] (Максипим); *Singapura:* Maxipime[®]; *Suécia:* Maxipime[®]; *Suíça:* Maxipime[®]; *Tailândia:* Maxipime[®]; *Turquia:* Maxipime[®]; *Venezuela:* Maxipime[®] (SWEETMAN, 2009).

4.1. Substância química de referência (SQR)

No decorrer do estudo foi utilizado o padrão secundário de cloridrato de cefepima como substância de referência, com teor declarado de 95,83% (validade 09/2014).

4.2. Forma farmacêutica

Foram utilizadas amostras comerciais de CEF (genérica) na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável em frasco ampola contendo 1 g de substância ativa (validade 09/2015). Todos os produtos utilizados no trabalho (SQR e a forma farmacêutica) foram gentilmente doados pelo laboratório ABL Antibióticos do Brasil Ltda. (Cosmópolis-SP).

4.3. Diluentes da forma farmacêutica

O cloridrato de cefepima em pó liofilizado deve ser reconstituído em água estéril para injeção, solução injetável de glicose a 5% ou soro fisiológico a 0,9% nas vias intravenosa e intramuscular, e em água bacteriostática para injeção com parabenos ou álcool benzílico somente na via intramuscular (MAXCEF[®], 2013).



ANÁLISE QUALITATIVA

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1. Características físicas

5.1.1. Método

A CEF forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável, descrita no item 4.2, foi avaliada visualmente em relação ao aspecto, cor e odor.

5.1.2. Resultados e discussão

A análise demonstrou que a CEF apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco inodoro e não higroscópico. A solução reconstituída em água purificada é límpida, incolor e inodora. Assim, a análise está de acordo com as especificações encontrada na literatura e a citada pelo fabricante (SWEETMAN, 2009; EP, 2011; JP, 2011; BP, 2012; USP 37, 2014).

5.2. Determinação do peso médio

A determinação do peso médio bem como a investigação da variação de peso servem como indicativos importantes nas unidades de um determinado lote de produto farmacêutico para averiguar não só a homogeneidade, mas também a variação do teor da substância ativa (SAKR et al., 1972; ZAID et al., 2012).

Para este ensaio devem ser seguidos os limites de variação descritos na Farmacopeia Brasileira, onde são aceitos não mais do que duas unidades fora desses limites, entretanto, nenhuma poderá exceder ou estar abaixo do dobro das porcentagens especificadas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O limite de variação de peso permitido para a CEF pó liofilizado para solução injetável é de $\pm 10,0\%$ conforme recomendações da Farmacopeia Brasileira (2010).

5.2.1. Material

A determinação do peso médio da amostra de pó liofilizado para solução injetável de cefepima foi feita em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

5.2.2. Método

O método empregado para a determinação do peso médio é o mesmo descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Vinte unidades de frascos-ampola foram limpas externamente e os lacres metálicos retirados para a pesagem de todas as unidades, individualmente. Após a pesagem, os frascos foram abertos para a retirada do conteúdo e foram lavados utilizando água e em seguida etanol. Os recipientes foram secos a 105 °C por uma hora, esfriados em dessecador e submetidos à pesagem novamente.

5.2.3. Resultados e discussão

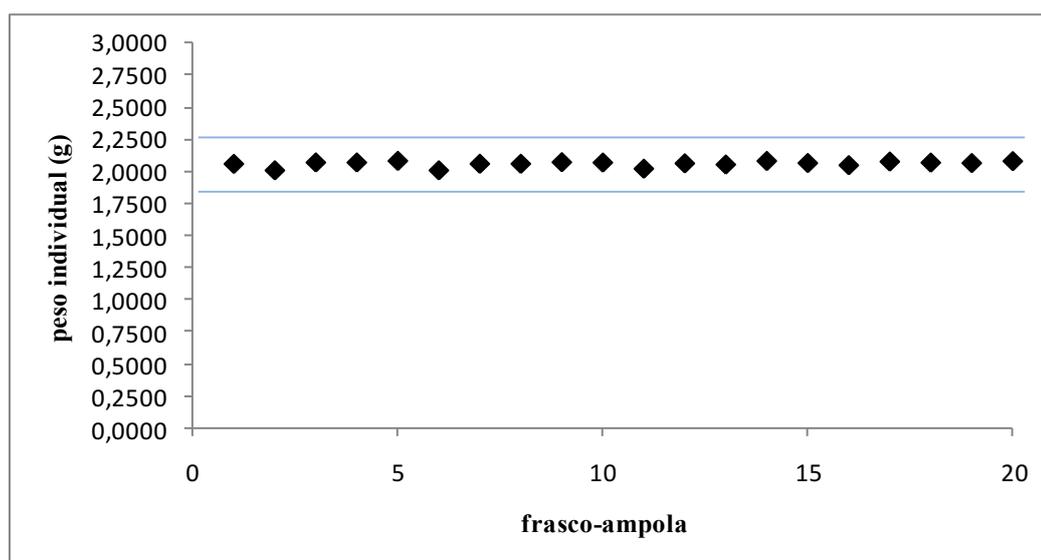
O valor do peso médio (g) obtido das 20 unidades de frascos-ampola de CEF pó liofilizado para solução injetável é apresentado na Tabela 5. Na Figura 3 pode se observar a variação do peso (g) apresentada por cada um dos vinte frascos pesados.

Tabela 5- Peso médio de vinte unidades de frascos-ampola de cefepima

Unidades	Recipiente cheio (g)	Recipiente vazio (g)	Diferença de peso (g)	Peso médio (g)	DPR% ^a
1	32,5207	30,4590	2,0617		
2	32,5379	30,5271	2,0108		
3	32,2964	30,2234	2,0730		
4	32,4722	30,3994	2,0728		
5	32,2970	30,2118	2,0852		
6	32,5374	30,5266	2,0108		
7	32,4771	30,4146	2,0625		
8	31,8269	29,7645	2,0624		
9	32,6030	30,5279	2,0751		
10	32,0422	29,9702	2,0720		
11	32,5545	30,5307	2,0238	2,0620	1,08
12	32,3481	30,2823	2,0658		
13	31,9174	29,8608	2,0566		
14	32,2998	30,2152	2,0846		
15	32,5601	30,4917	2,0684		
16	32,0449	29,9937	2,0512		
17	31,9388	29,8589	2,0799		
18	32,4367	30,3650	2,0717		
19	31,9528	29,8845	2,0683		
20	32,3803	30,2970	2,0833		

^aDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3- Variação do peso médio de vinte unidades de frascos-ampola de cefepima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O limite de variação pré-estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2010) para esta determinação é de $\pm 10,0\%$, tendo em vista que o peso médio é superior a 40 mg, conforme os critérios de avaliação da determinação do peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária. Deste modo, o valor do peso de cada frasco apresentado não excedeu 2,2682 g e nem esteve abaixo de 1,8558 g, estando todos dentro do limite estabelecido. O desvio padrão relativo apresentou valor de 1,08%, dentro das especificações.

5.3. Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão de uma substância é a temperatura na qual esta passa da fase sólida para líquida, e é confirmado pelo desaparecimento da fase sólida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Esta análise é frequentemente utilizada na caracterização de um composto, por se tratar de um método simples, econômico e rápido, possuindo também a característica de indicativo de pureza, quando comparada a padrões de referência. O fato de a amostra conter uma pequena quantidade de impureza faz com que haja uma diminuição do ponto de fusão ou o alargamento da faixa de fusão de uma determinada substância (GRAHAM, 1995).

5.3.1. Material

O ponto de fusão foi avaliado na SQR e na amostra. Foi utilizado para a análise o equipamento Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire, UK) e tubos capilares de vidro com 7,5 cm de comprimento e 1,6 mm de espessura.

5.3.2. Método

O método utilizado para determinação do ponto de fusão foi o capilar. A CEF SQR e a CEF amostra foram previamente dessecadas a 105 °C por uma hora e introduzidas nos tubos capilares, onde uma das extremidades do tubo estava selada, depois foram compactadas ao final do tubo contendo de 3,0 a 4,0 mm de altura. Desta forma, os capilares foram colocados verticalmente no equipamento automático Stuart Scientific, a taxa de aquecimento para o método foi de 1,0 °C por minuto, permanecendo até 10,0 °C após a completa fusão do fármaco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

5.3.3. Resultados e discussão

Como é possível observar na Tabela 6, os valores obtidos do ponto de fusão para CEF SQR e CEF amostra foram 202,6 °C e 186,8 °C, respectivamente, sendo que cada ensaio apresenta a média de três determinações simultâneas realizadas em dias distintos. A fusão do CEF SQR teve início e pode ser visualizada por volta de 196,0 °C, já a CEF amostra teve início por volta de 180,0 °C, ambos apresentaram fusão com decomposição.

Tabela 6- Valores obtidos do ponto de fusão de CEF SQR e CEF amostra

Ensaio ^a	SQR	Amostra
1	202,5	187,2
2	202,8	185,8
3	202,4	187,4
Média	202,6	186,8
DP^b	0,208	0,872
DPR^c	0,10	0,47

^aCada ensaio é a média de três determinações em dias diferentes;

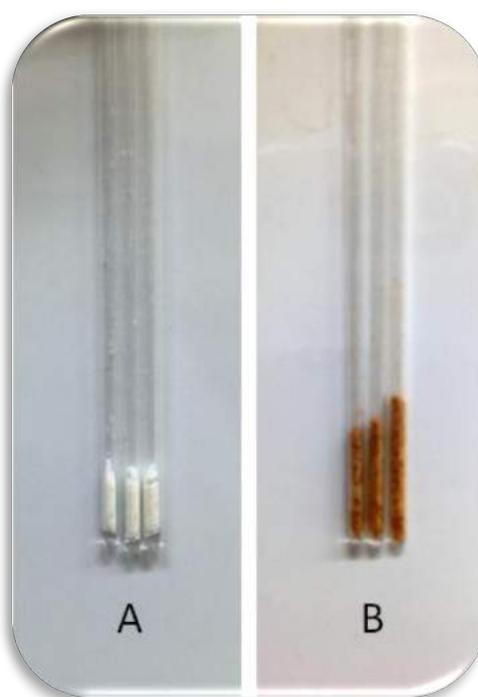
^bDP= Desvio Padrão;

^cDPR= Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores obtidos para o ponto de fusão não foram comparados com valores oficiais, devido à inexistência deste dado nos compêndios que descrevem o fármaco estudado (SWEETMAN, 2009; EP, 2011; JP, 2011; BP, 2012; USP 37, 2014). Os diferentes comportamentos apresentados entre CEF SQR e CEF amostra para os valores de ponto de fusão são decorrentes da presença do adjuvante L-arginina em CEF amostra, resultando no valor abaixo ao apresentado pelo CEF SQR. Na Figura 4 pode se observar os tubos capilares antes e após a realização do ponto de fusão.

Figura 4- Ponto de fusão de CEF pó liofilizado para solução injetável antes (A) e após a fusão (B).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4. Determinação da umidade

A determinação da umidade visa verificar a quantidade de substâncias voláteis de qualquer natureza presente em amostras. O ensaio foi realizado conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2010).

5.4.1. Material

Para a determinação da umidade foi utilizado CEF amostra, descrita no item 4.2, sendo realizada em analisador de umidade por infravermelho Gehaka[®], modelo IV-2000, possuindo

balança com aquecimento por radiação infravermelha, que permite avaliar a umidade da amostra.

5.4.2. Método

A umidade da amostra de cloridrato de cefepima foi determinada pelo analisador de umidade por infravermelho, que consiste em secar o fármaco em temperatura apropriada (normalmente 105 °C) por um determinado período de tempo (normalmente 1 minuto) segundo preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010). Pesou-se a massa equivalente a 1 g de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável e transferiu para o coletor da balança. Após 1 minuto a 105 °C foi verificado o valor da umidade em porcentagem, por meio de três determinações.

5.4.3. Resultados e discussão

Os resultados para a determinação da umidade são apresentados na Tabela 7.

O CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável apresentou média do teor de umidade de 1,70%, com e.p.m. de 0,12. Os resultados obtidos indicam que a hidratação da molécula está de acordo com o valor preconizado nos compêndios oficiais para o fármaco, sendo não mais que 4% (JP, 2011; USP 37, 2014).

Tabela 7- Teor de umidade da CEF pó liofilizado para solução injetável determinado por analisador de umidade por infravermelho

Ensaio ^a	Teor de Umidade (%)
1	1,50
2	1,70
3	1,90
Média	1,70
DP^b	0,20
e.p.m.^c	0,12

^aCada ensaio é a média de três determinações em dias diferentes;

^bDP = Desvio Padrão;

^ce.p.m. = Erro Padrão da Média.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método muito utilizado para a caracterização de um composto, bem como a determinação de impurezas e a monitoração das reações nos produtos em análise, já que possui custos baixos e facilidade na execução quando comparada a outros métodos. Trata-se de uma técnica versátil, que através da adsorção líquido-sólido ocorre a separação dos componentes de uma mistura justamente pela afinidade que estes possuem pela fase estacionária. Deste modo, na CCD podem ser utilizados vários tipos de sistemas eluentes e agentes reveladores, que irá depender das características apresentadas do produto em análise (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; JOSHI et al., 2009).

Assim, o presente trabalho buscou como um de seus objetivos o desenvolvimento de nova técnica por CCD para identificação do CEF em pó liofilizado para solução injetável, que mantivesse também a capacidade de detectar a presença de produtos de degradação, utilizando solventes menos tóxicos, sendo mais simples, econômica e mais sensível.

5.5.1. Material

Para a realização da CCD foram utilizadas placas de sílica gel Alugram[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Alemanha) de tamanho 10 x 7 cm e 10 x 10 cm com espessura de 0,25 mm, e as pesagens de CEF SQR e CEF amostra, descritas nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente, foram feitas na balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil). Foi realizado também um ensaio com o excipiente L-arginina.

No preparo da fase móvel foram utilizados alguns solventes como: ácido acético (J.T. Baker), água purificada (Milli-Q[®]), etanol (Synth[®]) e metanol (Synth[®]). Para a revelação das manchas foi utilizado o reagente iodo (Synth[®]). Nos ensaios para degradação acelerada foram utilizadas as soluções de ácido clorídrico 0,1 M (Syth[®]), hidróxido de sódio 0,1 M (Cinética[®]) e peróxido de hidrogênio 3% (Vetec Química Fina[®]) em placas de 10 x 10 cm.

5.5.2. Método

O preparo da solução de CEF SQR (item 4.1) foi feito através da pesagem de 20,88 mg, onde se transferiu para balão volumétrico de 10 mL e foi completado com água purificada para obtenção da solução a 2,0 mg/mL. Para a CEF amostra (item 4.2) realizou-se o mesmo

procedimento, porém foram pesados 34,50 mg para a obtenção da solução a 2,0 mg/mL. A solução placebo contendo somente excipiente foi realizada pesando 14,50 mg de L-arginina e diluída em balão volumétrico de 10 mL também com água purificada.

As placas de sílica gel foram ativadas em estufa a 105 °C por 1 hora. A fase móvel foi preparada e transferida para a cuba para a saturação. Deste modo, foram aplicadas alíquotas de 10 µL de cada solução com auxílio de microseringa de vidro (Hamilton[®], Nevada, EUA) diretamente na placa, que foi levada à cuba para a eluição dos compostos onde permaneceu até que a fase móvel alcançasse 8 cm de migração. Em seguida, a placa foi retirada para secagem. A revelação das manchas foi feita com a placa seca através de vapores de iodo por 10 min; após este tempo, foi observada a formação de manchas que foram comparadas quanto à forma, tamanho, cor e aspecto e determinado cada fator de retenção (R_f).

Foram testadas as seguintes fases móveis:

Sistema 1: etanol : água purificada (40:60, v/v)

Sistema 2: etanol : água purificada (60:40, v/v)

Sistema 3: etanol : água purificada (65:35, v/v) ajuste de pH 3,0 com ácido acético

Sistema 4: etanol : água purificada (70:30, v/v)

Sistema 5: etanol : água purificada (70:30, v/v) ajuste de pH 3,0 com ácido acético

Sistema 6: etanol

Sistema 7: metanol : água purificada (40:60, v/v)

Sistema 8: metanol : água purificada (60:40, v/v)

Sistema 9: metanol : água purificada (70:30, v/v) ajuste de pH 3,0 com ácido acético

Sistema 10: metanol

5.5.2.1. Degradação acelerada

Com o intuito de avaliar a capacidade do sistema escolhido em revelar a presença de possíveis produtos de degradação, soluções da amostra de CEF na concentração de 2,0 mg/mL foram submetidas à degradação acelerada, as quais foram preparadas em condições ácida, alcalina, neutra, oxidativa e fotolítica.

Para as reações de hidrólise, as soluções de CEF foram preparadas em ácido clorídrico 0,1 M (ácida) e hidróxido de sódio 0,1 M (alcalina). Para a condição oxidativa, a solução de CEF foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Na degradação neutra, a solução aquosa de CEF foi exposta à temperatura de 60 °C. As condições ácida, alcalina e oxidativa

também foram expostas à temperatura de 60 °C. Para a condição fotolítica foi utilizada câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) de 20 W, onde a solução aquosa de CEF ficou exposta à luz ultravioleta.

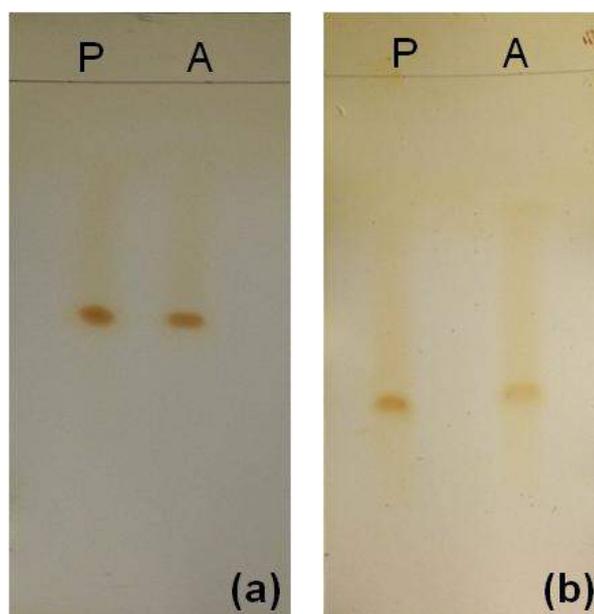
As degradações aceleradas foram avaliadas através do método desenvolvido de CCD com a fase móvel etanol : água (40:60, v/v). Os tempos de análises em que as soluções ficaram sob condições de degradação são 0; 0,5; 1,5; 3; 24 e 48 horas.

5.5.3. Resultados e discussão

A maior parte dos sistemas testados apresentaram capacidade para identificar a CEF pó liofilizado em solução injetável. Dentre aqueles que não obtiveram a separação da mancha de CEF e apresentaram rastros, estão os sistemas 4, 6 e 10.

Os sistemas 2, 3, 5, 7 e 9, apesar de separarem a CEF, não apresentaram as manchas bem delimitadas. Desta forma, os sistemas que apresentaram as melhores manchas foram o sistema 1 constituído por etanol : água (40:60, v/v) e o sistema 8 por metanol : água (60:40, v/v), ilustrados na Figura 5.

Figura 5- Perfil cromatográfico obtido de solução aquosa de CEF SQR e CEF amostra na concentração de 2,0 mg/mL. **(a)** Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. $R_f = 0,53$. **(b)** Fase móvel: metanol : água (60:40, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. $R_f = 0,40$. (P = SQR; A = amostra).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Deste modo, o sistema mais eficaz e escolhido para a identificação da CEF SQR e CEF amostra foi o de nº 1. Como pode ser visto na Figura 6, o cromatograma utilizando como fase móvel o sistema 1 comprova que o excipiente não interfere na eluição da amostra de CEF e quando a mancha de CEF SQR é comparada com a da amostra observa-se que são praticamente idênticas, com valores semelhantes de R_f de 0,53.

Figura 6- Perfil cromatográfico obtido de solução aquosa de CEF SQR e CEF amostra na concentração de 2,0 mg/mL e solução de excipiente. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. (P = SQR; A = amostra; E = excipiente).



Fonte: Elaborada pelo autor.

De todos os compêndios oficiais que descrevem a CEF pó liofilizado para solução injetável foi localizado somente na Farmacopeia Americana 37^a ed. (2014) o método de identificação por CCD. A Farmacopeia Americana 37^a ed. (2014) utiliza na sua metodologia a fase móvel constituída por uma mistura de álcool *n*-propílico : água : hidróxido de amônio (7:5:4, v/v/v) e solução de ninidrina para a revelação das manchas por nebulização das placas secas, a concentração da solução de CEF utilizada neste método é de 40 mg/mL. No entanto, a fase móvel e o agente revelador apresentam solventes potencialmente tóxicos, tais como o hidróxido de amônio e a ninidrina. Em artigos científicos não se encontrou nenhuma outra metodologia de identificação da CEF por CCD.

Portanto, o método desenvolvido neste trabalho para a caracterização da CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável demonstrou ser mais seguro, simples, prático e econômico, além de apresentar vantagens como baixa toxicidade ao operador e fácil descarte.

5.5.3.1. Degradação acelerada

Nos estudos de degradação acelerada a fase móvel utilizada foi constituída pela mistura de etanol : água (40:60, v/v) e avaliada nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3; 24 e 48 horas. A placa de sílica empregada nos ensaios teve 10 x 10 cm de tamanho e para revelação das manchas utilizou-se vapores de iodo.

Na Tabela 8 são apresentados todos os resultados obtidos nos ensaios de degradação acelerada por CCD, com intuito de avaliar possíveis produtos de degradação da CEF em pó liofilizado para solução injetável. A Figura 7 mostra os perfis cromatográficos referentes a esta análise.

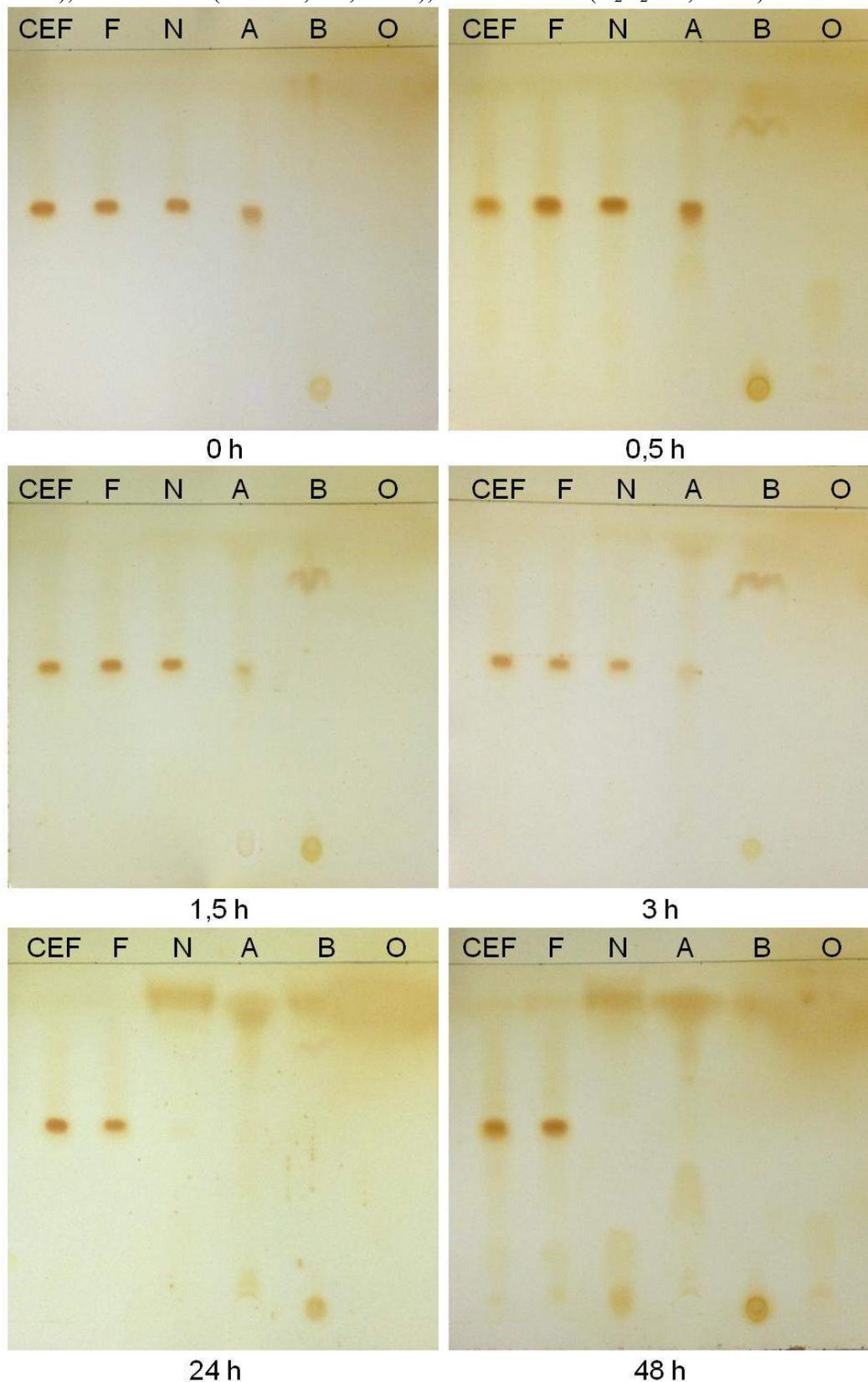
Tabela 8- Estudo de degradação acelerada de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável por CCD

Tempo (h)	Degradação				
	Neutra	Fotolítica	Ácida	Alcalina	Oxidativa
0	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,52$ Manchas extras: ND	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,87$	CEF: ND Manchas extras: ND
0,5	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,52$ Manchas extras: ND	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,75$	CEF: ND Manchas extras: ND
1,5	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,52$ (baixa intensidade) Manchas extras: ND	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,78$	CEF: ND Manchas extras: ND
3	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: $R_f = 0,50$ (baixa intensidade) Manchas extras: ND	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,78$	CEF: ND Manchas extras: ND
24	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,90$	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,88$	CEF: ND Manchas extras: $R_f = 0,75$ e $0,87$	CEF: ND Manchas extras: ND
48	CEF: ND Manchas extras: $R_f = 0,20$ e $0,90$	CEF: $R_f = 0,53$ Manchas extras: ND	CEF: ND Manchas extras: $R_f = 0,37$ e $0,88$	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,87$	CEF: ND Mancha extra: $R_f = 0,22$

R_f = Fator de retenção; ND = Não apresentou manchas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7- Perfil cromatográfico obtido nas análises de degradação acelerada do CEF amostra em tempos de 0 h; 0,5 h; 1,5 h; 3 h; 24 h e 48 h. Fase móvel: etanol : água (40:60, v/v). Agente revelador: vapores de iodo. **CEF** = Amostra; **F** = Fotolítica (luz UVC 254 nm); **N** = Neutra (água, 60 °C); **A** = Ácida (HCl 0,1 M, 60 °C); **B** = Alcalina (NaOH 0,1 M, 60 °C); **O** = Oxidativa (H₂O₂ 3%, 60 °C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em pesquisa realizada nos bancos de dados foi reportado apenas um artigo no qual é descrito o estudo de degradação para CEF por CCD com detecção densitométrica, em que a fase móvel é constituída por etanol : 2-propanol : ácido acético glacial 99,5% : água (4:4:1:3, v/v/v/v) (DĄBROWSKA et al., 2015).

Através dos resultados obtidos, é possível observar que a solução do fármaco apresentou uma maior degradação na condição de estresse oxidativa e foi mais estável em condição fotolítica. Na condição oxidativa, a mancha referente ao fármaco não pode ser visualizada já no tempo 0 hora, indicando a degradação total do CEF. Algumas das manchas apresentadas em condições diferentes ficaram com seus R_f próximos, indicando que são possíveis produtos de degradação semelhantes.

Assim, o método desenvolvido pode ser recomendado para a análise qualitativa no controle de qualidade de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.

5.6. Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível

5.6.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta

A espectrofotometria na região do ultravioleta é largamente utilizada nas análises de rotina do controle de qualidade, visto que, trata-se de uma importante ferramenta para quantificar compostos químicos, incluindo fármacos ou substâncias, ou até mesmo para identificá-las (OHANNESIAN; STREETER, 2002). Os principais fatores que fazem desta técnica ser a mais utilizada nas análises laboratoriais são: praticidade no preparo da amostra, custo reduzido, empregabilidade para vários compostos orgânicos, análises exatas e precisas de fácil manuseio pelo operador, resultando em uma menor quantidade de resíduos.

5.6.1.1. Material

Para a execução do método foram utilizados CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. O método por espectrofotometria no UV foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu® (Tóquio, Japão), modelo UV-1800, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os solventes utilizados para os ensaios foram: água purificada (Milli-Q®), solução de ácido clorídrico (Synth®) 0,1 M, solução de hidróxido de sódio (Cinética®) 0,001 M, etanol PA (Synth®), metanol PA (Synth®), solução tampão fosfato de potássio 1% pH 6,0, solução tampão

fosfato de potássio 1% pH 7,2 e solução tampão fosfato de potássio 1% pH 8,0. No decorrer da análise outros equipamentos também foram utilizados: balança analítica, modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil), peagâmetro micronal modelo B474 e purificador de água Milli-Q[®] (Direct-Q[®] 3, Merck Millipore, Alemanha).

5.6.1.2. Método

5.6.1.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

Para o preparo da solução de CEF SQR (item 4.1) foi pesada a massa de 10,44 mg e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As soluções em água purificada, solução de ácido clorídrico 0,1 M, solução de hidróxido de sódio 0,001 M, etanol PA, metanol PA, solução tampão fosfato de potássio 1% pH 6,0, solução tampão fosfato de potássio 1% pH 7,2 e solução tampão fosfato de potássio 1% pH 8,0 utilizadas no teste foram preparadas a partir da solução-mãe de CEF SQR, sendo retirada alíquota referente à concentração de 16 µg/mL, transferida para balão volumétrico de 10 mL e completado para cada um dos solventes. Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

5.6.1.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

O preparo da solução de CEF amostra (item 4.2) foi pesado a partir do *pool* de vinte frascos-ampola (item 5.2), a massa de 17,25 mg equivalente a 10,00 mg de CEF e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As soluções em água purificada, solução de ácido clorídrico 0,1 M, solução de hidróxido de sódio 0,001 M, etanol PA, metanol PA, solução tampão fosfato de potássio 1% pH 6,0, solução tampão fosfato de potássio 1% pH 7,2 e solução tampão fosfato de potássio 1% pH 8,0 utilizadas no teste foram preparadas a partir da solução-mãe de CEF amostra, sendo retirada alíquota referente a concentração de 16 µg/mL, transferida para balão volumétrico de 10 mL e completado para cada um dos solventes. Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

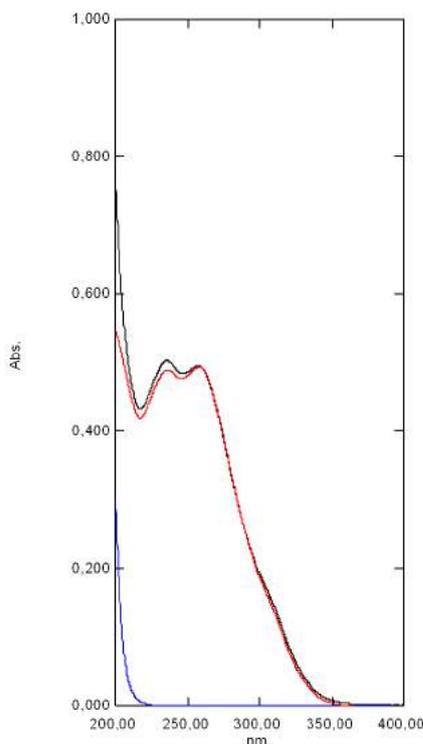
5.6.1.2.3. Preparo da solução de L-arginina

A solução placebo, contendo somente excipiente, foi preparada pesando a massa de 7,25 mg de L-arginina e transferida para balão volumétrico de 100 mL, sendo completado com água purificada, para obtenção de solução-mãe na concentração de 72,5 µg/mL. A partir desta solução-mãe, alíquota de 1,6 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, completado com água purificada, obtendo solução na concentração de 11,6 µg/mL, concentração teoricamente idêntica àquela encontrada na solução de amostra.

5.6.1.3. Resultados e discussão

Os espectros das soluções de CEF SQR, CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável e L-arginina preparados em água purificada são apresentados na Figura 8.

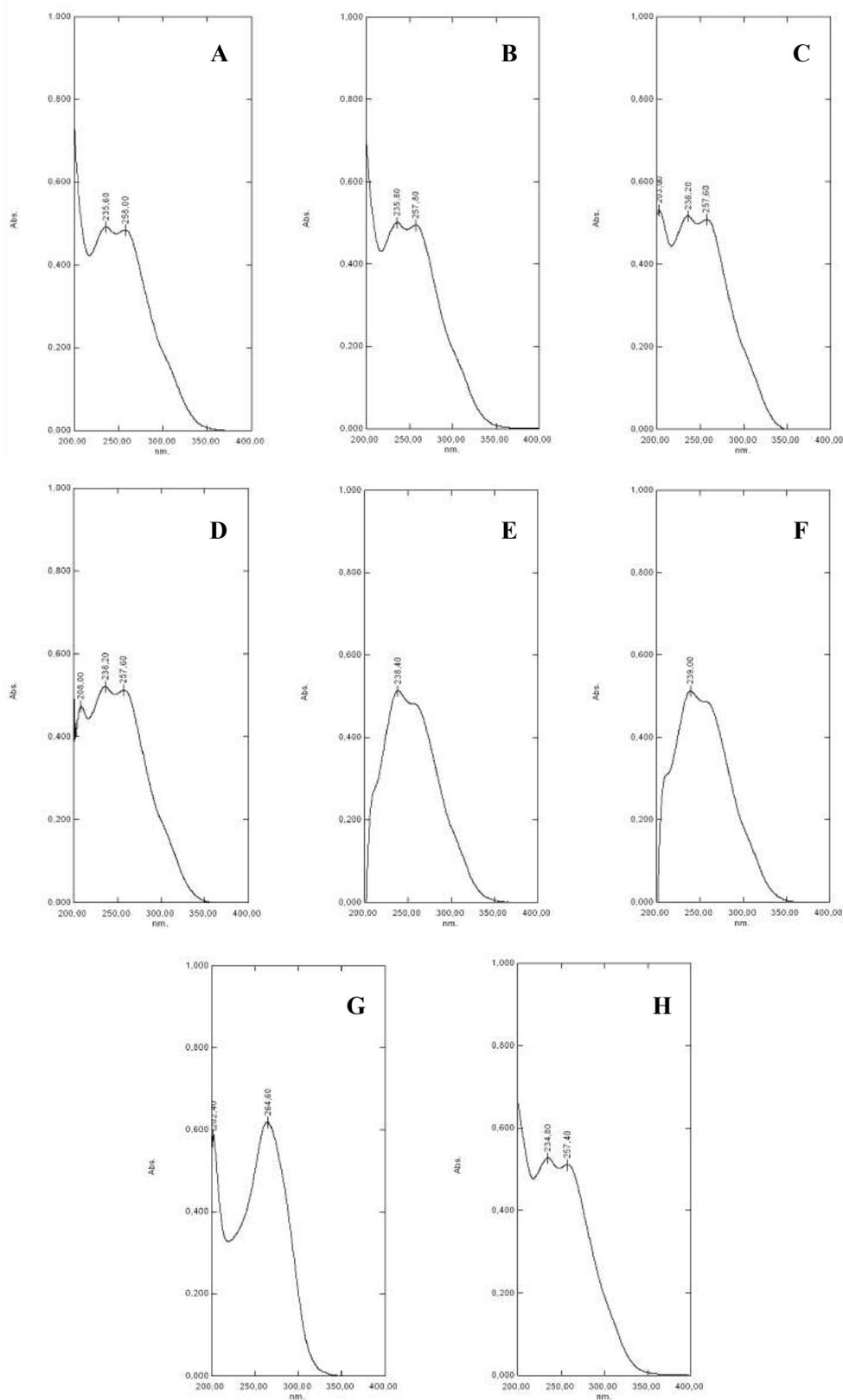
Figura 8- Sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta das soluções aquosas de CEF SQR 16 µg/mL (vermelho), CEF amostra 16 µg/mL (preto) e L-arginina 11,6 µg/mL (azul). (λ : 200-400 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

As demais soluções preparadas com os diferentes solventes são apresentadas na Figura 9.

Figura 9- Comparação dos espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta utilizando soluções de CEF amostra a 16 µg/mL preparadas com: (A) água; (B) tampão fosfato de potássio pH 6,0; (C) tampão fosfato de potássio pH 7,2; (D) tampão fosfato de potássio pH 8,0; (E) metanol; (F) etanol; (G) ácido clorídrico 0,1 M; (H) hidróxido de sódio 0,001 M. (λ : 200-400 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

O método de espectrofotometria com absorção na região do UV apresenta-se como uma importante ferramenta na indústria farmacêutica, possibilitando ao operador análises simples, precisas e rápidas, a qual auxilia na identificação e quantificação de compostos.

Os perfis espectrais das soluções de CEF preparados em vários solventes foram avaliados através de seu comprimento de onda com absorção máxima (λ_{max}), absorvância e o tipo de solvente utilizado.

As soluções de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina (excipiente) preparadas com água foram comparadas (Figura 8), apresentando resultados semelhantes para ambas soluções de CEF com máximo de absorção nos comprimentos de onda em 235 e 258 nm. O excipiente L-arginina não interfere nas análises de CEF por espectrofotometria de absorção na região do UV, pois não foi absorvido por este tipo de radiação. Este dado obtido corrobora com outro estudo em que foi utilizado a L-arginina, apresentando resultados idênticos (FIGUEIREDO, 2014).

Quando comparada com os demais solventes, a solução de CEF amostra preparada em água purificada apresentou espectro de absorção bem próximo aos espectros dos solventes solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 e NaOH 0,001 M, com máximo de absorção também em dois pontos com comprimentos de onda em 235 e 257 nm e 234 e 257 nm, respectivamente. Nas soluções tampão fosfato de potássio pH 7,2 e pH 8,0, foram obtidos três pontos de absorção, sendo 203, 236 e 257 nm para o tampão fosfato de potássio pH 7,2 e 208, 236 e 257 nm para o tampão fosfato de potássio pH 8,0. Para o metanol e etanol, o máximo de absorção foi obtido em um único ponto de 238 nm no metanol e 239 nm no etanol. Já para a solução preparada em HCl 0,1 M, a absorção ocorreu em dois pontos também, mas foi a única que apresentou o máximo de absorção maior em um comprimento de onda de 264 nm e outro menor de 202 nm, estando possivelmente relacionada com a ionização da molécula de CEF.

Dentre todos os fatores e comprimentos de onda com máximo de absorção avaliados, o solvente HCl 0,1 M foi o que apresentou uma absorção maior, porém, optou-se em trabalhar com a solução aquosa de CEF, sendo que os espectros apresentaram características adequadas, semelhante a outros solventes e pelo fato do objetivo do trabalho estar voltado a métodos de química verde. O comprimento de onda escolhido para os ensaios foi o de 258 nm, o qual apresentou absorvâncias de 0,507 para CEF SQR e 0,525 para CEF amostra. Este comprimento de onda depende da integridade do anel β -lactâmico, como também da dupla ligação entre os carbonos C3 e C4 do núcleo da molécula (EVAGELOU; TSANTILI-KAKOULIDOU; KOUPPARIS, 2003).

Esta escolha traz inúmeros benefícios, tanto para o operador, pois trata-se de um solvente atóxico, de fácil manuseio e com simplicidade para adquiri-lo, como também para o meio ambiente, não gerando resíduos tóxicos e sendo fácil de descartar, além do baixo custo.

5.6.2. Espectrofotometria na região do visível

A técnica de espectrofotometria de absorção na região do VIS apresenta os mesmos princípios da técnica de espectrofotometria de absorção na região do UV, difere apenas na necessidade de reações químicas entre o composto e o reagente para a formação de cor. Os métodos espectrofotométricos apresentam algumas vantagens, como redução dos custos das análises, rapidez, praticidade, sensibilidade e de fácil aplicação. Por outro lado, os custos certamente dependem dos reagentes escolhidos para as análises (CHIERENTIN; SALGADO, 2014).

Na literatura e em bancos de dados, é possível encontrar inúmeros métodos por espectrofotometria de absorção na região do VIS voltados na determinação de compostos β -lactâmicos, os quais utilizam várias reações dos fármacos com reagentes distintos, transformando-os em compostos corados. Alguns destes, empregam solventes orgânicos e procedimentos para a extração do produto de reação (MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; ALI; ELBASHIR; ABOUL-ENEIN, 2015).

Análises para a determinação de CEF também foram encontradas nos bancos de dados. Algumas publicações citam a utilização de reagentes como: Folin-Ciocalteau (diluído 1:4 com água destilada) na presença de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20%; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno na presença de dimetilsulfóxido (DMSO); 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS); nitrato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$); ninidrina na presença de molibdato de sódio; redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (SUJITH; ABRAHAM; DIVAKAR, 2010; CHAVALA et al., 2011; PATEL et al., 2011; ELAZAZY; SHALABY, 2012; NAWAL et al., 2012; ALI; ELBASHIR; ABOUL-ENEIN, 2015; PAPANNA; KRISHNEGOWDA; NAGARAJA, 2015).

A maioria dos métodos publicados para a determinação de CEF utiliza reagentes tóxicos, demanda de grandes volumes de solventes orgânicos ou de reações de complexação para a formação de compostos corados, aumentando o tempo das análises, tornando-os inviáveis para utilização neste trabalho. Assim, diversos ensaios foram realizados com vários reagentes, a fim de se obter uma melhor análise para a determinação de CEF. Todavia, os solventes

utilizados não apresentaram capacidade de reação para a formação de cor com a CEF, seja por falta de condições adequadas de reação ou por não apresentarem afinidades químicas.

Neste contexto, optou-se em otimizar e validar um método existente para a quantificação de CEF. Trata-se do método publicado por Patel e colaboradores (2011), os quais utilizam a solução reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:4 com água destilada) na presença da solução de Na_2CO_3 a 20%. Quando comparados aos reagentes descritos nas publicações, a solução de Folin-Ciocalteu é a que apresenta menor toxicidade e fácil acesso. As alterações realizadas no método por espectrofotometria no VIS utilizando o reagente Folin-Ciocalteu foram de grande importância para o aprimoramento do método e estão detalhadas na Tabela 9.

Tabela 9- Alterações dos parâmetros utilizados por Patel e colaboradores (2011) na validação do método espectrofotométrico com absorção na região do VIS

	Patel e colaboradores (2011)	Rodrigues, D.F. (2017)
Reagente / volume	Folin-Ciocalteu diluído 1:4 com água destilada (3 mL) na presença da solução de Na_2CO_3 a 20% (1,5 mL)	Folin-Ciocalteu diluído 1:10 com água purificada (30 μL) na presença da solução de Na_2CO_3 a 10% (30 μL)
Faixa de linearidade ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4-40	15-40
Comprimento de onda (nm)	765	740
Método	Convencional (cubeta)	Miniaturizado (microplaca)

Fonte: Elaborada pelo autor.

As mudanças realizadas no método trouxeram inúmeras vantagens, dentre elas destaca-se a principal, que foi a miniaturização do método, promovendo importante diminuição das quantidades de soluções do fármaco e dos solventes utilizados nas análises, menor tempo de preparo, bem como, a redução na geração de resíduos, além da utilização de solventes com concentrações bem menores do que a utilizada por Patel e colaboradores (2011).

Devido à preocupação científica e pública com a poluição ambiental, foram introduzidas práticas ambientalmente favoráveis em diferentes áreas da sociedade e da investigação. Nas análises voltadas à química verde são utilizadas técnicas e metodologias químicas que reduzem ou eliminam o uso ou a geração de matérias-primas, produtos, subprodutos, solventes, reagentes, etc., que são perigosas para a saúde humana ou para o ambiente (TOBISZEWSKI et al., 2009; STOCKA et al., 2011).

O impacto ambiental adverso das metodologias analíticas tem sido reduzido principalmente de três formas diferentes: redução da quantidade de solventes necessária no pré-tratamento da amostra; redução da quantidade e da toxicidade dos solventes e reagentes utilizados no passo de medição, especialmente por automatização e miniaturização; desenvolvimento de metodologias analíticas diretas que não exijam solventes ou reagentes (ARMENTA; GARRIGUES; GUARDIA, 2008; STOCKA et al., 2011).

5.6.2.1. Material

Para realização do método foram utilizados CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. O método por espectrofotometria na região do VIS foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS SPECTROstar[®] Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha), utilizando microplacas de polipropileno de 96 poços apresentando volume total de 360 µL para cada, fundo chato e sem tampa. Os dados foram analisados através do *software* MARS[®] Data Analysis versão V3.10 R6. Os solventes utilizados para os ensaios foram: água purificada (Milli-Q[®]), solução reagente de Folin-Ciocalteu fenólico 2 N (Sigma-Aldrich[®], EUA) diluída 1:10 em água purificada e solução de carbonato de sódio (Dinâmica[®]) 10%.

Durante os ensaios foram utilizados outros materiais e equipamentos: balança analítica, modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil); balança analítica, modelo AG 200 (Gehaka[®], São Paulo, Brasil); purificador de água Milli-Q[®] (Direct-Q[®] 3, Merck Millipore, Alemanha); banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, São Paulo, Brasil); micropipetador modelo Research[®] Plus 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); micropipetador multicanal modelo Research[®] Plus 30-300 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); micropipetadores multicanal modelo Discovery Comfort 1-10 µL e 20-200 µL (HTL Lab Solutions, Varsóvia, Polônia).

5.6.2.2. Método

5.6.2.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

A solução de CEF SQR (item 4.1) foi preparada através da pesagem da massa de 20,88 mg e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 200 µg/mL. No ensaio qualitativo,

foi preparada a partir desta solução-mãe, a diluição referente à concentração final de 30 µg/mL em um volume total de 200 µL.

5.6.2.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Para a solução de CEF amostra (item 4.2) o preparo foi realizado a partir do *pool* de vinte frascos-ampola (item 5.2), sendo pesada a massa de 34,50 mg equivalente a 20,00 mg de CEF e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 200 µg/mL. Semelhantemente à solução de CEF SQR, no ensaio qualitativo, foi preparada a partir desta solução-mãe de CEF amostra, a diluição referente à concentração final de 30 µg/mL em um volume total de 200 µL.

5.6.2.2.3. Preparo da solução de L-arginina

O preparo da solução placebo, contendo somente adjuvante, foi feito pesando a massa de 14,50 mg de L-arginina e transferida para balão volumétrico de 100 mL, sendo completado com água purificada, para obtenção de solução-mãe na concentração de 145 µg/mL. No ensaio qualitativo, foi preparado a partir desta solução-mãe, a diluição referente à concentração final de 21,75 µg/mL em um volume total de 200 µL, concentração teoricamente idêntica àquela encontrada na solução de amostra.

5.6.2.2.4. Preparo da solução de carbonato de sódio 10%

A solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) foi previamente preparada antes de cada ensaio. Para o preparo, 2,5 g de Na₂CO₃ foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de água purificada. Em seguida, levou-se ao banho ultrassônico por 30 minutos para completa solubilização e posteriormente completou-se o volume do balão volumétrico com água purificada, obtendo-se reagente com concentração final de 10%.

5.6.2.2.5. Procedimento do método

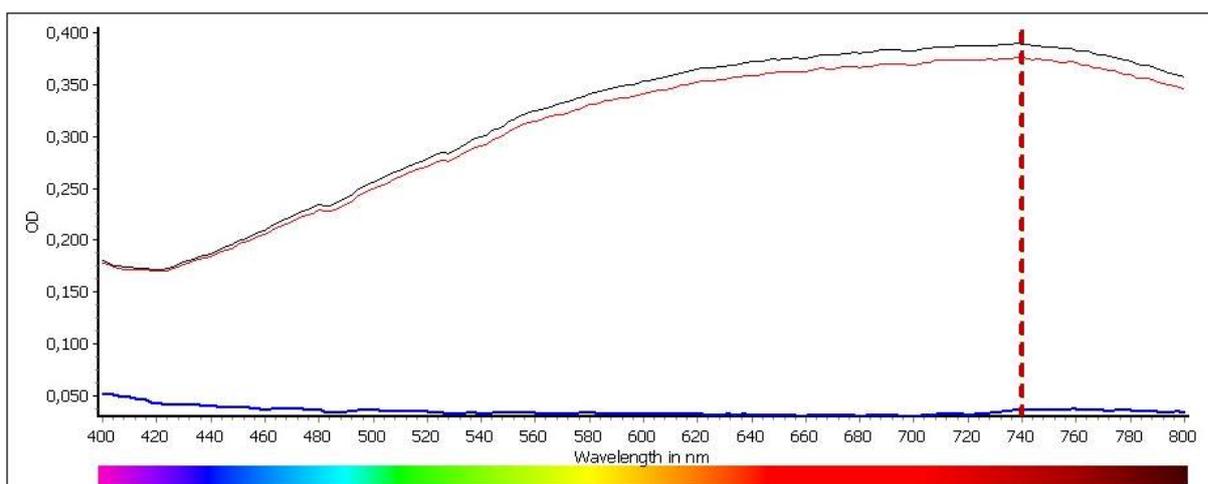
Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, sendo utilizada as soluções de CEF SQR (item 5.6.2.3.1), CEF amostra (item 5.6.2.3.2) e L-arginina (item 5.6.2.3.3) para o preparo das concentrações utilizadas no teste qualitativo de 30 µg/mL (CEF SQR e CEF

amostra) e 21,75 µg/mL (L-arginina – concentração teoricamente idêntica àquela encontrada na solução de amostra). Para cada solução foi retirada a alíquota de 30 µL e transferida para o poço respectivo ao teste na microplaca, posteriormente foram adicionados os solventes: 110 µL de água purificada, 30 µL da solução de Na₂CO₃ 10% e 30 µL da solução de Folin-Ciocalteu fenólico (1:10), totalizando um volume final de 200 µL por poço. Após adicionar os solventes, a microplaca com os ensaios foi inserida dentro do equipamento de leitura e para que a reação acontecesse aguardou-se o tempo de 10 minutos (5 minutos em repouso e 5 minutos sob agitação de 500 rpm) antes da leitura dos ensaios. Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 400 e 800 nm.

5.6.2.3. Resultados e discussão

Os espectros das soluções de CEF SQR, CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável e L-arginina preparados em água purificada são apresentados na Figura 10.

Figura 10- Sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do VIS das soluções aquosas de CEF SQR 30 µg/mL (vermelho), CEF amostra 30 µg/mL (preto) e L-arginina 21,75 µg/mL (azul). (λ : 400-800 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

O método para análise de CEF por espectrofotometria com absorção na região do VIS apresentou os perfis espectrais semelhantes para as soluções de CEF SQR e CEF amostra, conforme representado na Figura 10, preparadas com água purificada e analisadas através dos solventes Folin-Ciocalteu fenólico (1:10) na presença de Na₂CO₃ 10%, resultaram no λ_{max} em

740 nm. O excipiente L-arginina não interfere nas análises de CEF por espectrofotometria de absorção na região do VIS, não sendo absorvido por este tipo de radiação, resultado idêntico ao apresentado pelo método no UV.

O método proposto apresentou inúmeros benefícios, por se tratar de um método no VIS em que muitas vezes é necessária a extração ou complexação do produto para que a reação química promovendo cor na solução da amostra aconteça. Este método desenvolvido de forma miniaturizada, utilizando microplacas para as análises, possibilita ao operador, análises simples, precisas e rápidas, as quais auxiliam na identificação e quantificação de CEF, além de utilizar solventes com baixa toxicidade, facilidade no manuseio, bem como, baixa geração de resíduos tóxicos.

5.7. Espectrofotometria na região do infravermelho

A espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV) é uma técnica empregada para identificar e diferenciar compostos através dos perfis estruturais apresentados por suas moléculas. O infravermelho é dividido em três regiões de absorção próximo, médio e distante, com faixa de absorção distintas, sendo que para análises de identificação a mais utilizada é a região do infravermelho médio, no qual absorve dentro da faixa de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010).

Para que uma molécula seja absorvida na região médio do infravermelho é necessário que ocorram transições eletrônicas, as quais acontecem devido à vibração de energia presente nesta região. Assim, através destas vibrações ocorrem, na molécula, os chamados estiramentos e tensionamentos, bem como, modificações de ângulos de ligações (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010).

A espectrofotometria de IV tem se destacado dentro das técnicas utilizadas a nível industrial, principalmente pela pouca quantidade de material utilizada para análise, elucidação de estruturas complexas e rapidez no preparo dos ensaios (LOPES, FASCIO, 2004).

5.7.1. Material

As análises de espectrofotometria de infravermelho foram realizadas em equipamento Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21. O reagente utilizado para a confecção das pastilhas foi o brometo de potássio (KBr) (Synth[®]). No decorrer

do experimento outros equipamentos também foram utilizados: balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil), dessecador de vidro e estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE (Fanem[®], São Paulo, Brasil).

5.7.2. Método

5.7.2.1. Preparo das pastilhas de CEF SQR e CEF amostra

Foi preparada uma diluição 1:100 (p/p) de CEF SQR (item 4.1) em KBr, sendo pesada a massa de 40 mg desta diluição, a qual foi transferida para almofariz e pistilo de ágata para ser triturada e homogeneizada com 110 mg de KBr, totalizando ao final 150 mg cada pastilha e possuindo a concentração equivalente a 0,4 mg de CEF SQR. O mesmo foi realizado para o preparo da pastilha de CEF amostra (item 4.2), que foi pesado a partir do *pool* de vinte frascos-ampola (item 5.2). Antes do preparo o KBr foi dessecado até peso constante em estufa a 105 °C. As análises foram obtidas em transmitância na região espectral médio com absorção a 4000 a 400 cm^{-1} (com resolução de 2 cm^{-1}), utilizando o *software* IR SolutionTM.

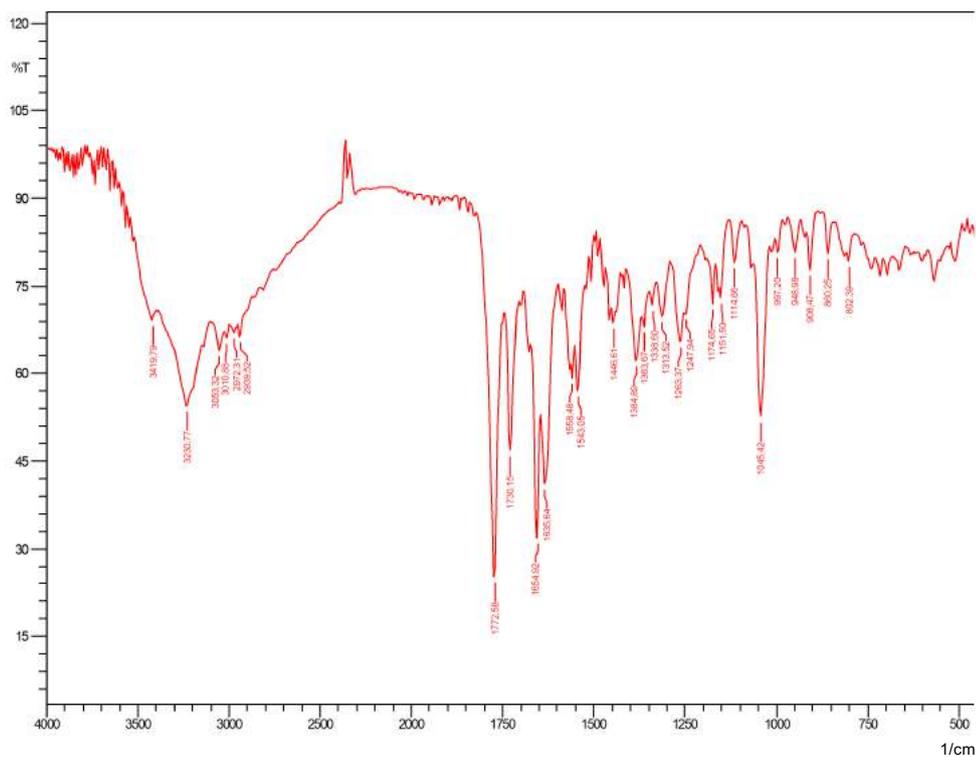
5.7.2.2. Preparo da pastilha de L-arginina

O preparo da pastilha da L-arginina foi realizado através da diluição 1:100 (p/p) em KBr, sendo pesada a massa de 40 mg desta diluição, a qual foi transferida para almofariz e pistilo de ágata para ser triturada e homogeneizada com 110 mg de KBr, totalizando ao final 150 mg cada pastilha e possuindo a concentração teórica equivalente a 0,29 mg de L-arginina. Antes do preparo o KBr foi dessecado até peso constante em estufa a 105 °C. As análises foram obtidas em transmitância na região espectral médio com absorção a 4000 a 400 cm^{-1} (com resolução de 2 cm^{-1}), utilizando o *software* IR SolutionTM.

5.7.3. Resultados e discussão

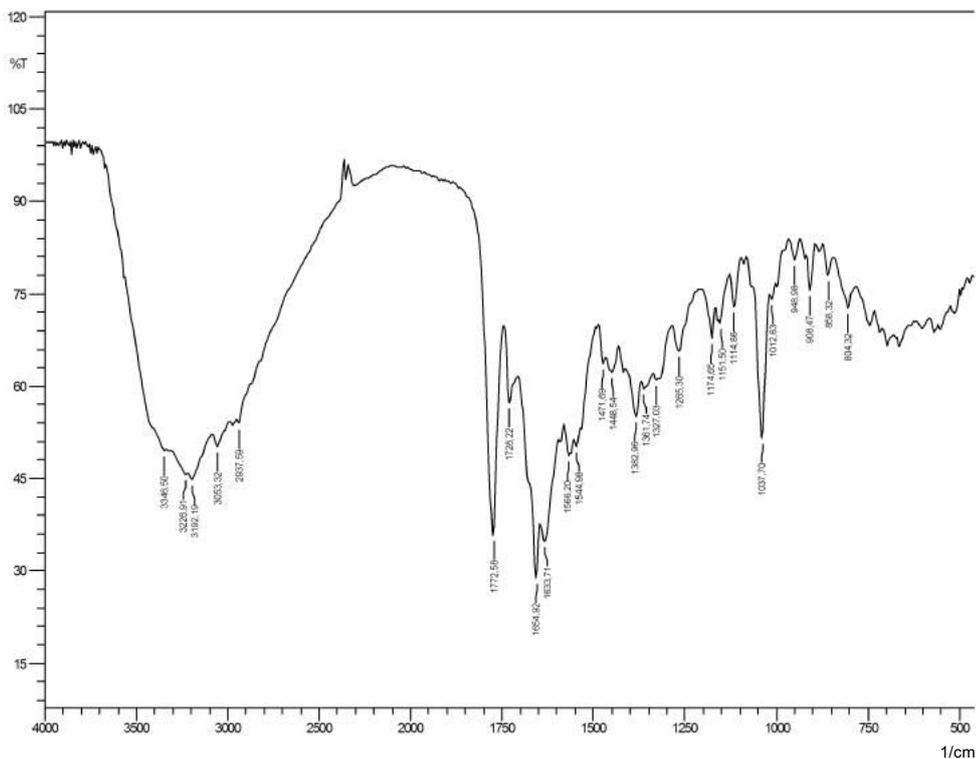
Os espectros obtidos nas análises de infravermelho para CEF SQR e CEF amostra são apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Na Figura 13 é apresentada a sobreposição destes espectros juntamente com o excipiente L-arginina.

Figura 11- Espectro de absorção obtido na região do infravermelho de CEF SQR 0,4 mg/pastilha de KBr.



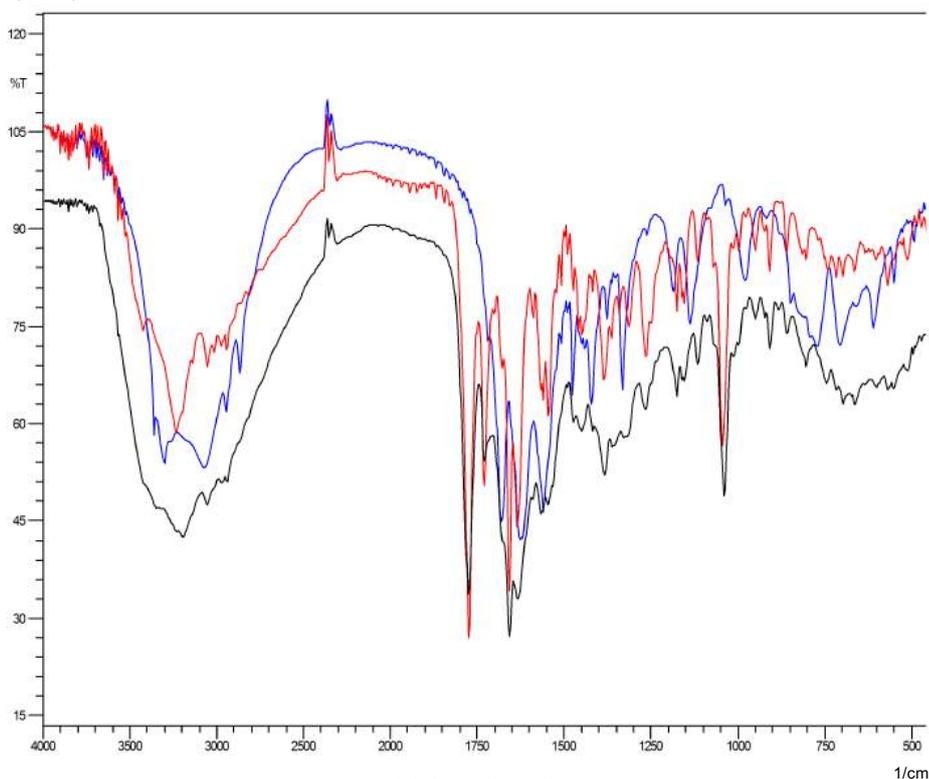
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12- Espectro de absorção obtido na região do infravermelho de CEF amostra 0,4 mg/pastilha de KBr.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13- Sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do infravermelho em pastilhas de KBr de CEF SQR 0,4 mg/pastilha (vermelho), CEF amostra 0,4 mg/pastilha (preto) e L-arginina 0,29 mg/pastilha (azul).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Tabela 10 são apresentados os picos obtidos após as análises realizadas com CEF SQR, comparando com as faixas de referência citadas na literatura (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

Tabela 10- Picos obtidos no espectro de absorção na região do infravermelho de CEF SQR

Posição do pico visualizado (cm^{-1})	Faixa de frequências de referência (cm^{-1}) ^a	Grupo funcional
3419, 3230	3600-3300, 3400-2400	N-H, O-H (carboxílico)
3053	3100-3000	C _{sp2} -H
2972	3000-2850	C _{sp3} -H
1772	1760-1700	C=O (β -lactâmico)
1730	1730-1700	C=O (carboxílico)
1654	1680-1630	C=O (amida)
1635	1680-1600	C=N, C=C
1558, 1543, 1446	1600-1450 ^b	C=C (anel aromático)
1338, 1313, 1263, 1174, 1151, 1114, 1045	1350-1000	C-O, C-N

^aSILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010.

^bPodem aparecer de 2 a 4 bandas dentro desta faixa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados da análise da CEF pela técnica de infravermelho apresentaram espectros semelhantes para CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, sendo característicos de compostos cefalosporínicos. Todos experimentos foram realizados com o reagente KBr para o preparo das pastilhas. As vibrações absorvidas a 3419 e 3230 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento do grupo N-H e do grupo O-H da função carboxila. A presença da absorção a 2972 cm^{-1} é característica de estiramento do grupo -C-H ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$), enquanto que as absorções a 1558, 1543 e 1446 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento do grupo C=C do anel aromático e 3053 cm^{-1} ao estiramento típico de =C-H ($\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$), evidenciando a existência da estrutura aromática. As absorções características dos estiramentos dos grupos carbonilas C=O foram observadas a 1772, 1730 e 1654 cm^{-1} , sendo atribuídas ao anel β -lactâmico, à função carboxílica e à função amida, respectivamente. A banda absorvida em 1635 cm^{-1} é indicativo das funções C=N e C=C presentes na molécula. As absorções em 1338, 1313, 1263, 1174, 1151, 1114 e 1045 cm^{-1} representam o estiramento dos grupos C-O e C-N. As aminas terciárias presentes no composto não foram visualizadas, uma vez que não apresentam bandas de absorção característica na região do infravermelho (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

Nas análises realizadas somente com o excipiente L-arginina, observou-se alta absorvidade na região do infravermelho, com picos altos em regiões de absorção comuns aos grupos existentes na CEF. Assim sendo, justifica-se as diferenças visualizadas entre os espectros da CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, não impedindo a análise da CEF, uma vez que, ambos espectros apresentaram picos similares atribuídos aos grupos característicos presentes na molécula. As análises de infravermelho foram avaliadas conforme dados relatados na literatura (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010) e também foram comparados aos poucos artigos encontrados para análise da CEF por espectrofotometria de IV (BUGAY; NEWMAN; FINDLAY, 1996; ZHANG; FENG; HU, 2008; JAGADEESH KUMAR et al., 2010; EL-RABBAT et al., 2012; ABDEL-FATTAH et al., 2013; FERDOUS et al., 2015; MOSTAFA et al., 2015), no qual as faixas encontradas neste estudo são semelhantes às descritas pela maioria dos autores, com exceção de (ZHANG; FENG; HU, 2008), que, ao invés da região médio, utilizou análises de espectrofotometria de IV na região próximo (12.000 a 4.000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1}).

Nos ensaios quantitativos, a banda absorvida em 1772 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo carbonila C=O do anel β -lactâmico, foi utilizada para quantificação da CEF pela técnica de infravermelho.

5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais utilizadas na indústria farmacêutica, estando presente desde a pesquisa até o desenvolvimento e produção de fármacos (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007), como também contribuindo de maneira significativa nas análises de medicamentos (RAMBLA-ALEGRE et al., 2011). A CLAE é fundamentada em um processo de separação de compostos presentes em uma amostra, sendo realizada a partir de duas fases, uma estacionária (pode ser sólida, sendo porosa ou na forma de pequenas partículas) e outra móvel (composta por solventes de diferentes polaridades) (MEYER, 2010).

5.8.1. Material

Para a realização do método foram utilizados CEF SQR e amostra em pó para solução injetável, descritos nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. O método por cromatografia líquida de fase reversa foi realizado em sistema Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, Califórnia, EUA), conectado a detector de UV/VIS Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 µL (Rheodyne Breeze[®], Califórnia, EUA). O ensaio de CEF em estudo foi realizado isocriticamente em coluna Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) Phenomenex[®] (Torrance, Califórnia, EUA), em temperatura ambiente. O método foi realizado com vazão de 0,5 mL/min, usando detector UV a 258 nm. As áreas dos picos foram integradas usando o programa de *software* Empower[®].

No decorrer da análise outros equipamentos também foram utilizados: balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil), banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, São Paulo, Brasil) e purificador de água Milli-Q[®] (Direct-Q[®] 3, Merck Millipore, Alemanha).

5.8.2. Método

5.8.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

Para o preparo da solução de CEF SQR (item 4.1) foi pesada a massa de 10,44 mg e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As concentrações utilizadas

no teste foram preparadas a partir desta solução-mãe, sendo retiradas alíquotas referentes a cada concentração e transferidas para balão volumétrico de 10 mL. Após a estabilização do sistema cromatográfico, foram injetados 20 μ L de cada solução.

5.8.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Os vinte frascos-ampola utilizados para o ensaio de peso médio citado no item 5.2 foram acondicionados em uma única embalagem para a formação de um *pool* das amostras de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Para o preparo da solução de CEF amostra (item 4.2) foi pesado a partir do *pool* a massa de 17,25 mg equivalente a 10,00 mg de CEF e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 μ g/mL. As concentrações utilizadas no teste foram preparadas a partir desta solução-mãe, sendo retiradas alíquotas referentes a cada concentração e transferidas para balão volumétrico de 10 mL. Após a estabilização do sistema cromatográfico, foram injetados 20 μ L de cada solução de trabalho.

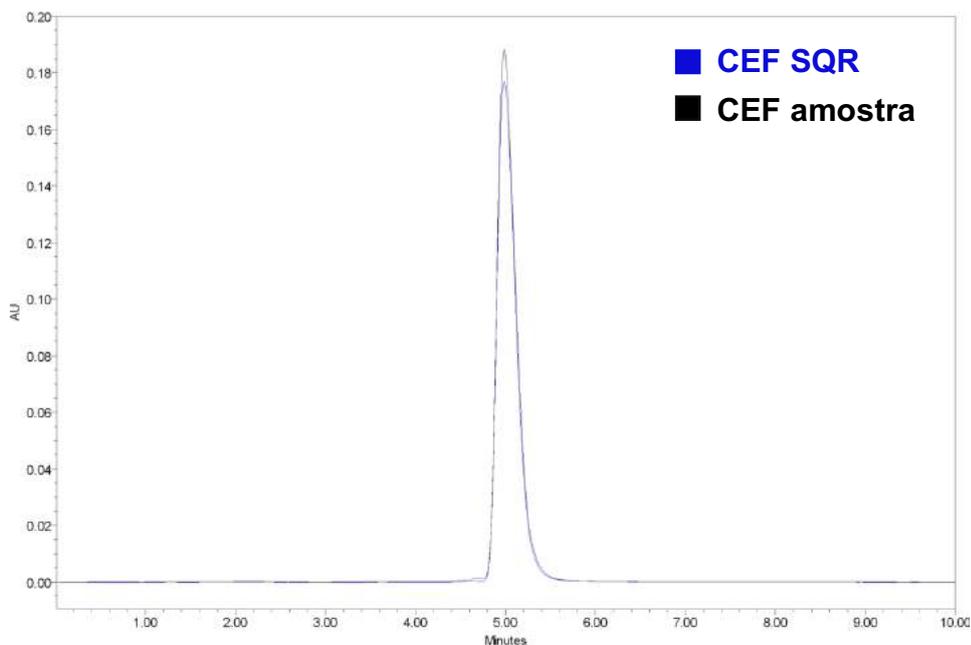
5.8.2.3. Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de água purificada : etanol (J.T. Baker) no proporção de 45:55, v/v, sendo o solvente utilizado de grau CLAE. A fase móvel foi submetida à filtragem sob vácuo por membrana de *nylon* com poro de 0,45 μ m e 47 mm de diâmetro (Millipore[®]) e degaseificada em banho ultrassônico (Unique, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos antes do uso.

5.8.3. Resultados e discussão

Os cromatogramas referentes à CEF SQR e à CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, analisados pelo método desenvolvido por CLAE, são representados na Figura 14.

Figura 14- Cromatogramas obtidos por CLAE para soluções de CEF SQR e CEF amostra (40 µg/mL) sobrepostos. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). Vazão: 0,5 mL/min. Comprimento de onda: 258 nm. Tempo de retenção: 4,99 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros para as análises de CLAE foram definidos após alguns testes preliminares, visando buscar um método seguro, que de certo modo evitasse danos à coluna cromatográfica e com baixo índice de resíduo. A CEF SQR e a CEF amostra apresentaram os mesmos perfis cromatográficos, indicando a presença de CEF nas amostras em pó liofilizado para solução injetável, sem a presença de impurezas e produtos de degradação. Análises com o excipiente L-arginina de CEF amostra não foram realizadas, já que no método desenvolvido e validado neste trabalho de espectrofotometria de absorção na região do UV, bem como, em estudo apresentado anteriormente demonstrou que este adjuvante não interfere na leitura do teste, pois não é absorvido pela luz UV.



ANÁLISE QUANTITATIVA

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. Espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível

6.1.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta

Nas análises por UV, os elétrons absorvem a energia, passando de orbitais em estado fundamental para o excitado. Isto é possível devido à alguns fatores, tais como, a estrutura eletrônica da molécula, o tipo de solvente utilizado, o comprimento de onda e a temperatura (SILVERSTEIN et al., 2007).

Esta análise tem como fundamento a ligação proporcional entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância. Os cálculos para estas análises são realizados por meio da Lei de Lambert-Beer, a qual utiliza as medidas de absorção da radiação de vários tipos de amostras em análises espectrofotométricas. Através do cálculo de Lambert-Beer (Equação 2), a absorvância é obtida (HARRIS, 2001; VOGEL, 2002; ROCHA; TEIXEIRA, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon . b . c$$

Equação 2

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, uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente

b = distância percorrida pelo feixe através da amostra (cm)

c = concentração da espécie absorvente (mol/L)

O método desenvolvido por espectrofotometria de absorção na região do UV teve embasamento nos trabalhos (MARONA; SCHAPOVAL, 1999; MARONA; SCHAPOVAL, 2001a; SALGADO; OLIVEIRA, 2005; LOPES; SALGADO, 2008; MORENO; SALGADO, 2009; BONFILIO; ARAÚJO; SALGADO, 2011; VIEIRA; SALGADO, 2011; CAZEDEY; SALGADO, 2012; FIORENTINO; SALGADO, 2012; PEDROSO; SALGADO, 2013;

CAZEDEY; SALGADO, 2014; CHIERENTIN; SALGADO, 2014; CORRÊA; SERRA; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2015a; KOGAWA; SALGADO, 2016).

6.1.1.1. Material

O método por espectrofotometria no UV foi determinado em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), modelo UV-1800, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água purificada (Milli-Q[®]) como solvente.

No decorrer da análise outros equipamentos também foram utilizados: espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), modelo UVmini-1240; balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil) e purificador de água Milli-Q[®] (Direct-Q[®] 3, Merck Millipore, Alemanha).

6.1.1.2. Método

6.1.1.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

A massa equivalente a 10,44 mg de CEF SQR (item 4.1) foi pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As concentrações foram preparadas a partir desta solução-mãe, sendo retiradas alíquotas de 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL completados com água purificada, atingindo as concentrações finais de 10; 12; 14; 16; 18 e 20 µg/mL, respectivamente.

6.1.1.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

A partir do *pool* dos vinte frascos-ampola de amostra (item 5.2), foi pesada a massa de 17,25 mg equivalente a 10,00 mg de CEF (item 4.2) e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As concentrações foram preparadas a partir desta solução-mãe, sendo retiradas alíquotas de 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL completados com água purificada, atingindo as concentrações teóricas finais de 10; 12; 14; 16; 18 e 20 µg/mL, respectivamente.

6.1.1.3. Curva de Ringbom

A finalidade para a elaboração da curva de Ringbom foi a determinação da faixa de concentração em que o método apresenta linearidade. Desta maneira, foram transferidas, para balões volumétricos de 10 mL, alíquotas a partir da solução-mãe de CEF amostra referentes às concentrações crescentes de 1 a 70 µg/mL, os quais posteriormente foram completados com água purificada. As concentrações utilizadas para a curva de Ringbom são descritas na Tabela 11. O comprimento de onda utilizado para a análise foi 258 nm.

Tabela 11- Determinação da curva de Ringbom de CEF por espectrofotometria no ultravioleta

Pontos	Concentração teórica final (µg/mL)	CEF amostra (100 µg/mL) (mL) ^a
1	1,0	0,1
2	2,0	0,2
3	3,0	0,3
4	4,0	0,4
5	5,0	0,5
6	6,0	0,6
7	7,0	0,7
8	8,0	0,8
9	10,0	1,0
10	12,0	1,2
11	14,0	1,4
12	16,0	1,6
13	18,0	1,8
14	20,0	2,0
15	22,0	2,2
16	26,0	2,6
17	30,0	3,0
18	35,0	3,5
19	40,0	4,0
20	45,0	4,5
21	50,0	5,0
22	55,0	5,5
23	60,0	6,0
24	65,0	6,5
25	70,0	7,0

^aBalão volumétrico de 10 mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.4. Obtenção da curva analítica

A curva analítica de CEF foi preparada utilizando alíquotas da solução-mãe, conforme descrita no item 6.1.1.2.1, realizando análises em triplicata para cada concentração da curva. O branco da análise constituiu-se de água purificada e todos ensaios foram lidos no comprimento de onda de 258 nm.

6.1.1.5. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável

Durante os ensaios espectrofotométricos foi realizado o cálculo para determinar a concentração em que CEF estava presente nas amostras em pó liofilizado para solução injetável, sendo utilizada a Equação 3 e posteriormente a Equação 4 para obter o teor percentual da amostra.

$$Ca = Aa \times \frac{Csqr}{Asqr}$$

Equação 3

$$Ca\% = Ca \times \frac{100}{Ct}$$

Equação 4

Em que:

Ca = Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

$Ca\%$ = Concentração percentual da amostra

$Csqr$ = Concentração da substância química de referência ($\mu\text{g/mL}$)

Aa = Absorvância da amostra

$Asqr$ = Absorvância da substância química de referência

Ct = Concentração teórica do CEF na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

6.1.1.6. Validação do método desenvolvido para espectrofotometria na região do ultravioleta

Os parâmetros avaliados para a validação do método espectrofotométrico com absorção na região do UV foram: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação. O método foi validado de acordo com o preconizado na literatura FDA (1994), BRASIL (2003) e ICH (2005).

6.1.1.6.1. Linearidade

Através da análise de três dias distintos, a linearidade foi determinada por meio de uma curva analítica para cada dia, detalhada no item 6.1.1.4. Em seguida, os dados obtidos foram avaliados para consecução da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados, constatando a linearidade por análise de variância (ANOVA).

6.1.1.6.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão do método desenvolvido para análises espectrofotométricas com absorção na região do UV foi avaliada de duas formas, por repetibilidade e a precisão intermediária (ICH, 2005).

6.1.1.6.2.1. Repetibilidade (intradia)

Na precisão por repetibilidade foram realizadas sete análises da solução de CEF SQR na concentração de 16 µg/mL no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo (DPR%) foi analisado entre a comparação das determinações ensaiadas.

6.1.1.6.2.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)

Na determinação da precisão intermediária interdia foram realizadas sete análises sucessivas da solução aquosa de CEF SQR na concentração de 16 µg/mL, sendo preparadas diariamente para análise em três dias diferentes, empregando as mesmas condições

experimentais, método, equipamento e analista. Os resultados foram avaliados pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

A precisão intermediária entre analistas também utilizou sete determinações sucessivas da solução de CEF SQR na concentração de 16 µg/mL, foram realizadas no mesmo dia, mas por analistas diferentes, empregando as mesmas condições experimentais, método e equipamento. As absorvâncias foram avaliadas pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

6.1.1.6.3. Exatidão

Na exatidão do método foi realizado o ensaio de recuperação, na qual quantidades conhecidas de CEF SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável (ICH, 2005). O teste por recuperação foi realizado em triplicata e as soluções preparadas são descritas na Tabela 12.

Tabela 12- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico com absorção na região do ultravioleta

	CEF amostra (100 µg/mL) (mL)	CEF SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^a
Amostra	1,0	---	10,0
R1	1,0	0,28	12,8
R2	1,0	0,60	16,0
R3	1,0	0,92	19,2
Padrão	---	1,0	10,0

^aBalão volumétrico de 10 mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 5, preconizada pela AOAC, 2002.

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

Equação 5

Em que:

C_f = Concentração da substância de amostra adicionada de padrão (SQR) ($\mu\text{g/mL}$)

C_u = Concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_s = Concentração teórica da substância química de referência adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

6.1.1.6.4. Robustez

A determinação da robustez do método por espectrofotometria com absorção na região do UV foi realizada através da comparação dos teores obtidos, conforme apresentado na Tabela 13, modificando-se o comprimento de onda, equipamento e a fonte do solvente de diluição (para o preparo das soluções de CEF SQR e CEF amostra), avaliados pelo DPR%.

Tabela 13- Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método por espectrofotometria com absorção na região do ultravioleta

Fator	Condição normal	Condições variadas
Equipamento	Shimadzu [®] (UV-1800)	Shimadzu [®] (UVmini-1240)
Fonte do solvente de diluição (SQR e amostra)	água 1 ^a	água 2 ^b
Comprimento de onda da leitura do teste	258 nm	259 nm 257 nm

^aÁgua 1: Água purificada coletada no próprio laboratório da pesquisa;

^bÁgua 2: Água purificada coletada no laboratório de farmacotécnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.6.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Segundo a ICH (2005), os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são estudos que se baseiam no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Após três análises das soluções de CEF SQR atingindo toda faixa de trabalho, os dados foram calculados conforme as Equações 6 e 7 para LD e LQ, respectivamente.

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

Equação 6

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

Equação 7

Em que:

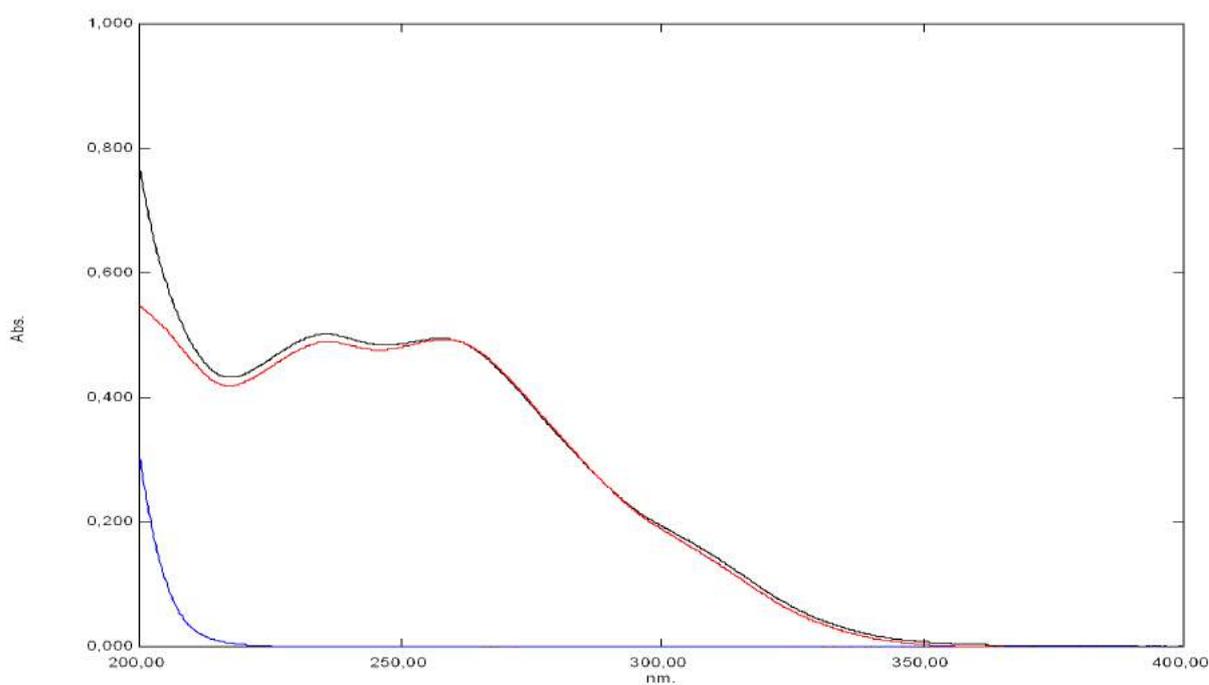
σ = Desvio padrão do intercepto

IC = Inclinação da curva analítica

6.1.1.7. Resultados

As análises de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina por espectrofotometria de absorção na região do UV utilizando água purificada estão apresentadas sobrepostas na Figura 15.

Figura 15- Espectros de absorção obtidos na região do ultravioleta das soluções aquosas de CEF SQR 16 $\mu\text{g/mL}$ (vermelho), CEF amostra 16 $\mu\text{g/mL}$ (preto) e L-arginina 11,6 $\mu\text{g/mL}$ (azul) sobrepostos. (λ : 200-400 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.7.1. Curva de Ringbom

A faixa linear das concentrações utilizadas no método foi determinada através da curva de Ringbom, cujos dados são apresentados na Tabela 14. As absorvâncias obtidas neste ensaio foram transformadas em transmitância. Em seguida, foi utilizado o gráfico transmitância *versus* o log da concentração de CEF (em µg/mL) para a elaboração da curva de Ringbom, conforme Figura 16.

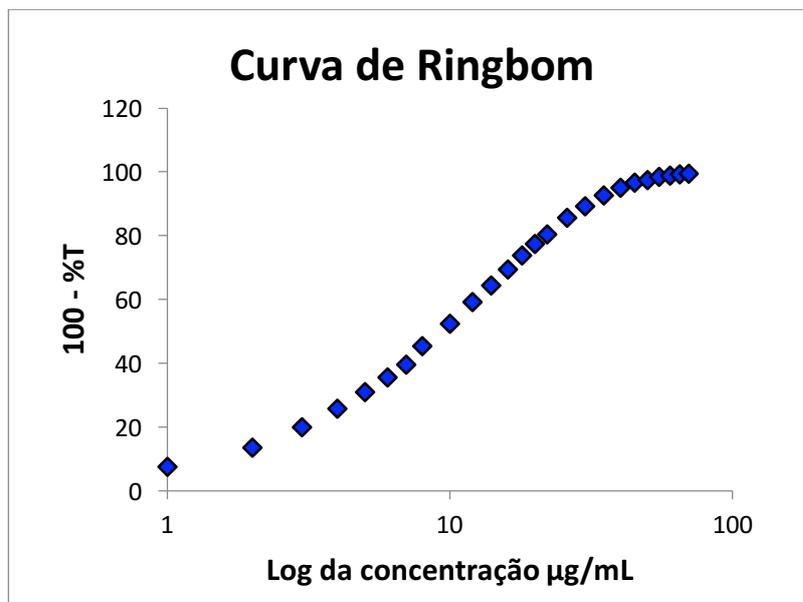
Tabela 14- Curva de Ringbom preparada para análise de CEF através do método de espectrofotometria com absorção na região do ultravioleta (λ : 258 nm)

Concentração (µg/mL) ^a	Média Absorvâncias (A)	10 ^A	%T (100/10 ^A)	100 - %T
1	0,034	1,081	92,470	7,530
2	0,064	1,159	86,298	13,702
3	0,097	1,250	79,983	20,017
4	0,130	1,349	74,131	25,869
5	0,161	1,449	69,024	30,976
6	0,191	1,552	64,417	35,583
7	0,220	1,660	60,256	39,744
8	0,263	1,832	54,576	45,424
10	0,322	2,099	47,643	52,357
12	0,389	2,449	40,832	59,168
14	0,449	2,812	35,563	64,437
16	0,514	3,266	30,620	69,380
18	0,583	3,828	26,122	73,878
20	0,648	4,446	22,491	77,509
22	0,711	5,140	19,454	80,546
26	0,847	7,031	14,223	85,777
30	0,973	9,397	10,641	89,359
35	1,139	13,772	7,261	92,739
40	1,303	20,091	4,977	95,023
45	1,475	29,854	3,350	96,650
50	1,603	40,087	2,495	97,505
55	1,793	62,087	1,611	98,389
60	1,955	90,157	1,109	98,891
65	2,120	131,826	0,759	99,241
70	2,281	190,985	0,524	99,476

^aBalão volumétrico de 10 mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16- Curva de Ringbom preparada para análise de CEF SQR através do método de espectrofotometria com absorção na região do ultravioleta. (λ : 258 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.7.2. Linearidade

A linearidade do método foi realizada através dos valores das absorvâncias das concentrações de CEF SQR preparadas em água purificada descritas na Tabela 15. Por meio desses valores, foi possível a elaboração gráfica da curva analítica, a qual utilizou o valor médio das três curvas analíticas no decorrer deste parâmetro. A curva analítica está representada na Figura 17.

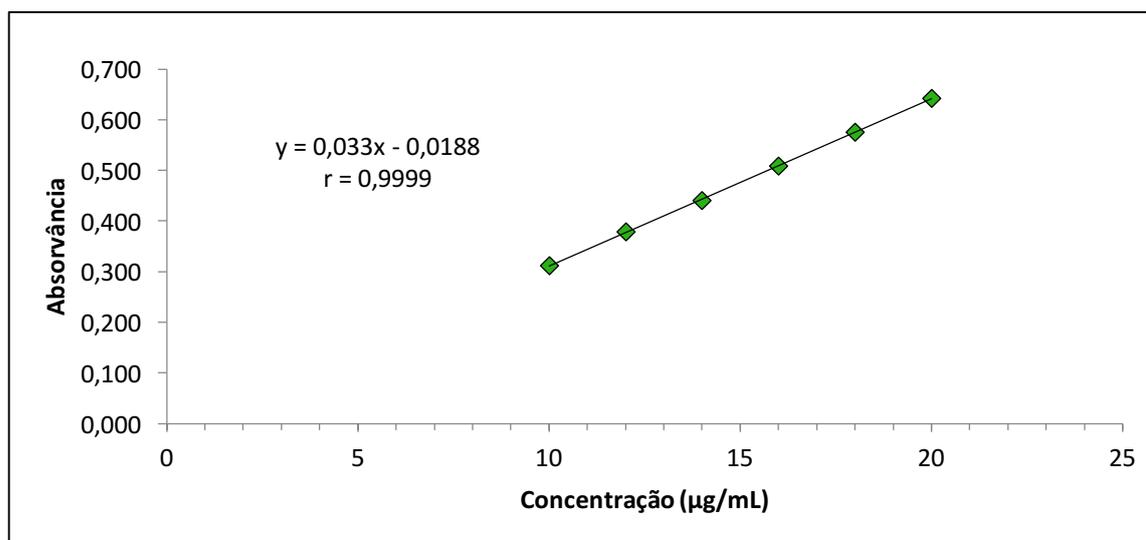
Tabela 15- Valores das absorvâncias referentes à análise de CEF SQR para a construção da curva analítica do método de espectrofotometria de ultravioleta (λ : 258 nm)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância ^a	Absorvância média \pm DP ^b	DPR% ^c
10	0,3120	0,3126 \pm 0,0007	0,22
	0,3123		
	0,3133		
12	0,3787	0,3787 \pm 0,0013	0,35
	0,3773		
	0,3800		
14	0,4407	0,4416 \pm 0,0025	0,56
	0,4397		
	0,4443		
16	0,5100	0,5090 \pm 0,0039	0,77
	0,5047		
	0,5123		
18	0,5770	0,5759 \pm 0,0025	0,44
	0,5730		
	0,5777		
20	0,6480	0,6433 \pm 0,0045	0,70
	0,6390		
	0,6430		

^aValor médio de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17- Curva analítica do método de espectrofotometria na região do ultravioleta para análise de CEF. (λ : 258 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Tabela 16 mostra os resultados estatísticos obtidos da análise de variância (ANOVA) provenientes da curva analítica realizada para análise de CEF pelo método de espectrofotometria na região do UV.

Tabela 16- Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados utilizando o método de espectrofotometria na região do ultravioleta na obtenção da curva analítica de CEF SQR

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F_{cal}	F_{tab}
Entre concentrações	5	2,2934E-01	4,5867643E-02	5493,86*	3,11
Regressão Linear	1	2,2930E-01	2,2930318E-01	27465,11*	4,75
Desvio da Linearidade	4	3,5033E-05	8,7583333E-06	1,05	3,26
Dentro (resíduo)	12	1,0019E-04	8,3488889E-06	-	-
Total	17	2,2944E-01	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.7.3. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável

O doseamento da solução aquosa de CEF amostra na concentração de 16 µg/mL foi determinado através dos cálculos da média de três análises realizadas em triplicata e do valor do DPR% apresentados nestes ensaios. O teor de CEF presente na amostra é mostrado na Tabela 17, com valor de 103,81% e seu DPR de 0,51%.

Tabela 17- Doseamento obtido por espectrofotometria na região do ultravioleta para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Doseamento					
Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Média	DP ^b	DPR% ^c
104,41%	103,61%	103,41%	103,81%	0,5294	0,51

^aMédia de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.7.4. Precisão

Neste parâmetro realizado por repetibilidade intradia, os dados foram avaliados através do valor de DPR%. Os resultados foram obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, através da análise consecutiva de sete soluções aquosas de CEF SQR (16 µg/mL), apresentando o valor de DPR de 0,39%.

Na precisão interdias, os resultados também foram avaliados através do valor de sete soluções aquosas de CEF SQR preparadas na concentração de 16 µg/mL, porém realizados em três dias seguidos, na qual foi preparada uma nova solução-mãe por dia, sendo o valor do DPR de 0,19%. A precisão entre analistas, foi avaliada por dois analistas, na qual foram preparadas sete soluções de CEF SQR (16 µg/mL) por cada um dos analistas, resultando no valor de DPR de 0,08%. Os dados das precisões do método espectrofotométrico na região do ultravioleta são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18- Precisão interdias e entre analistas do método analítico para análise de CEF por espectrofotometria na região do ultravioleta

Interdias			Entre analistas		
Dia	Absorvância ¹	DPR% ²	Analista	Absorvância ¹	DPR% ²
1	0,507		1	0,502	
2	0,507	0,19			0,08
3	0,505		2	0,503	

¹Média de sete determinações; ²DPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas Tabelas 19 e 20, são apresentados os resultados da análise estatística de variância (ANOVA) para as precisões interdias e entre analistas, respectivamente. O cálculo foi realizado através dos valores das absorvâncias das sete soluções de CEF SQR preparadas para cada ensaio.

Tabela 19- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias do método de ultravioleta

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	1,26667E-05	2	6,33333E-06	1,33893	3,554557
Dentro dos grupos	8,51429E-05	18	4,73016E-06		
Total	9,78095E-05	20			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 20- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas do método de ultravioleta

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	1,14286E-06	1	1,14286E-06	0,37500	4,747225
Dentro dos grupos	3,65714E-05	12	3,04762E-06		
Total	3,77143E-05	13			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.7.5. Exatidão

Os resultados da exatidão do método preparados por recuperação são apresentados na Tabela 21. Desta forma, a análise de três ensaios com suas concentrações pré-estabelecidas resultou no valor da recuperação média de 100,80%.

Tabela 21- Determinação da exatidão do método analítico para análise de CEF por espectrofotometria na região do ultravioleta

	Concentração esperada de CEF ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada de CEF ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR% ^b
R1	12,8	13,35	101,23		
R2	16	16,54	100,40	100,80	0,41
R3	19,2	19,79	100,78		

^aMédia de três determinações; ^bDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.7.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Neste parâmetro foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), com o intuito de verificar a sensibilidade do método de espectrofotometria na região do UV. Os dados calculados resultaram em valores de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ para LD e o 1,53 $\mu\text{g/mL}$ para LQ.

6.1.1.7.7. Robustez

Na robustez do método, as pequenas variações realizadas nos parâmetros de forma individual não apresentaram diferenças significativas para os valores do teor de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável. A Tabela 22 descreve os resultados com as variações e seus valores de DPR%, os quais se mostraram abaixo de 0,85%.

Tabela 22- Valores apresentados para a determinação da robustez no método de espectrofotometria na região do ultravioleta

Variável	Condições variadas	Cefepima ¹ (%)	Média (%)	DPR% ²
Equipamento	Shimadzu [®] (UV-1800)	103,53	103,18	0,48
	Shimadzu [®] (UVmini-1240)	102,82		
Fonte do solvente de diluição (SQR e amostra)	Água 1 ^a	103,64	103,01	0,85
	Água 2 ^b	102,39		
Comprimento de onda da leitura (nm)	259	103,02	103,08	0,11
	258	103,02		
	257	103,22		

¹Média de três determinações; ²DPR% = Desvio Padrão Relativo.

^aÁgua 1: Água purificada coletada no próprio laboratório da pesquisa;

^bÁgua 2: Água purificada coletada no laboratório de farmacotécnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.1.8. Discussão

Conforme descrito no item 5.6.3, o método foi validado utilizando água purificada como solvente. A curva de Ringbom permitiu determinar a faixa em que o método possui linearidade. Após esta verificação, optou-se em trabalhar com as concentrações de 10 a 20 µg/mL. Desta forma, os resultados apresentaram correlação linear para estas concentrações utilizadas no parâmetro da linearidade do método, o qual resultou no coeficiente de correlação igual a 0,9999. Pode-se afirmar que este método de espectrofotometria de absorção na região do UV é linear, pois através da análise de variância (ANOVA) os resultados estatísticos não apresentaram desvios significativos de linearidade em um nível de 5% de significância.

O doseamento do método foi realizado a fim de determinar a quantidade do CEF presente na forma farmacêutica, apresentando um valor de teor de 103,81%, dentro do limite estabelecido pelo compêndio oficial de 90,0% a 115,0% (USP 37, 2014).

Por meio das curvas analíticas foram calculados os limites do método, tanto o de detecção (LD) quanto o de quantificação (LQ), mostrando que a sensibilidade está de acordo, pois as concentrações escolhidas na validação estão acima do limite de quantificação.

O valor de DPR obtido para precisão intradia do método foi de 0,39%, determinado através de sete soluções de CEF SQR com 16 µg/mL em condições idênticas e no mesmo dia. Para a precisão interdias representada na Tabela 18, os dados foram obtidos através do valor da

absorvância de sete soluções de CEF SQR a uma concentração de 16 µg/mL realizados em três dias consecutivos e nas mesmas condições de ensaio, obtendo valores médios de absorvância de 0,507, 0,507 e 0,505 e o valor de DPR de 0,19%. Já para a precisão entre analistas os dados coletados foram semelhantes à da intradia, porém realizada por dois analistas, onde para o analista 1 obteve-se o valor médio da absorvância de 0,502 e para o analista 2 foi 0,503, resultando no DPR de 0,08%. Análises de variância (ANOVA) foram utilizadas nestas precisões interdias e entre analistas, com o intuito de avaliar se a um nível de significância de 5% as absorvâncias obtidas através dos dias ou dos analistas apresentaram diferenças estatísticas. Assim, para a precisão interdias o valor de F_{cal} foi 1,33 sendo menor que o F_{tab} de 3,55. O mesmo ocorreu para a precisão entre analistas que teve um valor de F_{cal} de 0,37 e de F_{tab} 4,74. Desta maneira, podemos dizer que o método é preciso, pois não apresentou diferenças significativas a um nível de 5%.

Quanto ao parâmetro da exatidão, que foi avaliada por meio do teste de recuperação, o resultado obtido para o valor médio recuperado foi de 100,80% com o DPR de 0,41%, indicando que o método possui uma apropriada exatidão.

Na robustez, as pequenas modificações realizadas durante os ensaios não demonstraram interferência na quantificação de CEF para o método de UV, apresentando valores de DPR abaixo de 0,85%, com isso não houve diferença significativa na robustez.

O método por espectrofotometria com absorção na região do UV validado neste estudo alcançou todos os parâmetros determinados pelos órgãos oficiais (ICH, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 37, 2014). Deste modo, este método poderá ser introduzido nas análises de rotina de controle de qualidade para a quantificação de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, a fim de buscar sempre por técnicas voltadas à química verde e que tenham custos acessíveis para a análise.

6.1.2. Espectrofotometria na região do visível

As técnicas de espectrofotometria nas regiões do VIS e do UV são técnicas versáteis e muito utilizadas por inúmeras áreas, podendo suas aplicações estender para determinações analíticas de compostos orgânicos e inorgânicos ou até mesmo materiais biológicos. Por serem de fácil execução, menores despesas das análises e com acessibilidade aos materiais, estes métodos são vastamente incorporados ao controle de qualidade industrial (ASLAN et al., 2010).

O método desenvolvido por espectrofotometria de absorção na região do VIS teve embasamento nos trabalhos (MARONA; SCHAPOVAL, 2001b; PATEL et al., 2011; SILVA; SALGADO, 2012; CHIERENTIN; SALGADO, 2014).

A validação do método foi realizada de acordo com a Resolução RE nº 899 de 2003 (BRASIL, 2003), com o guia de validação do ICH (2005) e com a Farmacopeia Americana 37^a ed. (USP 37, 2014).

6.1.2.1. Material

Na realização do método foram utilizados CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. O método por espectrofotometria na região do VIS foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS SPECTROstar[®] Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha), utilizando microplacas de polipropileno de 96 poços apresentando volume total de 360 µL para cada, fundo chato e sem tampa. Os dados foram analisados através do *software* MARS[®] Data Analysis versão V3.10 R6. Os solventes utilizados para os ensaios foram: água purificada (Milli-Q[®]), solução reagente de Folin-Ciocalteu fenólico 2 N (Sigma-Aldrich[®], EUA) diluída 1:10 em água purificada, solução de carbonato de sódio (Dinâmica[®]) 10%, solução de ácido clorídrico (Synth[®]) 0,1 M, solução de hidróxido de sódio (Cinética[®]) 0,001 M e solução de peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina[®]) 0,05%.

Durante os ensaios foram utilizados outros materiais e equipamentos: espectrofotômetro UV-VIS Epoch[™] (BioTek[®], Winooski, EUA); balança analítica, modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil); balança analítica, modelo AG 200 (Gehaka[®], São Paulo, Brasil); purificador de água Milli-Q[®] (Direct-Q[®] 3, Merck Millipore, Alemanha); banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, São Paulo, Brasil); banho de aquecimento modelo Q334M (Quimis[®], São Paulo, Brasil); micropipetador modelo Research[®] Plus 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); micropipetador multicanal modelo Research[®] Plus 30-300 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); micropipetadores multicanal modelo Discovery Comfort 1-10 µL e 20-200 µL (HTL Lab Solutions, Varsóvia, Polônia).

6.1.2.2. Método

6.1.2.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

A solução de CEF SQR (item 4.1) foi preparada através da pesagem da massa de 20,88 mg e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 200 µg/mL. As concentrações finais utilizadas no método foram de 15; 20; 25; 30; 35 e 40 µg/mL, preparadas a partir desta solução-mãe.

6.1.2.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

A partir do *pool* dos vinte frascos-ampola de amostra (item 5.2), foi pesada a massa de 34,50 mg equivalente a 20,00 mg de CEF (item 4.2) e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 200 µg/mL. As concentrações finais utilizadas no método foram de 15; 20; 25; 30; 35 e 40 µg/mL, preparadas a partir desta solução-mãe.

Para os ensaios da curva de Ringbom também foi necessário preparar uma solução de CEF amostra na concentração de 1 mg/mL, sendo pesada a massa de 172,50 mg equivalente a 100,00 mg de CEF e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada.

6.1.2.2.3. Procedimento do método

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, sendo utilizadas as soluções de CEF SQR (item 6.1.2.2.1) e CEF amostra (item 6.1.2.2.2) para o preparo das concentrações utilizadas no teste quantitativo. Para cada concentração foi retirada uma alíquota correspondente e transferida para o poço respectivo ao teste na microplaca. Posteriormente, foram adicionados os solventes: água purificada, solução de Na₂CO₃ 10% e solução de Folin-Ciocalteau fenólico (1:10), totalizando um volume final de 200 µL por poço. Na Tabela 23 estão representados os volumes de cada solução utilizados para cada concentração do teste. Após adicionar os solventes, a microplaca com os ensaios foi inserida dentro do equipamento de leitura e para que a reação acontecesse aguardou-se o tempo de 10 minutos (5 minutos em repouso e 5 minutos sob agitação de 500 rpm) antes da leitura dos ensaios. A validação do

método foi realizada utilizando o comprimento de onda com máximo de absorção em 740 nm. A Figura 18 representa o procedimento dos ensaios para análise por espectrofotometria na região do VIS.

Tabela 23- Volumes de cada solução utilizados nos ensaios quantitativos para a análise de CEF por espectrofotometria no VIS

Concentração final ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Solução de CEF (200 $\mu\text{g/mL}$) ^b (μL)	Água purificada (μL)	Solução de Na_2CO_3 10% (μL)	Solução de Folin-Ciocalteu fenólico (1:10) (μL)	Volume final ^c (μL)
15,0	15	125	30	30	200
20,0	20	120	30	30	200
25,0	25	115	30	30	200
30,0	30	110	30	30	200
35,0	35	105	30	30	200
40,0	40	100	30	30	200
Branco		140	30	30	200

^aConcentração final para as soluções de CEF SQR e CEF amostra (concentração teórica final);

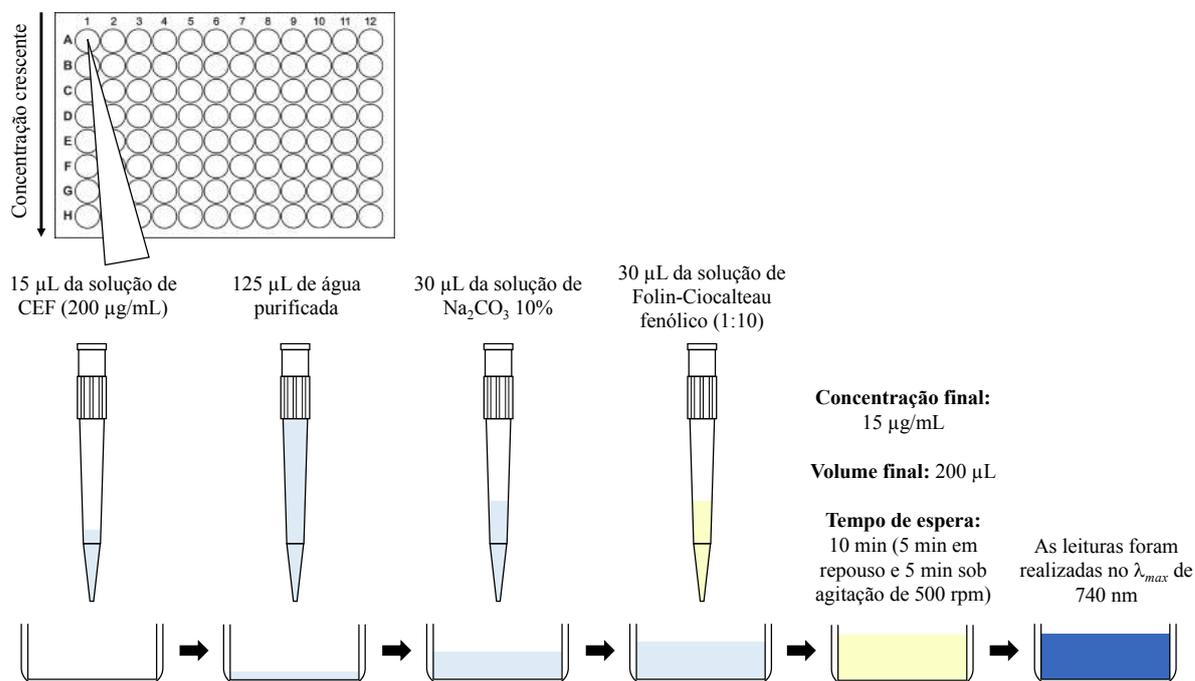
^bSoluções-mãe de CEF SQR e CEF amostra;

^cEnsaio realizado em microplaca de 96 poços com capacidade de 360 μL por poço.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18- Ensaio realizado pelo método de espectrofotometria na região do VIS.

Ex: Concentração final 15 $\mu\text{g/mL}$



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.3. Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi elaborada para se determinar a faixa de concentração em que o método apresenta linearidade. Assim, a partir das soluções-mãe de CEF amostra, as alíquotas referentes às concentrações crescentes de 1 a 700 µg/mL foram transferidas para os respectivos poços da microplaca, sendo posteriormente adicionados os solventes: água purificada, solução de Na₂CO₃ 10% e solução de Folin-Ciocalteau fenólico (1:10). Na Tabela 24 estão descritas as concentrações utilizadas para a curva de Ringbom. O comprimento de onda utilizado para a análise foi 740 nm.

Tabela 24- Determinação da curva de Ringbom de CEF por espectrofotometria no VIS

Pontos	Concentração teórica final (µg/mL)	CEF amostra (200 µg/mL) (µL) ^a	CEF amostra (1 mg/mL) (µL) ^a
1	1,0	1	-
2	2,0	2	-
3	3,0	3	-
4	4,0	4	-
5	5,0	5	-
6	7,0	7	-
7	10,0	10	-
8	12,0	12	-
9	14,0	14	-
10	16,0	16	-
11	20,0	20	-
12	30,0	30	-
13	40,0	40	-
14	50,0	50	-
15	60,0	60	-
16	70,0	70	-
17	100,0	100	-
18	140,0	140	-
19	220,0	-	44
20	280,0	-	56
21	400,0	-	80
22	500,0	-	100
23	600,0	-	120
24	700,0	-	140

^aMicroplaca com volume final de preparo de 200 µL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.4. Obtenção da curva analítica

A curva analítica de CEF foi preparada utilizando alíquotas da solução-mãe, conforme descrita no item 6.1.2.2.1, realizando análises em triplicata para cada concentração da curva. O branco da análise constituiu-se de água purificada, solução de Na₂CO₃ 10% e solução de Folin-Ciocalteu fenólico (1:10). As absorvâncias foram lidas no comprimento de onda de 740 nm.

6.1.2.5. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável

No método de espectrofotometria de absorção na região do visível as Equações 3 e 4, citadas no item 6.1.1.5, foram utilizadas para o cálculo do teor em que CEF estava presente nas amostras em pó liofilizado para solução injetável.

6.1.2.6. Validação do método desenvolvido para espectrofotometria na região do visível

O método espectrofotométrico com absorção na região do VIS foi validado de acordo com o preconizado na literatura FDA (1994), BRASIL (2003) e ICH (2005), por meio da avaliação dos parâmetros: linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

6.1.2.6.1. Linearidade

A linearidade foi determinada por meio de três ensaios, no qual utilizou-se para cada ensaio uma solução-mãe de CEF SQR (item 6.1.2.2.1) previamente preparada, resultando em uma curva analítica para cada ensaio, detalhada no item 6.1.2.4. Em seguida, os dados obtidos foram avaliados para a obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados, constatando a linearidade por análise de variância (ANOVA).

6.1.2.6.2. Seletividade

A seletividade do método de espectrofotometria de absorção na região do VIS foi determinada com o intuito de verificar a capacidade que o método possuía em detectar o IFA na presença de possíveis impurezas, provenientes da degradação acelerada realizada com a amostra de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Foram utilizadas soluções de CEF

amostra na concentração de 30 µg/mL, sendo submetidas às degradações aceleradas por condições ácida, alcalina, neutra, oxidativa e fotolítica.

Para o preparo das soluções de CEF amostra os solventes utilizados foram: HCl 0,1 M, NaOH 0,001 M e H₂O₂ 0,05%, para as condições de estresse ácida, alcalina e oxidativa, respectivamente. Nas condições neutra e fotolítica as soluções de CEF amostra foram preparadas utilizando como solvente água purificada. Todas amostras foram aquecidas a 60 °C, com exceção da condição fotolítica, que foi induzida através da exposição à luz ultravioleta (UVC, 254 nm) em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Os tempos de análise nestas condições foram de 0; 0,5; 1,5; 3 e 6 horas. Todas as condições foram avaliadas no comprimento de onda de 740 nm e uma varredura na faixa de λ de 400-800 nm também foi realizada, para observar se haveria a formação de novos picos de absorção, diferentes ao do fármaco íntegro.

6.1.2.6.3. Precisão

Neste parâmetro foi realizada a precisão do método, que é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão do método desenvolvido nas análises espectrofotométricas com absorção na região do VIS foi avaliada por meio de duas formas, por repetibilidade e por precisão intermediária (ICH, 2005).

6.1.2.6.3.1. Repetibilidade (intradia)

A primeira forma utilizada para avaliar a precisão foi por repetibilidade, sendo realizadas sete análises da solução de CEF SQR na concentração de 30 µg/mL no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo (DPR%) foi analisado entre a comparação das determinações ensaiadas.

6.1.2.6.3.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)

Na segunda forma de avaliar a precisão, foram realizadas a precisão intermediária interdia e a entre analistas. Para a precisão intermediária interdia foram feitas sete análises sucessivas de soluções aquosas de CEF SQR na concentração de 30 µg/mL, preparadas diariamente para análise em três dias diferentes, empregando as mesmas condições

experimentais, método, equipamento e analista. Os resultados foram avaliados pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

A precisão intermediária entre analistas também utilizou sete determinações sucessivas da solução de CEF SQR na concentração de 30 µg/mL, realizadas no mesmo dia, mas por analistas diferentes, empregando as mesmas condições experimentais, método e equipamento. As absorvâncias foram avaliadas pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

6.1.2.6.4. Exatidão

Para o parâmetro da exatidão foi realizada a análise comparativa dos métodos (ICH, 2005), no qual utilizou-se a comparação dos resultados obtidos por meio do método espectrofotométrico no VIS com um segundo método validado para o composto, neste caso optou-se em comparar com o método espectrofotométrico no UV, devido à semelhança apresentada por ambos. Os ensaios comparativos foram realizados utilizando as soluções aquosas de CEF SQR e CEF amostra, através de análise de sete doseamentos para cada método, calculados pelas Equações 3 e 4 (item 6.1.1.5). A concentração utilizada foi de 20 µg/mL e a avaliação foi feita pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

6.1.2.6.5. Robustez

A robustez do método por espectrofotometria com absorção na região do VIS foi determinada através da comparação dos teores obtidos, conforme apresentado na Tabela 25, modificando-se o comprimento de onda, equipamento e a fonte do solvente de diluição para o preparo das soluções de CEF SQR e CEF amostra, solução de Na₂CO₃ 10% e solução de Folin-Ciocalteau fenólico (1:10), avaliados pelo DPR%.

Tabela 25- Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método por espectrofotometria com absorção na região do VIS

Fator	Condição normal	Condições variadas
Equipamento	SPECTROstar [®] Nano	Epoch [™] (BioTek [®])
Fonte do solvente de diluição (SQR, amostra, Na ₂ CO ₃ 10% e Folin-Ciocalteu 1:10)	água 1 ^a	água 2 ^b
Comprimento de onda da leitura do teste	740 nm	738 nm 742 nm

^aÁgua 1: Água purificada coletada no próprio laboratório da pesquisa;

^bÁgua 2: Água purificada coletada no laboratório de farmacotécnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

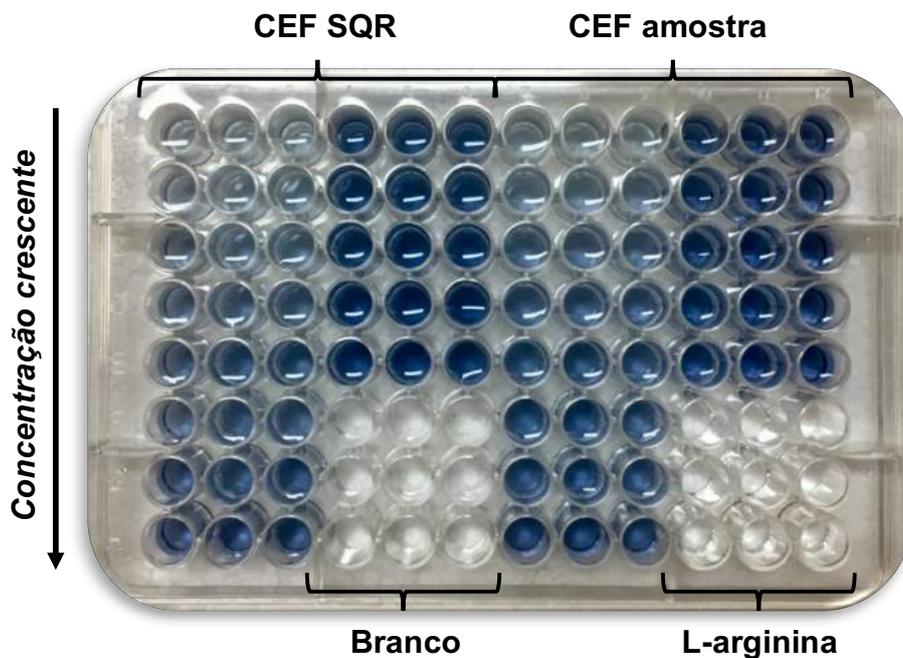
6.1.2.6.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os parâmetros limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) avaliados no método são estudos baseados no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica (ICH, 2005). Após três análises das soluções de CEF SQR, atingindo toda faixa de trabalho, os dados foram calculados conforme as Equações 6 e 7 descritas no item 6.1.1.6.5.

6.1.2.7. Resultados

Na Figura 19 é apresentada a microplaca após a realização de um dos ensaios da validação para a quantificação de CEF pelo método de espectrofotometria de absorção no VIS.

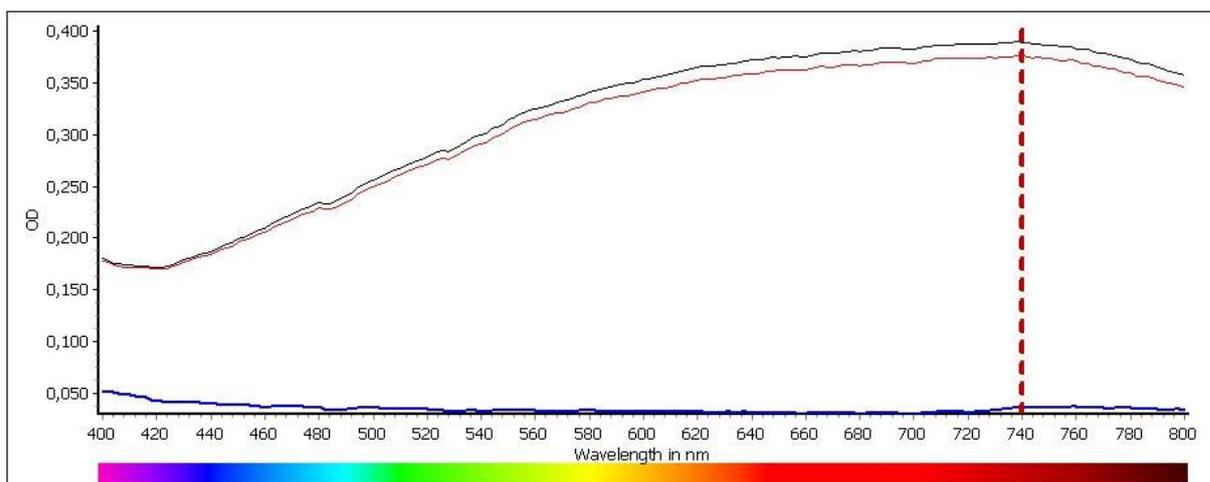
Figura 19- Microplaca após a realização dos ensaios para a validação do método por espectrofotometria no VIS, utilizando as soluções aquosas de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros provenientes das análises de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina por espectrofotometria de absorção na região do VIS utilizando água purificada estão apresentadas na Figura 20.

Figura 20- Espectros de absorção obtidos na região do VIS das soluções aquosas de CEF SQR 30 $\mu\text{g/mL}$ (vermelho), CEF amostra 30 $\mu\text{g/mL}$ (preto) e L-arginina 21,75 $\mu\text{g/mL}$ (azul) sobrepostos. (λ : 400-800 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.1. Curva de Ringbom

Neste parâmetro da curva de Ringbom foi possível determinar a faixa linear das concentrações utilizadas no método. Na Tabela 26, são apresentadas todas as absorvâncias obtidas por meio desta análise, as quais foram transformadas em transmitância. Posteriormente, para a elaboração da curva de Ringbom foi realizado o gráfico de transmitância *versus* o log da concentração de CEF (em µg/mL), sendo apresentado pela Figura 21.

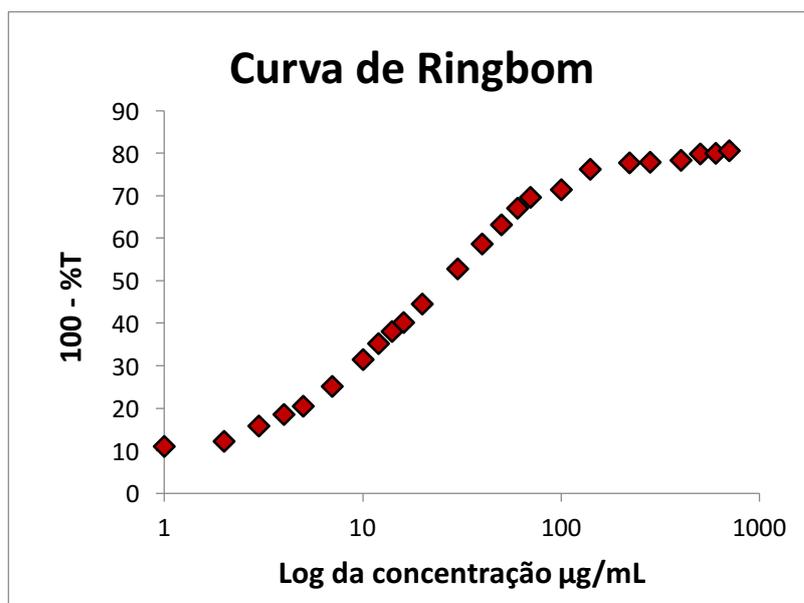
Tabela 26- Curva de Ringbom preparada para análise de CEF através do método de espectrofotometria com absorção na região do VIS (λ : 740 nm)

Concentração (µg/mL) ^a	Média Absorvâncias (A)	10 ^A	%T (100/10 ^A)	100 - %T
1	0,051	1,125	88,920	11,080
2	0,057	1,140	87,700	12,300
3	0,075	1,189	84,140	15,860
4	0,089	1,227	81,470	18,530
5	0,100	1,259	79,433	20,567
7	0,126	1,337	74,817	25,183
10	0,164	1,459	68,549	31,451
12	0,189	1,545	64,714	35,286
14	0,208	1,614	61,944	38,056
16	0,223	1,671	59,841	40,159
20	0,256	1,803	55,463	44,537
30	0,327	2,123	47,098	52,902
40	0,384	2,421	41,305	58,695
50	0,434	2,716	36,813	63,187
60	0,483	3,041	32,885	67,115
70	0,519	3,304	30,269	69,731
100	0,545	3,508	28,510	71,490
140	0,625	4,217	23,714	76,286
220	0,652	4,487	22,284	77,716
280	0,656	4,529	22,080	77,920
400	0,665	4,624	21,627	78,373
500	0,695	4,955	20,184	79,816
600	0,700	5,012	19,953	80,047
700	0,714	5,176	19,320	80,680

^aMicroplaca com volume final de preparo de 200 µL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21- Curva de Ringbom preparada para análise de CEF SQR através do método de espectrofotometria com absorção na região do VIS. (λ : 740 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.2. Linearidade

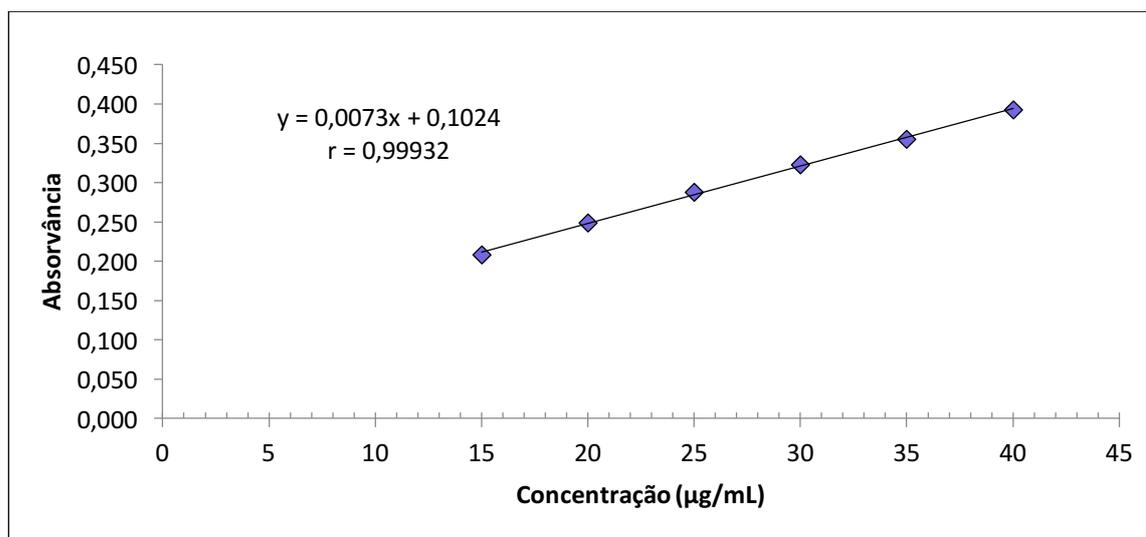
Através das soluções aquosas de CEF SQR nas concentrações pré-estabelecidas, obteve-se os valores das absorvâncias, que foram utilizados para a avaliação da linearidade do método e estão descritas na Tabela 27. Com os valores das absorvâncias, foi elaborado um gráfico da curva analítica, representada na Figura 22, onde utilizou-se o valor médio das três curvas analíticas no decorrer deste parâmetro.

Tabela 27- Valores das absorvâncias referentes à análise de CEF SQR para a construção da curva analítica do método de espectrofotometria no VIS (λ : 740 nm)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância ^a	Absorvância média \pm DP ^b	DPR% ^c
15	0,2070	0,2087 \pm 0,0015	0,73
	0,2100		
	0,2090		
20	0,2465	0,2491 \pm 0,0049	1,95
	0,2547		
	0,2460		
25	0,2895	0,2883 \pm 0,0084	2,91
	0,2960		
	0,2793		
30	0,3200	0,3230 \pm 0,0079	2,46
	0,3320		
	0,3170		
35	0,3570	0,3556 \pm 0,0053	1,50
	0,3600		
	0,3497		
40	0,3960	0,3931 \pm 0,0068	1,73
	0,3980		
	0,3853		

^aValor médio de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22- Curva analítica do método de espectrofotometria na região do VIS para análise de CEF. (λ : 740 nm)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Tabela 28 são apresentados os resultados estatísticos obtidos por meio da análise de variância (ANOVA) originados a partir da curva analítica realizada para análise de CEF pelo método de espectrofotometria na região do VIS.

Tabela 28- Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados utilizando o método de espectrofotometria na região do VIS na obtenção da curva analítica de CEF SQR

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F_{cal}	F_{tab}
Entre concentrações	5	6,9818E-02	1,3963614E-02	351,16*	3,11
Regressão linear	1	6,9723E-02	6,9722736E-02	1753,42*	4,75
Desvio da linearidade	4	9,5333E-05	2,3833333E-05	0,60	3,26
Dentro (resíduo)	12	4,7717E-04	3,9763889E-05	-	-
Total	17	7,0295E-02	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.3. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável

Através dos cálculos da média de três análises realizadas em triplicata foi determinado o doseamento da solução aquosa de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável na concentração de 30 µg/mL. Avaliou-se também o valor do DPR% apresentado por estes ensaios. Na Tabela 29, é apresentado o teor de CEF presente na amostra, sendo de 104,26% e seu DPR de 0,30%.

Tabela 29- Teor obtido por espectrofotometria na região do VIS para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Doseamento					
Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Média	DP ^b	DPR% ^c
103,92%	104,54%	104,32%	104,26%	0,3169	0,30

^aMédia de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

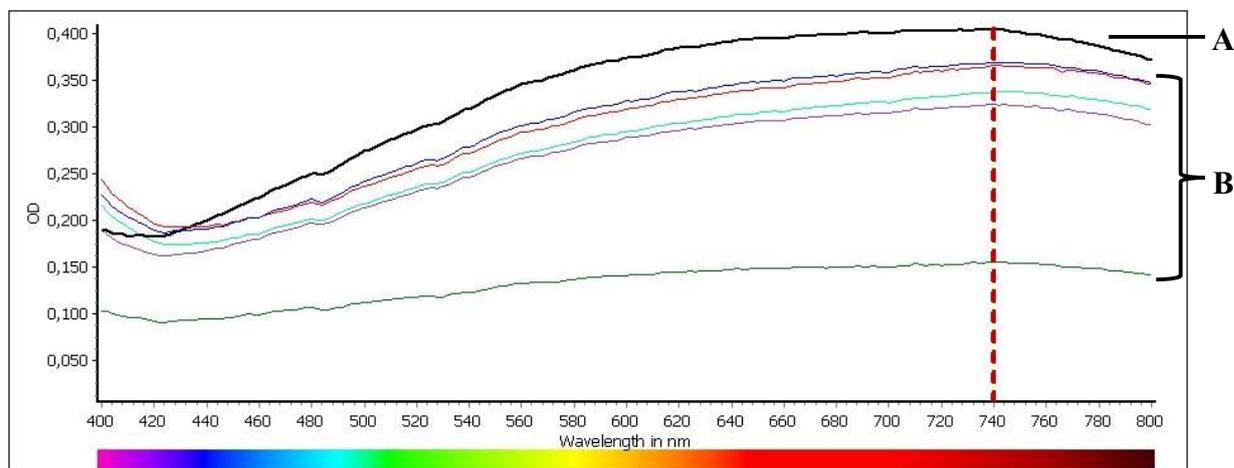
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.4. Seletividade

Na seletividade do método de espectrofotometria de absorção na região do VIS, foi possível verificar a possibilidade da presença ou não de produtos de degradação, provenientes do estudo de degradação forçada, realizada com CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável. Para todas as condições de estresse avaliadas ocorreram decréscimos das absorvâncias no comprimento de onda de 740 nm e não ocorreu a formação de novos picos nos espectros, quando avaliados por varredura na faixa de comprimento de onda de 400-800 nm. As porcentagens de degradação da CEF para as condições analisadas foram 14,4% para ácida, 18,0% para alcalina, 7,3% para neutra, 60,5% para oxidativa e 1,3% para fotolítica, quando comparadas nos tempos de degradação 0 e 6 horas. Através dos ensaios observou-se que a CEF amostra foi mais estável em condição fotolítica e apresentou maior degradação em condição oxidativa.

Os espectros com as degradações ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa estão sobrepostos e são apresentados na Figura 23.

Figura 23- Espectros do CEF amostra (30 µg/mL) submetido às degradações ácida (HCl 0,1 M), alcalina (NaOH 0,001 M), neutra (água) e oxidativa (H₂O₂ 0,05%) após 6 horas a 60 °C e fotolítica (luz UVC 254 nm) após 6 horas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). **A) Preto:** CEF amostra em tempo zero. **B) Azul:** fotolítica; **Vermelho:** neutra; **Verde claro:** ácida; **Roxo:** alcalina; **Verde escuro:** oxidativa; todas em 6 horas de degradação. (λ: 400-800 nm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.5. Precisão

Para a precisão realizada por repetibilidade intradia, a avaliação dos dados foi feita através do valor de DPR%. Os resultados foram obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, através da análise consecutiva de sete soluções aquosas de CEF SQR (30 µg/mL), apresentando o valor de DPR de 1,94%.

Os resultados das absorvâncias para a precisão interdias também foram avaliados através do valor de DPR%, a qual foi realizada através de três dias seguidos, com o preparo de uma nova solução-mãe por dia e a análise de sete soluções aquosas de CEF SQR com concentração de 30 µg/mL, resultando em um valor de DPR de 1,05%. No parâmetro da precisão entre analistas, as análises foram feitas por dois analistas, na qual foram preparadas sete soluções de CEF SQR (30 µg/mL) por cada um dos analistas, tendo como resultado um valor de DPR de 0,52%. A Tabela 30 apresenta os resultados das precisões do método espectrofotométrico na região do VIS.

Tabela 30- Precisão interdias e entre analistas do método analítico para análise de CEF por espectrofotometria na região do VIS

Dia	Interdias		Entre analistas		
	Absorvância ¹	DPR% ²	Analista	Absorvância ¹	DPR% ²
1	0,327		1	0,329	
2	0,328	1,05			0,52
3	0,321		2	0,331	

¹Média de sete determinações; ²DPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise estatística de variância (ANOVA) para as precisões interdias e entre analistas são apresentadas nas Tabelas 31 e 32, respectivamente. O cálculo foi realizado através dos valores das absorvâncias das sete soluções de CEF SQR preparadas para cada ensaio.

Tabela 31- Análise de variância (ANOVA) para precisão interdias do método de espectrofotometria no VIS

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	0,000162	2	0,000081	1,73926	3,55456
Dentro dos grupos	0,000838	18	4,65714E-05		
Total	0,001000	20			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 32- Análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas do método de espectrofotometria no VIS

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	2,06429E-05	1	2,06429E-05	0,85335	4,74723
Dentro dos grupos	2,90286E-04	12	2,41905E-05		
Total	3,10929E-04	13			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.6. Exatidão

Os resultados da exatidão por doseamentos realizados através de comparação de métodos são apresentados na Tabela 33. Os ensaios foram realizados pelas técnicas espectrofotométricas na região de absorção do ultravioleta e do VIS com concentrações pré-estabelecidas, resultando em valores de teores da amostra de CEF em pó liofilizado para solução injetável de 103,75% e 104,63%, respectivamente.

Tabela 33- Determinação da exatidão do método por espectrofotometria na região do VIS através da comparação de métodos

Doseamentos				
UV ^a	VIS ^a	Média	DP ^b	DPR% ^c
103,75%	104,63%	104,19%	0,6188	0,59

^aMédia de sete doseamentos; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Neste parâmetro, avaliou-se também os doseamentos pela análise estatística de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 34. Para a elaboração da análise estatística foi utilizado os valores dos sete teores realizados para cada método.

Tabela 34- Análise de variância (ANOVA) para a exatidão do método de espectrofotometria no VIS por comparação de métodos

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	2,042605	1	2,042605	2,30781	4,74723
Dentro dos grupos	10,620983	12	0,885082		
Total	12,663587	13			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.7.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com o intuito de verificar a sensibilidade do método de espectrofotometria na região do VIS. Os resultados para estes parâmetros foram de 2,02 µg/mL para LD e o 6,11 µg/mL para LQ.

6.1.2.7.8. Robustez

A robustez do método foi avaliada através das pequenas variações nos parâmetros de forma individual, não resultando em diferenças significativas para os valores do teor de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável. Na Tabela 35 estão dispostos os resultados dos teores com as variações e seus valores de DPR%, que ficaram abaixo de 0,73%.

Tabela 35- Teores apresentados para a determinação da robustez no método de espectrofotometria na região do VIS

Variável	Condições variadas	Cefepima ¹ (%)	Média (%)	DPR% ²
Equipamento	Shimadzu [®] (UV-1800)	104,79	104,36	0,60
	Shimadzu [®] (UVmini-1240)	103,92		
Fonte do solvente de diluição (SQR, amostra, Na ₂ CO ₃ 10% e Folin-Ciocalteu 1:10)	Água 1 ^a	104,80	104,26	0,73
	Água 2 ^b	103,73		
Comprimento de onda da leitura (nm)	742	104,32	103,80	0,44
	740	103,58		
	738	103,50		

¹Média de três determinações; ²DPR% = Desvio Padrão Relativo.

^aÁgua 1: Água purificada coletada no próprio laboratório da pesquisa;

^bÁgua 2: Água purificada coletada no laboratório de farmacotécnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.1.2.8. Discussão

O método por espectrofotometria na região do VIS foi miniaturizado e validado levando em consideração o método publicado por Patel e colaboradores (2011). Esta escolha foi feita, a fim de realizar várias otimizações no método, como a redução, tornando a escala de volume das soluções de CEF e reagentes utilizados de mL para µL, bem como, a significativa diminuição

do tempo de preparo das análises. Outra grande vantagem foi a capacidade de preparar e realizar inúmeros teste de uma só vez, ao contrário da utilização de um método convencional utilizando cubetas para o preparo das soluções.

Tendo em vista que este trabalho busca implantar análises voltadas à química verde e por ter desenvolvido e validado um método convencional de espectrofotometria na região do UV, fortaleceu-se a escolha pelo desenvolvimento do método no VIS de forma miniaturizada, uma vez que, com tecnologias ainda mais modernas, o crescimento de sistemas químico-analíticos miniaturizados vem aumentando muito com o passar dos anos (SENZEL, 1970; KRICKA, 1998; JANASEK; FRANZKE; MANZ, 2006; ALBENDÍN; LÓPEZ-LÓPEZ; PINTO, 2016).

Para os ensaios da seletividade do método, soluções de CEF amostra foram submetidas ao estudo de degradação forçada em condições de estresse ácido, alcalino, neutro e oxidativo, à temperatura de 60 °C e para a condição de estresse fotolítico foi realizada em temperatura ambiente através da incidência de luz ultravioleta (UVC 254 nm). Todas as condições foram analisadas em 740 nm e uma varredura na faixa de λ de 400-800 nm também foi realizada. No entanto, para os ensaios de degradação realizados no método proposto não ocorreram a interferência dos produtos de degradação na quantificação de CEF, mas para todas as condições avaliadas, decréscimos das absorvâncias no comprimento de onda com absorção máxima do pico de CEF foi observado, quando comparado ao pico do fármaco no tempo zero de análise. A solução de CEF foi mais estável frente à condição fotolítica, enquanto que para a hidrólise oxidativa foi observado o máximo de degradação.

Os resultados para a curva de Ringbom possibilitaram determinar a faixa de concentrações que se apresentaram linear, sendo selecionadas para a validação do método proposto, constituindo na faixa de 15 a 40 $\mu\text{g/mL}$. Assim, o resultado para a linearidade do método apresentou um valor de coeficiente de correlação igual a 0,99932 e para os resultados estatísticos realizados através da ANOVA, não houve desvios significativos de linearidade em um nível de 5% de significância, comprovando que o método de espectrofotometria de absorção na região do VIS é linear.

As análises de doseamento do método determinaram a quantidade de CEF presente na forma farmacêutica, resultando no teor de 104,26%, condizente com o limite estabelecido pelo compêndio oficial de 90,0% a 115,0% (USP 37, 2014).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através das curvas analíticas, demonstrando que a sensibilidade do método está de acordo, pois os valores

apresentados para LD e LQ foram de 2,02 e 6,11 µg/mL, respectivamente, estando as concentrações escolhidas na validação acima do LQ.

Para a precisão intradia o resultado do DPR obtido foi de 1,94%, avaliado através de sete soluções de CEF SQR em concentração de 30 µg/mL, sob condições idênticas e no mesmo dia. Na precisão interdias, os resultados foram obtidos através do valor da absorvância de sete soluções de CEF SQR com concentração de 30 µg/mL, realizadas em três dias consecutivos e nas mesmas condições de ensaio, apresentando valores médios de absorvância de 0,327, 0,328 e 0,321 e o valor de DPR de 1,05%, detalhados na Tabela 30. A última análise dentro do parâmetro da precisão foi a entre analistas, tendo os dados obtidos semelhante à da intradia, mas por analistas diferentes, resultando para o primeiro analista o valor médio da absorvância de 0,329 e para o segundo analista foi de 0,331, com valor de DPR de 0,52%. As análises de variância (ANOVA) realizadas para as precisões interdias e entre analistas, apresentaram os valores de F_{cal} de 1,73 e de F_{tab} de 3,55, para interdias, e F_{cal} de 0,85 e F_{tab} de 4,74, para entre analistas, no qual os valores de F_{cal} foram inferiores ao de F_{tab} , podendo dizer que o método é preciso, pois não apresentou diferenças significativas a um nível de 5%.

A exatidão do método foi avaliada por meio da análise comparativa dos métodos, pois pelo ensaio de recuperação os resultados não se apresentaram dentro do esperado, provavelmente por alguma incompatibilidade da matriz do reagente Folin-Ciocalteau fenólico, que é composto pela mistura de alguns reagentes, tais como, fosfomolibdato e fosfotungstato. Desta maneira, a comparação dos métodos, segundo a ICH (2005), pode ser utilizada em casos que não for possível a determinação pelo ensaio de recuperação. Assim, a comparação foi realizada através de uma das técnicas já validadas com método proposto. Neste caso, utilizou-se o método por espectrofotometria de UV, com concentrações idênticas presentes em ambos os métodos, apresentando valores de teor de CEF de 103,75% para o UV e de 104,63% para o VIS e com DPR de 0,59%. A exatidão também foi avaliada pela ANOVA, não apresentando diferenças significativas a um nível de 5%, obtendo-se o valor de F_{cal} de 2,30 inferior ao valor de F_{tab} de 4,74, os quais indicam que o método possui uma apropriada exatidão.

A robustez, realizada através de pequenas variações nos parâmetros do método, não demonstrou interferência na quantificação de CEF para o método espectrofotométrico no VIS, resultando em valores de DPR abaixo de 0,73%, declarando que o método é robusto.

Todos os parâmetros estabelecidos pelos órgãos oficiais para uma validação foram alcançados neste método miniaturizado para espectrofotometria com absorção na região do VIS (ICH, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 37, 2014). Assim, este método miniaturizado pode ser recomendado nas análises de rotina de controle de qualidade, pois

fornece benefícios aos operadores e ao meio ambiente, pelo baixo consumo, baixo custo e baixo resíduo tóxico gerado nas análises, além de ser simples, rápido, de fácil manuseio e seguro, para a quantificação de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.

6.2. Espectrofotometria na região do infravermelho

As análises espectrofotométricas que absorvem na região do infravermelho (IV) são amplamente empregadas na síntese, transformações orgânicas, na área de química de produtos naturais, para a identificação e caracterização de substâncias, sendo estas puras ou na presença de impurezas, em que são avaliados os picos dos grupos funcionais presentes na molécula através da absorção nas faixas características do espectro (LOPES; FASCIO, 2004). A grande parte das análises realizadas por este tipo de técnica está voltada a compostos orgânicos, apresentando nos espectros vários picos estreitos, quando comparados às substâncias inorgânicas, que resultam em picos largos (JEFFREY et al., 1992).

Nas bandas em que os grupos funcionais são absorvidos existe uma região denominada impressão digital, absorvida a 1400 a 900 cm^{-1} . Nesta região, são apresentadas as características próprias para cada molécula, assim é possível alcançar a identidade de um composto através de análise comparativa dos espectros da substância em análise com a substância padrão. Além dessas propriedades, podem ser visualizadas impurezas presentes na amostra em análise, devido ao surgimento de picos extras (HARRIS, 2001; LOPES; FASCIO, 2004).

O método de espectrofotometria de infravermelho teve embasamento nos trabalhos (MORENO; SALGADO, 2012b; TÓTOLI; SALGADO, 2012; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012a; KOGAWA; SALGADO, 2013; CORRÊA; SALGADO, 2014; KOGAWA et al., 2014; DE MARCO; SALGADO, 2016; KOGAWA; MELLO; SALGADO, 2016; NATORI; TÓTOLI; SALGADO, 2016; CONSORTTI; SALGADO, 2017; KOGAWA; SALGADO, 2017).

6.2.1. Material

Na espectrofotometria de infravermelho foram utilizados CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável descritas nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente.

As análises de espectrofotometria de infravermelho foram realizadas em equipamento Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21. O reagente utilizado para a confecção das pastilhas foi o brometo de potássio (KBr) das marcas “Synth[®]”

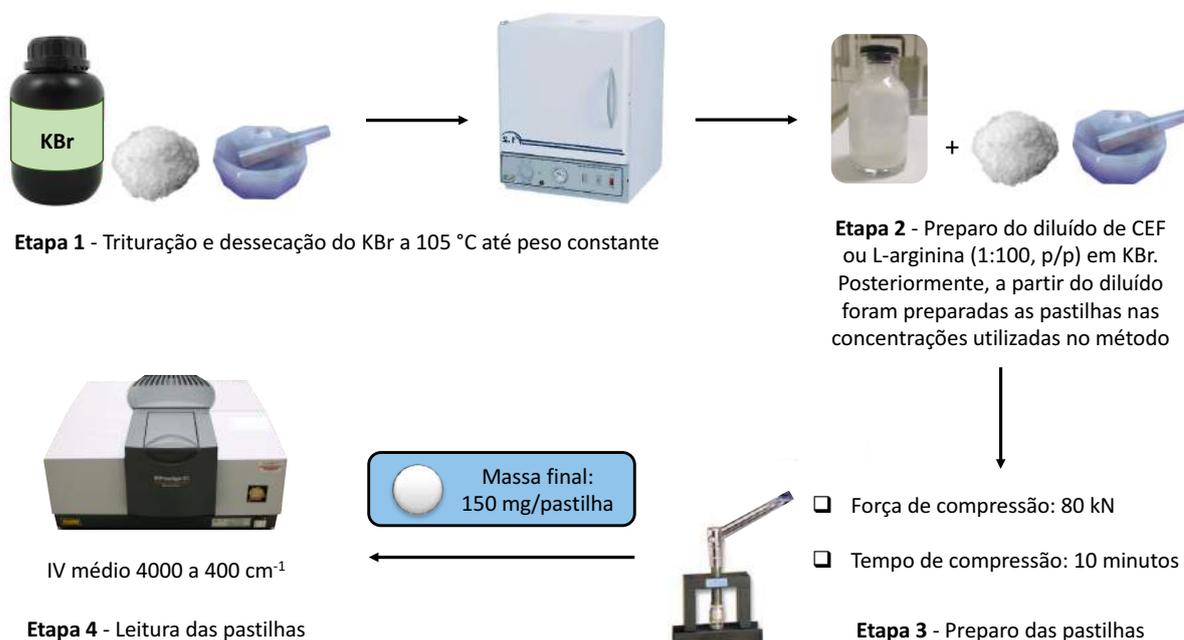
e “Dinâmica[®]”, ambos de grau analítico. Para confecção, as pastilhas foram prensadas utilizando prensador mecânico na força de compressão de 80 kN com tempo de compressão de 10 minutos. As análises foram obtidas na região espectral compreendida como médio, na faixa de absorção a 4000 a 400 cm^{-1} (com resolução de 2 cm^{-1}), através do *software* IR Solution[™].

No decorrer do experimento outros equipamentos também foram utilizados: balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil), dessecador de vidro e estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE (Fanem[®], São Paulo, Brasil).

6.2.2. Método

Antes do preparo, o KBr foi dessecado até peso constante em estufa a 105 °C. Em seguida, foram preparados os diluídos de CEF ou L-arginina (1:100, p/p) em KBr, sendo pesadas as massas a partir destes diluídos para a confecção das pastilhas nas concentrações utilizadas no método. Para o preparo das pastilhas foi realizada a compressão da mistura de CEF ou L-arginina com KBr em prensa manual com força de compressão de 80 kN e tempo de compressão de 10 minutos. Na sequência, as pastilhas foram lidas através de equipamento de infravermelho Shimadzu[®] com transformada de Fourier, na faixa de absorção a 4000 a 400 cm^{-1} . A Figura 24 representa as etapas realizadas para a análise de CEF pelo método de espectrofotometria de IV.

Figura 24- Etapas do método de espectrofotometria de absorção no infravermelho.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.2.1. Preparo da pastilha de CEF SQR

Para o preparo da pastilha, foi pesada a massa de 10,44 mg de CEF SQR (item 4.1), preparando uma diluição 1:100 (p/p) em KBr. As concentrações foram preparadas a partir desta diluição, pesando-se as massas de 20; 30; 40; 50 e 60 mg e transferindo-as para almofariz e pistilo de ágata, sendo trituradas e homogeneizadas com 130; 120; 110; 100 e 90 mg de KBr, respectivamente, totalizando ao final 150 mg cada pastilha e possuindo as concentrações finais equivalentes a 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg de CEF SQR por pastilha.

6.2.2.2. Preparo da pastilha de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

A massa de 17,25 mg de CEF amostra (item 4.2) foi pesada a partir do *pool* (vinte frascos-ampola) para preparar uma diluição 1:100 (p/p) em KBr. As concentrações foram preparadas a partir desta diluição, pesando-se as massas de 20; 30; 40; 50 e 60 mg e transferindo-as para almofariz e pistilo de ágata, sendo trituradas e homogeneizadas com 130; 120; 110; 100 e 90 mg de KBr, respectivamente, totalizando ao final 150 mg cada pastilha e possuindo as concentrações finais teóricas equivalentes a 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg de CEF SQR por pastilha.

6.2.2.3. Preparo da pastilha de L-arginina

Para a confecção da pastilha, foi pesada a massa de 7,25 mg de L-arginina e preparou-se uma diluição 1:100 (p/p) em KBr; na sequência foi pesada a massa de 40 mg desta diluição, a qual foi transferida para almofariz e pistilo de ágata, sendo triturada e homogeneizada com 110 mg de KBr, totalizando ao final 150 mg cada pastilha e possuindo a concentração final teórica equivalente a 0,29 mg de L-arginina por pastilha.

6.2.3. Obtenção da curva analítica

O desenvolvimento da curva analítica de CEF SQR pela técnica de espectrofotometria de infravermelho foi preparado utilizando pesagens da diluição (1:100), conforme descrita no item 6.2.2.1, sendo preparado análises em triplicata para cada concentração da curva. O branco da análise constituiu de KBr e todos ensaios de CEF foram quantificados na região espectral

absorvida a 1815-1745 cm^{-1} , atribuída ao grupo carbonila C=O do anel β -lactâmico, sendo avaliada sua altura em termos de absorvância.

6.2.4. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável

A determinação da concentração em que CEF estava presente nas amostras em pó liofilizado para solução injetável foi realizada pela Equação 3 e posteriormente pela Equação 4 para obter o teor percentual da amostra, citadas no item 6.1.1.5.

6.2.5. Validação do método de infravermelho

O método de espectrofotometria no IV foi validado adequadamente conforme preconiza a literatura FDA (1994), BRASIL (2003) e ICH (2005), avaliando-se os parâmetros: linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

6.2.5.1. Linearidade

Por meio da construção de uma curva analítica, a linearidade foi avaliada a partir da média de três curvas preparadas e analisadas em três dias diferentes, utilizando CEF SQR, conforme descrito no item 6.2.3. Por meio da obtenção das curvas, a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e para obtenção dos resultados estatísticos foi utilizada a análise de variância (ANOVA).

6.2.5.2. Seletividade

O parâmetro da seletividade do método de espectrofotometria no IV foi determinado com o intuito de verificar a capacidade do método detectar o ingrediente farmacêutico ativo (IFA) na presença de possíveis impurezas, provenientes da degradação acelerada realizada com a amostra de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Foram utilizadas pesagens de CEF amostra (item 6.2.2.2) na concentração de 0,4 mg/pastilha, sendo avaliadas em triplicatas após o pó da amostra de CEF ser submetido ao calor de 35 e 105 °C por meio de estufa de secagem. Os tempos de análise nestas condições foram de 0, 1 e 2 horas.

6.2.5.3. Precisão

A precisão desenvolvida para o método espectrofotométrico com absorção na região do IV foi avaliada de duas formas, por repetibilidade e precisão intermediária (ICH, 2005).

6.2.5.3.1. Repetibilidade (intradia)

Neste parâmetro de repetibilidade foram preparadas seis pastilhas de CEF SQR na concentração de 0,4 mg/pastilha no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. Após a comparação dos resultados obtidos foi avaliado o valor do desvio padrão relativo (DPR%).

6.2.5.3.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)

A precisão intermediária interdia foi determinada pela realização de seis pastilhas, analisadas sucessivamente de CEF SQR na concentração de 0,4 mg/pastilha, sendo preparadas diariamente para análise em três dias diferentes, empregando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista. Os resultados foram avaliados pelo DPR% e por análise de variância (ANOVA).

A precisão intermediária entre analistas também utilizou seis pastilhas de CEF SQR na concentração de 0,4 mg/pastilha, realizadas no mesmo dia, analisadas sucessivamente, mas por analistas diferentes, empregando as mesmas condições experimentais, método e equipamento. As absorvâncias foram avaliadas pelo DPR% e por análise de variância (ANOVA).

6.2.5.4. Exatidão

Neste parâmetro foi realizado o teste de recuperação para avaliar a exatidão do método, em que foram adicionadas quantidades conhecidas de CEF SQR a quantidades conhecidas de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável (ICH, 2005). O preparo das pastilhas para o teste de recuperação é apresentado na Tabela 36, ressaltando que o ensaio foi realizado em triplicata. A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada por meio da Equação 5, referida no item 6.1.1.6.3, conforme descrita na literatura (AOAC, 2002).

Tabela 36- Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método por espectrofotometria de infravermelho para determinação de CEF em pó liofilizado para solução injetável

	CEF amostra (mg) ^a	CEF SQR (mg) ^a	Concentração teórica final (mg/pastilha) ^b
Amostra	0,20	---	0,20
R1	0,20	0,12	0,32
R2	0,20	0,20	0,40
R3	0,20	0,28	0,48
Padrão	---	0,20	0,20

^aDiluição 1:100 (p/p), em KBr.^bQuantidade presente na pastilha com massa total de 150 mg.**Fonte:** Elaborada pelo autor.

6.2.5.5. Robustez

Nos ensaios de robustez foi avaliada a capacidade da resistência do método sob influência de pequenas modificações nas análises. Este parâmetro foi determinado através do planejamento fatorial 2³. A aplicação de delineamentos experimentais nas análises é muito importante para reduzir o erro experimental presente em todos tipos de ensaio. Assim sendo, foram realizados dois planejamentos fatoriais 2³, um para alterações em níveis inferiores (denominados -1) e outro para níveis superiores (denominados 1), em relação à condição normal do método (denominados 0). Cada planejamento foi realizado separadamente e em ambos experimentos foram avaliadas variações de três fatores nas análises, comparando ao nível 0, no qual corresponde aos parâmetros normais pré-estabelecidos no processo. Na Tabela 37 são descritos os fatores alterados realizados para os níveis -1 e 1.

Tabela 37- Condições alteradas do parâmetro da robustez do método por espectrofotometria de infravermelho realizadas através dos planejamentos fatoriais 2³ para os níveis superiores e inferiores

Fatores	(-1) ^a	(0) ^{a, b}	(1) ^b
A) Tempo de compressão (minutos)	9	10	11
B) Força de compressão (kN)	74	80	86
C) Marca do brometo de potássio (KBr)	Dinâmica [®]	Synth [®]	Dinâmica [®]

^a(-1): Planejamento fatorial 2³ para o nível inferior;^b(1): Planejamento fatorial 2³ para o nível superior.**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Após definir os parâmetros a serem avaliados, foram elaboradas as matrizes de planejamento dos ensaios para o nível inferior e para o nível superior, apresentadas nas Tabelas 38 e 39, respectivamente. As análises foram realizadas em ordem aleatória e em duplicata para cada um dos 8 ensaios, totalizando ao final 16 pastilhas por planejamento. A concentração de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável utilizada nos ensaios foi de 0,4 mg/pastilha. O planejamento foi realizado conforme descrito na literatura (MONTGOMERY, 2009; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Tabela 38- Matriz de planejamento de ensaios para as variações realizadas com o nível inferior (-1) do parâmetro de robustez pelo método de espectrofotometria de infravermelho

Ensaio	Fatores		
	A	B	C
1	0	0	0
2	-1	0	0
3	0	-1	0
4	-1	-1	0
5	0	0	-1
6	-1	0	-1
7	0	-1	-1
8	-1	-1	-1

A-C: fatores selecionados; 1-8: número de experimentos;
0 = Nível normal; -1 = Nível inferior.

Fonte: Adaptada de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010.

Tabela 39- Matriz de planejamento de ensaios para as variações realizadas com o nível superior (1) do parâmetro de robustez pelo método de espectrofotometria de infravermelho

Ensaio	Fatores		
	A	B	C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0	1	0
4	1	1	0
5	0	0	1
6	1	0	1
7	0	1	1
8	1	1	1

A-C: fatores selecionados; 1-8: número de experimentos;
0 = Nível normal; 1 = Nível superior.

Fonte: Adaptada de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010.

Os efeitos de referência para o parâmetro da robustez do método, através do planejamento fatorial 2^3 , foram calculados pela Equação 8, que exemplifica o cálculo para os ensaios 1 e 2, sendo calculados da mesma forma para os demais ensaios.

$$ef = \sqrt{\frac{(N1 - 1) \cdot S1^2 + (N2 - 1) \cdot S2^2}{(N1 - 1) + (N2 - 1)}}$$

Equação 8

$$ef_{referência} = 2,3060 \cdot \sqrt{ef}$$

Em que:

$N1$ = Número de replicata do ensaio 1 (2, 3, 4, ...)

$S1^2$ = Desvio padrão do ensaio 1 elevado ao quadrado (2, 3, 4, ...)

2,3060 = Valor de t_{tab} (α 0,05; GL: 8)

\sqrt{ef} = Raiz quadrada do resultado obtido em ef

Para encontrar o valor do efeito de referência no qual são comparados os demais efeitos resultantes dos coeficientes de contraste, foi necessário utilizar o valor de t_{tab} reportado na literatura (CALLEGARI-JACQUES, 2009), cruzando as informações da tabela da distribuição t de *Student* (teste bilateral de 0,05 de significância com o número de graus de liberdade (GL), que são 8 ensaios), obteve-se o valor de 2,3060 para t_{tab} , que posteriormente foi multiplicado com o valor resultante da raiz quadrada do efeito, alcançando assim o valor de referência do efeito.

Os resultados obtidos para os fatores alterados foram avaliados pela análise estatística de variância (ANOVA), realizada através do *software* ASSISTAT[®] versão 7.7 Beta, e por meio dos coeficientes de contraste, sendo estes dados posteriormente utilizados para a confecção do gráfico de Pareto. A Tabela 40 apresenta como foi feita a elaboração dos coeficientes de contraste (MONTGOMERY, 2009; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Tabela 40- Elaboração dos coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2³

Média dos Ensaio	Efeito Fatorial						
	A	B	C	AB ^a	AC ^a	BC ^a	ABC ^b
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

^aAB, AC e BC são efeitos de interação de 2^a ordem;

^bABC é o efeito de interação de 3^a ordem.

Fonte: Adaptada de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010.

As interações foram realizadas não só entre os três principais efeitos **A** (tempo de compressão - minutos), **B** (força de compressão - kN) e **C** (marca do brometo de potássio - KBr), mas as três interações de dois fatores **AB**, **AC** e **BC**, e, por fim, o efeito de interação entre três fatores **ABC**. Lembrando que os sinais (+) e (-) aqui utilizados, são apenas sinais representativos para se realizarem as comparações entre as interações e alcançarem os valores dos efeitos, não influenciando nos valores resultantes dos experimentos. Assim sendo, os efeitos médios foram calculados para cada coluna da Tabela 40 sendo determinados pela Equação 9, no qual exemplifica para a coluna **A**, porém para as demais interações **B**, **C**, **AB**, ..., foram calculados da mesma forma. O efeito médio de cada variável é a diferença apresentada entre a subtração da soma dos valores presentes nos sinais (+) com as dos sinais (-).

$$A(+) = \sum \bar{y}_2 (+) + \bar{y}_4 (+) + \bar{y}_6 (+) + \bar{y}_8 (+)$$

$$A(-) = \sum \bar{y}_1 (-) + \bar{y}_3 (-) + \bar{y}_5 (-) + \bar{y}_7 (-)$$

Equação 9

$$ef_{m\u00e9dio} \text{ de } A = \sum_{A(-)}^{A(+)} -$$

Em que:

$A(+)$ = Soma de todos os valores presentes nos sinais (+)

$A(-)$ = Soma de todos os valores presentes nos sinais (-)

(+) = Sinal representativo para realizar as interações

(-) = Sinal representativo para realizar as interações

\bar{y} = Média das absorvâncias obtidas de cada ensaio realizado (1, 2, 3, 4, ...)

Os resultados apresentados para os efeitos médios deverão ser menores que o valor resultante do efeito de referência obtido pela Equação 8, para se inferir que os efeitos obtidos com as variações dos parâmetros não foram significativos e, portanto, o método é robusto para todos os fatores selecionados.

6.2.5.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

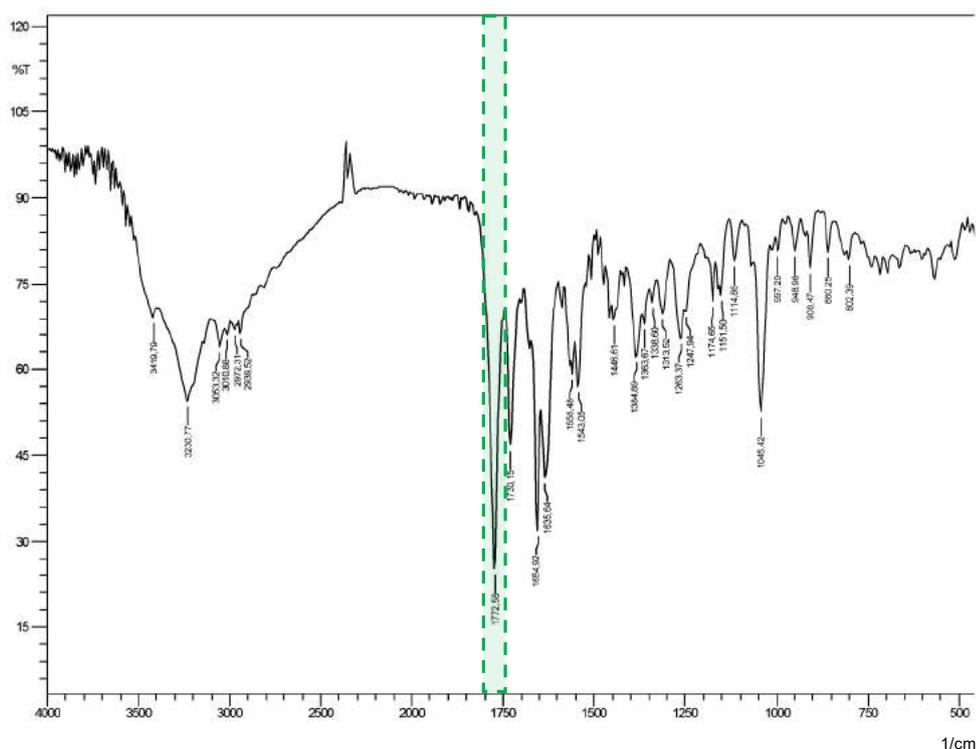
Nestes parâmetros foram avaliados os limites de detecção (LD) e os de quantificação (LQ) do método, sendo estudos baseados no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica (ICH, 2005). Após três análises das pastilhas de CEF SQR, atingindo toda faixa de trabalho, os dados foram calculados conforme as Equações 6 e 7 descritas no item 6.1.1.6.5.

6.2.6. Resultados

As faixas de absorção nas regiões espectrais características do espectro de IV de CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado de solução injetável foram discutidas na análise qualitativa deste trabalho, descrita no item 5.7.3.

A região espectral selecionada para quantificar CEF nas análises de espectrofotometria de IV é apresentada na Figura 25, sendo a faixa absorvida a $1815\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao grupo carbonila C=O do anel β -lactâmico, sendo avaliada sua altura em termos de absorvância.

Figura 25- Espectro de absorção obtido por espectrofotometria de infravermelho de CEF SQR 0,4 mg em pastilha de KBr com a região espectral selecionada para quantificação de CEF absorvida a $1815\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao grupo carbonila C=O do anel β -lactâmico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.6.1. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável

Neste estudo foi obtido o teor de CEF amostra através dos cálculos da média de três análises realizadas em triplicata das pastilhas de CEF na concentração de 0,4 mg/pastilha de KBr e avaliou-se também o DPR% destas análises. O valor do teor de CEF amostra encontrado para o método de espectrofotometria de IV foi de 103,86%, com DPR de 0,61%, apresentado na Tabela 41.

Tabela 41- Doseamento obtido por espectrofotometria de infravermelho desenvolvido para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Doseamento					
Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Média	DP ^b	DPR% ^c
104,55%	103,29%	103,75%	103,86%	0,63760	0,61

^aMédia de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.6.2. Linearidade

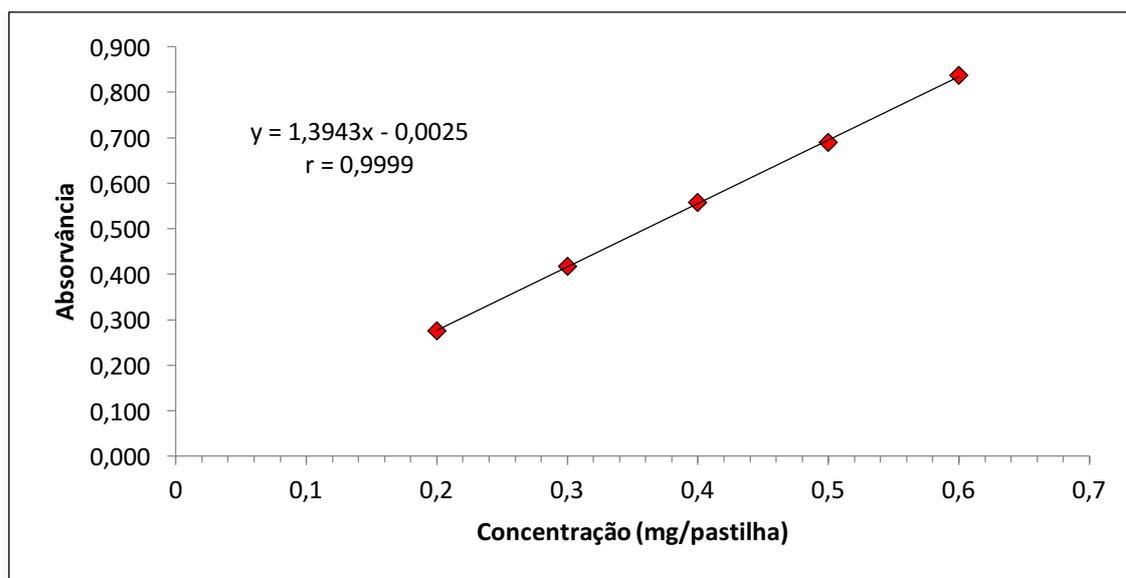
Na linearidade do método espectrofotométrico de IV foi utilizado as absorvâncias obtidas das concentrações das pastilhas de CEF SQR preparadas em KBr, apresentadas na Tabela 42. Deste modo, foi plotado um gráfico referente à curva analítica utilizando o valor médio de cada concentração das três curvas analíticas feitas neste parâmetro. O gráfico da curva analítica está representado na Figura 26.

Tabela 42- Valores das absorvâncias referentes à análise de CEF SQR para a construção da curva analítica do método de espectrofotometria de infravermelho

Concentração (mg/pastilha)	Absorvância ^a	Absorvância média ± DP ^b	DPR% ^c
0,2	0,2880	0,2757 ± 0,0108	3,91
	0,2710		
	0,2680		
0,3	0,4270	0,4170 ± 0,0100	2,40
	0,4170		
	0,4070		
0,4	0,5590	0,5573 ± 0,0047	0,85
	0,5610		
	0,5520		
0,5	0,6870	0,6900 ± 0,0030	0,43
	0,6900		
	0,6930		
0,6	0,8480	0,8363 ± 0,0169	2,02
	0,8440		
	0,8170		

^aValor médio de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26- Curva analítica do método de espectrofotometria de infravermelho para análise de CEF.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados estatísticos da curva analítica elaborada para análise de CEF por espectrofotometria de IV obtidos pela análise de variância (ANOVA) são apresentados na Tabela 43.

Tabela 43- Análise de variância dos valores de absorvâncias determinados utilizando o método de espectrofotometria de infravermelho na obtenção da curva analítica de CEF SQR

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F_{cal}	F_{tab}
Entre concentrações	4	5,8335E-01	1,4583723E-01	1370,65*	3,11
Regressão Linear	1	5,8325E-01	5,8324960E-01	5481,67*	4,75
Desvio da Linearidade	3	9,9333E-05	3,3111000E-05	0,31	3,26
Dentro (resíduo)	10	1,0640E-03	1,0640000E-04	-	-
Total	14	5,8441E-01	-	-	-

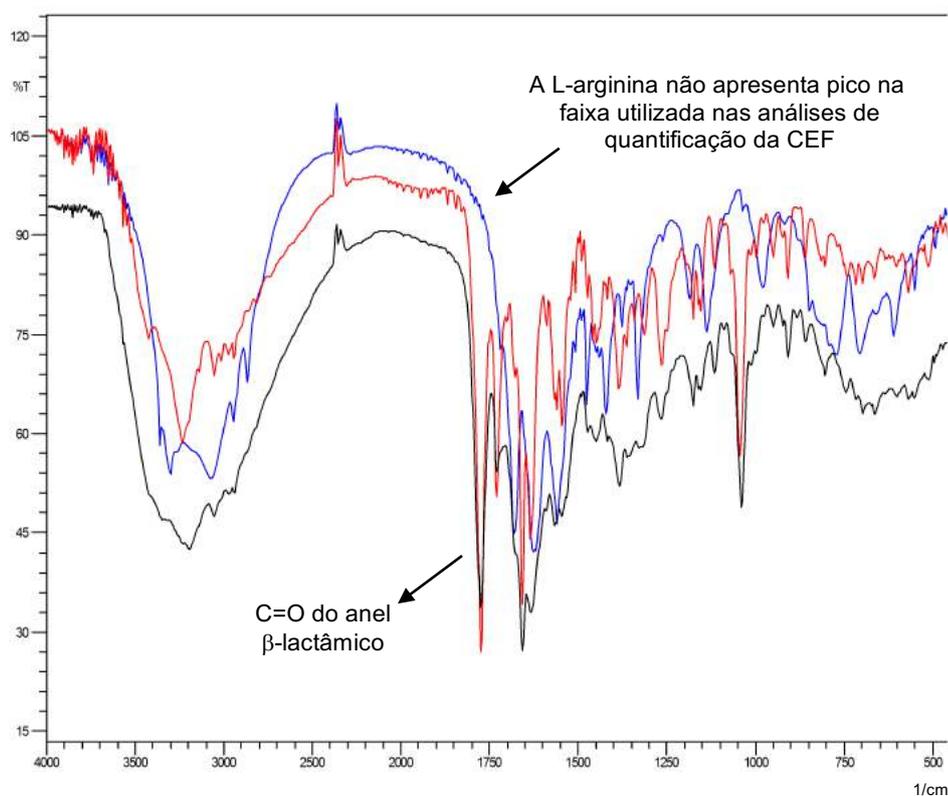
*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.6.3. Seletividade

Na seletividade do método por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho foi verificada a estabilidade de CEF utilizando o estudo de degradação acelerada da amostra de CEF em pó liofilizado para solução injetável e também foi avaliado através da sobreposição dos espectros de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina observando se o excipiente interfere nas análises. Na Figura 27 é apresentada a sobreposição dos espectros de CEF SQR, CEF amostra e L-arginina, evidenciando que o excipiente não interferiu nas análises quantitativas, uma vez que não possui absorção na faixa da carbonila C=O utilizada para quantificação de CEF nos ensaios de infravermelho.

Figura 27- Avaliação da seletividade através da sobreposição dos espectros de absorção obtidos na região do infravermelho em pastilhas de KBr de CEF SQR 0,4 mg/pastilha (vermelho), CEF amostra 0,4 mg/pastilha (preto) e L-arginina 0,29 mg/pastilha (azul).

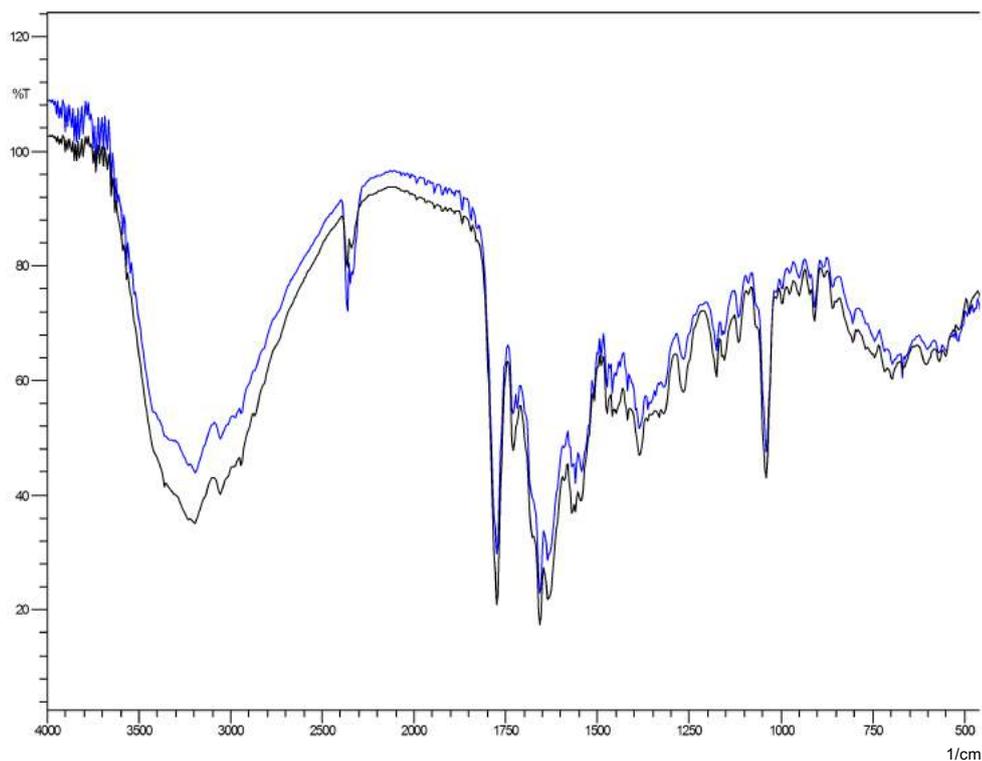


Fonte: Elaborada pelo autor.

A outra avaliação foi feita expondo a amostra de CEF ao calor de 35 e 105 °C nos tempos 0, 1 e 2 horas de análise. Para as duas condições avaliadas ocorreu decréscimo do pico da carbonila C=O do anel β -lactâmico da molécula de CEF, o qual foi mensurado e apresentou porcentagens de degradação para a condição em 35 °C de 7,29% (1 hora) e 14,47% (2 horas), e para a condição em 105 °C obteve-se os valores de 14,92% (1 hora) e 27,08% (2 horas), quando comparado os tempos de degradação de 1 e 2 horas ao tempo 0 hora da análise. Outras bandas também diminuíram após a exposição ao calor, como a do estiramento de N-H e O-H (carboxílico), tais como, as dos picos da carbonila C=O do grupo carboxílico e da amida e do C=C do anel β -lactâmico.

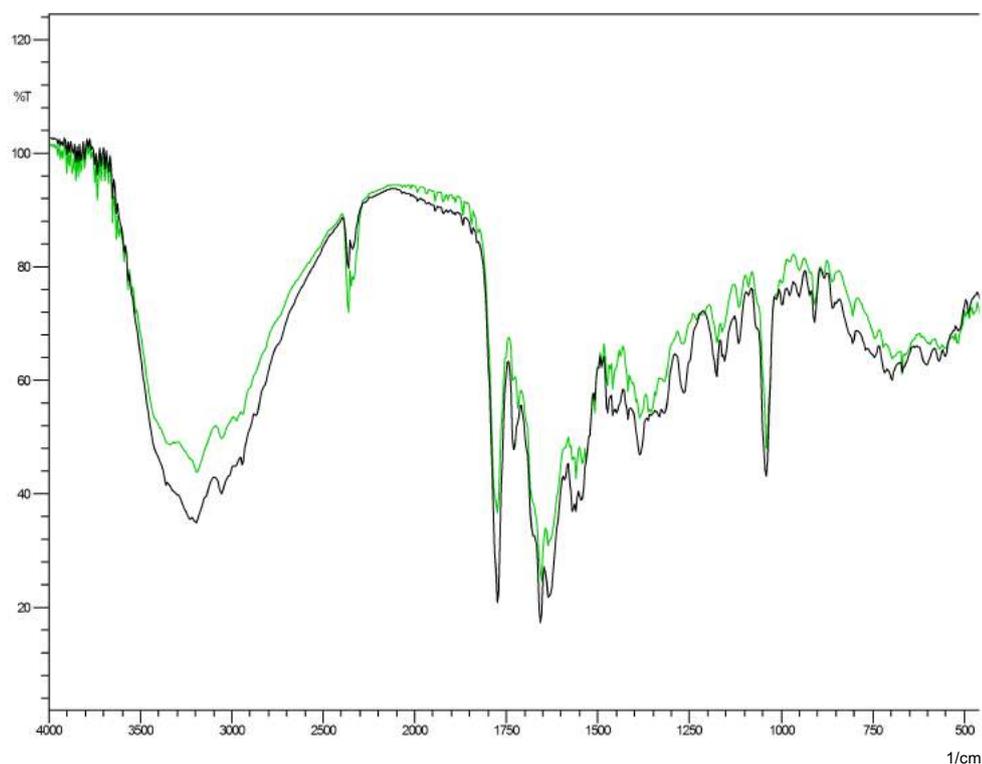
Os espectros das amostras submetidas às temperaturas de 35 e 105 °C são apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente, sendo possível visualizar a diminuição de alguns picos frente ao tempo zero.

Figura 28- Espectros de CEF amostra (0,4 mg/pastilha) submetida à temperatura de 35 °C após 2 horas de análise. A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 2 horas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29- Espectros de CEF amostra (0,4 mg/pastilha) submetida à temperatura de 105 °C após 2 horas de análise. A) Preto: tempo zero; B) Verde: tempo 2 horas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.6.4. Precisão

A precisão do método de espectrofotometria de IV realizada por repetibilidade intradia teve seus resultados avaliados através do valor de DPR%. Os dados coletados foram analisados e resultou no valor de DPR de 1,15%.

Para as precisões interdias e entre analistas, os resultados também foram avaliados através do valor do desvio padrão relativo, apresentando para a precisão interdias o valor do DPR de 1,23% e para a precisão entre analistas o valor de 2,65%. Na Tabela 44 estão descritos os valores obtidos para a precisão interdias e entre analistas avaliadas no método.

Tabela 44- Precisão interdias e entre analistas do método de espectrofotometria de infravermelho para análise de CEF

Dia	Interdias		Entre analistas		
	Absorvância ¹	DPR% ²	Analista	Absorvância ¹	DPR% ²
1	0,551		1	0,571	
2	0,548	1,23			2,65
3	0,561		2	0,593	

¹Média de seis determinações; ²DPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As precisões interdias e entre analistas foram avaliadas também pela análise de variância (ANOVA), sendo seus resultados apresentados nas Tabelas 45 e 46, respectivamente. O cálculo foi realizado pelos valores das absorvâncias de seis pastilhas de CEF SQR preparadas para cada ensaio.

Tabela 45- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias do método de espectrofotometria de infravermelho de CEF

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	0,000547111	2	0,000273556	1,59301	3,682320
Dentro dos grupos	0,002575833	15	0,000171722		
Total	0,003122944	17			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 46- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas do método de espectrofotometria de infravermelho de CEF

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Entre grupos	0,001430083	1	0,001430083	2,60070	4,964603
Dentro dos grupos	0,005498833	10	0,000549883		
Total	0,006928917	11			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.6.5. Exatidão

Testes de recuperação foram utilizados para a determinação do parâmetro da exatidão do método, em que três concentrações na faixa pré-estabelecida foram analisadas e são apresentadas na Tabela 47, resultando no valor correspondente à porcentagem média de recuperação de 100,83%.

Tabela 47- Determinação da exatidão do método de espectrofotometria de infravermelho para análise de CEF

	Concentração teórica de CEF (mg/pastilha)	Concentração encontrada de CEF ^{a,b} (mg/pastilha)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR% ^c
R1	0,32	0,324	101,29		
R2	0,40	0,405	101,27	100,83	0,77
R3	0,48	0,479	99,93		

^aMédia de três determinações;

^bQuantidade presente na pastilha com massa total de 150 mg;

^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.6.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A sensibilidade do método foi obtida através dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), resultando em valores de 0,006 mg/pastilha para LD e o 0,019 mg/pastilha para LQ, sendo satisfatória para análise por apresentar valores das concentrações inferiores das utilizadas no método.

6.2.6.7. Robustez

Os resultados médios das absorvâncias obtidas nos ensaios com as pequenas modificações realizadas no método foram utilizados para calcular os efeitos médios através da tabela de coeficientes de contraste. Os planejamentos fatoriais 2^3 para nível inferior (-1) e para nível superior (1), bem como, os cálculos foram realizados separadamente. A Tabela 48 apresenta os valores dos efeitos médios calculados para cada planejamento realizado na avaliação do parâmetro de robustez.

Tabela 48- Valores dos efeitos obtidos por meio dos coeficientes de contraste dos planejamentos fatoriais 2^3 dos níveis inferiores e superiores utilizando as médias das absorvâncias dos ensaios

Fator	(-1) ^a	$\Sigma \bar{y}(+) - \Sigma \bar{y}(-)^{f,g,h}$				(1) ^b	$\Sigma \bar{y}(+) - \Sigma \bar{y}(-)^{f,g,h}$			
A ^c	9 min	2,338 - 2,308 = 0,0300				11 min	2,289 - 2,317 = -0,0280			
B ^c	74 kN	2,319 - 2,326 = -0,0070				86 kN	2,304 - 2,302 = 0,0020			
C ^c	Dinâmica [®]	2,315 - 2,331 = -0,0160				Dinâmica [®]	2,306 - 2,301 = 0,0050			
AB ^d	---	2,332 - 2,314 = 0,0180				---	2,307 - 2,299 = 0,0080			
AC ^d	---	2,323 - 2,322 = 0,0010				---	2,317 - 2,290 = 0,0270			
BC ^d	---	2,327 - 2,319 = 0,0080				---	2,294 - 2,313 = -0,0190			
ABC ^e	---	2,337 - 2,308 = 0,0290				---	2,307 - 2,300 = 0,0070			
(-1) ^a	$\bar{y} \text{ Abs}^g$	0,580	0,590	0,579	0,583	0,581	0,577	0,569	0,589	
(1) ^b	$\bar{y} \text{ Abs}^g$	0,580	0,566	0,585	0,571	0,581	0,577	0,573	0,576	
Ensaio		1	2	3	4	5	6	7	8	

^a(-1): Planejamento fatorial 2^3 para o nível inferior;

^b(1): Planejamento fatorial 2^3 para o nível superior;

^cA) Tempo de compressão (minutos); B) Força de compressão (kN); C) Marca do brometo de potássio (KBr);

^dAB, AC e BC são efeitos de interação de 2^a ordem;

^eABC é o efeito de interação de 3^a ordem;

^fSoma das médias das absorvâncias presentes nos sinais (+) – Soma das médias das absorvâncias presentes nos sinais (-);

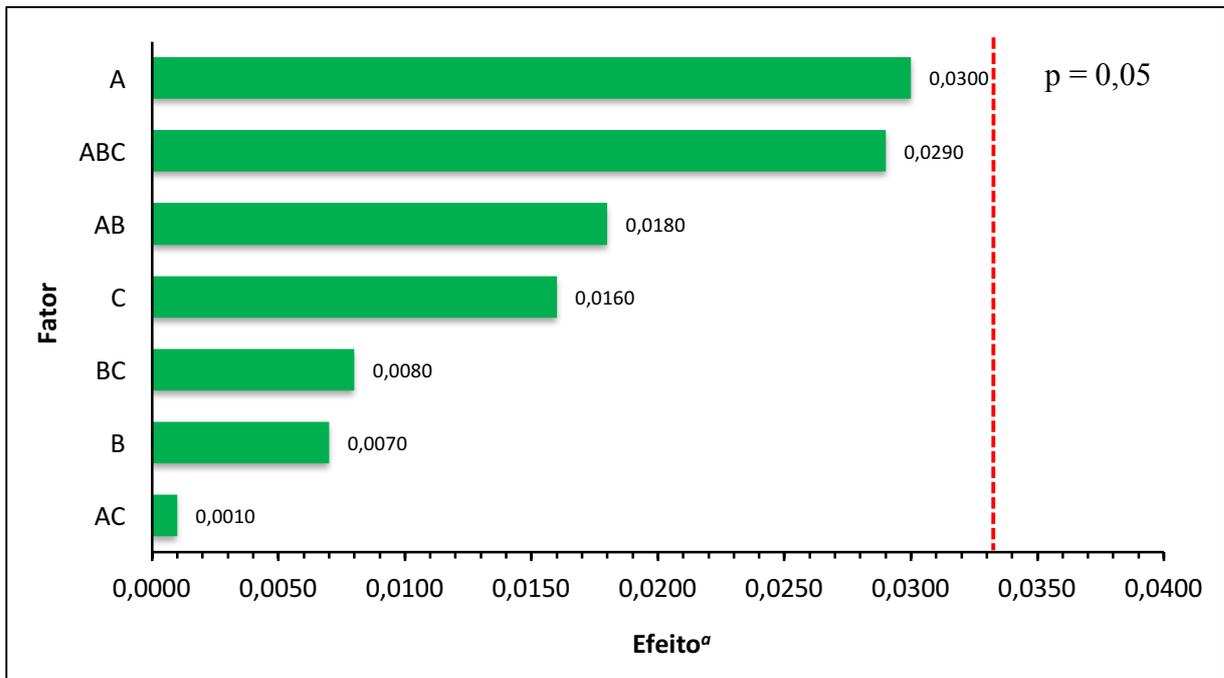
^g $\bar{y} \text{ Abs}$: Média das absorvâncias apresentadas para cada ensaio;

^hCrítérios de referência calculados: 0,0331 para o teste -1 e 0,0323 para o teste 1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio do cálculo da Equação 8, foram obtidos os valores empregados como critérios de referência dos efeitos, sendo de 0,0331 para o planejamento 2^3 -1 e de 0,0323 para o planejamento 2^3 1. Posteriormente, os valores obtidos para os efeitos resultantes dos ensaios alterados foram comparados aos valores de referência através dos gráficos de Pareto apresentados nas Figuras 30 e 31, para os planejamentos -1 e 1, respectivamente. Todos os resultados obtidos que estavam negativos foram convertidos para positivo (ex. planejamento -1, fator B = -0,0070, após conversão ficou B = 0,0070), para uma melhor disposição e avaliação no gráfico de Pareto, apresentando os dados somente em uma escala.

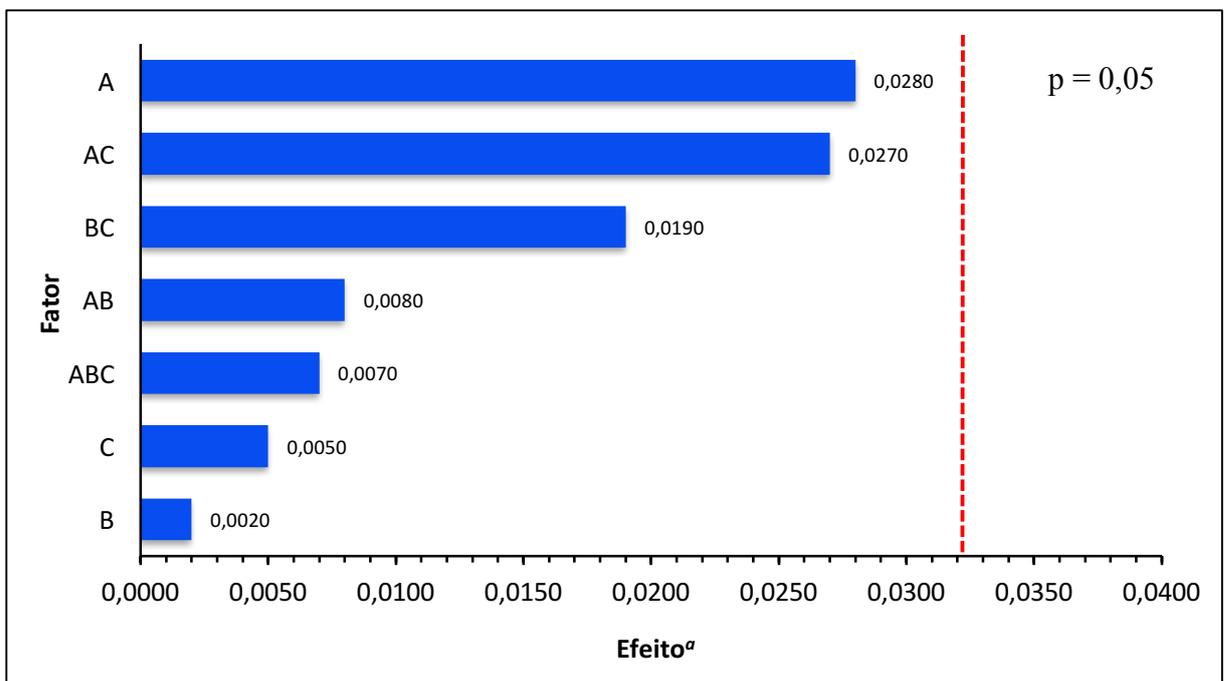
Figura 30- Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 do nível inferior comparando os efeitos calculados das variáveis e suas interações aos critérios de referência na avaliação do parâmetro de robustez do método por espectrofotometria de infravermelho para determinação de CEF.



^aCritério de referência calculado para o teste -1: 0,0331.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31- Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 do nível superior comparando os efeitos calculados das variáveis e suas interações aos critérios de referência na avaliação do parâmetro de robustez do método por espectrofotometria de infravermelho para determinação de CEF.



^aCritério de referência calculado para o teste 1: 0,0323.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As absorvâncias encontradas nos ensaios também foram avaliadas estatisticamente pela análise de variância, realizada através do *software* ASSISTAT[®] versão 7.7 Beta, sendo apresentada na Tabela 49 para o planejamento -1 e na Tabela 50 para o planejamento 1, utilizando um nível de significância de 5%. Desta forma, o parâmetro da robustez do método ficou comprovado, uma vez que os valores de efeitos não foram significativos para análise.

Tabela 49- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para robustez do método de espectrofotometria de infravermelho do planejamento 2³ realizado para o nível inferior

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F_{cal}	F_{tab}	valor-p*
Fator A	1	0,00023	0,00023	1,0889	5,3177	0,3271
Fator B	1	0,00001	0,00001	0,0593	5,3177	0,8136
Fator C	1	0,00006	0,00006	0,3097	5,3177	0,5485
Interação fator A e B	1	0,00008	0,00008	0,3920	5,3177	0,5929
Interação fator A e C	1	0,00000	0,00000	0,0012	5,3177	0,9730
Interação fator B e C	1	0,00002	0,00002	0,0774	5,3177	0,7877
Interação fator A, B e C	1	0,00021	0,00021	1,0175	5,3177	0,3425
Tratamentos	7	0,00061	0,00009	0,4209	5,3177	0,8644
Resíduo	8	0,00165	0,00021	-	3,5005	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 50- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para robustez do método de espectrofotometria de infravermelho do planejamento 2³ realizado para o nível superior

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F_{cal}	F_{tab}	valor-p*
Fator A	1	0,00020	0,00020	0,9968	5,3177	0,3472
Fator B	1	0,00000	0,00000	0,0051	5,3177	0,9447
Fator C	1	0,00001	0,00001	0,0318	5,3177	0,7825
Interação fator A e B	1	0,00002	0,00002	0,0814	5,3177	0,8628
Interação fator A e C	1	0,00018	0,00018	0,9269	5,3177	0,3637
Interação fator B e C	1	0,00009	0,00009	0,4590	5,3177	0,5171
Interação fator A, B e C	1	0,00001	0,00001	0,0623	5,3177	0,8090
Tratamentos	7	0,00050	0,00007	0,3662	5,3177	0,8984
Resíduo	8	0,00157	0,00020	-	3,5005	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.7. Discussão

Ao contrário de métodos que empregam solventes orgânicos nas análises, a prospecção por métodos analíticos que não se utilizam estes tipos de solventes, pode ser a alternativa na redução dos impactos gerados por estas atividades ao meio ambiente, através de modificações

para redução, prevenção ou eliminação da geração dos resíduos químicos (NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006; TÓTOLI; SALGADO, 2012; CORRÊA; SALGADO, 2014; DE MARCO; SALGADO, 2016; KOGAWA; MELLO; SALGADO, 2016; NATORI; TÓTOLI; SALGADO, 2016; CONSORTTI; SALGADO, 2017; KOGAWA; SALGADO, 2017). É neste contexto que foi desenvolvido e validado o método para a análise de CEF por espectrofotometria de IV.

Testes preliminares em várias concentrações foram desenvolvidos para avaliar as melhores condições de análise da CEF, bem como, a faixa a ser utilizada para quantificação do fármaco. As pastilhas foram confeccionadas empregando prensador mecânico por compressão em aparato de aço inoxidável com características próprias para o preparo da pastilha, empregando força de compressão de 80 kN e mantendo o tempo de compressão em 10 minutos. Na sequência, ficou definido que a quantificação de CEF deveria ser realizada na faixa do grupo carbonila C=O do anel β -lactâmico absorvida a 1815-1745 cm^{-1} , pelo fato de não haver interferência com o adjuvante da preparação farmacêutica e também por apresentar um pico intenso nos espectros.

As concentrações selecionadas para serem utilizadas como faixa de trabalho no método foram 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg/pastilha de KBr (preparadas a partir da diluição 1:100 p/p do fármaco em KBr), sendo definidas por terem apresentado correlação linear nas análises, as quais resultaram em um coeficiente de correlação igual a 0,9999. Os dados da curva analítica foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), demonstrando que não ocorreram desvios significativos para o teste de linearidade utilizando nível de significância de 5%, assegurando que o método de espectrofotometria de IV é linear.

O limite do teor de CEF para produtos injetáveis estabelecido pela USP 37 (2014) é de 90,0% a 115,0%, deste modo, através dos ensaios de doseamento foi possível determinar a quantidade de CEF presente na preparação farmacêutica, resultando no valor do teor de 103,86% com DPR de 0,61%, estando dentro do limite estabelecido.

Na seletividade do método foi evidenciado que, após exposição do pó da CEF amostra ao calor de 35 e 105 °C, ocorreram perdas das intensidades absorvidas em grupos característicos da molécula, como na faixa das carbonilas C=O (anel β -lactâmico, carboxílico e amida), N-H, O-H (carboxílico) e nos picos referentes ao grupo C=C do anel β -lactâmico. Em 2 horas de análise, a porcentagem de degradação da molécula foi relativamente alta, destacando-se a importância de estudos desta natureza já que o conhecimento das perdas apresentadas na molécula pode auxiliar na elucidação de compostos, como também em melhorias ou

implementação de novas formulações. Ainda neste contexto, o método de espectrofotometria de IV foi seletivo, pois o adjuvante L-arginina não interferiu na quantificação de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), avaliados por meio das curvas analíticas, resultaram nos valores de 0,006 e 0,019 mg/pastilha, respectivamente, demonstrando que o método é sensível, pois as concentrações utilizadas na validação foram 0,2 a 0,6 mg/pastilha.

Os ensaios realizados para a precisão por repetibilidade (intradia) do método apresentou um valor de DPR igual a 1,15%. As demais precisões avaliadas interdias e entre analistas, resultaram em valores de DPR de 1,23% e 2,65%, respectivamente, descritas na Tabela 44. Para as análises estatísticas das precisões interdias e entre analistas através da ANOVA, os valores apresentados foram de F_{cal} 1,59 e F_{tab} 3,68 para interdias e de F_{cal} 2,60 e F_{tab} 4,96 para entre analistas, onde para ambos os valores de F_{cal} foram menores que o de F_{tab} , demonstrando que o método é preciso, uma vez que não apresentou diferenças significativas a um nível de significância de 5%.

A exatidão realizada para o método de espectrofotometria de IV, avaliada pela técnica de adição nos testes de recuperação, foi comprovada por apresentar o valor médio recuperado de 100,83% com DPR de 0,77%, estando dentro da faixa preconizada de 98% a 102% (BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 37, 2014).

O parâmetro da robustez do método foi avaliado por meio dos planejamentos fatoriais 2^3 realizados para o nível inferior (-1) e para o superior (1), pela interação das absorvâncias obtidas nos fatores isolados e pela interação entre cada fator. Os resultados dos efeitos médios calculados para cada fator ficaram abaixo dos valores de referência calculados para ambos planejamentos -1 e 1, ou seja, não apresentaram diferença significativa utilizando $p = 0,05$, conforme apresentado nos gráficos de Pareto, demonstrados nas Figuras 30 e 31, respectivamente. O valor de efeito obtido para cada fator foi analisado também pela análise de variância, utilizando nível de significância de 5%, para todos os fatores associados e para aqueles realizados isoladamente o resultado apresentou valor de F_{cal} menor que F_{tab} , evidenciando que as modificações aplicadas para as análises de robustez não interferiram significativamente nos ensaios. Assim sendo, foi possível comprovar a robustez do método de espectrofotometria de IV proposto para a determinação de CEF.

Em análise nos bancos de dados foram reportados poucos artigos para análise da CEF por espectrofotometria de IV (ZHANG; FENG; HU, 2008; EL-RABBAT et al., 2012; FERDOUS et al., 2015). Foi encontrado na literatura que somente um artigo empregou análises

para quantificação de CEF por espectrofotometria de IV (BUGAY; NEWMAN; FINDLAY, 1996). Porém, a análise utilizada por estes autores foi voltada à caracterização de duas formas de CEF mono e diidratada em comparação com a técnica de difração de raios X. Os demais artigos foram somente para a avaliação qualitativa do fármaco.

Neste estudo foi desenvolvido e validado o método por espectrofotometria de absorção na região médio do IV, apresentando resultados relevantes e cumprindo todos os parâmetros determinados pelos órgãos oficiais (ICH, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 37, 2014). O método desenvolvido para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável por espectrofotometria de IV pode ser incorporado para a análise do fármaco no controle de qualidade industrial, visando sempre a redução na geração de resíduos, a fim de minimizar os impactos ambientais, bem como, agilidade nos ensaios e custo acessível.

6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE se destaca por apresentar algumas características importantes para a análise, dentre elas podemos citar a rápida velocidade na separação dos compostos, o grande poder de resolução, capacidade de quantificação exata, permitindo ainda análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna, além de possibilitar a utilização de várias fases móveis e estacionárias (JEFFERY et al., 1992).

O desenvolvimento do método de CLAE teve embasamento nos trabalhos (SALGADO et al., 2005; TOZO; SALGADO, 2006; LOPES; SALGADO, 2008; MORENO; SALGADO, 2008; LOPES; SALGADO, 2009; SALGADO; MORENO; GARG, 2009; CAZEDEY et al., 2009; BONFILIO et al., 2009; CAZEDEY et al., 2011; VIEIRA; SALGADO, 2011; MORENO; SALGADO, 2012a; CORRÊA et al., 2012; SILVA; SALGADO, 2012; TÓTOLI; SALGADO, 2014; PEDROSO; SALGADO, 2014a; RUGANI; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2015b), dando continuidade à linha de pesquisa da orientadora Profa. Dra. Hérica R. N. Salgado do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

6.3.1. Material

No método cromatográfico foram utilizadas CEF SQR (item 4.1) e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável (item 4.2).

Para o preparo das soluções e das fases móveis foi utilizado água ultrapura obtida do equipamento Milli-Q[®] (Direct-Q[®] 3, Merck Millipore, Alemanha). O solvente constituinte da fase móvel foi o etanol da marca J.T. Baker, grau CLAE. Para os estudos de degradação forçada, foram utilizados os seguintes solventes: solução de ácido clorídrico (Synth[®]) 0,1 M, solução de hidróxido de sódio (Cinética[®]) 0,001 M e solução de peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina[®]) 0,05%. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA) antes de serem injetadas.

O cromatógrafo utilizado para a realização das análises de cromatografia líquida foi Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, Califórnia, EUA), conectado a detector de UV/VIS Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 µL (Rheodyne Breeze, Califórnia, EUA). Foi utilizado para separação cromatográfica através de condições isocráticas de fase reversa a coluna Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) Phenomenex[®] (Torrance, Califórnia, EUA).

Outros materiais e equipamentos utilizados no decorrer da análise: banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, São Paulo, Brasil); banho de aquecimento modelo Q334M (Quimis[®], São Paulo, Brasil); balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®], São Paulo, Brasil); micropipetador modelo Research[®] Plus 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); câmara UV com espelhos em seu interior, equipada com lâmpada UVC (254 nm).

6.3.2. Método

Os testes preliminares foram realizados com o objetivo de encontrar condições favoráveis para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável, bem como reduzir a assimetria do pico, danos à coluna cromatográfica e geração de resíduos, testando-se diferentes colunas, fases móveis e outros parâmetros cromatográficos, representados na Tabela 51.

Tabela 51- Condições cromatográficas testadas para o desenvolvimento de método por CLAE para quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Parâmetros	Descrição
Fases móveis	Água : etanol (70:30, v/v)
	Água : etanol (50:50, v/v)
	Água : etanol (45:55, v/v)
	Água : etanol (45:55, v/v) pH ajustado para 4,5 com ácido acético glacial
Colunas analíticas	Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm)
	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ Agilent [®] (150 x 4,6 mm; 5 µm)
Vazões (mL/min)	0,5
	1,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após uma varredura em detector de UV, o comprimento de onda foi pré-selecionado em 258 nm. Depois da realização das análises com parâmetros diferentes, foram estabelecidas as condições ideais para a realização da quantificação de CEF por CLAE. Na Tabela 52 são apresentados os parâmetros estabelecidos do método desenvolvido para as análises de CLAE.

Tabela 52- Parâmetros estabelecidos para o método de CLAE nas análises de CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Água : etanol (45:55, v/v)
Coluna	Luna C ₁₈ Phenomenex [®] (250 x 4,6 mm; 5 µm)
Detecção	258 nm
Vazão	0,5 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C ± 2
Tempo de retenção	4,99 minutos

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

Para o preparo da solução de CEF SQR foi pesada a massa de 10,44 mg e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As concentrações foram preparadas a partir desta solução-mãe, sendo retiradas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL completados com água purificada, atingindo as concentrações finais de 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 µg/mL, respectivamente. Todas as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm antes de serem injetadas.

6.3.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Os vinte frascos-ampola utilizados para o ensaio de peso médio citado no item 5.2 foram acondicionados em uma única embalagem para a formação de um *pool* das amostras de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Para o preparo da solução de CEF amostra (item 4.2) foi pesada a partir do *pool* a massa de 17,25 mg equivalente a 10,00 mg de CEF e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração teórica de 100 µg/mL. As concentrações foram preparadas a partir desta solução-mãe descritas no item 6.3.2.1. Todas as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm antes de serem injetadas.

6.3.2.3. Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de água purificada : etanol (J.T. Baker) no proporção de 45:55, v/v, sendo o solvente utilizado de grau CLAE. A fase móvel foi submetida à filtração sob vácuo por membrana de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore®) e desgaseificada em banho ultrassônico (Unique, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos antes do uso.

6.3.3. Cálculo do teor de CEF pó liofilizado para solução injetável

O cálculo para determinar a concentração em que o CEF estava presente nas amostras em pó liofilizado para solução injetável foi realizado pela Equação 3 e posteriormente pela

Equação 4 para obter o teor percentual da amostra, citadas no item 6.1.1.5, utilizando o dado da área absoluta obtida pelo método CLAE.

6.3.4. Validação do método desenvolvido para CLAE

Os parâmetros avaliados para a validação do método de CLAE foram: conformidade do sistema, linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação. O método foi validado de acordo com o preconizado pelas literaturas FDA (1994), BRASIL (2003) e ICH (2005).

6.3.4.1. Linearidade

Para a curva analítica foi utilizada uma faixa de trabalho de 7 pontos, preparada a partir da solução de CEF SQR na concentração de 100 µg/mL (solução-mãe). Desta forma, foram transferidas alíquotas de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 mL da solução-mãe para balões volumétricos de 25 mL completando o volume final com água purificada, obtendo-se, respectivamente, concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 µg/mL. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. Após a obtenção das curvas, foi determinada a equação da reta pelo estudo de regressão linear, por meio do método dos mínimos quadrados e, para os parâmetros estatísticos, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

6.3.4.2. Conformidade do sistema (*System suitability*)

Durante o desenvolvimento de um método analítico existem alguns testes que devem ser realizados para obter alguns parâmetros antes da validação, estes ensaios são chamados de conformidade do sistema ou *system suitability*. Segundo a ICH (2005), esses testes são de suma importância para que o método a ser desenvolvido possa garantir o alto desempenho nas análises.

O teste de conformidade do sistema cromatográfico foi avaliado após ser analisada a solução de CEF SQR na concentração de 40 µg/mL em sextuplicata. Em seguida, foram avaliados os parâmetros: tempo de retenção (t_R) e área do pico, e calculados segundo a USP 37 (2014), o número de pratos (N), assimetria do pico (A_S) e fator de retenção (k). Para cada

parâmetro foi calculado e analisado o valor de DPR%. Os valores de t_R e área do pico cromatográfico foram fornecidos pelo *software* do equipamento de CLAE utilizado.

A assimetria do pico (A_S) ou fator de cauda como também é conhecido é a medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido longitudinal. É calculada pela medida da largura do pico na base a 5% da altura do pico ($W_{0,05}$) e pela distância entre o início do pico até máximo do pico (f), conforme apresentado na Equação 10 e representado na Figura 32 (USP 37, 2014).

$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2 \cdot f}$$

Equação 10

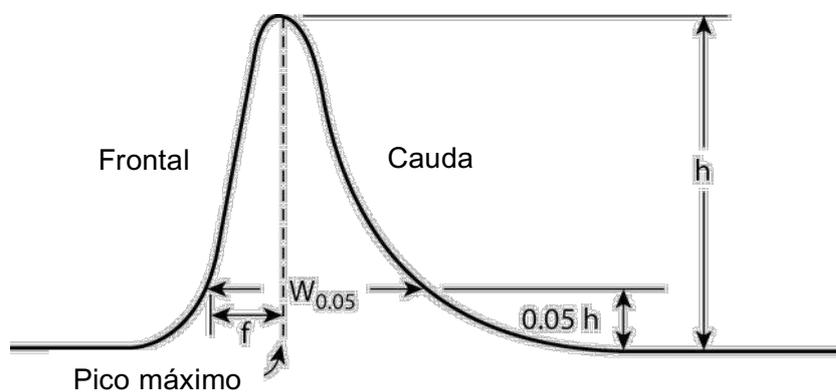
Em que:

A_S = Assimetria do pico

$W_{0,05}$ = Largura do pico na base a 5% da sua altura

f = Distância entre o máximo do pico e a linha de base

Figura 32- Medidas relacionadas à determinação da assimetria do pico cromatográfico (A_S), calculada pela Equação 10.



Fonte: Adaptada de USP 37, 2014.

O fator de retenção (k) é a medida da posição do pico de interesse relativo ao composto não retido, sendo calculado pela Equação 11 (USP 37, 2014).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Equação 11

Em que:

k = Fator de retenção

t_R = Tempo de retenção do pico de interesse

t_M = Tempo do composto não retido (volume morto)

O número de pratos (N) é definido como uma medida da eficiência da coluna cromatográfica e é calculado pela Equação 12 (USP 37, 2014).

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Equação 12

Em que:

t_R = Tempo de retenção da substância analisada

W = Largura do pico medido na sua base

6.3.4.3. Seletividade

Para avaliar se existe alguma interferência de produtos de degradação na quantificação do CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável pelo método de CLAE, foi realizada a verificação do parâmetro seletividade. Foram utilizadas soluções de CEF amostra na concentração de 40 µg/mL, sendo submetidas às degradações aceleradas por condições ácida, alcalina, neutra, oxidativa e fotolítica.

No preparo das soluções de CEF amostra para os estudos acelerados de degradação foram utilizados os solventes HCl 0,1 M, NaOH 0,001 M e H₂O₂ 0,05%, para as condições de estresse ácida, alcalina e oxidativa, respectivamente. Optou-se por trabalhar com NaOH 0,001 M e H₂O₂ 0,05%, pois o fármaco degradava rapidamente quando foi submetido ao NaOH 0,1 M; NaOH 0,01 M; H₂O₂ 3%; H₂O₂ 0,3% e H₂O₂ 0,1%. Para as condições neutra e fotolítica as soluções de CEF amostra foram preparadas utilizando como solvente água purificada. Todas amostras foram aquecidas a 60 °C, com exceção da condição fotolítica, que foi induzida através

da exposição à luz ultravioleta (UVC, 254 nm) em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Vale ressaltar que todas as amostras foram injetadas no equipamento em concentrações de 40 µg/mL. Os tempos de análise nestas condições foram de 0; 0,5; 1,5; 3 e 6 horas.

6.3.4.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão do método desenvolvido para CLAE foi avaliada sob duas maneiras por repetibilidade e a precisão intermediária (ICH, 2005).

6.3.4.4.1. Repetibilidade (intradia)

Na precisão por repetibilidade foram realizadas sete injeções da solução de CEF SQR na concentração de 40 µg/mL, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo (DPR%) foi analisado entre a comparação das determinações ensaiadas.

6.3.4.4.2. Precisão intermediária (interdias e entre analistas)

Para a precisão intermediária interdia foram realizadas sete determinações sucessivas da solução aquosa de CEF SQR na concentração de 40 µg/mL, onde foram preparadas diariamente, para análise em três dias diferentes, empregando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista. Os resultados foram avaliados pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

Por outro lado, a precisão intermediária entre analistas também utilizou sete determinações sucessivas da solução de CEF SQR na concentração de 40 µg/mL, foram realizadas no mesmo dia, mas por analistas diferentes, empregando as mesmas condições experimentais, método e equipamento. As áreas dos picos cromatográficos foram avaliadas pelo DPR% e por análise estatística de variância (ANOVA).

6.3.4.5. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método foi realizado o ensaio de recuperação, na qual quantidades conhecidas de CEF SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em

triplicata e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 53. A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada conforme a literatura (AOAC, 2002) por meio da Equação 5 descrita no item 6.1.1.6.3.

Tabela 53- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método por CLAE

	CEF amostra (100 µg/mL) (mL)	CEF SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^a
Amostra	2,0	---	20
R1	2,0	1,2	32
R2	2,0	2,0	40
R3	2,0	2,8	48
Padrão	---	2,0	20

^aBalão volumétrico de 10 mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.4.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações nas condições estabelecidas, indicando confiança nos parâmetros normais das análises de CLAE para obtenção do teor da CEF.

Para a realização da robustez foram avaliadas pequenas variações dos parâmetros pré-definidos como: marca da coluna cromatográfica, vazão, marca do solvente etanol, proporção da fase móvel, fonte do solvente de diluição (preparo das soluções de CEF SQR e CEF amostra), comprimento de onda e temperatura. Essas variações foram avaliadas concomitantemente através do planejamento fatorial de Plackett-Burman, onde é realizada uma matriz de 15 ensaios variando 7 parâmetros em nível superior e inferior. Todos os resultados obtidos de cada parâmetro foram calculados usando a metodologia proposta por Youden e Steiner (1975).

Na Tabela 54 é representada a combinação fatorial utilizada no teste Plackett-Burman, sendo que as letras de A a G representam os fatores selecionados; os números 1 a 15 representam o número de experimentos ($2n + 1$), em que n é o número de fatores, no qual 0 corresponde aos parâmetros normais pré-estabelecidos no processo, enquanto que os 1 e -1 são os níveis superiores e inferiores a esses parâmetros.

Tabela 54- Avaliação da robustez utilizando o planejamento experimental de Plackett-Burman

Parâmetro Analítico	Combinação Fatorial														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0
B	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0
C	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1
D	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0
E	0	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1
F	1	0	1	0	0	1	1	0	-1	0	-1	0	0	-1	-1
G	1	1	0	1	0	0	1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1

A-G: fatores selecionados; 1-15: número de experimentos onde $2n + 1$, em que n = número de fatores; 1, 0, -1: níveis dos fatores.

Fonte: BERZAS et al., 2004; PEDROSO; SALGADO, 2014a.

A confiabilidade do teste de robustez está interligada com a escolha das variáveis a serem ensaiadas, como: os fatores e os níveis, sendo condizentes com a realidade prática onde os níveis devem ser modificados conforme a necessidade observada. Para a avaliação da robustez deste trabalho foram escolhidos alguns fatores e níveis de variação que podem ser observados na Tabela 55.

Tabela 55- Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método de CLAE

Fator	Unidade	Limite	Condição variada (1)	Condição normal (0)	Condição variada (-1)
A) Marca da coluna	---	---	Agilent	Phenomenex	Akzo Nobel
B) Vazão da fase móvel	mL/min	± 2	0,52	0,50	0,48
C) Marca do etanol	---	---	Tedia	J. T. Baker	Tedia
D) Proporção da fase móvel	%, v/v	± 2	43:57	45:55	47:53
E) Fonte do solvente de diluição (SQR e amostra)	---	---	Água 2 ^b	Água 1 ^a	Água 2 ^b
F) Comprimento de onda	nm	± 2	260	258	256
G) Temperatura da sala	°C	± 2	27	25	23

1 = Nível superior; 0 = Nível normal; -1 = Nível inferior;

^aÁgua 1: Água purificada coletada no próprio laboratório da pesquisa;

^bÁgua 2: Água purificada coletada no laboratório de farmacotécnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a determinação da robustez os ensaios foram realizados em triplicata, sendo injetadas soluções aquosas de CEF SQR e CEF amostra na concentração de 40 µg/mL, sob condições experimentais idênticas.

Na avaliação dos dados obtidos da robustez são comparadas as condições normais, que são representadas pela média do doseamento dos três ensaios obtidos para o parâmetro normal, com as médias das análises correspondentes aos níveis alterados realizados em triplicata, identificando se houve ou não a influência de cada parâmetro no resultado final da robustez.

O efeito médio de cada variável é a diferença média entre as observações determinadas nos níveis extremos e aqueles determinados no nível ideal. Para calcular o desvio de cada fator foi utilizada a metodologia de Youden e Steiner.

Como pode ser visto, na Equação 13 é exemplificada a avaliação do efeito da alteração do parâmetro A- Marca da coluna, do mesmo modo os outros parâmetros também foram avaliados (BERZAS et al., 2004; PEDROSO; SALGADO, 2014a).

$$\sqrt{2} \times S > |DA|$$

Equação 13

Em que:

$$S = \sqrt{\frac{2}{7} (DA^2 + DB^2 + DC^2 + DD^2 + DE^2 + DF^2 + DG^2)}$$

Sendo que:

A diferença entre os valores normais e os valores alterados em módulo (DA, DB, DC, etc...) deverá ser menor que o valor resultante de $\sqrt{2} \times S$ para se inferir que os efeitos obtidos com as variações dos parâmetros não foram significativos e, portanto, o método é robusto para todos os fatores selecionados.

6.3.4.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e os de quantificação (LQ) são estudos que se baseiam no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica (ICH, 2005). Após três análises das soluções de CEF SQR atingindo toda faixa de trabalho, os dados foram calculados conforme as Equações 6 e 7 descritas no item 6.1.1.6.5.

6.3.5. Resultados

Os testes preliminares citados na Tabela 51 que foram realizados no desenvolvimento do método de CLAE para a quantificação de CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável apresentaram alguns resultados que foram levados em conta para a definição dos parâmetros finais do método.

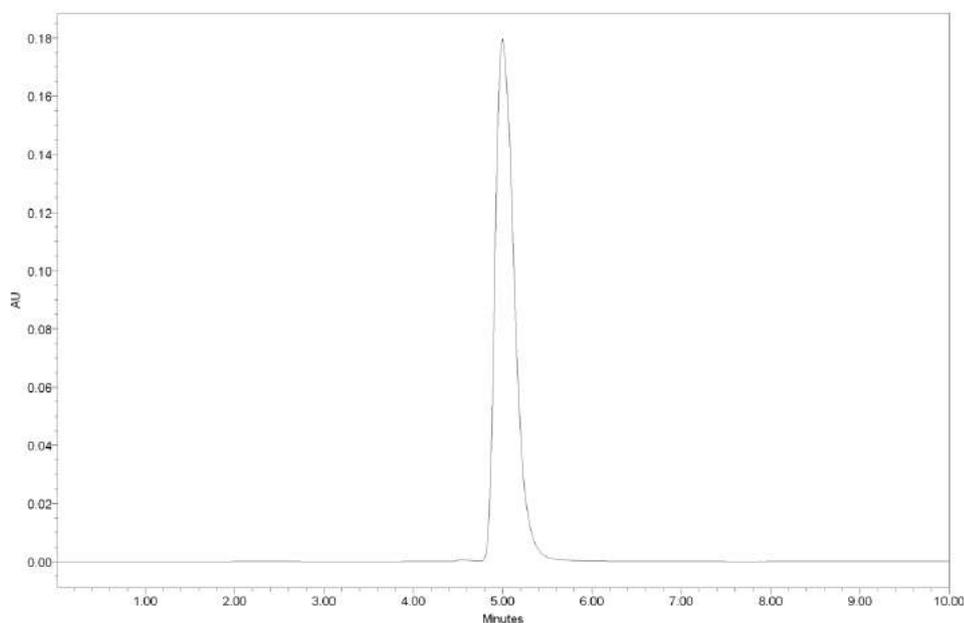
As análises realizadas com a coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C₁₈ Agilent[®] (150 x 4,6 mm; 5 µm) não apresentaram picos muito simétricos e sua pressão se manteve dentro do limite estabelecido pelo equipamento (4000 psi), por outro lado a coluna Luna C₁₈ Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm; 5 µm) apresentou picos mais simétricos e também se manteve bem abaixo do limite da pressão, sendo, portanto, escolhida para a validação do método.

Para a escolha da vazão foram realizados testes com 1,0 mL/min e 0,5 mL/min, neste caso optou-se por trabalhar com a última vazão, já que com 1,0 mL/min o tempo de retenção ficou próximo ao tempo do composto não retido (volume morto), tornando o seu uso inadequado.

Durante os testes preliminares foram testadas quatro fases móveis com vazão de 0,5 mL/min, sendo obtidos tempos de retenção próximos uns dos outros. As fases móveis água : etanol (70:30, v/v); (50:50, v/v); (45:55, v/v) e (45:55, v/v) com pH ajustado para 4,5 com ácido acético glacial apresentaram os seguintes tempos de retenção: 5,15; 5,00; 4,99 e 4,91, respectivamente. Para a escolha da fase móvel, foram observados os cromatogramas e levados em consideração alguns fatores como assimetria do pico, cauda frontal e que fosse mais simples possível, sem utilização de solventes tóxicos. Desta forma, a fase móvel escolhida foi água : etanol (45:55, v/v). A fase móvel escolhida não necessitou do ajuste de pH, porém, para nível de conhecimento o pH dela foi medido, resultando no valor de 5,84.

Na Figura 33 é apresentado o cromatograma da solução aquosa de CEF SQR em concentração de 40 µg/mL com os parâmetros escolhidos para a utilização no método.

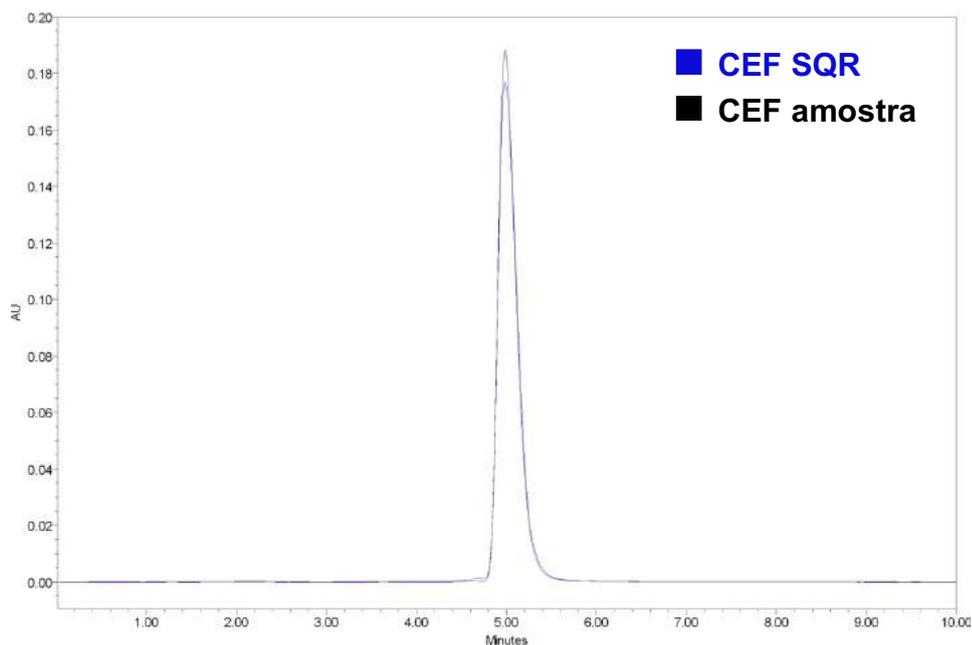
Figura 33- Cromatograma de CEF SQR (40 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). Vazão: 0,5 mL/min. Comprimento de onda: 258 nm. Tempo de retenção: 4,99 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A sobreposição dos cromatogramas das soluções aquosas de CEF SQR e CEF amostra na forma farmacêutica em concentração de 40 µg/mL é apresentada na Figura 34.

Figura 34- Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE das soluções de CEF SQR e CEF amostra (40 µg/mL). Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). Vazão: 0,5 mL/min. Comprimento de onda: 258 nm. Tempo de retenção: 4,99 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.1. Doseamento de CEF pó liofilizado para solução injetável

O teor de CEF amostra foi realizado através dos cálculos da média de três análises realizadas em triplicata da solução aquosa CEF na concentração de 40 µg/mL e avaliou-se também o DPR% destas análises. Na Tabela 56 é possível observar o valor do teor de 106,31% referente à quantidade de CEF presente na amostra e o valor de DPR de 0,28%.

Tabela 56- Teores obtidos por sistema cromatográfico desenvolvido para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Teor					
Dia 1 ^a	Dia 2 ^a	Dia 3 ^a	Média	DP ^b	DPR% ^c
106,20%	106,64%	106,09%	106,31%	0,292513	0,28

^aMédia de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.2. Conformidade do sistema (*System suitability*)

A conformidade do sistema foi avaliada através de alguns parâmetros, como: tempo de retenção (t_R), área do pico, número de pratos (N), assimetria do pico (A_S) e fator de retenção (k). Na Tabela 57, é possível observar os resultados obtidos para a conformidade do sistema.

Tabela 57- Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Parâmetros avaliados					
	Assimetria ($\leq 2,0$)	Fator de retenção ($> 2,0$)	Número de pratos (> 2000)	Tempo de retenção (min)	Área
	0,66	2,26	6936,09	4,997	2584224
	0,65	2,31	6919,44	4,991	2575847
	0,66	2,31	6930,56	4,995	2555261
	0,66	2,26	6933,29	4,996	2581572
	0,66	2,31	6919,44	4,991	2589774
	0,66	2,31	6930,56	4,995	2561022
Média	0,66	2,29	6928,23	4,994	2574617
DPR% ^a	0,62	0,97	0,10	0,05	0,53

^aDPR% = Desvio Padrão Relativo.

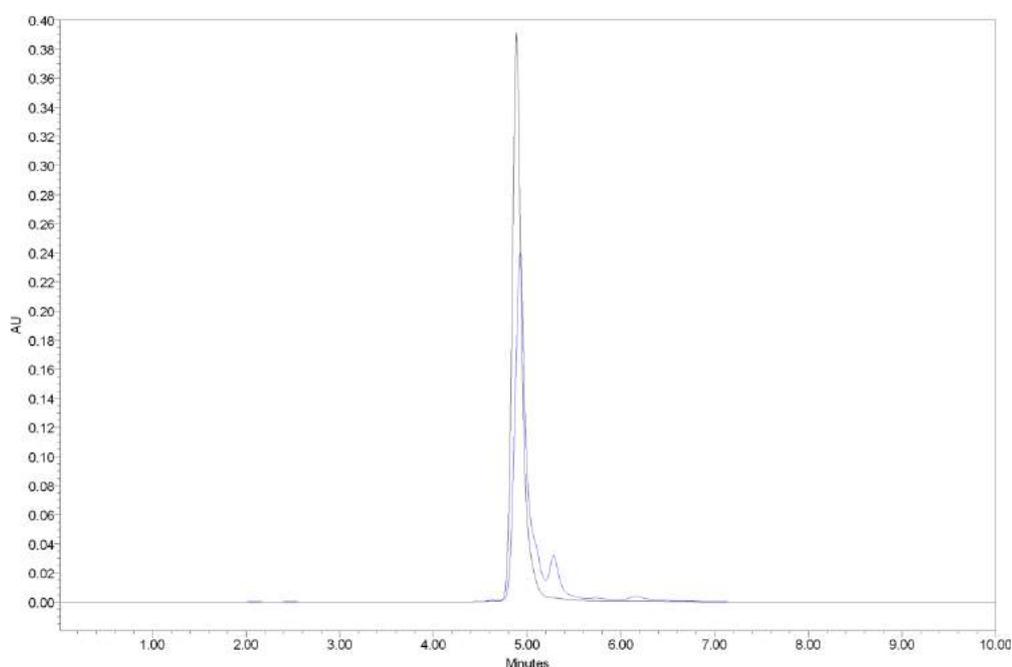
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.3. Seletividade

Neste parâmetro foi possível verificar as propriedades indicadoras de estabilidade do método proposto, frente ao estudo de degradação acelerada da amostra de CEF em pó para solução injetável. Para todas as condições de estresse avaliadas ocorreram decréscimos do pico de CEF e na maioria dos casos a formação de novos picos nos cromatogramas foi observada. As porcentagens de degradação dos picos da CEF para as condições analisadas foram 26,5% para ácida, 39,4% para alcalina, 10,9% para neutra, 97,5% para oxidativa e 3,0% para fotolítica, quando comparadas nos tempos de degradação 0 e 6 horas. A amostra foi mais estável em condição fotolítica e apresentou maior degradação em condição oxidativa.

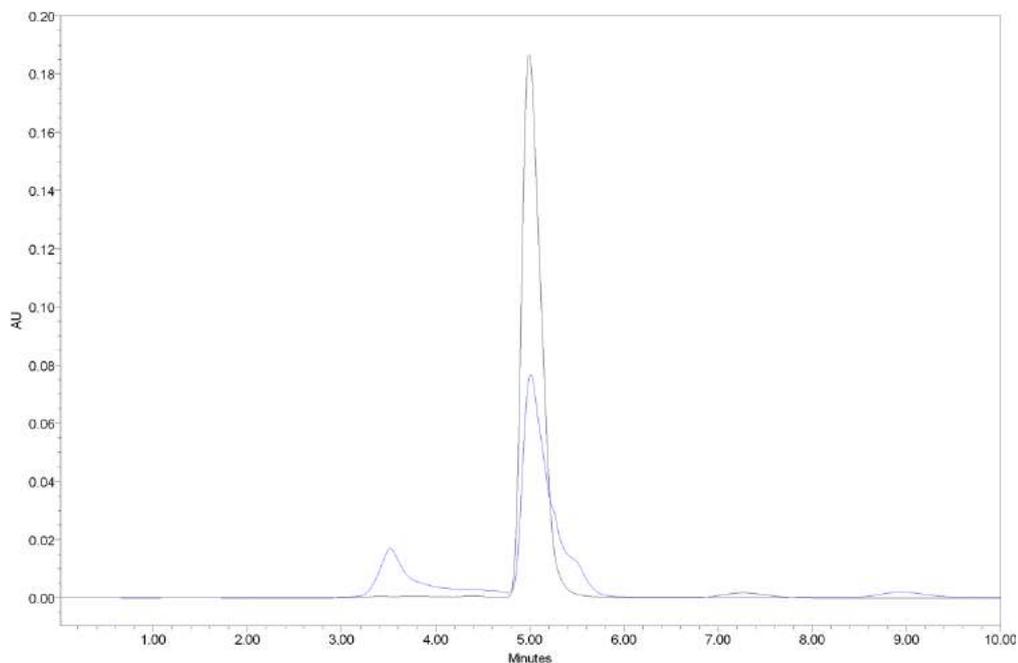
Os cromatogramas com as degradações ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa são apresentados nas Figuras 35, 36, 37, 38 e 39, respectivamente, sendo possível a visualização dos picos adicionais correspondentes aos produtos de degradação e pico principal do CEF no tempo de retenção de 4,99 minutos.

Figura 35- Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação ácida (HCl 0,1 M) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.



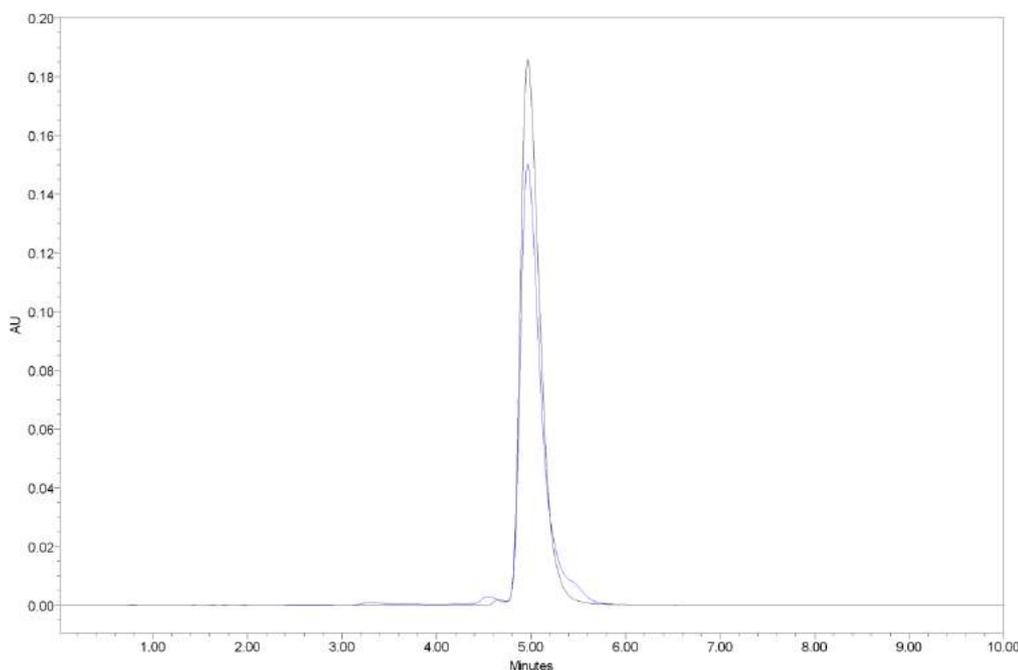
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 36- Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação alcalina (NaOH 0,001 M) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.



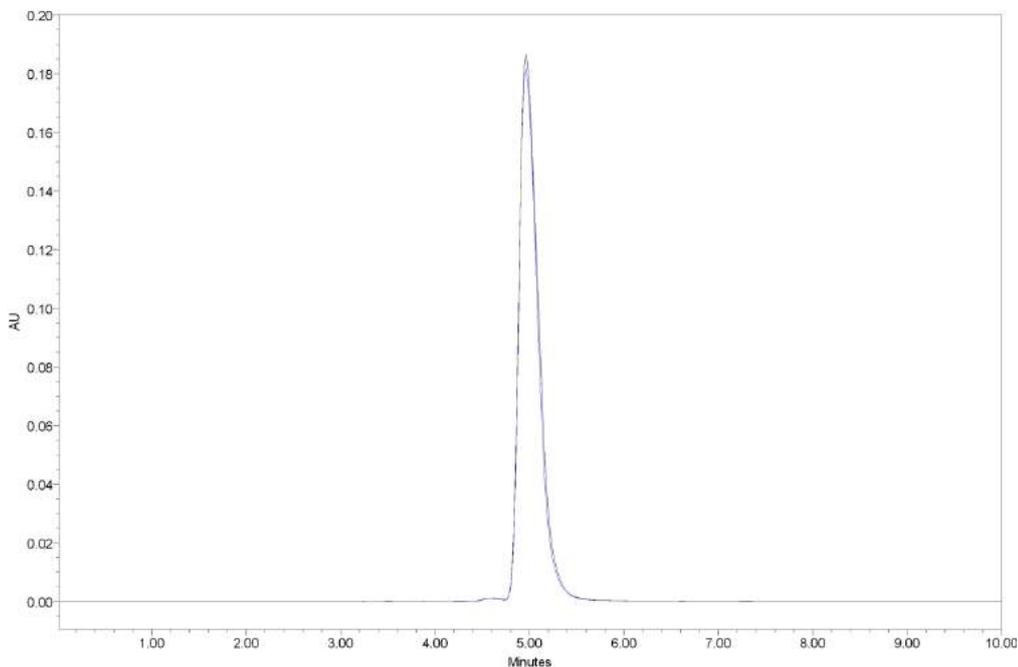
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 37- Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação neutra (água) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.



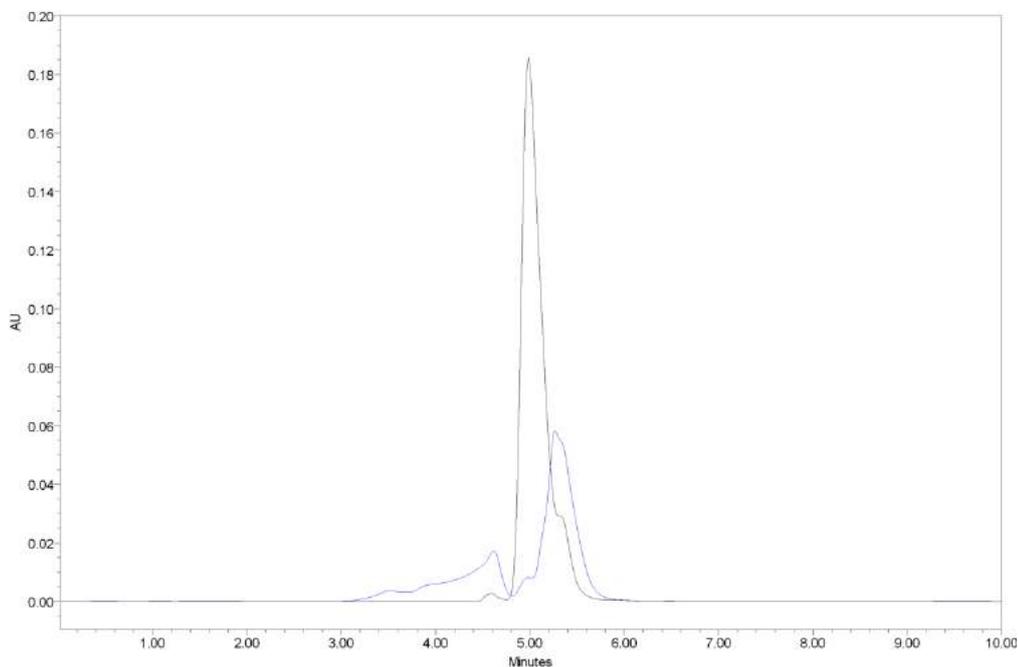
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 38- Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação fotolítica (luz UVC 254 nm) após 6 horas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 39- Cromatograma de CEF amostra (40 µg/mL) submetido à degradação oxidativa (H₂O₂ 0,05%) após 6 horas a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm; 5 µm). A) Preto: tempo zero; B) Azul: tempo 6 horas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.4. Linearidade

Na Tabela 58 são apresentados os valores das áreas da faixa de concentrações obtidos para a curva analítica de CEF SQR.

Tabela 58- Valores das áreas referentes ao pico de CEF SQR para a construção da curva analítica de CLAE

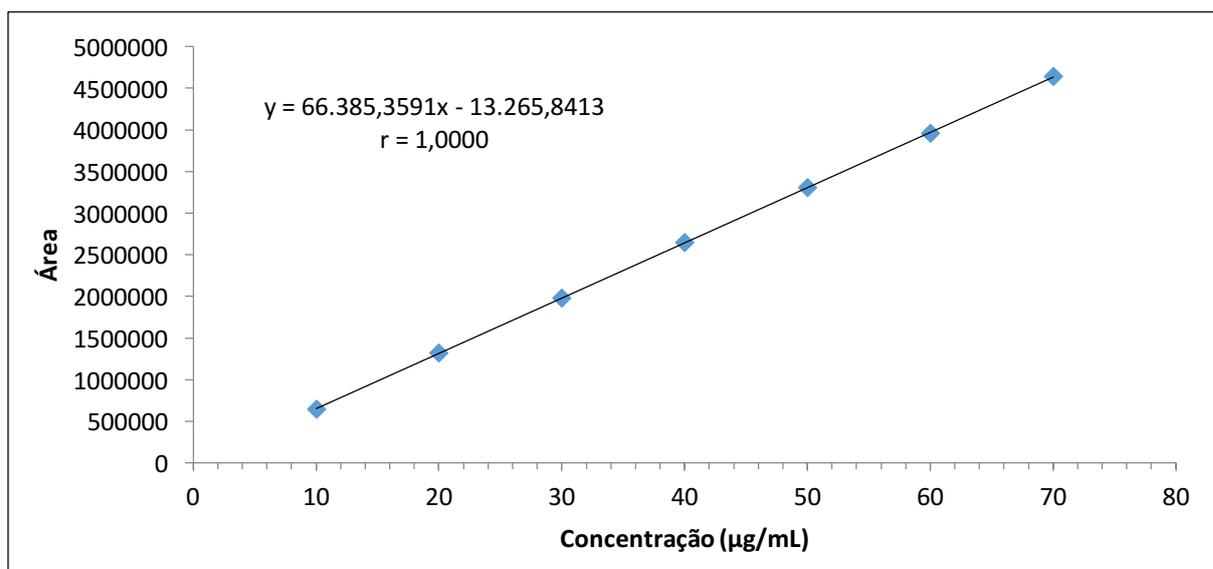
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas ^a (AU)	Área média \pm DP ^b	DPR% ^c
10	654909	646684 \pm 7166,04	1,11
	643359		
	641785		
20	1323954	1318029 \pm 11760,59	0,89
	1325649		
	1304485		
30	1987909	1977366 \pm 9588,71	0,48
	1975024		
	1969166		
40	2654625	2649690 \pm 29207,73	1,10
	2676116		
	2618329		
50	3335592	3304684 \pm 27310,60	0,83
	3294650		
	3283809		
60	3957600	3959065 \pm 10722,45	0,27
	3970444		
	3949150		
70	4675823	4639521 \pm 32660,02	0,70
	4630222		
	4612520		

^aValor médio de três determinações; ^bDP = Desvio Padrão; ^cDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A linearidade foi observada dentro da faixa de concentrações de 10 a 70 $\mu\text{g/mL}$, em que cada valor médio das áreas absolutas obtidas foi disposto num gráfico em relação à respectiva concentração para determinação da curva analítica. Estes resultados são apresentados na Figura 40.

Figura 40- Curva analítica do CEF SQR obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm; 5 µm).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Tabela 59 mostra os dados da análise estatística da curva analítica de CEF SQR realizada através da ANOVA.

Tabela 59- Análise de variância dos valores de área determinados utilizando o método por CLAE na obtenção da curva analítica de CEF SQR

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F_{cal}	F_{tab}
Entre concentrações	6	37019647054114,30	6169941175685,72	14104,03*	2,85
Regressão linear	1	37017982360319,80	37017982360319,80	84620,40*	4,60
Desvio da linearidade	5	1664693794,52	332938758,90	0,761074	2,96
Resíduo	14	6124430392,22	437459313,73	-	-
Total	20	37025771484506,50	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.5. Precisão

Na precisão do método por repetibilidade intradia, os resultados foram determinados com base no desvio padrão relativo. Sete soluções aquosas de CEF SQR, preparadas na concentração de 40 µg/mL, foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, apresentaram o valor de DPR igual a 0,38%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de sete soluções de CEF SQR preparadas na concentração de 40 µg/mL, em três dias consecutivos, sendo preparada uma nova solução-mãe por dia, obtendo-se valores de DPR de 0,15%. Na precisão entre analistas, foram avaliadas também sete soluções de CEF SQR preparadas por analistas diferentes, na concentração de 40 µg/mL, obtendo-se valores de DPR de 0,43%. A Tabela 60 apresenta os dados obtidos para as análises de precisão utilizando o método de CLAE.

Tabela 60- Precisão interdias e entre analistas do método analítico para determinação de CEF por CLAE

Interdias			Entre analistas		
Dia	Área ¹	DPR% ²	Analista	Área ¹	DPR% ²
1	2664659		1	2485182	
2	2669815	0,15			0,43
3	2661916		2	2469974	

¹Média de sete determinações; ²DPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise estatística de variância (ANOVA) foi utilizada para calcular os resultados obtidos nas precisões interdias e entre analistas, comparando as áreas das sete soluções realizadas em cada dia de experimento por análise, como apresentado nas Tabelas 61 e 62, respectivamente.

Tabela 61- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F_{cal}	valor-p	F_{tab}
Entre grupos	225174970,6	2	112587485,3	0,32569	0,726197408	3,554557
Dentro dos grupos	6222444138	18	345691341			
Total	6447619109	20				

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 62- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre analistas

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F_{cal}	valor-p	F_{tab}
Entre grupos	809552257,1	1	809552257,1	2,68457	0,127259829	4,747225
Dentro dos grupos	3618693803	12	301557816,9			
Total	4428246060	13				

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.6. Exatidão

O parâmetro da exatidão no método foi realizado por recuperação através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida. Os resultados da exatidão estão dispostos na Tabela 63, sendo que o valor correspondente à porcentagem média de recuperação foi de 100,08%.

Tabela 63- Determinação da exatidão do método analítico para análise de CEF por CLAE

	Concentração teórica de CEF ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada de CEF ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR% ^b
R1	32	33,11	101,94		
R2	40	40,66	98,88	100,08	1,63
R3	48	48,71	99,42		

^aMédia de três determinações; ^bDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.5.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados no método analítico para determinar a sensibilidade do método. Os resultados obtidos através dos cálculos foram 0,18 µg/mL para LD e 0,55 µg/mL para LQ.

6.3.5.8. Robustez

Para a determinação da robustez do método desenvolvido para análises de CEF pó liofilizado para solução injetável foram feitas pequenas alterações de alguns parâmetros, dentre elas pode-se citar: marca da coluna cromatográfica, vazão, marca do solvente etanol, proporção da fase móvel, fonte do solvente de diluição (preparo das soluções de CEF SQR e CEF amostra), comprimento de onda e temperatura da sala.

Na avaliação da robustez foi utilizada a matriz fatorial de Plackett-Burman, em que 15 experimentos foram realizados com alterações simultâneas dos parâmetros citados na Tabela 55. Os valores obtidos como referência dos efeitos para o teste foram de 1,08 para os parâmetros 1 e 2,18 para os parâmetros -1 (Equação 13). Em seguida, os valores obtidos para os efeitos resultantes dos parâmetros alterados foram analisados e comparados aos valores de referência. Deste modo, a robustez do método ficou comprovada, já que os valores dos efeitos não apresentaram resultados significativos. Na Tabela 64 são apresentados todos os valores dos teores para cada fator em condições normais e alteradas.

Tabela 64- Teores de cada variação obtidos no teste de Plackett-Burman

Fator	(1)	Teor (%) ^{a,b}	(-1)	Teor (%) ^{a,b}
A) Marca da Coluna	Agilent [®]	106,24 - 107,30 = -1,06	Akzo Nobel [®]	107,10 - 107,48 = -0,37
B) Vazão (mL/min)	0,52	106,80 - 106,75 = 0,05	0,48	107,66 - 106,92 = 0,74
C) Marca do etanol	Tedia	106,75 - 106,79 = -0,04	Tedia	106,50 - 108,08 = -1,57
D) Proporção da FM (%)	43:57	107,07 - 106,47 = 0,60	47:53	107,84 - 106,74 = 1,10
E) Fonte do solvente de diluição	Água 2 ^c	107,13 - 106,41 = 0,71	Água 2 ^c	107,88 - 106,70 = 1,18
F) Comprimento de onda (nm)	260	106,67 - 106,88 = -0,20	256	106,83 - 107,75 = -0,92
G) Temperatura da sala (°C)	27	106,69 - 106,85 = -0,16	23	106,63 - 107,95 = -1,31

^aMédia de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas;

^bCritérios de referência calculados: 1,08 para o teste 1 e 2,18 para o teste -1;

^cÁgua 2: Água purificada coletada no laboratório de farmacotécnica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.6. Discussão

Para realizar a validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi necessária a realização de alguns testes para se definir os parâmetros a serem utilizados. Esses testes são chamados de adequabilidade do sistema ou conformidade do sistema (*system suitability*) cromatográfico e servem para garantir que o método proposto apresente parâmetros cromatográficos aptos para a validação. Deste modo, os resultados dos testes de conformidade do sistema cromatográfico, apresentados na Tabela 57, foram analisados e comparados frente aos valores de referência obtidos na literatura (FDA, 1994), demonstrando eficiência e confiança para o desenvolvimento do método cromatográfico. Segundo a FDA (1994), os valores de referências recomendados é que a assimetria do pico seja ≤ 2 e o número de pratos > 2000 . Assim sendo, o método proposto para a quantificação de CEF por CLAE cumpre os requisitos preconizados na literatura oficial e pode ser empregado para análise na indústria farmacêutica.

Nas análises realizadas no controle de qualidade de uma indústria farmacêutica o tempo e alguns fatores são sinais de custos para a empresa, de tal modo que as indústrias sempre buscam como critério métodos analíticos com curto tempo de análise, bem como a prevenção ou eliminação de resíduos do processo. Desta maneira, o método desenvolvido para CEF por CLAE apresentou estes critérios, já que o tempo de corrida necessário para a análise é de 4,99 minutos e pelo fato de utilizar solventes menos tóxicos e baixa vazão, reduz o impacto gerado ao meio ambiente, tornando viável o seu uso no controle de qualidade industrial.

A fase móvel escolhida para o método de CLAE é constituída pela mistura dos solventes água : etanol (45:55, v/v), optando por não utilizar soluções-tampão na sua composição. Esta é uma característica muito importante, pois o fato da fase móvel não conter soluções-tampão diminui possíveis consequências ocasionadas à coluna analítica, como lavagens da coluna na busca para retirada dos sais deixados por essas soluções.

Outro benefício apresentado pela fase móvel é o uso de etanol como constituinte, pois, na literatura oficial e em periódicos, é comum encontrar a utilização de solventes mais tóxicos para os sistemas cromatográficos, como acetato de amônio, acetonitrila, hidróxido de amônio e metanol. Quando comparado aos outros solventes, o etanol além da baixa toxicidade apresentada, é de fácil acesso, baixo custo e seu descarte é realizado de modo simples (RIBEIRO et al., 2004).

Há alguns anos não era comum encontrar sistemas cromatográficos que utilizassem como fase móvel misturas de água e etanol, uma vez que o uso do etanol aumentava a pressão

de trabalho por incorporar ao sistema maior viscosidade. Além disto, em alguns países, existe certo controle na sua comercialização, como ocorre nos Estados Unidos. Nos dias atuais, os equipamentos mais sofisticados tornam possível a utilização do etanol como solvente de fases móveis, já que esses equipamentos suportam pressões muito mais elevadas (RIBEIRO et al., 2004; PEDROSO; MEDEIROS; SALGADO, 2016). Vários estudos também vêm demonstrando que misturas de etanol e água possuem ótimas propriedades cromatográficas quando empregadas nas colunas de fase reversa C₈ e C₁₈ (MIYABE; TAKEUCHI; TEZUCA, 1999; RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2004; TÓTOLI; SALGADO, 2014; PEDROSO; MEDEIROS; SALGADO, 2016).

A seletividade do método foi realizada para avaliar a interferência dos produtos de degradação na quantificação de CEF. Para estes ensaios, as amostras do fármaco foram submetidas ao estudo de degradação forçada em condições de estresse ácido, alcalino, neutro, fotolítico e oxidativo, a temperatura de 60 °C, com exceção do teste fotolítico que foi avaliado em temperatura ambiente através da incidência de luz ultravioleta (UVC 254 nm). Para todas as condições avaliadas ocorreram decréscimos dos picos de cloridrato de cefepima, quando comparado aos picos do fármaco nos tempos zeros de análise. A solução de CEF foi mais estável frente à condição fotolítica, enquanto que para a hidrólise oxidativa foi observado o máximo de degradação. A avaliação do estresse oxidativo ficou prejudicada com os parâmetros estabelecidos do método, pois o solvente peróxido de hidrogênio apresentou um grande pico característico, que coeluiu no mesmo tempo de retenção do CEF, encobrindo o pico do fármaco e não sendo possível a separação nestas condições. Por outro lado, isto não interfere na seletividade do método, sendo possível quantificar o cloridrato de cefepima mesmo na presença de seus produtos de degradação.

A validação do método foi realizada de acordo com os critérios apresentados nos guias da FDA (1994) e da ICH (2005), nos quais foram determinados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Para a linearidade do método foram utilizadas sete concentrações da solução de CEF SQR, sendo avaliada por meio de curvas analíticas. A elaboração da curva analítica foi realizada pela plotagem das áreas dos picos apresentadas nos cromatogramas *versus* a concentração de CEF em um gráfico, em que o valor obtido para o coeficiente de correlação foi $r = 1,0000$, mostrando-se linear na faixa de 10 a 70 µg/mL, estando de acordo com o recomendado pela RE n° 899 (BRASIL, 2003) que possui critério mínimo aceitável de $r = 0,99$. Através das análises

de variância (ANOVA) pode-se afirmar que o método é linear, pois o resultado da análise estatística não apresentou desvios significativos de linearidade.

O doseamento realizado para determinar a porcentagem do conteúdo de CEF nas amostras, apresentou teor de 106,31%, que é condizente com o valor apresentado no compêndio oficial de 90,0% a 115,0% (USP 37, 2014).

Na precisão do método foram avaliados os parâmetros de precisão intradia, interdias e entre analistas, apresentando valores de DPR de 0,38%; 0,15% e 0,43%, respectivamente, demonstrando que a precisão do método é adequada. Análises de variância (ANOVA) foram calculadas para as precisões interdias e entre analistas, apresentando como resultado o valor de F_{cal} menor que o F_{tab} , indicando não haver diferenças significativas, e confirmando que a precisão do método é apropriada. A exatidão do método ficou comprovada após analisar os resultados obtidos por recuperação de CEF, que apresentou 100,08% de recuperação.

A capacidade do método em detectar e quantificar com garantia a CEF em pó liofilizado para solução injetável foi estabelecida pelos parâmetros LD e LQ, com resultados de 0,18 e 0,55 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Na robustez do método foi utilizado o modelo fatorial de Plackett-Burman, sendo comprovada por alterações simultâneas dos parâmetros pré-selecionados para o método (Tabela 64). Assim, os resultados ao final dos testes não apresentaram nenhum efeito considerado significativo em comparação com os valores dos efeitos calculados e mantidos como referência através da Equação 13.

O método desenvolvido neste estudo para cromatografia líquida de fase reversa segue todas as características preconizadas pela literatura para validação de métodos. Deste modo, o método mostrou-se apropriado e vantajoso, sendo simples, linear, preciso, exato, robusto e com limites de detecção e de quantificação satisfatórios.

Nos compêndios oficiais e periódicos pesquisados não foram encontrados trabalhos que utilizassem em sua fase móvel solventes menos tóxicos para a quantificação de CEF.

Outros fatores importantes a serem destacados é que o método utiliza baixa quantidade de solvente orgânico, produz baixas quantidades de resíduos e não utiliza solução-tampão, minimizando o tratamento de efluentes, o que contribui com o meio ambiente, implementando métodos voltados à química verde. Assim sendo, o método pode ser recomendado em análises de rotina no controle de qualidade da indústria farmacêutica para a quantificação de cloridrato de cefepima em pó liofilizado para solução injetável.

6.4. Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

A potência dos antimicrobianos é realizada através de ensaios microbiológicos, sendo determinada a atividade perante a inibição de crescimento microbiano, comparada à inibição promovida pela substância de referência do fármaco (KAVANAGH, 1972; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). Estes ensaios são comumente empregados principalmente quando existem dúvidas referentes à perda de atividade microbiológica da molécula, nas quais os métodos químicos e físico-químicos não permitem a obtenção deste tipo de informação (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; MORENO, SALGADO, 2007).

Na literatura são citados dois métodos microbiológicos para determinar o teor de um antimicrobiano, quais sejam difusão em ágar e turbidimétrico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os ensaios microbiológicos por difusão em ágar, embora sejam apropriados e altamente empregados nas pesquisas, não fornecem resultados rápidos. Neste contexto, a prospecção de novos métodos para controle de fármacos em diferentes matrizes tem revelado um grande aumento do número de amostras avaliadas. O ensaio turbidimétrico vem se destacando perante a avaliação da potência de antimicrobianos, já que possui excelente precisão e diminuição significativa no tempo de análise (PITKIN et al., 1974; PEDROSO; SALGADO, 2014b; CURBETE; SALGADO, 2016).

O método turbidimétrico é avaliado através da inibição do crescimento microbiano de uma suspensão de micro-organismos sensíveis ao fármaco teste realizados em um meio líquido, sendo que este caldo, quando na ausência do fármaco, deve proporcionar um rápido crescimento dos micro-organismos testados (ESMERINO et al., 2004). Esta técnica possui várias características frente à de difusão em ágar, como rapidez na análise, facilidade operacional, medida de resposta objetiva e ausência de interferência das características de difusão. Por outro lado, alguns quesitos também são necessários, como por exemplo, um equipamento para a leitura dos ensaios, os testes não podem apresentar contaminação e a solução do fármaco teste não pode interferir na leitura dos ensaios através da sua coloração (KAVANAGH, 1963; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

O estudo desenvolvido por turbidimetria teve embasamento nos trabalhos (MORENO, SALGADO, 2007; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012b; VIEIRA; FIUZA; SALGADO, 2014; PEDROSO; SALGADO, 2014b; CHIERENTIN; SALGADO, 2015; SILVA; SALGADO, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2015c; CURBETE; SALGADO, 2016).

6.4.1. Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

A realização do teste microbiológico por turbidimetria para quantificação de CEF na forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável foi conduzida em alguns ensaios preliminares alternando alguns parâmetros, como micro-organismo, meio de cultura, concentrações do inóculo e do fármaco, a fim de padronizar o método. Na Tabela 65 é possível observar os parâmetros avaliados.

Tabela 65- Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 2082
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meios de Cultura	Caldo BHI
	Caldo Casoy
Soluções diluentes	Água purificada
	Solução tampão fosfato de potássio pH 6,0
	Solução tampão fosfato de potássio pH 8,0
Concentrações do inóculo	3,0%; 5,0%; 6,0%; 7,0% e 8,0%
	1,0; 3,0; 9,0 e 27,0 µg/mL (Razão = 3)
Concentrações das soluções padrão e amostra	10,0; 25,0 e 62,5 µg/mL (Razão = 2,5)
	0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 µg/mL (Razão = 2)
	36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL (Razão = 1,5)
	26,0; 39,0 e 58,5 µg/mL (Razão = 1,5)
	25,0; 35,0 e 49,0 µg/mL (Razão = 1,4)
	28,0; 36,4 e 47,32 µg/mL (Razão = 1,3)

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.2. Execução do ensaio

Após a realização dos testes preliminares foram definidos os parâmetros para as análises microbiológicas por turbidimetria apresentados na Tabela 66.

Tabela 66- Parâmetros padronizados para ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico na avaliação de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 2082
Tempo de incubação	4 horas
Temperatura de incubação	35 °C
Meio de cultura	Caldo Casoy
Diluyente	Água purificada
Concentração do inóculo	8,0%
Concentrações das soluções padrão e amostra	36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL (Razão = 1,5)

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.3. Material

Nos ensaios microbiológicos por turbidimetria foram utilizados CEF SQR (item 4.1) e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável (item 4.2). Os meios de cultura empregados para o método foram ágar Casoy (Acumedia[®], EUA) para repique de manutenção da cepa do micro-organismo e caldo Casoy (Oxoid[®], Inglaterra) para a realização dos ensaios. Para a realização deste método, a água purificada, as ponteiras e os tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, contendo o meio de cultura e devidamente fechados com tampão de algodão envolvido em gaze, foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Lufenco, São Paulo, Brasil) por 15 minutos a 121 °C. A incubação foi realizada no equipamento Shaker modelo MA420 (Marconi, São Paulo, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás, São Paulo, Brasil). Para interromper o crescimento dos micro-organismos foi usado formaldeído grau analítico (Qhemis, Hexis Científica, Jundiaí, Brasil). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro modelo DU 530 (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). Também foram usados micropipetador modelo Research[®] Plus 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); balança analítica modelo DV215CD (Discovery, Ohaus[®],

São Paulo, Brasil); balança semi-analítica modelo B160 (Micronal, São Paulo, Brasil) e câmara de fluxo unidirecional (laminar) modelo HLFS 18 (Veco, São Paulo, Brasil).

6.4.4. Método

6.4.4.1. Preparo da solução de CEF SQR

Para o preparo da solução de CEF SQR foram pesados 10,44 mg do fármaco (item 4.1), transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para obtenção de solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. Aliquotas de 3,6; 5,4 e 8,1 mL desta solução-mãe foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL, respectivamente.

6.4.4.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Os vinte frascos-ampola utilizados para o ensaio de peso médio citado no item 5.2 foram acondicionados em uma única embalagem para a formação de um *pool* das amostras de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Para o preparo da solução de CEF amostra (item 4.2), foi pesado, a partir do *pool*, a massa de 17,25 mg equivalente a 10,00 mg de CEF e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em seguida o volume foi completado com água purificada, obtendo solução-mãe na concentração de 100 µg/mL. As concentrações foram preparadas a partir desta solução-mãe, sendo retiradas alíquotas de 3,6; 5,4; e 8,1 mL e transferidas para balão volumétrico de 10 mL completados com água purificada, atingindo as concentrações finais teóricas de 36,0; 54,0 e 81 µg/mL, respectivamente.

6.4.4.3. Preparo do meio de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave nas condições de 121 °C a 1 atm, durante 15 minutos.

6.4.4.4. Preparo do inóculo

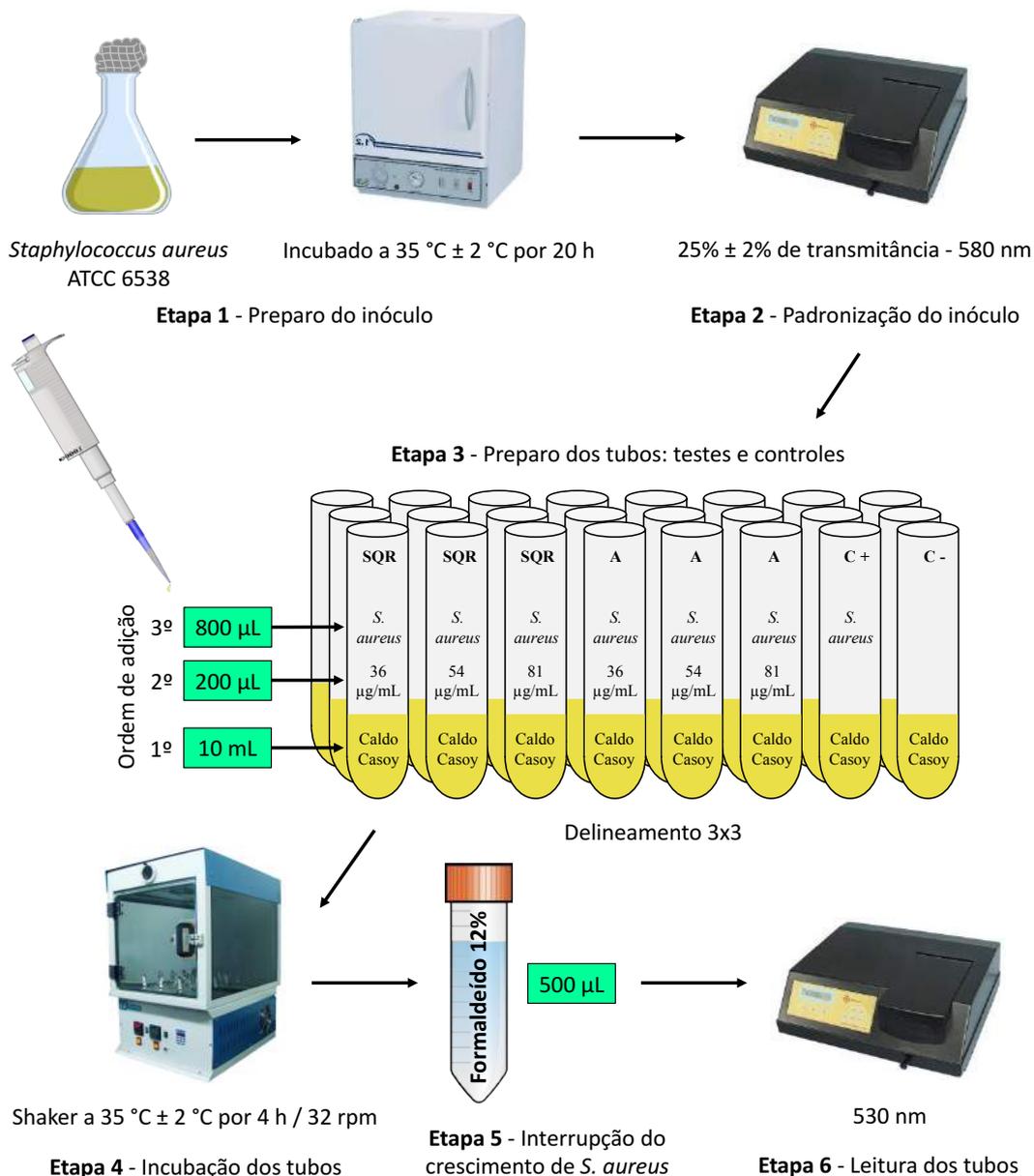
Inoculado com auxílio de alça de platina para caldo Casoy, o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi incubado para crescimento em estufa microbiológica à temperatura de 35 ± 2 °C por 20 horas. Em seguida, o inóculo foi padronizado obtendo-se a transmitância de $25 \pm 2\%$ realizado em espectrofotômetro a 580 nm, como descrito na literatura (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

6.4.4.5. Ensaio

Para a realização do teste foram empregados tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Casoy estéril; na sequência foram adicionados aos tubos 200 µL das soluções de CEF SQR ou CEF amostra descritas nos itens 6.4.4.1 e 6.4.4.2, respectivamente. Foram acrescentados 800 µL de caldo contendo o micro-organismo padronizado a $25 \pm 2\%$ de transmitância. O ensaio foi realizado com delineamento 3x3, preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010), sendo três tubos de ensaio para cada concentração do padrão e da amostra, um tubo para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de cloridrato de cefepima) e um tubo para o controle negativo (contendo somente o caldo).

Os tubos foram incubados em banho de aquecimento com agitador orbital, à temperatura de $35,0 \pm 2,0$ °C, por 4 horas e 32 rpm. Após o período de incubação, foi interrompida a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% em cada tubo. Assim, o espectrofotômetro foi zerado pelo tubo de controle negativo e as leituras de absorvância da turbidez apresentada para cada concentração foram efetuadas no comprimento de onda de 530 nm em cubetas de quartzo de 1 cm. A Figura 41 representa as etapas realizadas para o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico. Para cada teste foram calculados o teor e os resultados analisados estatisticamente.

Figura 41- Etapas para o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.4.6. Obtenção da curva analítica

Para o método microbiológico foi utilizado o delineamento 3x3, conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira (2010) e a curva analítica foi obtida de acordo com o descrito no item 6.4.4.5. Um gráfico foi construído para a obtenção da reta, no qual plotou-se o logaritmo da concentração *versus* a média das absorvâncias de cada uma das concentrações da CEF SQR. Neste método foram realizadas três curvas, sendo cada uma em dia diferente.

6.4.4.7. Determinação da potência de cloridrato de cefepima

Através da equação de Hewitt (2004), apresentada na Equação 14, foi possível calcular o teor do antimicrobiano, onde foram utilizadas as médias de absorvância dos tubos obtidas com as três doses de CEF SQR e de CEF amostra.

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

$$M = F/b \qquad b = E/I$$

Equação 14

Em que:

$$F = 1/3 [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) - (\bar{P}1 + \bar{P}2 + \bar{P}3)]$$

I = Logaritmo da razão das doses

$$E = 1/4 [(\bar{A}3 + \bar{P}3) - (\bar{A}1 + \bar{P}1)]$$

6.4.4.8. Validação do método

O método microbiológico turbidimétrico foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

6.4.4.8.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada por uma curva analítica construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, conforme descrito no item 6.4.4.6. Os resultados obtidos após a construção da curva analítica foram utilizados para obtenção da equação da reta através do método dos mínimos quadrados, verificando também a linearidade e o paralelismo através da análise de estatística de variância (ANOVA).

6.4.4.8.2. Precisão

A precisão foi determinada por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias e entre analistas). Para a repetibilidade foi realizada a leitura de sete tubos diferentes, na mesma concentração de CEF SQR (54,0 µg/mL), no mesmo dia e mesmas condições experimentais.

Os resultados obtidos foram avaliados através dos valores calculados do desvio padrão relativo (DPR%). Por outro lado, a precisão intermediária foi avaliada através da realização de determinações da potência de cloridrato de cefepima na amostra de pó liofilizado para solução injetável, em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados e avaliados (ICH, 2005).

6.4.4.8.3. Exatidão

Ensaio de recuperação foram realizados para se obter a exatidão do método, sendo adicionadas quantidades conhecidas de CEF SQR a quantidades conhecidas de CEF amostra (ICH, 2005). Os testes foram realizados em triplicata e do mesmo modo como descritos no item 6.4.4.5, com exceção do preparo das soluções que foram preparadas em três níveis, R1, R2 e R3, apresentadas pela Tabela 67. A Equação 5 determinada pela AOAC (2002) e descrita no item 6.1.1.6.3 foi utilizada para calcular a porcentagem de CEF recuperada.

Tabela 67- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método microbiológico por turbidimetria

	CEF amostra (100 µg/mL) (mL)	CEF SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^a
Amostra	3,6	---	36,0
R1	3,6	0,72	43,2
R2	3,6	1,80	54,0
R3	3,6	2,88	64,8

^aBalão volumétrico de 10 mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.4.8.4. Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de pequenas alterações em alguns parâmetros do teste já estabelecido descritos na Tabela 68. A potência de CEF amostra foi avaliada em parâmetros normais e alterados paralelamente, verificando ao final se ocorreu interferência das modificações no resultado.

Tabela 68- Variáveis selecionadas para avaliação da robustez no método microbiológico turbidimétrico

Fator	Condição normal	Condições variadas
Volume de meio de cultura	10,0 mL	10,1 mL 9,9 mL
Marca do meio de cultura	Oxoid [®]	BD [®]
Tempo de incubação no <i>shaker</i>	4 h	4 h 05 min 3 h 55 min
Comprimento de onda da leitura do teste	530 nm	532 nm 528 nm

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.5. Resultados

Durante o desenvolvimento do método turbidimétrico para quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável, foram realizados experimentos com diferentes concentrações de CEF e micro-organismos, buscando os parâmetros ideais para o método. A princípio utilizou-se a cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150 para a realização de alguns ensaios, no entanto esta cepa não foi apropriada para o teste, pois apresentou crescimento e controles positivos baixos, próximos à menor concentração de fármaco avaliado.

Posteriormente, foram realizados ensaios com o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1606, que apresentou resultados não muito satisfatórios, já que ocorreu a presença de alguns grumos de crescimento microbiano, promovendo certa interferência nas análises. Além disto, esta cepa não apresentou alta sensibilidade ao cloridrato de cefepima, com variação nos valores das absorvâncias das diferentes concentrações avaliadas, tornando inviável e irreprodutível o seu uso para os ensaios turbidimétricos.

Por fim, foram realizados novos experimentos com uma cepa diferente de *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538 IAL 2082, sendo avaliada a sensibilidade frente a várias concentrações de CEF verificando uma faixa linear de trabalho. Os resultados apresentados para esta cepa foram satisfatórios, mostrando-se apropriado e reprodutível para a análise de quantificação de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico. A faixa de trabalho em que as concentrações apresentaram mais lineares foi de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL. A Figura 42 representa o ensaio microbiológico por turbidimetria realizado para a determinação de CEF.

Figura 42- Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico desenvolvido e validado para a determinação da potência de CEF realizado nas concentrações de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL. C-: Controle negativo; C+: Controle positivo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.5.1. Linearidade

Na Tabela 69 são apresentados os valores de absorvância obtidos para as soluções em diferentes concentrações de CEF SQR e CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável durante avaliação da linearidade do método.

Tabela 69- Valores das absorvâncias de CEF SQR e CEF amostra para a determinação da curva analítica pelo método turbidimétrico

$\mu\text{g/mL}$	Absorvâncias ^a					
	P1 ^b	P2 ^b	P3 ^b	A1 ^c	A2 ^c	A3 ^c
Dia 1	0,823	0,624	0,377	0,816	0,618	0,366
Dia 2	0,868	0,631	0,364	0,852	0,600	0,352
Dia 3	0,851	0,629	0,376	0,836	0,605	0,368
Média	0,847	0,628	0,372	0,835	0,608	0,362
DPR%^d	2,68	0,57	1,94	2,16	1,53	2,41

^aMédia de três determinações;

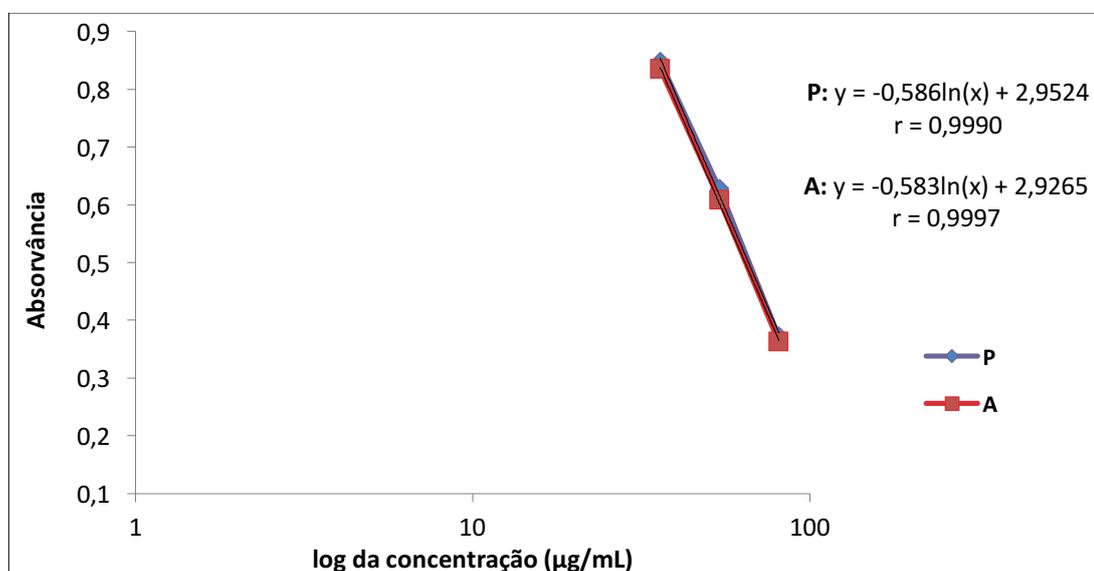
^bConcentrações de CEF SQR de 36,0 (P1); 54,0 (P2) e 81,0 (P3) $\mu\text{g/mL}$;

^cConcentrações de CEF amostra de 36,0 (A1); 54,0 (A2) e 81,0 (A3) $\mu\text{g/mL}$;

^dDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as curvas analíticas de CEF SQR e CEF amostra (Figura 43) foram plotados gráficos com as médias dos valores das absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, foram: $y = -0,586\ln(x) + 2,9524$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9990 para a CEF SQR e $y = -0,583\ln(x) + 2,9265$, com r de 0,9997 para CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.

Figura 43- Curvas analíticas das soluções de CEF SQR e CEF amostra, em concentrações de 36,0; 54,0 e 81,0 $\mu\text{g/mL}$ obtidas pelo método turbidimétrico. **P:** Padrão; **A:** Amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados das curvas analíticas de CEF foram calculados estatisticamente pela ANOVA e são apresentados na Tabela 70.

Tabela 70- Análise estatística de variância das absorvâncias obtidas nas curvas analíticas do CEF pelo método turbidimétrico

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F_{cal}	F_{tab}
Preparação	1	0,000939	0,000939	4,833820	4,96
Regressão	1	0,673554	0,673554	3467,76*	4,96
Desvio de Paralelismo	1	0,000004	0,000004	0,021023	4,96
Quadrático	1	0,000756	0,000756	3,893513	4,96
Diferença de Quadrático	1	0,000078	0,000078	0,401722	4,96
Entre doses	5	0,675331	0,135066	695,38150*	3,33
Entre tubos	2	0,000196	0,000098	0,505406	4,10
Dentro (erro)	10	0,001942	0,000194		
Total	17	0,677470			

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.5.2. Precisão

Para a precisão do método foram realizados os parâmetros através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias e entre analistas). Para o parâmetro de repetibilidade foram analisados sete tubos com a dose mediana de CEF SQR e avaliados perante os valores de DPR% apresentados. Os resultados apresentados para as análises no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 1,86%.

Por outro lado, a precisão intermediária foi determinada através de três curvas analíticas construídas em dias diferentes. Os resultados foram analisados e comparados entre si apresentando a média da potência de 102,46%, com DPR de 0,84%.

As análises entre analista também foram realizadas e apresentaram potência média de 101,99% e DPR de 0,71%, como apresentado na Tabela 71.

Tabela 71- Avaliação da precisão intermediária pelo método turbidimétrico para quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Precisão intermediária			
Precisão interdias		Precisão entre analistas	
Dia 1	101,50	Analista 1	102,50
Dia 2	103,17		
Dia 3	102,71	Analista 2	101,47
Média	102,46		101,99
DPR%^a	0,84		0,71

^aDesvio Padrão Relativo.**Fonte:** Elaborada pelo autor.

6.4.5.3. Exatidão

Na Tabela 72 são apresentados os resultados da exatidão do método que foi realizada pela técnica da adição, para a recuperação, sendo calculado pela Equação 5 para cada nível ensaiado. O valor médio apresentado para recuperação é de 99,92%.

Tabela 72- Determinação da exatidão para análise de CEF por método turbidimétrico

	Concentração esperada de CEF (µg/mL)	Concentração encontrada de CEF^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR%^b
R1	43,2	43,24	100,09		
R2	54,0	53,28	99,66	99,92	0,23
R3	64,8	64,80	100,00		

^aMédia de três determinações; ^bDPR% = Desvio Padrão Relativo.**Fonte:** Elaborada pelo autor.

6.4.5.4. Robustez

A robustez foi determinada realizando pequenas modificações dos parâmetros de forma individual, quais sejam: volume do meio de cultura, marca do meio de cultura, tempo de incubação no *shaker* e o comprimento de onda para leitura dos resultados. Os resultados da

potência de cloridrato de cefepima na forma farmacêutica apresentados na Tabela 73 foram analisados e verificou-se que estas modificações não apresentaram diferença significativa, apresentando valores de DPR inferiores a 1,17%.

Tabela 73- Valores apresentados para a determinação da robustez no método microbiológico turbidimétrico

Variável	Condições variadas	Cefepima ^a (%)	Média (%)	DPR% ^b
Volume de meio de cultura (mL)	10,1	100,72	101,94	1,16
	10,0	102,03		
	9,9	103,08		
Marca do meio de cultura	Oxoid [®]	102,01	102,55	0,74
	BD [®]	103,09		
Tempo de incubação no <i>shaker</i>	4 h 05 min	102,60	102,16	0,38
	4 h	102,03		
	3 h 55 min	101,86		
Comprimento de onda da leitura (nm)	532	102,79	102,15	0,58
	530	102,03		
	528	101,62		

^aMédia de três determinações; ^bDPR% = Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.6. Discussão

Muitas análises realizadas para a quantificação de antimicrobianos por meios físicos e químicos proporcionam confiabilidade nos resultados e precisões apropriadas, mas não conseguem demonstrar a atividade biológica desses medicamentos. Dentre este e outros fatores, os métodos microbiológicos, diferentes dos físico-químicos, fornecem a potência de um antimicrobiano, passo importante para a fabricação e controle de qualidade desses medicamentos, e quando comparados a métodos físico-químicos, diferença significativa poderia ser encontrada nos resultados (MORENO, SALGADO, 2007).

O método foi validado de acordo com o preconizado na literatura ICH (2005), Farmacopeia Brasileira (2010) e Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003). Para o método microbiológico por turbidimetria desenvolvido para a quantificação de cloridrato de cefepima em pó liofilizado para solução injetável foram determinados experimentalmente alguns parâmetros no decorrer das análises, tais como, faixa de trabalho, micro-organismo e tempo de

incubação, sempre buscando as melhores condições para a definição do teste. A faixa de trabalho foi escolhida após se avaliar a sensibilidade frente à cepa utilizada nos ensaios, sendo de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL. Esta faixa apresentou melhor linearidade possibilitando análises de CEF amostra com adequado paralelismo em relação à reta do padrão. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi selecionada como o micro-organismo para o teste de turbidimetria, pois diante dos resultados encontrados nos ensaios preliminares, a cepa se mostrou sensível ao cloridrato de cefepima, além de ser um micro-organismo comumente utilizado para ensaios desta natureza, apresentando-se estável e com crescimento simples em meio de cultura.

A potência determinada de CEF presente nas amostras de pó liofilizado para solução injetável foi de 102,46%, estando dentro da faixa delimitada pelo compêndio oficial que é de 90% a 115% (USP 37, 2014).

Nos parâmetros avaliados para a validação do método turbidimétrico, a linearidade apresentou resultados apropriados tanto para a análise estatística quanto para os coeficientes de correlação (r). Através dos resultados estatísticos apresentados na Tabela 70 foi evidenciado que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas de CEF SQR e CEF amostra. Através da curva analítica foram calculados os coeficientes de correlação para avaliar a linearidade. Os valores de r apresentados pelo método foram de 0,9990 para a CEF SQR e 0,9997 para CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, comprovando que o método é linear. Esta evidência foi concluída através do parâmetro “quadrático” que revelou valor de F_{cal} menor que F_{tab} , sendo de 3,893513 e 4,96, respectivamente. Do mesmo modo, ocorreu com a “diferença de quadrático”, que apresentou o F_{cal} de 0,401722 inferior ao F_{tab} que é de 4,96. O método não apresentou diferença significativa na inclinação das curvas analíticas, pois o resultado para o “desvio de paralelismo” das curvas teve o seu valor de F_{cal} (0,021023) abaixo do F_{tab} (4,96). Utilizou-se um nível de significância de 5% para esta análise.

A precisão por repetibilidade (intradia) foi realizada através da leitura de sete tubos diferentes, na mesma concentração de 54 µg/mL e em mesmas condições experimentais. A precisão interdias e entre analistas foi avaliada através da determinação e comparação das potências de CEF, nas mesmas condições experimentais, porém em dias diferentes para a interdias e com analistas diferentes para a entre analistas. Os resultados de DPR% obtidos para as análises de precisão estão dentro do limite estabelecido pela Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003) que é de 5%, com valores de 1,86%, 0,84% e 0,71% respectivamente, para as precisões intradia, interdias e entre analistas (Tabela 71).

Através do teste de adição para recuperação pode-se comprovar a exatidão do método microbiológico, na qual quantidades conhecidas do CEF SQR foram adicionadas a quantidades

conhecidas de CEF amostra, para posterior quantificação do fármaco. O valor médio obtido para a recuperação foi de 99,92%, indicando a exatidão do método.

A determinação da robustez do método foi verificada após realizar pequenas variações nos parâmetros já estabelecidos para o teste. Os parâmetros avaliados foram o volume de meio de cultura, a marca do meio de cultura, o tempo de incubação no *shaker* e o comprimento de onda para as leituras finais do teste no espectrofotômetro. Os resultados foram satisfatórios, pois não houve diferença significativa entre as potências dos parâmetros avaliados e, além disso, os seus DPR% apresentaram valores dentro do limite preconizado que é 5%. Assim, pode-se dizer que este método desenvolvido para quantificação de CEF em ensaio microbiológico por turbidimetria é robusto.

Em busca realizada na literatura e em bancos de dados, não foram encontradas informações que descrevessem a quantificação de cloridrato de cefepima através de análises microbiológicas por turbidimetria. Foram reportados alguns artigos para o método de difusão em ágar, microdiluição em caldo, diluição em ágar e disco-difusão em ágar, com intuito de avaliação de CIM (Concentração Inibitória Mínima), para dosagem em tecidos e secreções ou para parâmetros farmacocinéticos de matrizes biológicas (PAPAGORAS et al., 2003; VEDEL, 2005; SADER; FRITSCHÉ; JONES, 2006; SOUZA et al., 2006; GOUDAH et al., 2006; PETRIKKOS et al., 2006; ABD EL-ATY et al., 2007; MIRSALEHIAN et al., 2010; WAGNER et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2011; JABALAMELI et al., 2012; LAMY et al., 2012; EL-HEWAITY, 2014). As análises realizadas pelo método de difusão em ágar possuem algumas desvantagens perante o método turbidimétrico desenvolvido neste trabalho, que são: dificuldade de difusão do fármaco avaliado no meio de cultura sólido, maior tempo de incubação e, além disso, é necessário que tenha um crescimento microbiano homogêneo sobre a placa, para que os halos formados estejam bem delimitados e com diâmetros apropriados para serem avaliados. Por outro lado, o método turbidimétrico não apresenta estes problemas para a análise, visto que os ensaios não são realizados em um meio de cultura sólido e sim em um caldo, onde o crescimento é uniforme e se dá com maior facilidade.

Portanto, o método microbiológico por turbidimetria proposto para a quantificação de cloridrato de cefepima em pó liofilizado para solução injetável apresentou-se linear, preciso, exato e robusto, atendendo a todas as exigências e promovendo confiabilidade para os ensaios, podendo ser utilizado em análises de rotina do controle de qualidade na indústria farmacêutica, como uma opção para análise microbiológica, em relação aos métodos já reportados na literatura.

7. TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Vale ressaltar que o trabalho teve como proposta o desenvolvimento de métodos ecologicamente corretos, minimizando a utilização de solventes orgânicos e outros tóxicos, com baixa ou irrisória produção de resíduos, porém quando gerados, os resíduos oriundos das atividades laboratoriais foram recolhidos segundo protocolo estabelecido pela Comissão Local de Resíduos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, e encaminhados para tratamento específico. O tratamento é realizado com intuito de diminuir os danos causados ao meio ambiente.



ESPECTROMETRIA DE MASSAS

8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

Considerada uma das mais apropriadas técnicas instrumentais para a investigação de estrutura e reatividade de íons, a espectrometria de massas (EM) possui um meio elevado de vácuo, sendo de suma importância para estudar as propriedades intrínsecas de espécies iônicas em fase gasosa, oportunizando realizar uma equiparação com a fase condensada. Na fase gasosa por EM, podem ser produzidos com facilidade inúmeros íons complicados de serem isolados e/ou inacessíveis em solução (CABRINI, 2007). Nesta fase, alguns íons geralmente apresentam tempo de vida moderadamente prolongado, o que permite o isolamento e a fragmentação dos produtos intermediários ou da reação, por meio do processo de dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation* - CID) (SHUKLA; FUTRELL, 2000). Assim, a EM trata-se de um método altamente introduzido nas pesquisas de elucidação estrutural.

As análises por EM foram supervisionadas pelo Prof. Dr. Demian Ifa, sendo realizadas no Departamento de Química do *Centre for Research in Mass Spectrometry* (CRMS) da *York University* em Toronto no Canadá, por meio do suporte financeiro do programa de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - BEPE (Processo # 2015/01551-6), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

8.1. Espectrometria de massas com ionização por *Electrospray* (ESI-MS)

8.1.1. Material

O método por espectrometria de massas foi determinado em espectrômetro de massas *Ion trap* (Thermo Fisher Scientific™, EUA), modelo LTQ Linear, equipado com fonte de ionização por *electrospray* e bomba de seringa (Harvard Apparatus, EUA), operando em modo de íon positivo com as soluções de CEF preparadas em água purificada. As massas dos compostos foram automaticamente determinadas usando o *software* Xcalibur™ 3.0.

Para as análises de degradação acelerada utilizaram-se os solventes ácido clorídrico (Sigma-Aldrich®, EUA), hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich®, EUA) e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich®, EUA). Também foram utilizados solventes de grau de CLAE, tais como, etanol (Sigma-Aldrich®, EUA) e ácido fórmico (Sigma-Aldrich®, EUA). No decorrer da análise outros equipamentos também foram utilizados: balança analítica, banho de aquecimento e purificador de água (Barnsteade™ NANOpure™, Thermo Fisher Scientific™, EUA).

8.1.2. Método

8.1.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

A solução de CEF SQR (item 4.1) foi preparada do mesmo modo que a descrita no item 5.8.2.1. A partir da solução-mãe, alíquota de 4,0 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, sendo posteriormente completado com água purificada para a obtenção de solução com concentração de 40,0 µg/mL.

8.1.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Um *pool* realizado com a quantidade presente em 5 frascos-ampola de CEF em pó liofilizado para solução injetável foi utilizado para preparar a solução de CEF amostra (item 4.2), do mesmo modo que a descrita no item 5.8.2.2 com concentração teórica de 100 µg/mL. A concentração utilizada no teste foi preparada a partir desta solução-mãe, retirando-se alíquota de 4,0 mL e transferindo-a para balão volumétrico de 10 mL, completado em seguida com água purificada para obtenção de solução com concentração teórica de 40,0 µg/mL.

8.1.2.3. Preparo da solução de L-arginina

A solução placebo, contendo somente excipiente, foi preparada do mesmo modo que a descrita no item 5.6.1.2.3. A partir desta solução-mãe, alíquota de 4,0 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, completado com água purificada, obtendo solução na concentração de 29,0 µg/mL, concentração teoricamente idêntica àquela encontrada na solução de amostra.

8.1.2.4. Identificação das massas do CEF pela técnica de ESI-MS

A análise foi realizada para a determinação qualitativa das massas do CEF SQR, CEF amostra e seu adjuvante a L-arginina presente na sua formulação, bem como, dos fragmentos formados. Testes preliminares foram conduzidos a fim de encontrar condições favoráveis para análise da solução de CEF por ESI-MS.

Após definir as condições favoráveis, os ensaios foram preparados em espectrômetro equipado com fonte ESI no modo de íon positivo. Durante as análises foi utilizada a pressão da

nebulização por nitrogênio em 100 psi, com vazão de 7-12 L/min e a temperatura do gás em 285 °C. A voltagem do capilar foi selecionada em 5 kV. As amostras foram diretamente infundidas por meio de uma bomba de seringa com vazão de 5 µL/min. Os espectros completos (*full-scan*) foram adquiridos na faixa de m/z 50 a 800 amu e acumulados por 60 segundos. Todas as soluções foram acidificadas antes da análise, usando 0,1% de ácido fórmico.

8.1.2.5. Degradação acelerada

O perfil de fragmentação de CEF foi estudado sob várias condições, descritas abaixo. Todas as soluções de CEF amostra foram preparadas para gerar no final uma concentração de 40,0 µg/mL do fármaco. Aliquotas de cada solução foram analisadas em 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas de degradação.

- **Hidrólise ácida, alcalina e aquosa:** Para a degradação ácida, a solução de CEF foi preparada em HCl 0,1 M; a degradação alcalina foi preparada em NaOH 0,001 M e por fim, a degradação aquosa foi preparada em água. Essas soluções foram expostas à temperatura de 60 °C por 6 horas em banho de aquecimento.
- **Degradação oxidativa:** a solução de CEF foi preparada em H₂O₂ 0,05%, sendo exposta à temperatura de 60 °C por 6 horas em banho de aquecimento.
- **Degradação fotolítica:** a solução aquosa de CEF foi submetida à luz ultravioleta (UVC, 254 nm) em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 6 horas.

8.1.3. Resultados

A Figura 44 apresenta a técnica de ESI-MS utilizada em espectrômetro de massas para detectar as massas de CEF e L-arginina.

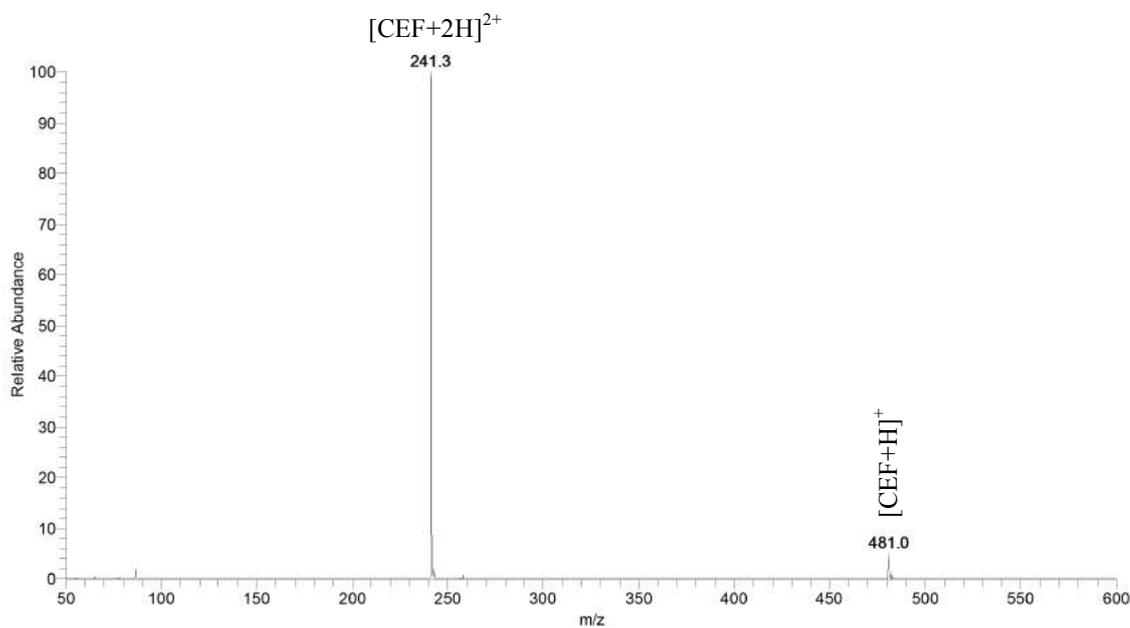
Figura 44- Análise de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).



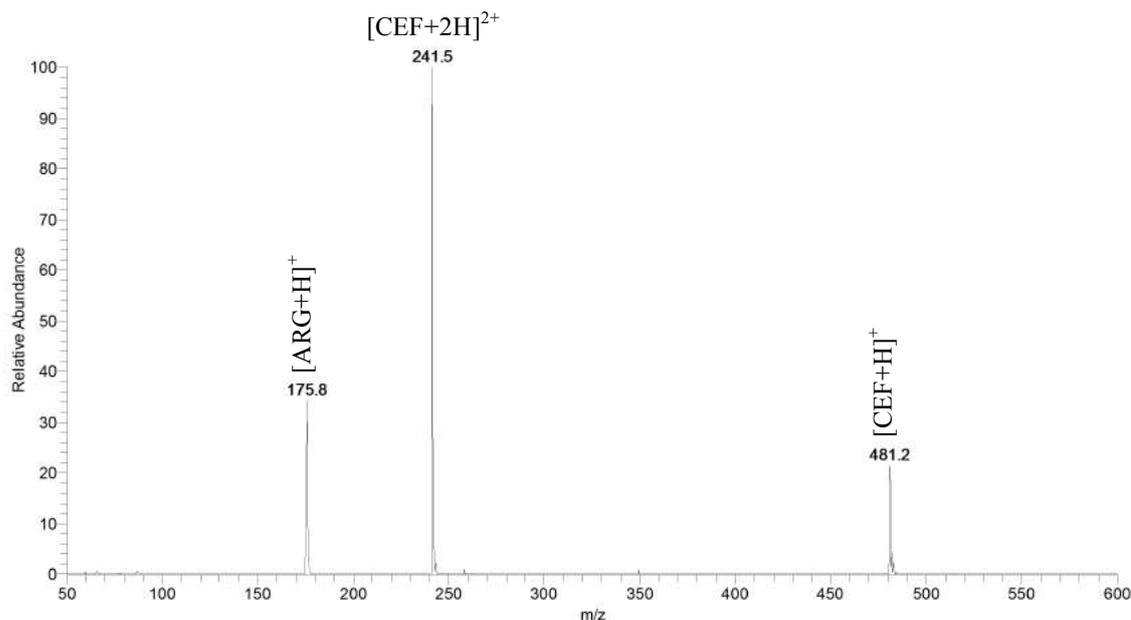
Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises realizadas pela técnica de ESI-MS em modo positivo apresentaram os seguintes espectros para CEF SQR, CEF amostra e L-arginina, ilustrados nas Figuras 45, 46 e 47, respectivamente.

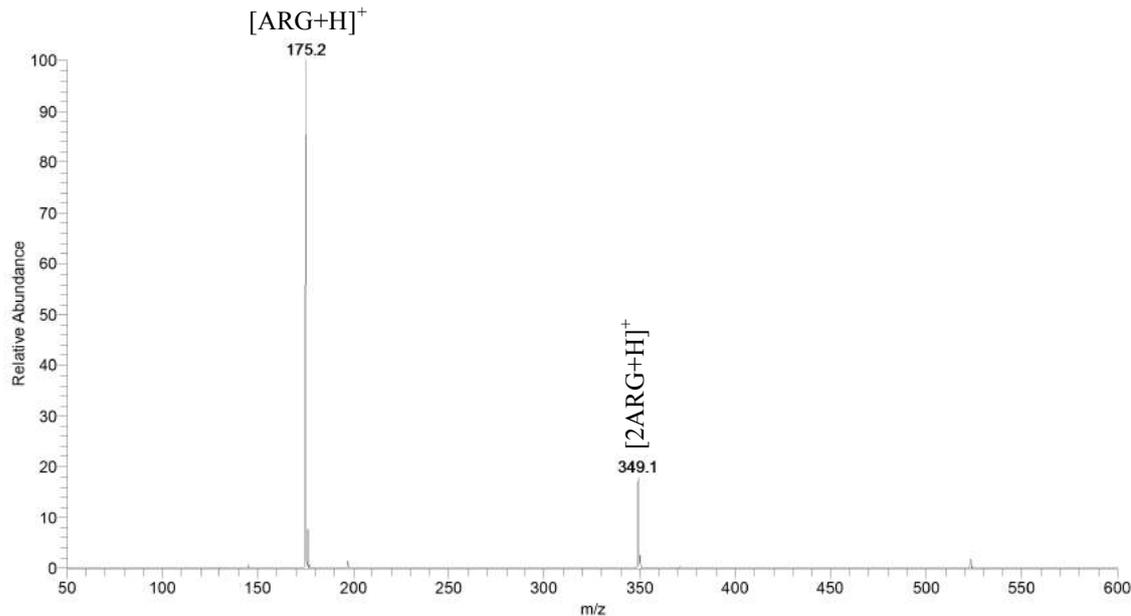
Figura 45- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF SQR (40 µg/mL).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 46- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor.

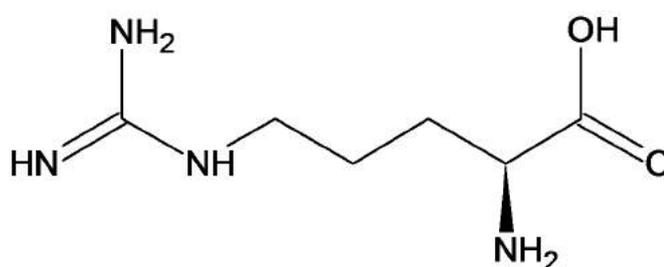
Figura 47- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de L-arginina (29 µg/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As massas apresentadas nos espectros correspondem com aos compostos analisados, resultando nos íons com m/z de 241 $[CEF+2H]^{2+}$ (cefepima duplamente protonada) e 481 $[CEF+H]^+$ (cefepima protonada) para CEF SQR e CEF amostra. Os espectros da L-arginina

apresentaram os íons de m/z 175 $[\text{ARG}+\text{H}]^+$ (arginina protonada) e 349 $[2\text{ARG}+\text{H}]^+$ (dímero protonado). A estrutura molecular da L-arginina está representada na Figura 48.

Figura 48- Estrutura química do excipiente L-arginina (CAS 74-79-3).

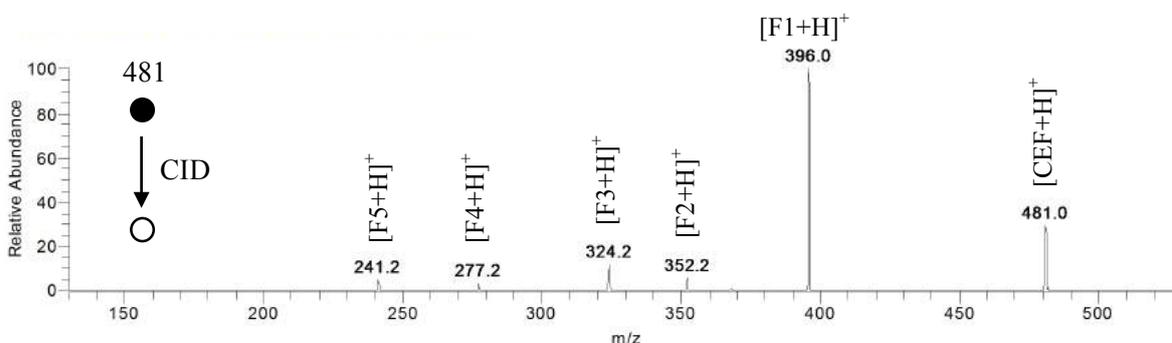


Fonte: Elaborada pelo autor.

8.1.3.1. Fragmentação de segunda ordem (MS/MS) da molécula de CEF

Análise de fragmentação de segunda ordem MS/MS ou MS^2 , realizada através do processo denominado CID (dissociação induzida por colisão), foi executada por meio da técnica de ESI-MS/MS com a molécula de CEF. Através destes experimentos foi possível observar a quebra da molécula de CEF e propor uma rota para sua fragmentação. O espectro obtido a partir de CEF com m/z de 481 $[\text{CEF}+\text{H}]^+$ em modo positivo é apresentado na Figura 49.

Figura 49- Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS do íon precursor de m/z 481 $[\text{CEF}+\text{H}]^+$.

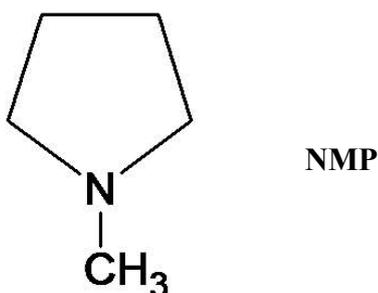


Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro ESI-MS/MS do íon de m/z 481, Figura 45, teve como resultado os íons de m/z 396 $[\text{PD}1+\text{H}]^+$, 352 $[\text{PD}2+\text{H}]^+$, 324 $[\text{PD}3+\text{H}]^+$, 277 $[\text{PD}4+\text{H}]^+$ e 241 $[\text{PD}5+\text{H}]^+$. O íon

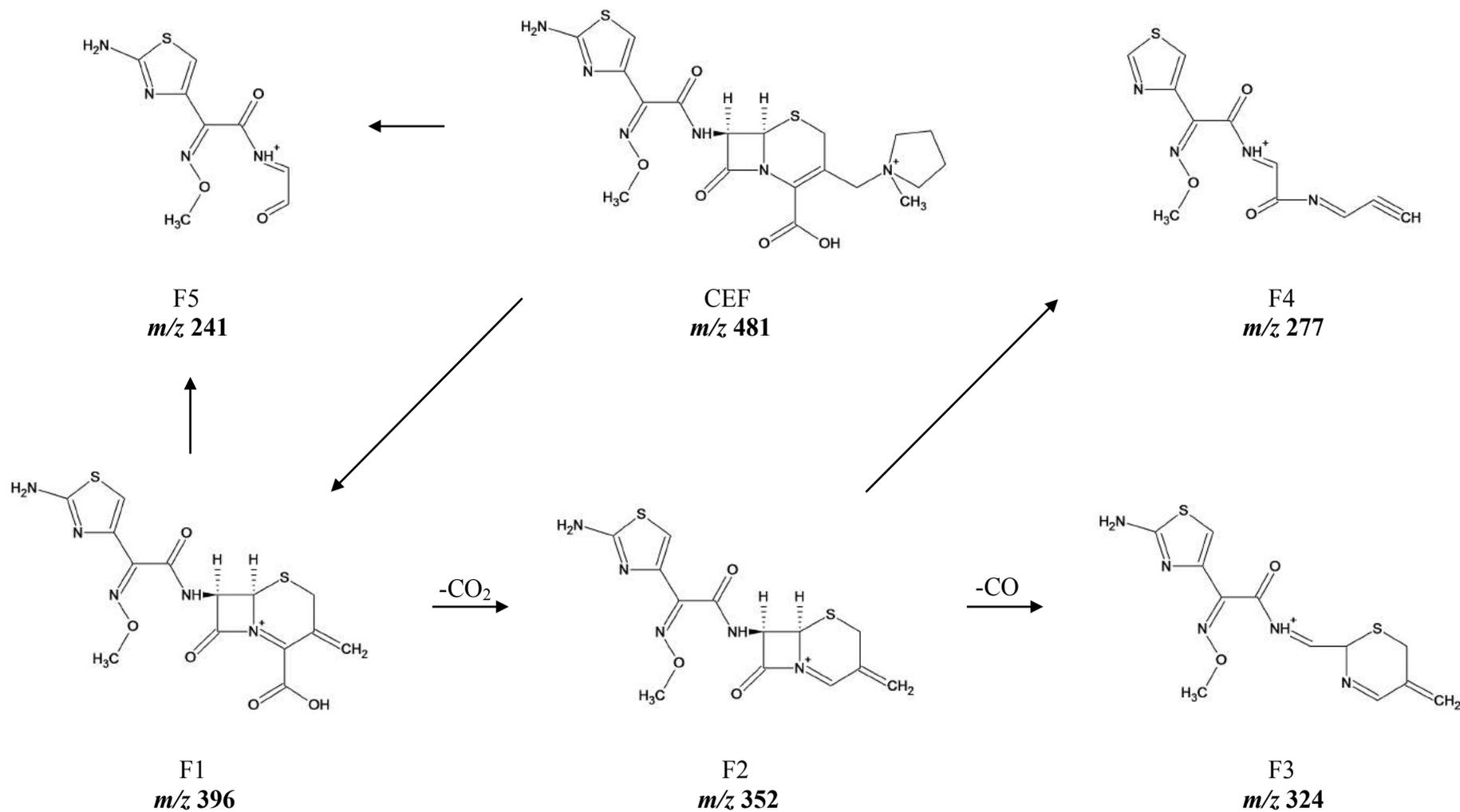
protonado com m/z 86 atribuído à *N*-metilpirrolidona (NMP) não foi visualizado, devido ao limite apresentado pelo equipamento em adquirir o MS/MS do CEF tendo como valor mínimo de 130 amu, acima do valor massa da NMP. A NMP é uma impureza, podendo estar presente na formulação do CEF em pó liofilizado para solução injetável como resultado da degradação do fármaco (SMITH et al., 2015). Esta impureza está representada na Figura 50.

Figura 50- Impureza derivada da degradação do CEF. NMP: *N*-metilpirrolidona.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio dos resultados obtidos das análises de ESI-MS/MS é apresentado no Esquema 1, a proposta da fragmentação para o íon m/z 481, referente à CEF. Os desenhos estruturais da fragmentação da molécula de CEF foram realizados pelo *software* ACD/ChemSketch® (Toronto, CA).

Esquema 1- Proposta para a fragmentação CID do íon de m/z 481, atribuído à cefepima [CEF+H]⁺.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fragmentação de CEF proposta neste trabalho ocorre através da quebra da molécula de CEF íntegra e ionizada m/z 481 $[\text{CEF}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$) nos fragmentos de m/z 241 $[\text{F5}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$) referente à abertura do anel β -lactâmico e de m/z 396 $[\text{F1}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2$) atribuído à perda do grupo da NMP pela clivagem da cadeia lateral R2 presente no C-3, sendo que para o F1 poderá ocorrer também a formação do F5. Na sequência, a molécula de F1 perde $-\text{CO}_2$, originando o íon de m/z 352 $[\text{F2}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$). A partir desta molécula de F2, ocorre a perda de $-\text{CO}$ formando outros dois fragmentos de m/z 324 $[\text{F3}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$) e 277 $[\text{F4}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$).

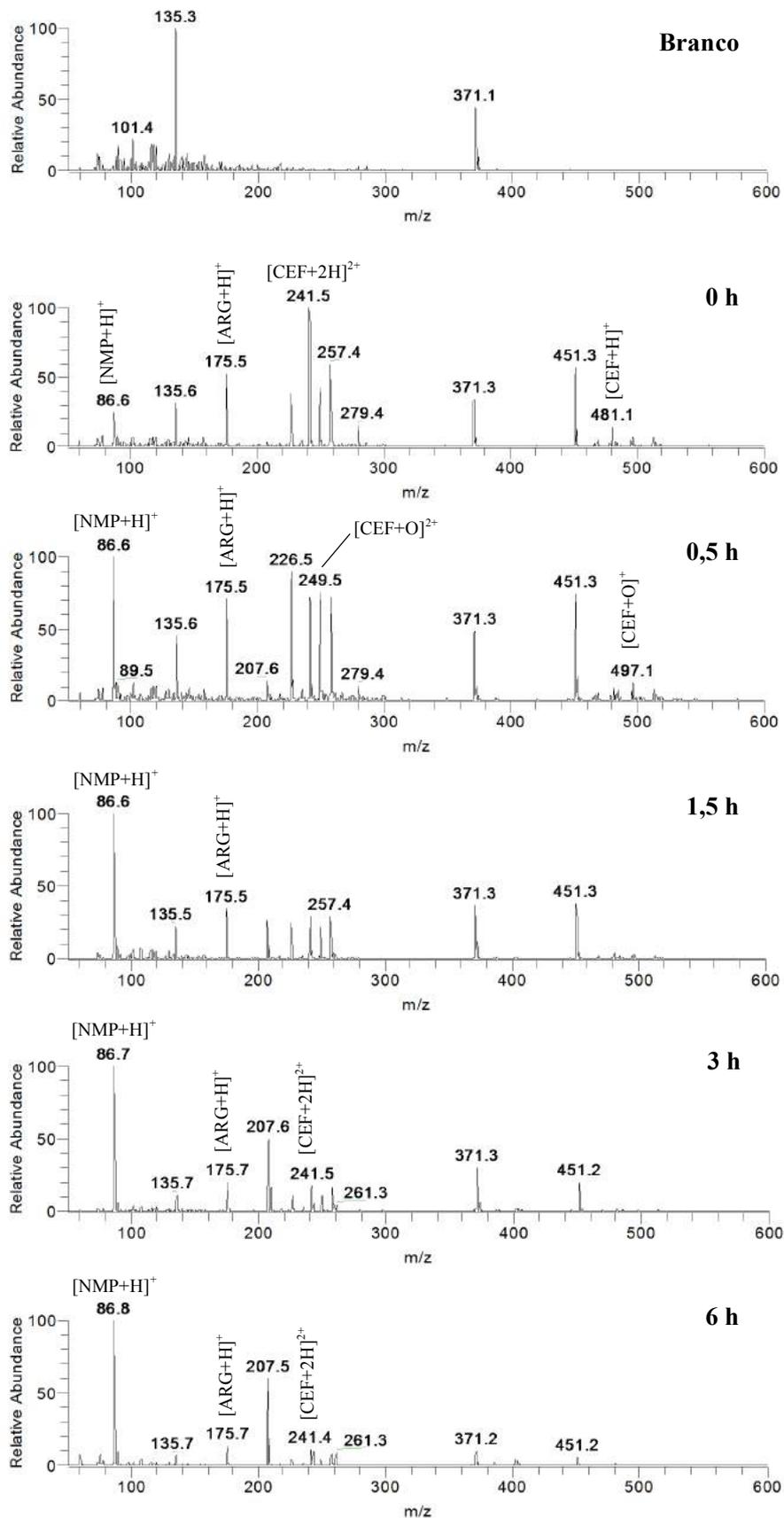
A fragmentação de CEF proposta teve embasamento em alguns artigos de degradação de antimicrobianos e compostos cefalosporínicos (BARBARIN; TILQUIN; HOFFMANN, 2001; DESHPANDE; BAHETI; CHATTERJEE, 2004; LI et al., 2005; FUKUTSU et al., 2006; CHONG; HU, 2008; LI et al., 2010; JAGADEESH KUMAR et al., 2010; LI; ZHANG; HU, 2014; ZALEWSKI; SKIBINSKI; CIELECKA-PIONTEK, 2014), os quais apresentam resultados semelhantes para alguns dos produtos de degradação formados.

8.1.3.2. Degradação acelerada pela técnica de ESI-MS

Neste método proposto foi possível verificar as possíveis massas dos produtos de degradação formados durante o experimento, realizados através da degradação acelerada da amostra de CEF em pó para solução injetável. Para todas as condições de estresse avaliadas ocorreu decréscimo do pico de CEF e também a formação de novos produtos nos espectros foi observada. Alguns espectros apresentaram massas idênticas em diferentes condições de estresse, assim, supostamente estes produtos formados são semelhantes.

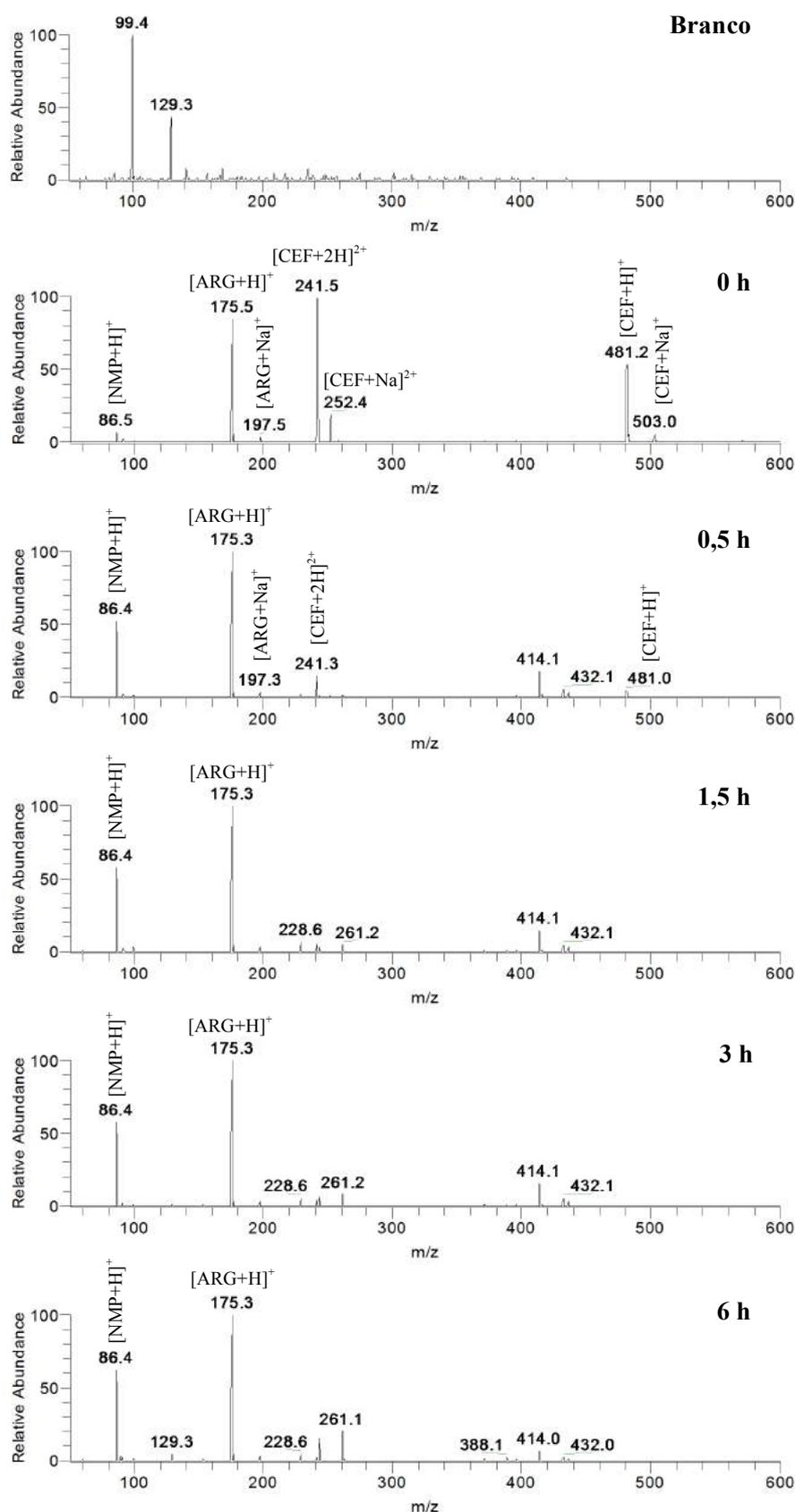
Os espectros com as degradações ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa são apresentados nas Figuras 51, 52, 53, 54 e 55, respectivamente, sendo possível a visualização das massas adicionais correspondentes aos produtos formados e a massa principal de CEF.

Figura 51- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação ácida (HCl 0,1 M) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: HCl 0,1 M.



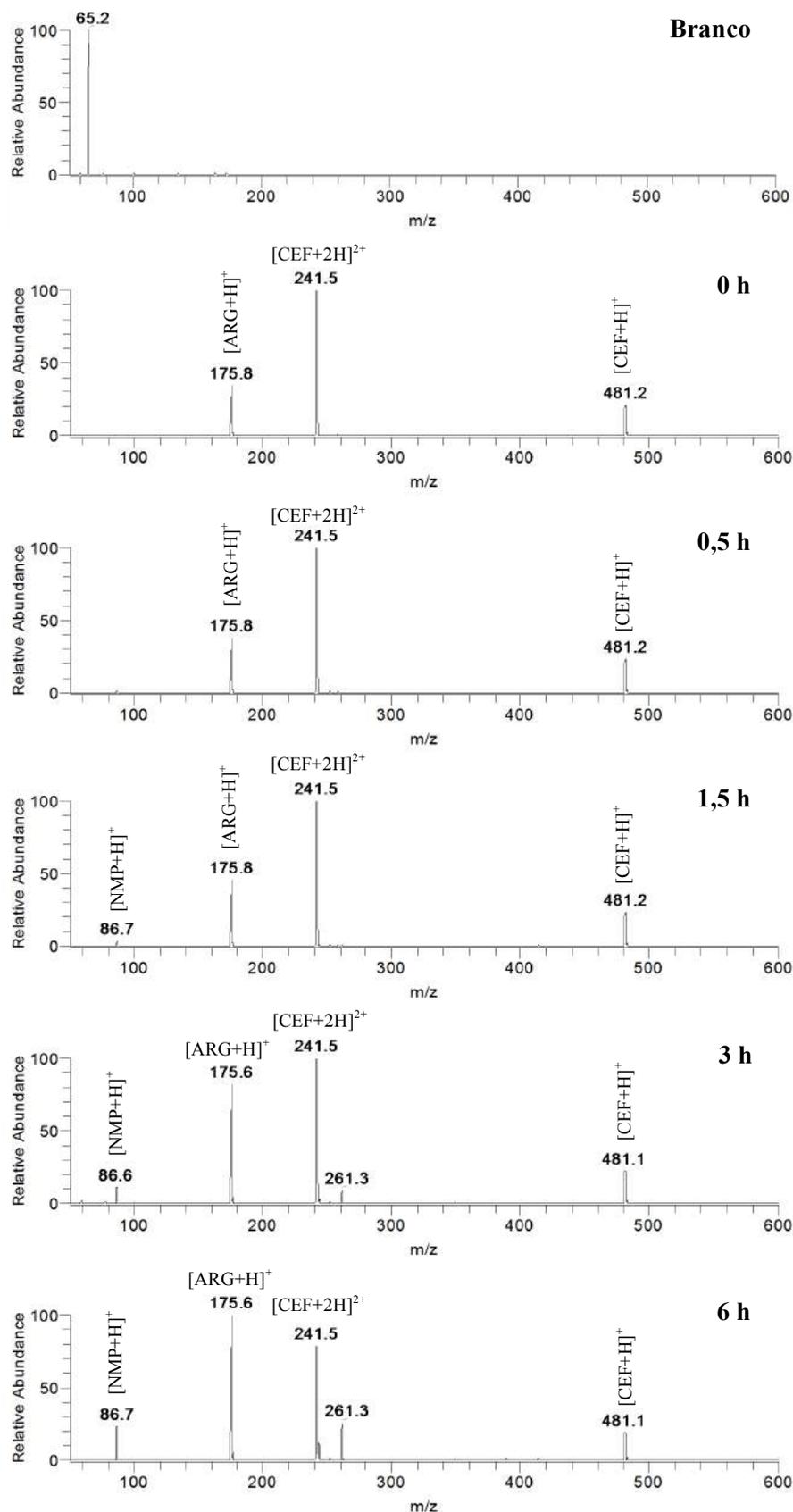
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 52- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação alcalina (NaOH 0,001 M) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: NaOH 0,001 M.



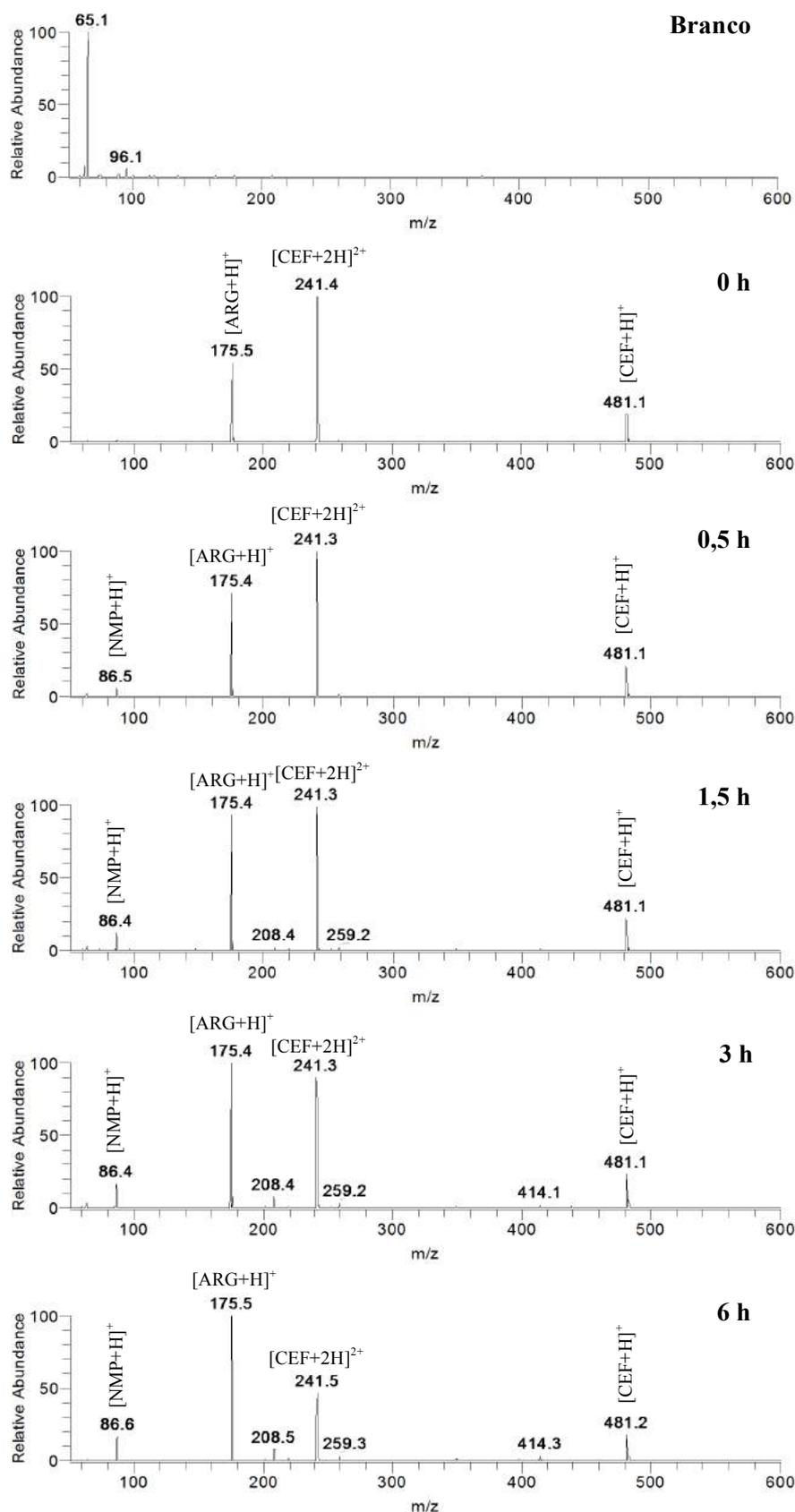
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 53- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação neutra (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: água purificada.



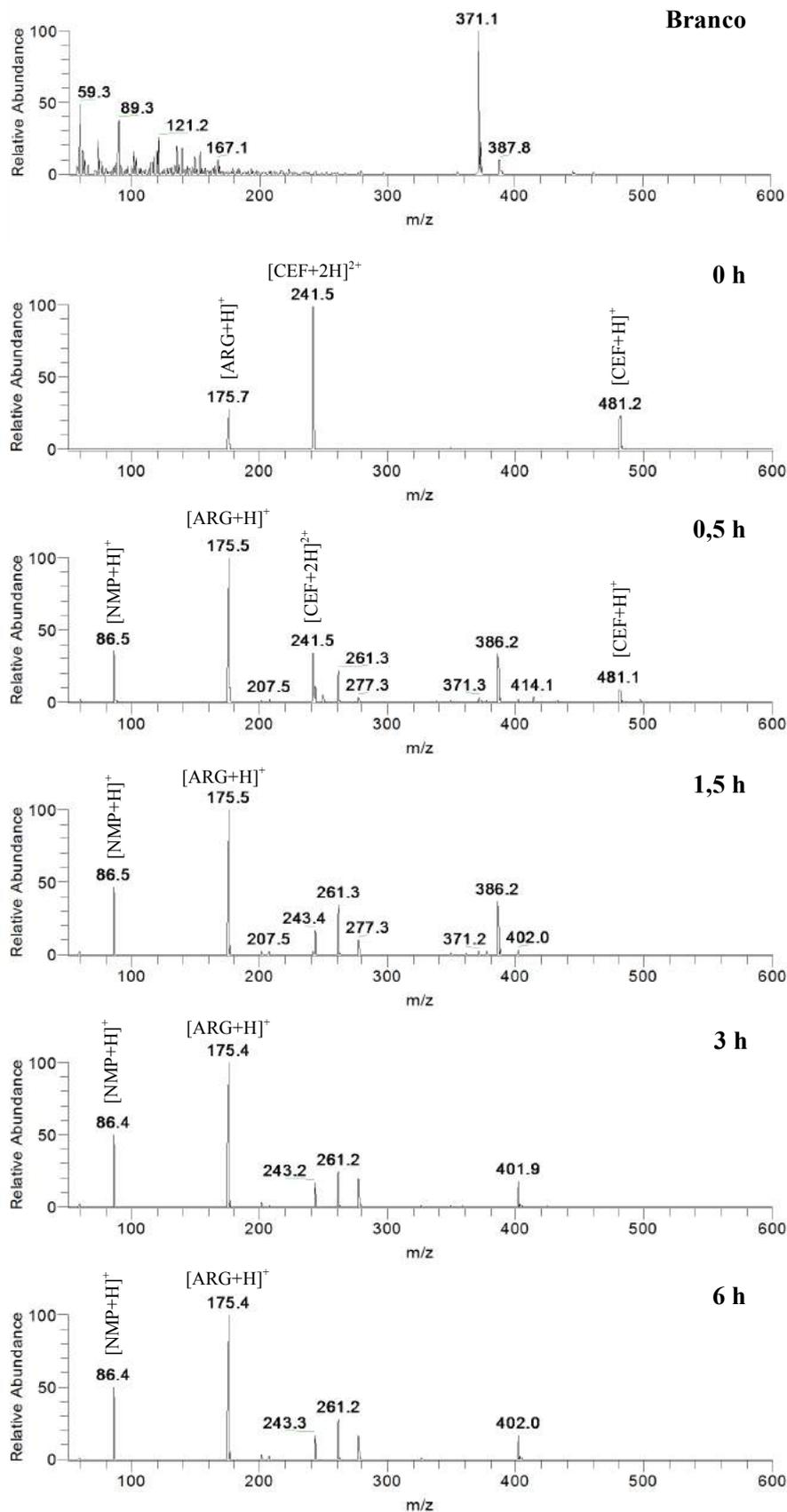
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 54- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação fotolítica (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a temperatura ambiente. Branco: água purificada.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 55- Espectro ESI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (40 µg/mL) submetida à degradação oxidativa (H₂O₂ 0,05%) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: H₂O₂ 0,05%.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na condição de estresse ácida (Figura 51) é apresentado um espectro referente ao branco da análise, que neste caso é o HCl 0,1 M. Os resultados para a degradação realizado na hidrólise em meio ácido são apresentados na Tabela 74 com suas respectivas massas (m/z).

Tabela 74- Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição ácida

m/z	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
207	PD11
226	PD10
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
249	CEF [CEF+O] ²⁺
257	PD8
279	PD5
451	PD1
481	CEF [CEF+H] ⁺
497	CEF [CEF+O] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na degradação básica representada pela Figura 52, observa-se primeiramente um espectro derivado do branco da análise, sendo realizado com o solvente NaOH 0,001 M. Nesta condição toda a degradação do CEF amostra foi observada a partir de 1,5 h de análise. A Tabela 75 apresenta a relação de todos os íons resultantes da hidrólise em meio alcalino.

Tabela 75- Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição alcalina

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
197	L-arginina [ARG+Na] ⁺
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
252	CEF [CEF+Na] ²⁺
261	PD7
414	PD2
481	CEF [CEF+H] ⁺
503	CEF [CEF+Na] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 53 apresenta a condição de estresse neutra, na qual o branco da análise realizado com água purificada. Para a hidrólise neutra não ocorreu a formação de muitos produtos e a relação das massas dos espectros são apresentadas na Tabela 76.

Tabela 76- Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição neutra

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
261	PD7
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A condição de estresse fotolítica (Figura 54), da mesma forma que a neutra, apresentou pouca formação de produtos, elencados na Tabela 77. Para o espectro do branco da análise foi utilizado água purificada.

Tabela 77- Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS de CEF para a condição fotolítica

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
414	PD2
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A última condição analisada através de ESI(+)-MS foi em meio oxidativo (Figura 55), onde o branco da análise foi realizado com H₂O₂ 0,05%. A degradação da CEF nesta condição foi relativamente rápida, após 1,5 h de análise já não foi possível visualizar os picos do CEF nos espectros. A Tabela 78 apresenta as massas dos produtos formados nesta análise.

Tabela 78- Relação dos picos apresentados na análise de ESI(+)-MS de CEF para a condição oxidativa

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
243	PD9
261	PD7
277	PD6
386	PD4
402	PD3
414	PD2
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

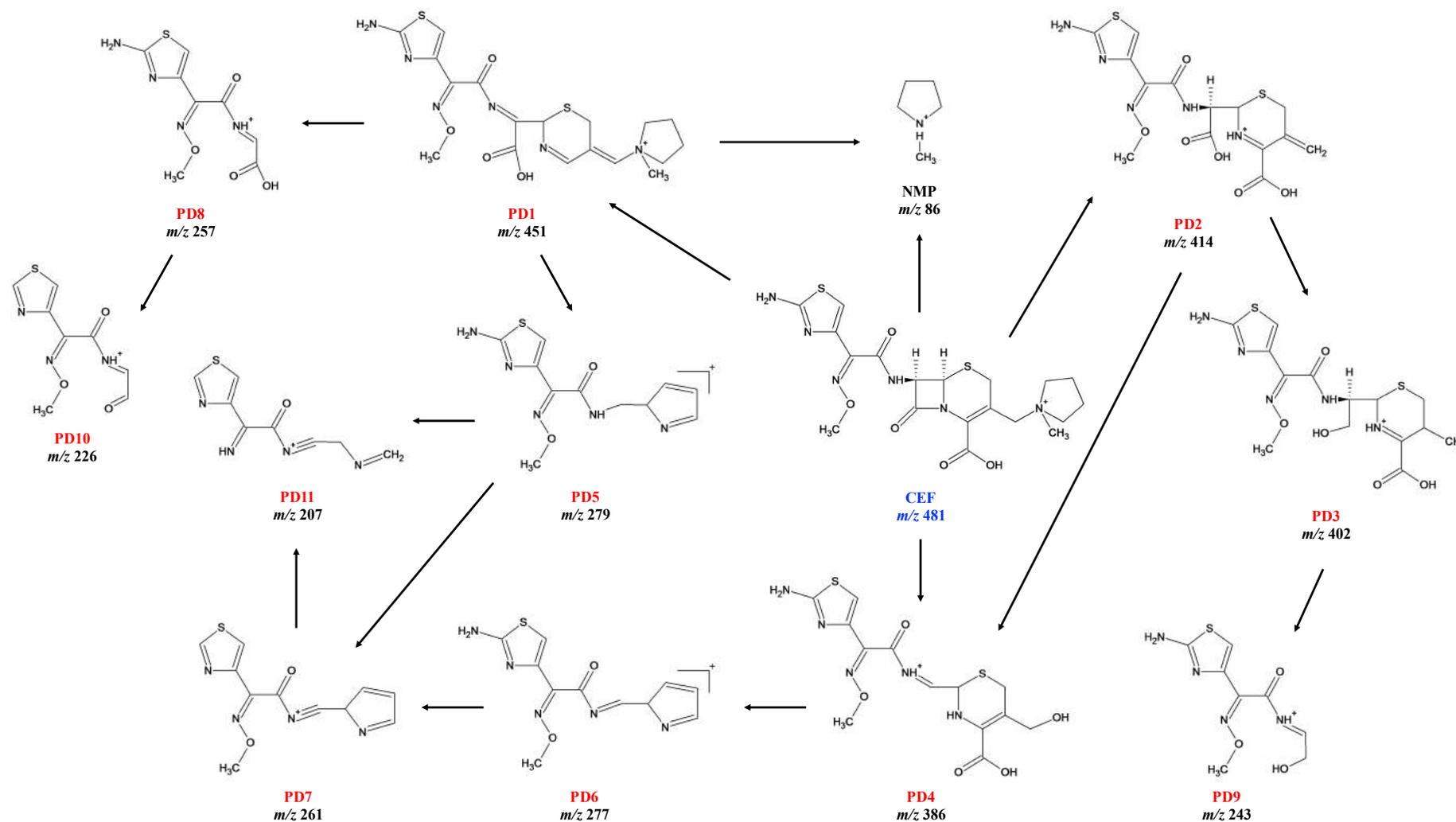
O estudo de degradação realizado pela técnica de ESI(+)-MS apresentou resultados relevantes para a pesquisa de CEF através das condições de estresse ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa. Por meio destas análises foi possível observar os produtos formados a partir de CEF e propor as rotas de degradação nas condições avaliadas, apresentadas no Esquema 2.

A proposta da fragmentação de CEF apresenta algumas modificações clássicas e importantes, que ocorrem na degradação de compostos β -lactâmicos, tais como, a perda do grupo da NMP pela clivagem da cadeia lateral R2 presente no C-3 (SMITH et al., 2015) e a quebra do anel β -lactâmico quando exposto em meio ácido ou alcalino, que também ocorre para as penicilinas (BASÁEZ; VANÝSEK, 1999). Estudos com a ceftazidima, uma cefalosporina de segunda geração, demonstraram similaridade na hidrólise do anel β -lactâmico, após sua solução aquosa ser exposta à alta temperatura, apresentando semelhança com o ocorrido com o CEF (FARINA et al., 1999). Outros estudos relacionados à quebra do anel β -lactâmico foram reportados na literatura, utilizando os fármacos ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, ceftriaxona, imipenem e penicilina (BRANCH et al., 1986; FRAU et al., 1997; ZAJĄC; MUSZALSKA, 1998; ZAJĄC; SIWEK; MUSZALSKA, 1998; HIRSCH et al., 1999; SACHER et al., 2001; SHAMSIPUR et al., 2002; DESHPANDE; BAHETI; CHATTERJEE, 2004; NÄGELE; MORITZ, 2005; LI et al., 2008; HIRTE et al., 2016).

A hidrólise da ligação entre o CO-N do anel β -lactâmico de CEF (m/z 481), a formação do grupamento carboxílico no anel β -lactâmico e a saída do grupo da NMP (m/z 86) sugerem a formação do produto PD2 de m/z 414, que já possuía um grupo livre de -COOH. Com isso, dois produtos são formados a partir de PD2, sendo que para a formação do primeiro ocorre a descarboxilação no anel β -lactâmico e a ligação de um radical hidroxila ao -CH₂ presente no C-3 formando o produto intermediário PD4 de m/z 386. Para o segundo produto, PD2 poderá perder a hidroxila do grupamento carboxílico do anel β -lactâmico dando origem ao produto PD3 de m/z 402. O produto PD3 poderá apresentar o rompimento da ligação do anel β -lactâmico formando o produto PD9 de m/z 243.

O PD4 pode sofrer processo da descarboxilação e as perdas do enxofre do anel diidrotiazina e do carbono com a hidroxila presente no C-3, ocorrendo o rearranjo das ligações entre os carbonos do anel de diidrotiazina formando o produto PD6 de m/z 277. Posteriormente, PD6 perde -NH₃ da molécula originando o produto PD7 de m/z 261, que ao final forma o produto PD11 de m/z 207.

Esquema 2- Proposta dos produtos de degradação formados a partir da molécula de CEF (m/z 481) exposta nas condições ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa obtidos por ESI(+)-MS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A outra parte da degradação de CEF (m/z 481) ocorre pela descarboxilação da molécula e pela hidrólise da ligação entre o CO-N do anel β -lactâmico mais a formação do grupamento carboxílico no anel β -lactâmico originando o produto PD1 de m/z 451, o qual posteriormente sofre a clivagem completa do anel β -lactâmico conduzindo ao produto PD8 de m/z 257. O PD1 poderá formar outro produto por meio da descarboxilação no anel β -lactâmico e pelas perdas do grupo da NMP e do enxofre do anel diidrotiazina, ocorrendo o rearranjo das ligações entre os carbonos do anel de diidrotiazina formando o produto PD5 de m/z 279. A partir do produto PD8, a molécula perde o grupo $-NH_2$ e a $-OH$ da carboxila formando o produto PD10 de m/z 226. O produto PD5 pode originar os produtos PD7 de m/z 261 e PD11 de m/z 207, sendo que para o PD7 também poderá ser formado o produto PD11.

Vale ressaltar que somente com estas análises de EM não se pode afirmar se o produto de degradação é primário ou secundário, sendo necessário estudos suplementares para a caracterização exata dos produtos apresentados.

A elaboração da proposta dos produtos formados a partir de CEF teve embasamento em alguns artigos de degradação de antimicrobianos contendo o anel β -lactâmico e compostos cefalosporínicos (FRAU et al., 1997; ZAJĄC; MUSZALSKA, 1998; ZAJĄC; SIWEK; MUSZALSKA, 1998; BASÁEZ; VANÝSEK, 1999; FARINA et al., 1999; HIRSCH et al., 1999; HALLIGAN et al., 2000; BARBARIN; TILQUIN; HOFFMANN, 2001; SACHER et al., 2001; SHAMSIPUR et al., 2002; DESHPANDE; BAHETI; CHATTERJEE, 2004; LI et al., 2005; NÄGELE; MORITZ, 2005; FUKUTSU et al., 2006; CHONG; HU, 2008; LI et al., 2008; KLAUSON et al., 2010; LI et al., 2010; JAGADEESH KUMAR et al., 2010; WANG; RUAN; SHAN, 2013; LI; ZHANG; HU, 2014; YAN; SONG, 2014; ZALEWSKI; SKIBINSKI; CIELECKA-PIONTEK, 2014; SMITH et al., 2015; HIRTE et al., 2016; MASOUD et al., 2016), os quais apresentam resultados semelhantes para alguns dos produtos de degradação formados.

A técnica de ESI-MS demonstrou ser sensível, eficaz e simples, podendo ser utilizada para análises qualitativas e estudos de estabilidade do CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável.

8.2. Espectrometria de massas com ionização por *Paper Spray* (PSI-MS)

A espectrometria de massas com ionização por *Paper Spray* (*Paper Spray Ionization Mass Spectrometry* - PSI-MS) apresenta algumas vantagens em relação à técnica de ESI-MS,

que é a não utilização de gás e de controle de temperatura, mas ao mesmo tempo pode apresentar algumas desvantagens dependendo do tipo de material utilizado para análise. O PSI-MS foi utilizado para avaliar o estudo de degradação da cefepima. Esta etapa foi realizada na *York University* no Canadá.

8.2.1. Material

O método foi determinado em espectrômetro de massas *Ion trap* (Thermo Fisher Scientific™, EUA), modelo LTQ Linear, equipado com fonte de ionização por *electrospray* e bomba de seringa (Harvard Apparatus, EUA), operando em modo de íon positivo com as soluções de CEF preparadas em água purificada. As massas dos compostos foram automaticamente determinadas usando o *software* Xcalibur™ 3.0. Na técnica de PSI-MS foram utilizados papéis filtros e politetrafluoretileno - PTFE (Teflon®).

Para as análises de degradação acelerada utilizaram-se os solventes ácido clorídrico (Sigma-Aldrich®, EUA), hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich®, EUA) e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich®, EUA). Também foram utilizados solventes de grau de HPLC, tais como, etanol (Sigma-Aldrich®, EUA) e ácido fórmico (Sigma-Aldrich®, EUA).

No decorrer da análise outros equipamentos também foram utilizados: balança analítica, banho de aquecimento e purificador de água (Barnstede™ NANOpure™, Thermo Fisher Scientific™, EUA).

8.2.2. Método

8.2.2.1. Preparo da solução de CEF SQR

A solução de CEF SQR (item 4.1) foi preparada pesando a massa de 20,88 mg e transferida para balão volumétrico de 10 mL, sendo posteriormente completado com água purificada, obtendo ao final solução na concentração de 2 mg/mL.

8.2.2.2. Preparo da solução de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável

Um *pool* realizado com a quantidade presente em 5 frascos-ampola de CEF em pó liofilizado para solução injetável foi utilizado para preparar a solução de CEF amostra (item 4.2), pesando a massa de 34,5 mg e transferindo-a para balão volumétrico de 10 mL, na

sequência completado com água purificada, obtendo ao final solução na concentração teórica de 2 mg/mL.

8.2.2.3. Preparo da solução de L-arginina

A solução placebo, contendo somente excipiente foi preparada pesando a massa de 14,5 mg de L-arginina e transferida para balão volumétrico de 10 mL, sendo completado com água purificada, obtendo solução na concentração de 1,45 mg/mL, concentração teoricamente idêntica àquela encontrada na solução de amostra.

8.2.2.4. Identificação das massas de CEF pela técnica de PSI-MS

A técnica de PSI-MS foi realizada com o intuito de incorporar novas metodologias de análise realizadas no controle de qualidade de CEF. Neste caso, a análise foi realizada para a determinação qualitativa das massas da CEF SQR, CEF amostra e seu excipiente a L-arginina presente na sua formulação, bem como, os fragmentos formados. Destaca-se que esta técnica possui uma grande praticidade no preparo e na realização das análises, tornando mais rápida a identificação do fármaco. Testes preliminares foram conduzidos, a fim de encontrar condições favoráveis para análise da solução de CEF por PSI-MS.

Os ensaios foram preparados em espectrômetro equipado com fonte ESI no modo de íon positivo. A técnica de PSI-MS não requer a nebulização por gás e o aquecimento. As análises foram realizadas utilizando PTFE (Teflon[®]), com a voltagem do capilar selecionada em 3,5 kV. Um volume de 10 µL da solução de CEF foi aplicado sobre o PTFE e na sequência um volume de 50 µL de etanol foi aplicado sobre a gota da solução de CEF presente no PTFE, a fim de auxiliar na dispersão da amostra durante a análise. Os espectros completos (*full-scan*) foram adquiridos na faixa de m/z 50 a 800 amu e acumulados por 30 segundos. Todas as soluções foram acidificadas antes da análise, usando 0,1% de ácido fórmico.

8.2.2.5. Degradação acelerada

O perfil de degradação de CEF foi estudado sob várias condições semelhante à descrita no item 6.3.2.1.2.5. Todas as soluções de CEF amostra foram preparadas para gerar no final a concentração teórica de 2,0 mg/mL do fármaco. Aliquotas de cada solução foram analisadas em 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas de degradação.

8.2.3. Resultados

Durante os ensaios preliminares foram realizados pequenos ajustes no método para definir a melhor condição de análise de CEF por meio da técnica de PSI-MS. Dentre estes ajustes, foram realizados ensaios com dois tipos de papéis: o papel filtro e o PTFE. O papel filtro utilizado nos testes preliminares apresentou ótima dissipação da amostra, porém, notou-se que durante os experimentos ocorreram problemas ocasionados pela descarga do eletrodo, de modo que houve a formação de arco elétrico entre o papel filtro e o *inlet* (dispositivo para introdução da amostra no espectrômetro), inviabilizando sua utilização neste caso. Isto provavelmente ocorreu pelo fato de se utilizar solução aquosa para o preparo da amostra.

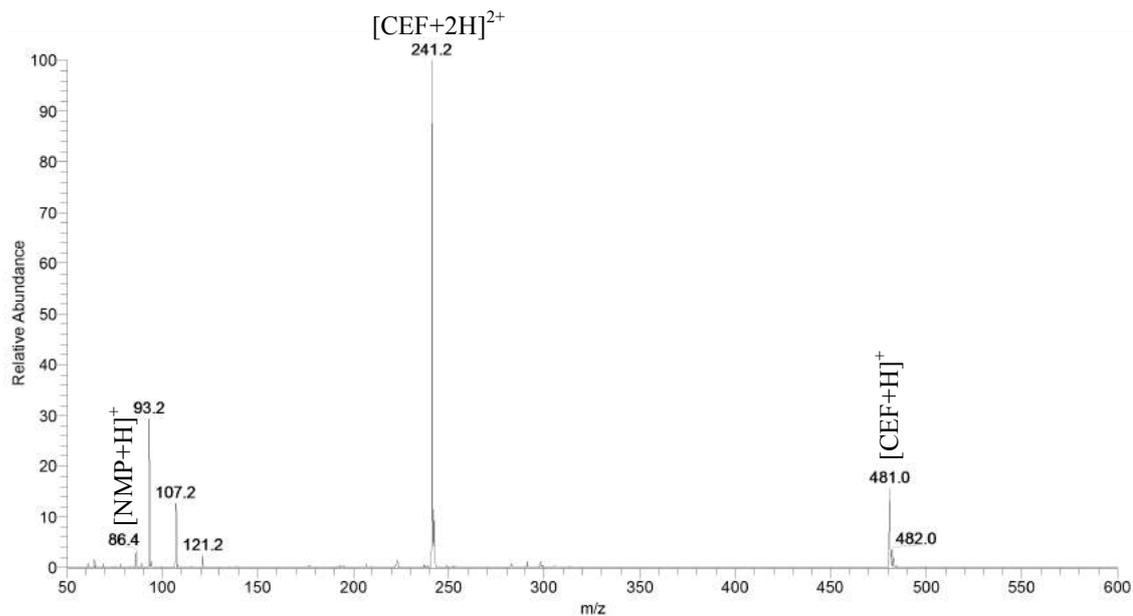
Por outro lado, a utilização do PTFE foi a que melhor apresentou os resultados com as soluções de CEF para a técnica de PSI-MS. Nas análises com PTFE foi necessária a aplicação de etanol puro para melhor solubilização da amostra. A técnica de PSI-MS está representada na Figura 56.

Figura 56- Análise de espectrometria de massas com ionização por *Paper Spray* (PSI-MS).

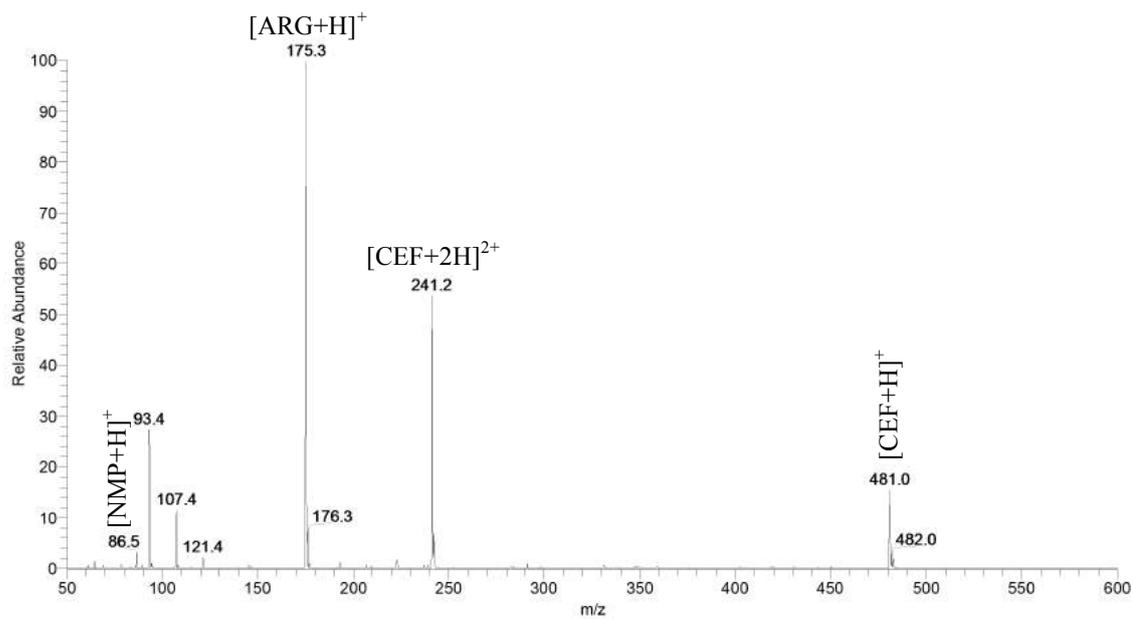


Fonte: Elaborada pelo autor.

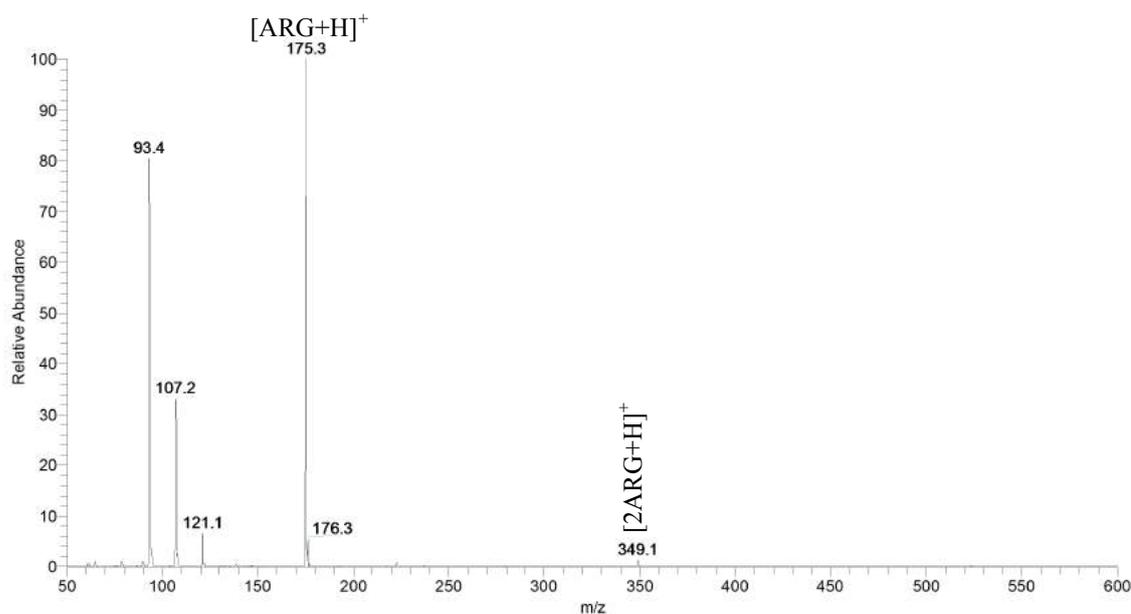
Os espectros resultantes para CEF SQR, CEF amostra e L-arginina analisados pela técnica de PSI-MS em modo positivo de análise são apresentados pelas Figuras 57, 58 e 59, respectivamente.

Figura 57- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF SQR (2 mg/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 58- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 59- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de L-arginina (1,45 mg/mL).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados para técnica de PSI(+)-MS para CEF SQR, CEF amostra e L-arginina foram relativamente semelhantes aos resultados da técnica de ESI(+)-MS, apresentando uma única diferença que foi a presença de três íons referentes ao ruído de base (*background*) da análise. As presenças dos íons do PTFE não interferiram as análises de PSI(+)-MS e os picos apresentados para o ruído de base foram com m/z de 93, 107 e 121, provenientes do polímero presente no PTFE formados por carbono e flúor. Outro fator importante foi que parte da amostra de CEF interagiu com o PTFE ficando retido. Desta forma, houve uma redução do pico de CEF apresentado no espectro. Devido este fator, utilizou-se a concentração da solução de CEF em 2 mg/mL ao invés de 40 $\mu\text{g/mL}$, como havia sido usado para ESI(+)-MS, mesmo assim, o pico de CEF ainda ficou abaixo do apresentado pela técnica de ESI(+)-MS.

Os espectros resultantes da técnica de PSI(+)-MS apresentaram íons de m/z 86 para *N*-metilpirrolidona (impureza presente no CEF), 241 [CEF+2H]²⁺ (cefepima duplamente protonada) e 481 [CEF+H]⁺ (cefepima protonada) para CEF SQR e CEF amostra, e para L-arginina as massas apresentadas foram íons de m/z 175 [ARG+H]⁺ (arginina protonada) e 349 [2ARG+H]⁺ (dímero protonado).

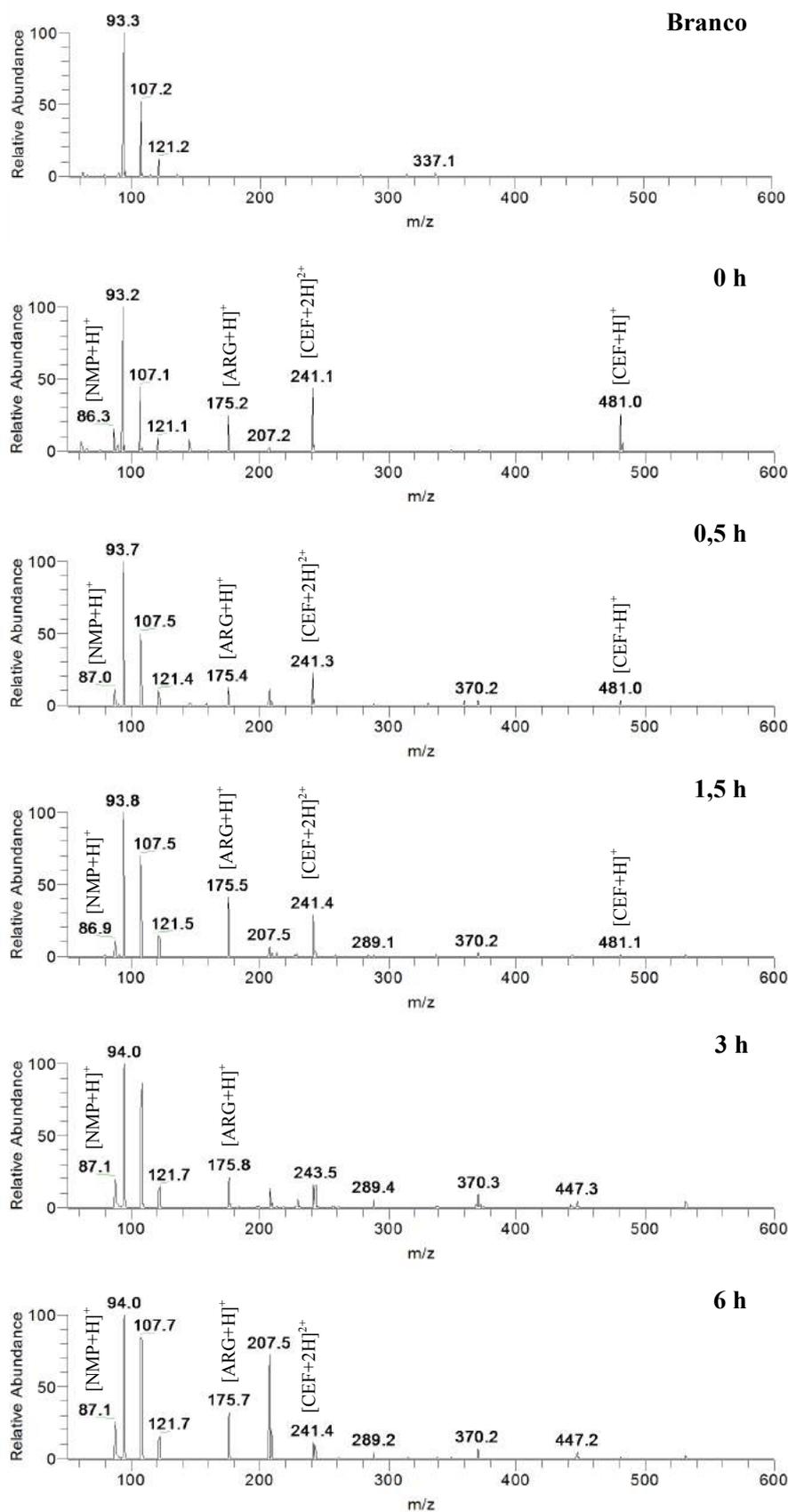
8.2.3.1. Degradação acelerada pela técnica de PSI-MS

Semelhante ao teste de degradação acelerada realizado por ESI(+)-MS, neste método de PSI(+)-MS foi possível verificar as massas dos produtos formados durante o experimento, realizados a partir da amostra de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Através deste estudo, foi possível observar se houve similaridade das massas apresentadas no PSI-MS com os ensaios realizados por ESI(+)-MS.

Para todas as condições de estresse avaliadas ocorreram o decréscimo do pico de CEF e também a formação de novos produtos nos espectros. Alguns espectros apresentaram massas idênticas em diferentes condições de estresse, sendo possivelmente o mesmo produto formado.

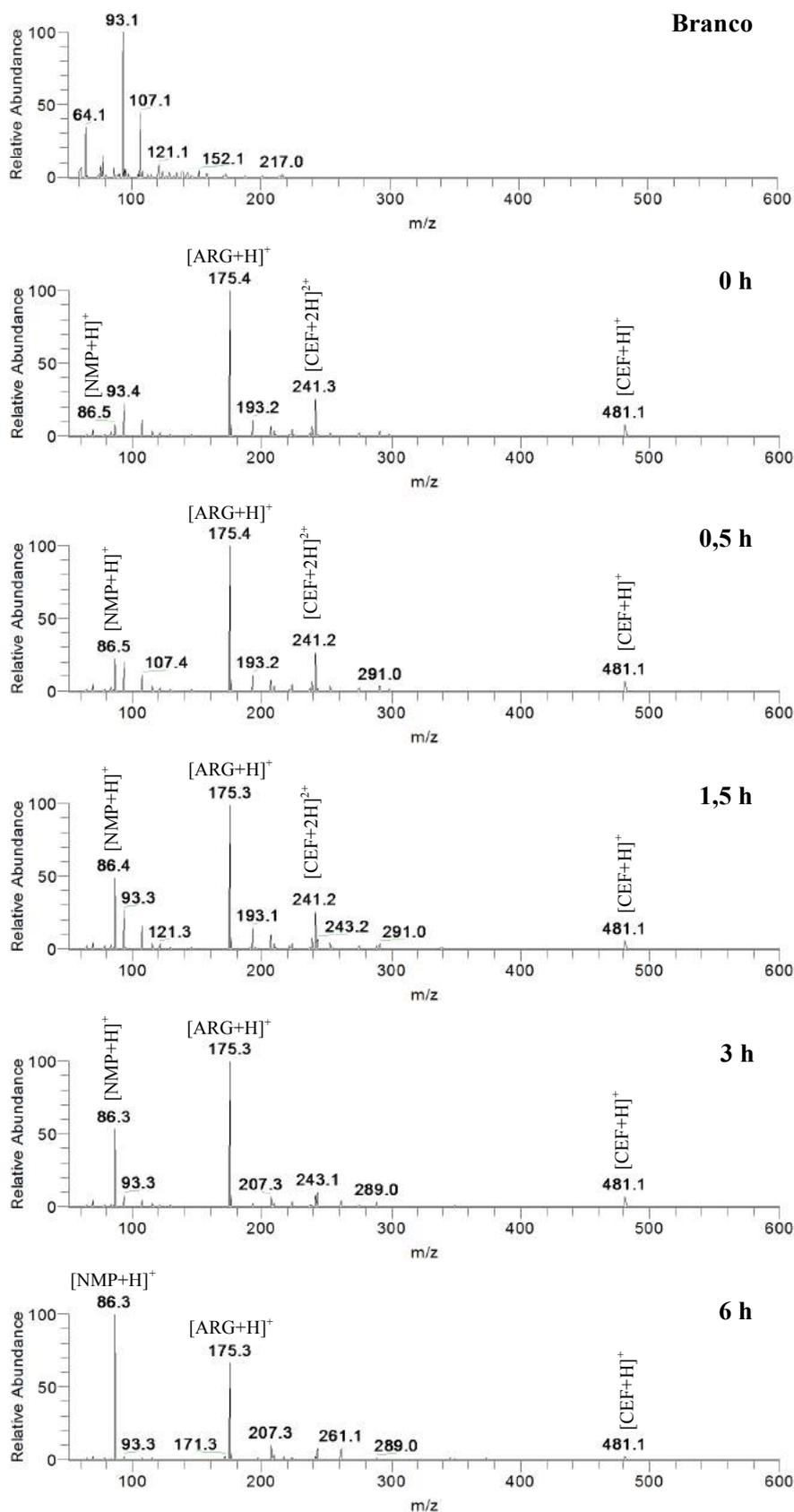
Os espectros com as degradações ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa são apresentados nas Figuras 60, 61, 62, 63 e 64, respectivamente, sendo possível a visualização das massas adicionais correspondentes aos produtos formados e à massa principal de CEF.

Figura 60- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação ácida (HCl 0,1 M) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: HCl 0,1 M.



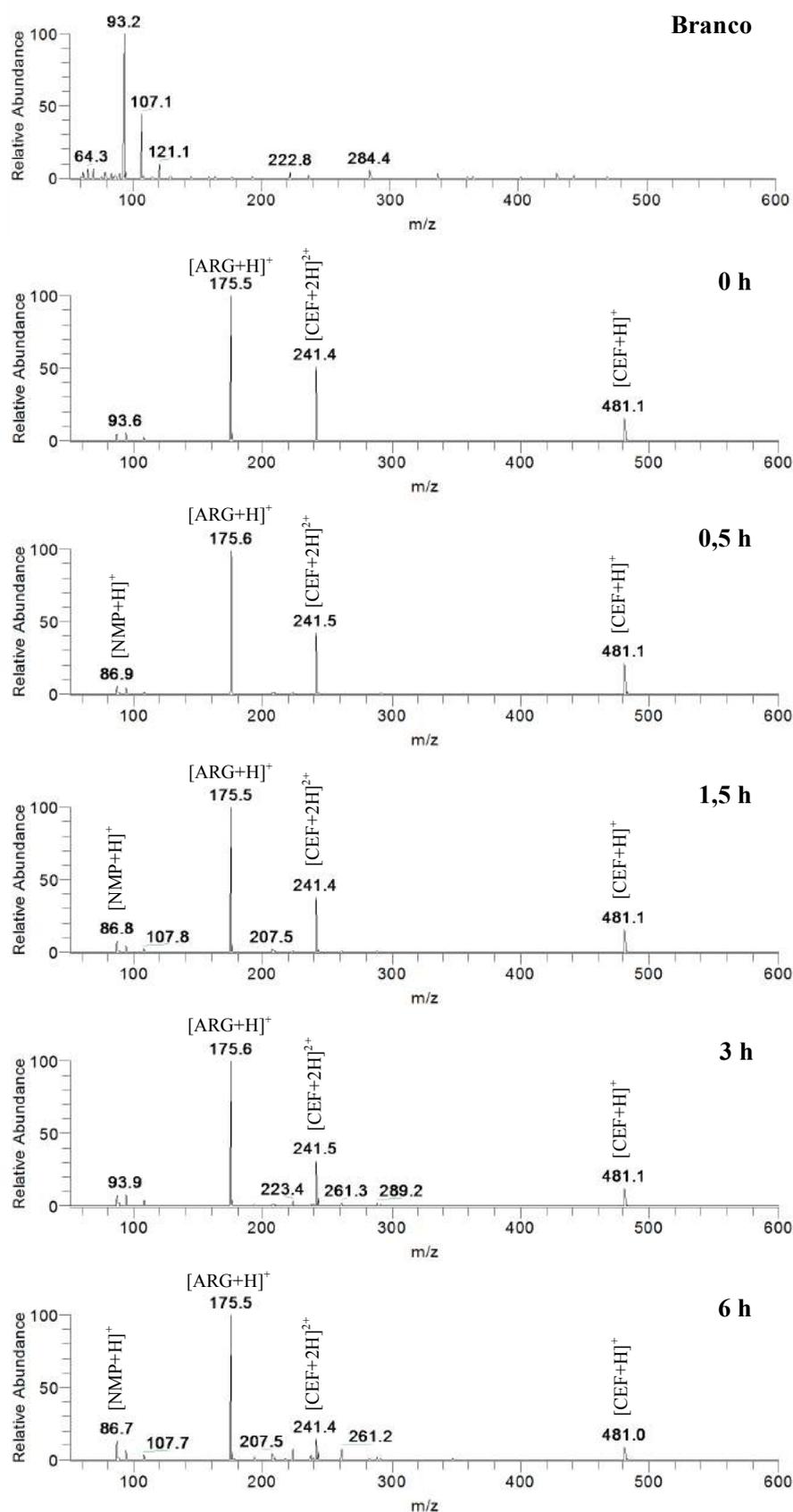
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 61- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação alcalina (NaOH 0,001 M) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: NaOH 0,001 M.



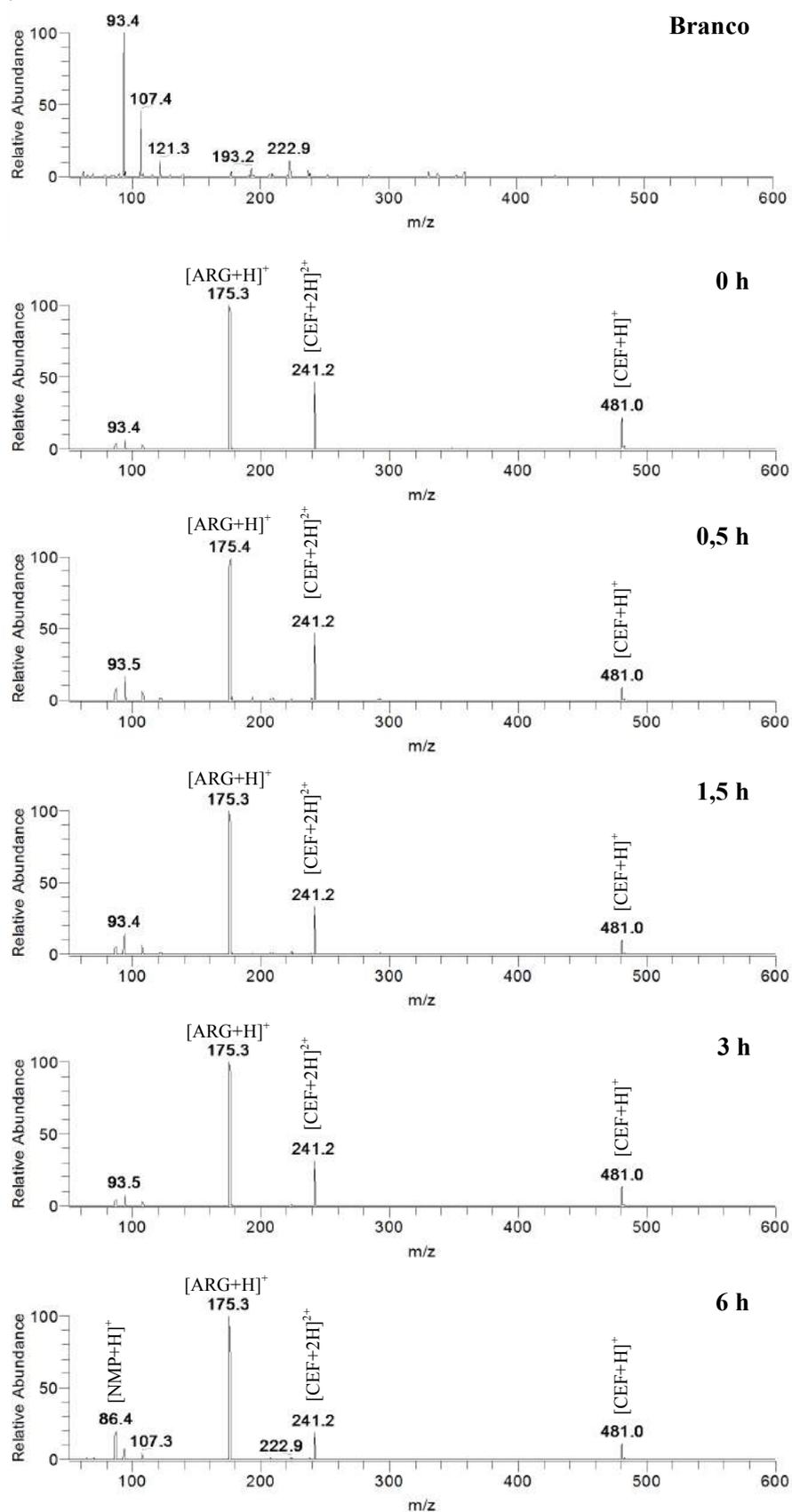
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 62- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação neutra (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: água purificada.



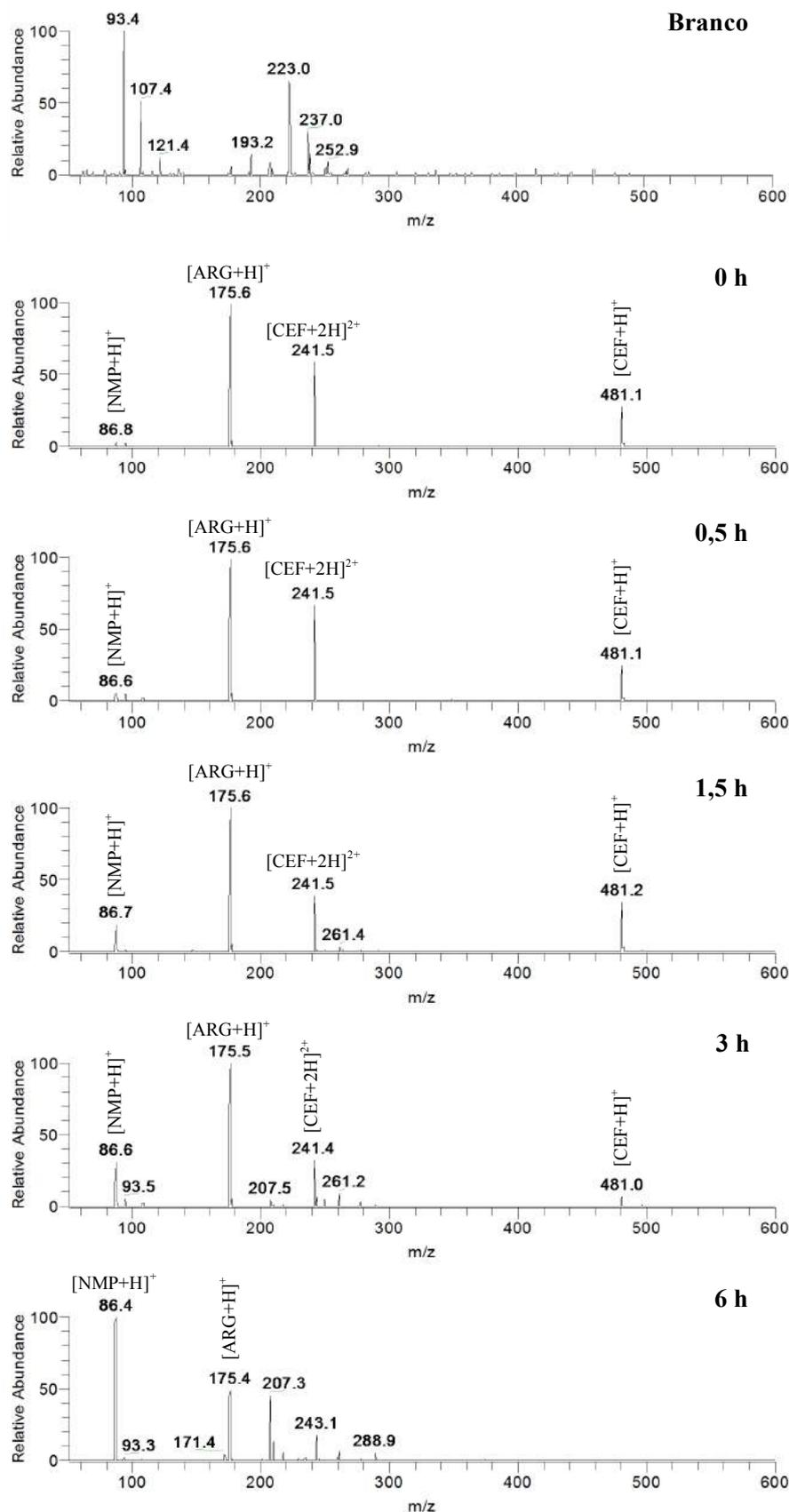
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 63- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação fotolítica (água purificada) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a temperatura ambiente. Branco: água purificada.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 64- Espectro PSI(+)-MS obtido a partir da solução de CEF amostra (2 mg/mL) submetida à degradação oxidativa (H_2O_2 0,05%) nos tempos 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 horas a 60 °C. Branco: H_2O_2 0,05%.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A hidrólise em meio ácido, apresentada na Figura 60, expõe um espectro referente ao branco da análise, o solvente HCl 0,1 M. Os resultados para a degradação realizada na condição de estresse ácida são apresentados na Tabela 79 com suas respectivas massas (m/z).

Tabela 79- Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição ácida

m/z	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
93	Ruído de base (PTFE)
107	Ruído de base (PTFE)
121	Ruído de base (PTFE)
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
207	PD11
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
243	PD9
289	PD
370	PD
447	PD
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados para a hidrólise em meio alcalino, representados pela Figura 61, apresentam um espectro derivado do branco da análise, NaOH 0,001 M. Para esta condição a relação de todos os íons resultantes da degradação é apresentada pela Tabela 80.

Tabela 80- Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição alcalina

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
93	Ruído de base (PTFE)
107	Ruído de base (PTFE)
121	Ruído de base (PTFE)
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
193	PD
207	PD11
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
243	PD9
261	PD
289	PD
291	PD
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A condição de estresse neutra, representada pela Figura 62, apresenta no primeiro espectro o branco da análise, realizado com água purificada. Para a hidrólise neutra observou-se que não ocorreu a formação de muitos produtos, igualmente à análise apresentada por ESI(+)-MS. A relação dos íons nos espectros está apresentada na Tabela 81.

Tabela 81- Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS para a hidrólise de CEF em condição neutra

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
93	Ruído de base (PTFE)
107	Ruído de base (PTFE)
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
207	PD9
223	PD
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
261	PD7
289	PD
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na condição de estresse fotolítica realizada por PSI(+)-MS, representada pela Figura 63, é possível observar que não houve formação de produtos para todos os tempos de análise ou os produtos ficaram retidos no PTFE. Para o espectro do branco da análise, foi utilizada água purificada. A Tabela 82 apresenta a relação de todos os íons da análise pela condição fotolítica.

Tabela 82- Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS de CEF para a condição fotolítica

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
93	Ruído de base (PTFE)
107	Ruído de base (PTFE)
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O último experimento realizado pela técnica de PSI(+)-MS foi em condição oxidativa (Figura 64), apresentando um espectro referente ao branco da análise, que foi realizado com H₂O₂ 0,05%. A degradação de CEF nesta condição pode ser observada após 6 h de análise, onde não era mais possível visualizar os picos de CEF no espectro. Na Tabela 83 é apresentada a relação dos produtos formados nesta análise.

Tabela 83- Relação dos picos apresentados na análise de PSI(+)-MS de CEF para a condição oxidativa

<i>m/z</i>	Produtos apresentados
86	<i>N</i> -metilpirrolidona [NMP+H] ⁺
93	Ruído de base (PTFE)
175	L-arginina [ARG+H] ⁺
207	PD11
241	CEF [CEF+2H] ²⁺
243	PD9
261	PD7
288	PD
481	CEF [CEF+H] ⁺

PD: Produto de degradação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises de degradação preparadas através da técnica de PSI(+)-MS foram de suma importância para avaliar os produtos formados a partir de CEF. Nos resultados apresentados foram observadas diferenças nos íons, quando comparado com a técnica de ESI(+)-MS. Outros fatores relevantes, foram a diminuição e o desaparecimento de alguns íons nos espectros de PSI(+)-MS, presentes na técnica de ESI(+)-MS. Provavelmente, este fato está relacionado com a interação das substâncias com o PTFE ou a volatilização desses compostos, as quais afetaram sua visualização e diminuição nos espectros.

Até o presente momento não foram encontrados artigos científicos publicados nos periódicos e em bancos de dados para análise de CEF através da técnica de PSI-MS.

Uma vantagem que esta técnica possui é a de não utilizar a nebulização por gás e não necessitar do controle da temperatura para seu funcionamento, deste modo ela se torna uma técnica prática e de fácil manuseio pelo operador, e de certa forma econômica, por não precisar de muitos materiais, com exceção do PTFE, que apresenta um valor considerável.

A técnica de PSI(+)-MS demonstrou ser eficaz, rápida e voltada ao meio ambiente; pode-se também utilizar esta técnica para análises qualitativas de CEF, porém, deverá ser proporcionada uma maior atenção nestas interações e à volatilização dos compostos.

8.3. Discussão das técnicas ESI-MS e PSI-MS

Neste trabalho foi possível verificar através das técnicas de ESI-MS e PSI-MS os produtos formados a partir de CEF por meio das condições de estresse ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa.

Nas pesquisas realizadas em periódicos e bancos de dados foram encontrados poucos artigos publicados referente ao estudo de degradação ou fragmentos de CEF. Os trabalhos publicados até o presente momento são: USLU; OZKAN; ZUMAN, 2004; CHONG; HU, 2008; JAGADEESH KUMAR et al., 2010; ABDEL-FATTAH et al., 2013; DAŁBROWSKA et al., 2015; MOSTAFA et al., 2015.

Pesquisas envolvendo a degradação forçada de um fármaco são de suma importância para a compreensão do comportamento químico da molécula. Este estudo identifica não apenas os possíveis produtos de degradação, mas também fornece detalhes relevantes para o desenvolvimento de novas fórmulas e a sua preparação. De acordo com a ICH (2005), a finalidade dos testes de estabilidade é provar a qualidade de um composto ou substância sob a influência de vários fatores.

Assim, os estudos de estabilidade de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável são essenciais para garantir a eficácia e segurança dos novos produtos farmacêuticos que utilizem este fármaco.



ESTUDOS DE ESTABILIDADE

9. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Os produtos farmacêuticos durante seu período de armazenamento e uso, deve apresentar estabilidade bem definida, mantendo suas características iniciais com limites estabelecidos (VADAS, 2000). Nestes estudos de estabilidade, destaca-se a importância da qualidade, segurança e eficácia apresentada pelos medicamentos, uma vez estes não sendo estáveis, poderão apresentar mudanças em suas características físicas, químicas e terapêuticas (MARKENS, 2010).

O estudo de estabilidade de curta duração (40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) e o estudo de estabilidade de longa duração (30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) foram realizados de acordo com a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005, com durações de seis meses e dois anos, respectivamente (BRASIL, 2005). Os parâmetros analisados foram: teor químico e possíveis produtos de degradação avaliados através do método cromatográfico e a potência do antimicrobiano realizada através do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, ambos desenvolvido e validado neste trabalho para a quantificação de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável, assim como as características físico-químicas, através de sua aparência (cor e odor) e seu pH.

O objetivo deste estudo não foi determinar o prazo de validade do produto, pois o mesmo já se encontra disponível no mercado com sua validade definida, mas sim verificar o comportamento da formulação frente às condições dos estudos de estabilidades de preparações farmacêuticas.

9.1. Material e método

Os estudos de estabilidade de CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável foram realizados em câmara climática modelo MA835 (Marconi[®], Piracicaba, SP, Brasil) com controle de temperatura e UR. Os frascos-ampola de CEF amostra foram adicionados na câmara climática em sua embalagem original de vidro e lacrado. Os estudos de estabilidade de curta duração foram conduzidos nas condições de 40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR, analisados nos tempos 0, 3 e 6 meses. Para os estudos de estabilidade de longa duração as condições utilizadas foram de 30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR, sendo analisados nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses.

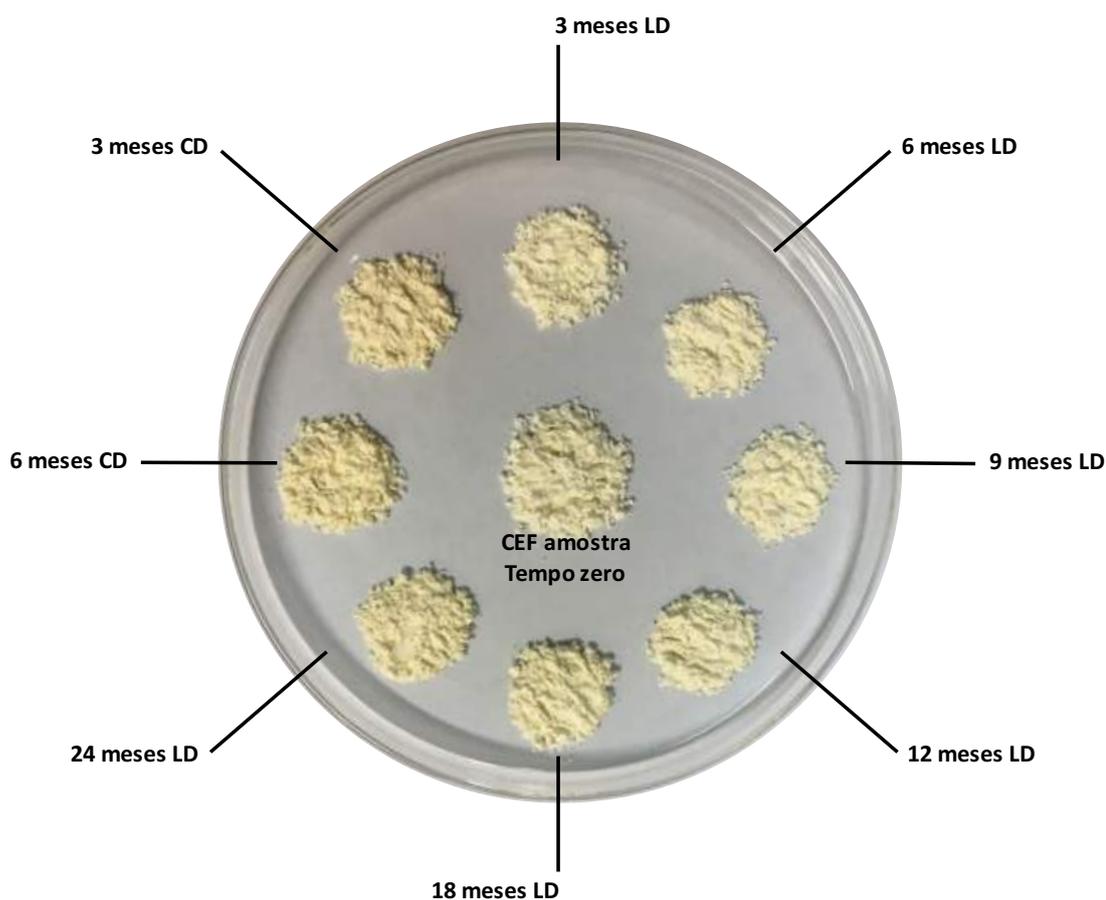
O método de CLAE foi empregado para a avaliação dos estudos de estabilidade de CEF, utilizando a coluna Luna C18 Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm; 5 µm) com fase móvel de água : etanol (45:55, v/v), vazão de 0,5 mL/min, a detecção foi realizada utilizando o comprimento de onda de 258 nm com um tempo de corrida de 8 min, conforme descrito no item 6.3. A concentração das soluções de CEF utilizadas para as análises por CLAE foi de 40 µg/mL.

O ensaio microbiológico por turbidimetria foi utilizado para a avaliação da atividade biológica da molécula de CEF frente aos estudos de estabilidade. Os ensaios foram realizados em caldo Casoy utilizando 8% do inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, incubados em *shaker* por 4 horas a 35 °C ± 1°C, conforme descrito no item 6.4. As concentrações das soluções de CEF nos ensaios foram de 36,0; 54,0 e 81,0 µg/mL.

9.2. Resultados e discussão

Em relação às características físico-químicas do estudo de estabilidade de CEF amostra não foi observada alteração no odor do produto, porém a coloração sofreu pequenas alterações, conforme o aumento do tempo de exposição, a qual passou de quase branco para levemente amarelado. A Figura 65 apresenta a comparação do produto farmacêutico no tempo zero de exposição aos demais meses do estudo de estabilidade.

Figura 65- Avaliação da cor apresentada por CEF amostra em pó liofilizado para solução injetável obtidas no estudo de estabilidade. CD: Curta duração; LD: Longa duração.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados de teores e de pH das soluções de CEF amostra obtidos ao longo dos estudos de estabilidade de curta e longa duração são apresentados na Tabela 84.

Tabela 84- pH e teores de CEF em pó liofilizado para solução injetável apresentados nos estudos de estabilidade de curta e longa duração obtidos por CLAE e ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

Estudo	Tempo (meses)	pH ^e	CLAE		TURBI	
			Teor (%) ^c	% de degradação ^d	Teor (%) ^c	% de degradação ^d
	0	4,8	106,21	---	102,46	---
Curta duração^a	3	4,7	101,55	4,38	98,90	3,48
	6	5,4	100,89	5,00	97,86	4,49
	3	5,6	106,29	---	101,79	0,65
Longa duração^b	6	5,8	106,58	---	101,23	1,20
	9	5,7	105,62	0,55	101,41	1,03
	12	6,0	105,20	0,95	100,77	1,65
	18	6,0	103,25	2,78	100,08	2,33
	24	6,0	101,94	4,02	100,17	2,23

^aCurta duração: realizados nas condições de 40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR (BRASIL, 2005);

^bLonga duração: realizados nas condições de 30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR (BRASIL, 2005);

^cMédia de três determinações;

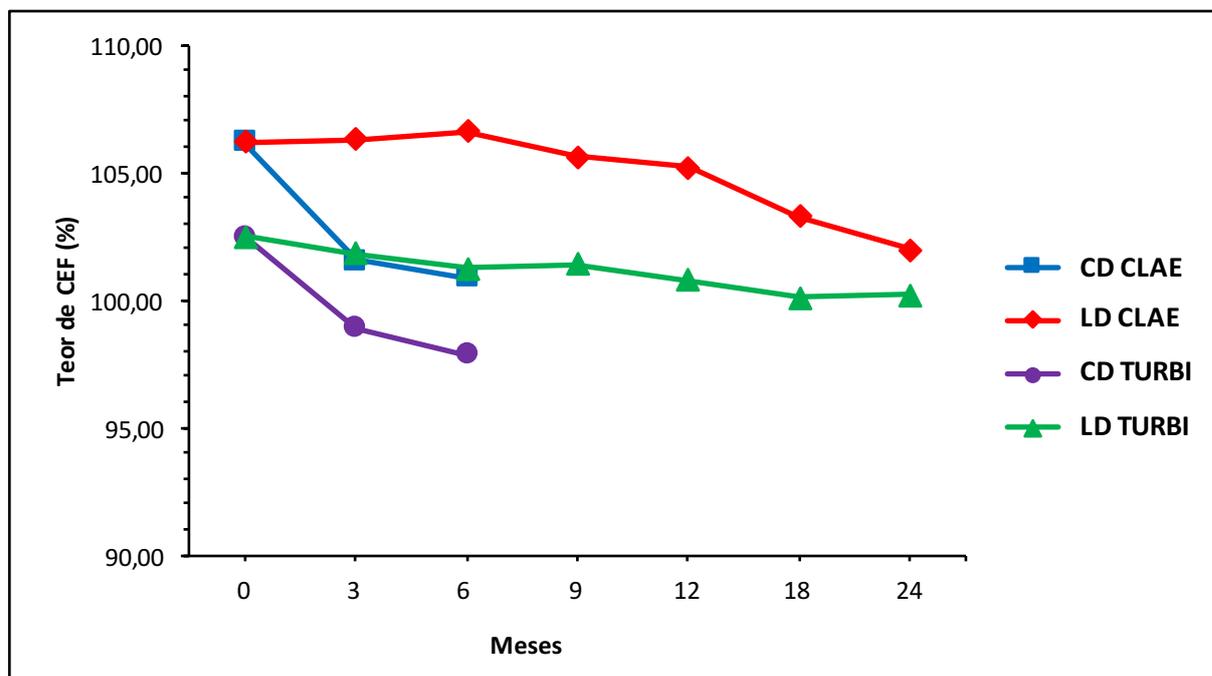
^dPorcentagem de degradação de CEF comparado ao tempo 0 meses;

^epH: Medições feitas em soluções-mãe de CEF na concentração de 100 µg/mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados de teores dos estudos de estabilidade obtidos em seus respectivos tempos de exposição (meses) por meio dos métodos de CLAE e microbiológico por turbidimetria foram plotados em um gráfico representado pela Figura 66.

Figura 66- Teores de CEF amostra em pó para solução injetável dos estudos de estabilidade de curta e longa duração obtidos por CLAE e ensaio microbiológico por turbidimetria. CD: Curta duração; LD: Longa duração.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante os estudos de estabilidade os valores de pH das soluções-mãe de CEF amostra foram verificados, apresentando, com o decorrer do tempo, um aumento no valor de pH, passando de 4,8 para 6,0 ao final dos estudos. Apesar deste aumento, os valores de pH obtidos para as soluções de CEF estão dentro da faixa estabelecida pela literatura descrita para o produto farmacêutico, sendo de 4,0 a 6,0 (USP 37, 2014).

O método cromatográfico foi escolhido para avaliar estes estudos devido à alta seletividade e a possibilidade de visualizar a presença ou não de produtos de degradação. Os valores de teores obtidos para os estudos de estabilidade de curta e longa duração, demonstraram que as perdas nas porcentagens dos teores de CEF ficaram abaixo de 5,0%, em relação ao tempo zero. Por meio do método de CLAE foram observados nos cromatogramas que não houve o aparecimento de novos picos relacionados aos produtos de degradação.

No quesito atividade biológica, a avaliação foi realizada por meio do ensaio microbiológico turbidimétrico, resultando em perdas abaixo de 4,49% nos teores, apresentando-se dentro do limite descrito na literatura, o qual preconiza que para testes biológicos o produto

não poderá apresentar ao final dos estudos perda superior a 5% comparado ao valor inicial (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Os resultados de teores apresentados pelos estudos de estabilidade de CEF ficaram dentro dos valores de referência de 90% a 115% estabelecido pelo compêndio oficial (USP 37, 2014).

Desta forma, foi possível avaliar o comportamento de CEF amostras em pó liofilizado para solução injetável nos estudos de estabilidade em exposição à temperatura e à UR.



ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

10. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

Neste estudo foi realizada a análise comparativa entre os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria de absorção nas regiões do ultravioleta, do visível e do infravermelho e ensaio microbiológico por turbidimetria, desenvolvidos e validados para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável. A análise estatística entre os métodos foi realizada através da comparação dos teores médios obtidos pelas diferentes técnicas, tendo como principal objetivo verificar se as variabilidades presentes entre os métodos são significativas. Foi utilizada para a avaliação a análise de variância (ANOVA) para nível de significância de 5%, realizada pelo *software* ASSISTAT[®] versão 7.7 Beta.

10.1. Resultados e discussão

Na Tabela 85, são apresentados os resultados dos teores médios obtidos pelos métodos empregados neste trabalho para quantificação de CEF amostra. Através destes resultados, é apresentada na Tabela 86 a análise de variância (ANOVA).

Tabela 85- Teores médios obtidos pelos métodos validados para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável

	Método				
	CLAE ^a	UV ^b	VIS ^c	IV ^d	TURBI ^e
	106,20	104,41	103,92	103,29	101,50
Teor (%)	106,64	103,61	104,54	104,55	103,17
	106,09	103,41	104,32	103,75	102,71
Teor médio (%)	106,31	103,81	104,26	103,86	102,46
DPR%^f	0,28	0,51	0,30	0,61	0,84

^aCLAE: Método por cromatografia líquida de alta eficiência;

^bUV: Método por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta;

^cVIS: Método por espectrofotometria de absorção na região do visível;

^dIV: Método por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho;

^eTURBI: Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico;

^fDPR%: Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 86- Comparação estatística por análise de variância (ANOVA) entre os métodos utilizados na quantificação de CEF pó liofilizado para solução injetável

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	valor-p	F_{tab}
Entre grupos	23,17444519	4	5,793611297	17,916113*	0,000148	3,478050
Dentro dos grupos	3,233743369	10	0,323374337			
Total	26,40818856	14				

*Significativo para $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A comparação estatística dos métodos pela ANOVA demonstrou existir diferença significativa entre os métodos, quando utilizado o nível de significância de 5%. Desta forma, foi realizado o teste de Tukey, com o intuito de identificar quais métodos comparados entre si apresentam diferenças significativas das médias. O teste de Tukey é apresentado na Tabela 87, no qual foi empregado os valores de teores do CEF amostra obtidos em cada um dos métodos validados.

Tabela 87- Análise comparativa pelo teste de Tukey dos teores médios obtidos pelos métodos validados para a quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável

Métodos	Média dos tratamentos ¹	valor-p*	dms ²
CLAE	106,31 a		
UV	103,81 b c		
VIS	104,26 b	0,0001	1,52866
IV	103,86 b c		
TURBI	102,46 c		
Teor médio (%)	104,14		
DPR% ³	1,33		

*Significativo para $p < 0,05$;¹As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si;²dms: Diferença mínima significativa;³DPR%: Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (DPR) é uma estimativa do erro experimental em relação à média geral do teste. O CV é um valor estatístico muito empregado como medida de avaliação da qualidade experimental. É estabelecido para o CV que quanto menor for sua estimativa, maior será a precisão do teste, da mesma forma ocorre ao contrário. Na presença de elevada precisão dos testes (indicando uma maior qualidade), observa-se resultados com menores diferenças significativas entre as estimativas de médias (CARGNELUTTI FILHO; STORCK, 2007).

O DPR é uma medida de dispersão importante para avaliar a variação observada nos valores de um conjunto de dados e indicar a homogeneidade do grupo. Quanto menor o valor do desvio padrão relativo, maior a precisão dos dados obtidos. Assim, observou-se DPR inferior a 0,84% nos cinco métodos validados.

O valor-p, definido como a probabilidade de se observar um valor da estatística de teste maior ou igual ao encontrado, foi calculado. Usualmente, o valor de corte para rejeitar a hipótese nula é de 0,05. Isto significa que quando não houver nenhuma diferença, um valor extremo para a estatística de teste é esperado em menos de 5% das vezes.

A comparação das médias dos métodos permitiu um valor de 1,52866, com valor-p = 0,0001. O valor de corte de 0,05 para o valor-p indica a rejeição da hipótese nula com a conclusão de que houve diferença estatisticamente significativa entre teores determinados nos métodos analisados. Isto indica que o valor “p = 0,0001” infere que há apenas uma probabilidade de 0,01% de se observar uma diferença entre os grupos sob a hipótese nula.

Embora o valor muito pequeno de p signifique que houve diferença entre os grupos, isto não seria altamente relevante. O valor-p é significativo, mas as diferenças encontradas nos valores de teor do fármaco quantificado não têm relevância científica.

Médias dos tratamentos seguidas de mesma letra indicadas na segunda coluna, não apresentam diferenças significantes, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Embora o método de CLAE não tenha apresentado equivalência por meio dos resultados estatísticos, esta técnica possui uma maior precisão e sensibilidade, além de, possibilitar análises de estabilidade da molécula, a fim de detectar impurezas formadas após degradação forçada ou presentes na formulação. Outro fator relevante é o tempo de análise para CLAE, que deve ser levado em consideração na escolha do método a ser utilizado, uma vez que, apresenta rapidez e agilidade no preparo e na análise de compostos. Destaca-se também por não incorporar solventes tóxicos como constituinte de fase móvel, reduzindo a geração de resíduos. Por outro lado, o método apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de grande

quantidade de solventes e a utilização de equipamento e colunas cromatográficas com custos elevados.

O método de espectrofotometria de UV apresenta baixo custo nas análises, sendo facilmente preparado pelo operador e com rapidez na obtenção dos dados, porém, não é específico e seletivo o bastante ao ponto de detectar produtos de degradação formados ou presentes na formulação de CEF.

O mesmo ocorre com o método de espectrofotometria no VIS, pois trata-se de um método não seletivo e específico igual ao método de UV. Por outro lado, apresenta baixo custo nas análises, rapidez no preparo e compilação dos dados, além disso, o método no VIS desenvolvido e validado foi realizado em escala miniaturizada, minimizando tempo, consumo de materiais, solventes e compostos, promovendo segurança ao operador e gerando baixa quantidade de resíduo.

As análises microbiológicas resultam em informações relevantes da molécula sobre suas características antimicrobianas, a fim de fornecer os dados da potência do produto farmacêutico. Análises desta natureza deverão sempre estar em conjunto com outras análises físico-químicas, visto que estas últimas podem não apresentar capacidade de caracterizar a formação de produtos de degradação. As vantagens apresentadas para as técnicas microbiológicas são a não utilização de solventes orgânicos, os custos reduzidos e a possibilidade de identificação das cepas que foram sensíveis frente ao composto testado. Por outro lado, necessita de descontaminação dos materiais utilizados e pode apresentar um maior tempo de análise, porém, este tempo pode ser reduzido se utilizado o ensaio microbiológico por turbidimetria, o qual apresenta um tempo de análise relativamente baixo, tratando-se de análises microbiológicas.

É importante ressaltar que os cinco métodos validados são capazes de quantificar a cefepima.

Portanto, mesmo que nos testes estatísticos fossem evidenciadas diferenças e equivalências dos métodos utilizados na quantificação de CEF, cada um em particular possui características próprias para a análise da substância, destacando-se que alguns são mais específicos do que outros, tendo sua aplicação adequada na prática de controle de qualidade industrial.



CONCLUSÕES

11. CONCLUSÕES

- ✓ Em relação às análises qualitativas para a caracterização de CEF na forma farmacêutica, foram avaliadas as características organolépticas, ponto de fusão, teor de umidade, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria com absorção nas regiões do ultravioleta, do visível e do infravermelho, espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência; os métodos utilizados demonstraram ser adequados para a identificação.
- ✓ Neste trabalho foram desenvolvidos e validados cinco métodos para quantificação de CEF, tais como, espectrofotometria nas regiões do UV, do VIS e do IV, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico por turbidimetria.
- ✓ O método espectrofotométrico na região do UV foi validado utilizando água purificada como solvente, com detecção em 258 nm, apresentando os parâmetros de validação adequados.
- ✓ O método de espectrofotometria no VIS foi preparado em escala miniaturizada, a fim de buscar sempre pela inovação e avanço de técnicas de determinação de fármacos, destacou-se também pelo fato do método não empregar solventes orgânicos nas análises. As soluções de CEF foram preparadas em água purificada como solvente e a detecção utilizada para os ensaios foi em 740 nm. Assim, houve diminuição dos materiais e solventes utilizados para a análise de CEF, bem como, redução significativa dos resíduos gerados pelas análises.
- ✓ Em relação ao método de espectrofotometria no IV médio ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), para o preparo da pastilha foi utilizado somente o fármaco homogeneizado com o reagente KBr. No método, não foram empregados solventes orgânicos, fato que vem ao encontro dos objetivos deste trabalho na prospecção de métodos voltados à química verde.
- ✓ Quanto ao método de CLAE, destaca-se a não utilização de solventes tóxicos ou soluções tamponantes, empregando solventes como, água e etanol na constituição da fase móvel, condições significativas para a redução dos resíduos tóxicos, e também não foram reportados na literatura e em bancos de dados a utilização desta mistura para a análise de CEF.

- ✓ Foi validado o ensaio microbiológico por turbidimetria, para determinar a potência de CEF na preparação farmacêutica. O método foi desenvolvido utilizando água purificada para o preparo das soluções de CEF, a fim de verificar a potência de CEF frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082, resultando em um método apropriado para a proposta estabelecida. A vantagem deste método vai além da não utilização de solventes orgânicos tóxicos aos operadores; destaca-se principalmente a redução no tempo de análise com incubação de 4 horas, quando comparado aos demais métodos microbiológicos tradicionais, como o de difusão em ágar. Assim como o método de CLAE, não foram encontrados na literatura e em bancos de dados métodos que utilizassem ensaios microbiológicos por turbidimetria para a quantificação de CEF.
- ✓ Através do método de espectrometria de massas utilizando a ionização por *electrospray* - ESI(+)-MS, foram observados pelo menos 11 possíveis produtos de degradação formados a partir da molécula de CEF, quando expostas às condições de estresse ácida, alcalina, neutra, fotolítica e oxidativa. Assim, este estudo contribuiu para o conhecimento do comportamento da molécula nestes solventes, apresentando a proposta de rotas de degradação da molécula de CEF elaboradas mediante os resultados.
- ✓ Em relação aos estudos de estabilidade de curta e longa duração, a amostra de CEF apresentou perdas nas porcentagens de teores ao longo dos meses avaliados, quando exposta à temperatura e à UR, ficando dentro do limite preconizado pela literatura. Desta forma, destaca-se a importância do correto armazenamento do fármaco e do medicamento, visando manter o teor dentro dos limites preconizados durante seu prazo de validade.
- ✓ Desta maneira, conclui-se que todos os métodos desenvolvidos e validados neste trabalho poderão ser empregados nas análises de controle de qualidade, pois se apresentaram eficazes na quantificação de CEF em pó liofilizado para solução injetável. Outra importante característica é que os métodos foram planejados para serem ecologicamente corretos, não utilizando solventes tóxicos aos operadores, bem como, reduzindo os volumes utilizados e os impactos gerados ao meio ambiente.



REFERÊNCIAS

12. REFERÊNCIAS

ABD EL-ATY, A.M.; GOUDAH, A.; MOUNEIR, S.M.; SUNWOO, Y.E.; JANG, J.H.; SHIN, J.G.; SHIM, J.H.; SHIMODA, M. Acute-phase response alters the disposition kinetics of cefepime following intravenous administration to rabbits. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 67-75, 2007.

ABDEL-FATTAH, L.; WESHAHY, S.A.; HASSAN, N.Y.; MOSTAFA, N.M.; BOLTIA, S.A. Development and validation of spectrophotometric, chemometric and high pressure liquid chromatographic methods for the determination of cefepime hydrochloride in the presence of its acid and alkaline degradation products. **International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 86-96, 2013.

ALBENDÍN, G.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.A.; PINTO, J.J. Miniaturized and direct spectrophotometric multi-sample analysis of trace metals in natural waters. **Analytical Biochemistry**, v. 497, p. 18-23, 2016.

ALI, S.M.; ELBASHIR, A.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Spectroscopic methods for analysis of cephalosporins in pharmaceutical formulations. **World Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1A, p. 21-32, 2015.

AL-MOMANI, I.F. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 751-757, 2001.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17. ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v. 1, p. xx.

ARAS, C.; OZDAMAR, A.; OZTURK, R.; KARACORLU, M.; OZKAN, S. Intravitreal penetration of cefepime after systemic administration to humans. **Ophthalmologica**, v. 216, p. 261-264, 2002.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 497-511, 2008.

ASBEL, L.E.; LEVISON, M.E. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 14, p. 435-447, 2000.

ASLAN, M.M.; WEBSTER, N.A.; BYARD, C.L.; PEREIRA, M.B.; HAYES, C.M.; WIEDERKEHR, R.S.; MENDES, S.B. Low-loss optical waveguides for the near ultra-violet and visible spectral regions with Al₂O₃ thin films from atomic layer deposition. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 17, p. 4935-4940, 2010.

BARBARIN, N.; TILQUIN, B.; HOFFMANN, E. Radiosterilization of cefotaxime: investigation of potential degradation compounds by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 929, p. 51-61, 2001.

BARBOSA, A.M.J.; ARAUJO, T.A.; TRINDADE, M.A.G.; FERREIRA, V.S. Direct cefepime determination in human milk using solid mercury amalgam electrode manufactured with silver nanoparticles. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 681, p. 127-132, 2012.

BARIRIAN, N.; CHANTEUX, H.; VIAENE, E.; SERVAIS, H.; TULKENS, P.M. Stability and compatibility study of cefepime in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 651-658, 2003.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BASÁEZ, L.; VANÝSEK, P. Transport studies of β -lactam antibiotics and their degradation products across electrified water/oil interface. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 183-192, 1999.

BEHIN, S.; PUNITHA, I.S.R.; KRISHNAN, S. Stability studies of cefepime hydrochloride by stability indicating RP-HPLC method. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 2181-2186, 2013.

BERZAS, J.J.; GUIBERTEAU, C.; VILLASEÑOR, M.J.; RODRÍGUEZ, V. Development of a capillary gas chromatographic procedure for determining selective serotonin reuptake inhibitors: validation study and experimental design to evaluate the robustness of method. **Analytica Chimica Acta**, v. 519, p. 219-230, 2004.

BHATT, D.A.; PRAJAPATI, L.M.; JOSHI, A.K.; KHARODIY, M.L. Development and validation of spectrophotometry method for simultaneous estimation of cefepime hydrochloride and amikacin sulphate. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 5, p. 1482-1491, 2015.

BHAVANA, M.; RAMAMOHANAREDDY, T.; SANDHYA, M.; UMA MAHESWARA RAO, V. RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of cefepime and tazobactam in marketed formulation. **International Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 4, p. 837-842, 2013.

BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BLIESNER, D.M. **Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide**. Hoboken - New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. p. 1.

BONAPACE, C.R.; WHITE, R.L.; FRIEDRICH, L.V.; NORCROSS, E.D.; BOSSO, J.A. Pharmacokinetics of cefepime in patients with thermal burn injury. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2848-2854, 1999.

BONFILIO, R.; TARLEY, C.R.T.; PEREIRA, G.R.; SALGADO, H.R.N.; ARAÚJO, M.B. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, v. 80, p. 236-241, 2009.

BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an UV-derivative spectrophotometric method for determination of glimepiride in tablets. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 292-299, 2011.

BRANCH, S.K.; CASY, A.F.; LIPCZYNSKI, A.; OMINDE, M.A. Carbon-13 NMR of β -lactam antibiotics and related compounds. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 24, p. 465-479, 1986.

BP. BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de junho 2003.

BRASIL Ministério da Saúde. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 de agosto. 2005.

BREILH, D.; LAVALLEE, C.; FRATTA, A.; DUCINT, D.; CONY-MAKHOUL, P.; SAUX, M.C. Determination of cefepime and ceftazidime in human serum by high-performance liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 734, p. 121-127, 1999.

BREILH, D.; SAUX, M.C.; DELAISEMENT, C.; FRATTA, A.; DUCINT, D.; VELLY, J.F.; COURAUD, L. Pharmacokinetic population study to describe cefepime lung concentrations. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 14, p. 69-74, 2001.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: AMGH, 2012. 2079p.

BU, W.; SEXTON, H.; FAN, X.; TORRES, P.; HOUSTON, P.; HEYMAN, I.; LIU, L. The novel sensitive and high throughput determination of cefepime in mouse plasma by SCX-LC/MS/MS method following off-line μ elution 96-well solid-phase extraction to support systemic antibiotic programs. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 19, p. 1623-1628, 2010.

BUGAY, D.E.; NEWMAN, A.W.; FINDLAY, W.P. Quantitation of cefepime \cdot 2HCl dihydrate in cefepime \cdot 2HCl monohydrate by diffuse reflectance IR and powder X-ray diffraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 49-61, 1996.

BUGNON, D.; GIANNONI, E.; MAJCHERCZYK, P.; GLAUSER, M.P.; MOREILLON, P. Pitfalls in cefepime titration from human plasma: plasma- and temperature-related drug degradation in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3654-3656, 2002.

BURGESS, D.S.; HASTINGS, R.W.; HARDIN, T.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefepime administered by intermittent and continuous infusion. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 66-75, 2000.

CABRINI, G.L. **Aplicação de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear na detecção e caracterização de intermediários chave de reações orgânicas**. 2007. 267 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Estadual de Campinas, 2007.

- CALAHORRA, B.; CAMPANERO, M.A.; SÁDABA, B.; AZANZA, J.R. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 13, p. 272-275, 1999.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed editora, 2009. 253 p.
- CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L. Estatísticas de avaliação da precisão experimental em ensaios de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 17-24, 2007.
- CAZEDEY, E.C.L.; PEREZ, D.P.; PEREZ, J.P.; SALGADO, H.R.N. LC Assay for ciprofloxacin hydrochloride ophthalmic solution. **Chromatographia Supplement**, v. 69, p. S241-S244, 2009.
- CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; GARG, 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. 1-6, 2011.
- CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin hydrochloride in ophthalmic solution. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, p. 74-79, 2012.
- CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of UV spectrophotometric method for orbifloxacin assay and dissolution studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 457-465, 2014.
- CAZORLA-REYES, R.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A.G.; RODRÍGUEZ MARESCA, M.A.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 203-212, 2014.
- CHAFLE, D.M. Development and validation of spectrophotometric method for the estimation of cefepime in bulk and dosage form. **Der Pharma Chemica**, v. 5, n. 2, p. 127-132, 2013.
- CHAN, C.Y.; CHAN, K.; FRENCH, G.L. Rapid high performance liquid chromatographic assay of cephalosporins in biological fluids. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 18, n. 4, p. 537-545, 1986.
- CHANG, Y.L.; CHOU, M.H.; LIN, M.F.; CHEN, C.F.; TSAI, T.H. Determination and pharmacokinetic study of unbound cefepime in rat bile by liquid chromatography with on-line microdialysis. **Journal of Chromatography A**, v. 914, p. 77-82, 2001a.
- CHANG, Y.L.; CHOU, M.H.; LIN, M.F.; CHEN, C.F.; TSAI, T.H. Effect of cyclosporine, a P-glycoprotein inhibitor, on the pharmacokinetics of cefepime in rat blood and brain A microdialysis study. **Life Sciences**, v. 69, p. 191-199, 2001b.
- CHAPUIS, T.M.; GIANNONI, E.; MAJCHERCZYK, P.A.; CHIOLÉRO, R.; SCHALLER, M.D.; BERGER, M.M.; BOLAY, S.; DÉCOSTERD, L.A.; BUGNON, D.; MOREILLON, P. Prospective monitoring of cefepime in intensive care unit adult patients. **Critical Care**, v. 14, n. 2, p. 1-10 (R51), 2010.

CHAVALA, A.K.; BANMIMATH, G.; SAMA, N.S.; PRASANTH, K.V.R. Spectrophotometric determination some cephalosporins containing amino group using 1,2-naphthaquinone-4-sulfonic acid sodium in pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Technology**, v. 3, p. 1750-1767, 2011.

CHEATHAM, S.C.; SHEA, K.M.; HEALY, D.P.; HUMPHREY, M.L.; FLEMING, M.R.; WACK, M.F.; SMITH, D.W.; SOWINSKI, K.M.; KAYS, M.B. Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefepime administered by prolonged infusion in hospitalised patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 46-50, 2011.

CHEN, Y.; ZHANG, Y. Determination of cefepime in serum by solid phase extraction HPLC. **Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi**, v. 26, n. 4, p. 420-422, 2006.

CHEN, H.; LIN, Y.; DONG, P.; WEN, S.; HAN, M. Development of a HPLC method for determination of cefepime in plasma and its clinical application. **Zhongguo Yaoyue Zazhi**, v. 44, n. 2, p. 143-146, 2009.

CHERTI, N.; KINOWSKI, J.; LEFRANT, J.Y.; BRESSOLLE, F. High-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma and in urine and dialysis fluid using a column-switching technique. **Journal of Chromatography B**, v. 754, p. 377-386, 2001.

CHIERENTIN, L.; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of UV and visible spectrophotometry methods for quantitative determination norfloxacin in tablets. **Journal of Scientific Research**, v. 6, p. 531-541, 2014.

CHIERENTIN, L.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of norfloxacin in tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 629-635, 2015.

CHONG, X.M.; HU, C.Q. Compilation of an ESI-MS library of β -lactam antibiotics for rapid identification of drugs. **Chromatographia**, v. 68, p. 759-766, 2008.

COLIN, P.; BOCK, L.; T'JOLLYN, H.; BOUSSERY, K.; BOCXLAER, J.V. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify β -lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 103, p. 285-293, 2013.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453 p.

CONSORTTI, L.P.; SALGADO, H.R.N. Green method for quantification of sodium cefotaxime in lyophilized powder by infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Emerging Drugs**, v. 5, n. 1, p. 2-6, 2017.

CORRÊA, J.C.R.; REICHMAN, C.; VIANNA SOARES, C.D.; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 530-534, 2012.

- CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. A platform for designing quantitative infrared spectrophotometric method for drugs and pharmaceuticals analysis: a rediscover for an ecological and safer technique in the routine quality control laboratories. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 1, 2014.
- CORRÊA, J.C.R.; SERRA, C.H.R.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of first derivative spectrophotometric method for quantification of darunavir in tablets. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 722-730, 2014.
- CURBETE, M.M.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay for quantification of fusidic acid in a dermatological cream. **Talanta (Oxford)**, v. 153, p. 51-56, 2016.
- DĄBROWSKA, M.; STAREK, M.; KRZEK, J.; PAPP, E.; KRÓL, P. A degradation study of cefepime hydrochloride in solutions under various stress conditions by TLC–densitometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, p. 388-395, 2015.
- DE MARCO, B.A.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an innovative method for the determination of cefadroxil monohydrate in capsules. **Physical Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 67-74, 2016.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Cromatografia**, v. 7, p. 21-25, 1998.
- DELATTRE, I.K.; MUSUAMBA, F.T.; VERBEECK, R.K.; DUGERNIER, T.; SPAPEN, H.; LATERRE, P.F.; WITTEBOLE, X.; CUMPS, J.; TACCONE, F.S.; VINCENT, J.L.; JACOBS, F.; WALLEMACQ, P.E. Empirical models for dosage optimization of four β -lactams in critically ill septic patients based on therapeutic drug monitoring of amikacin. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 589-598, 2010.
- DENOOZ, R.; CHARLIER, C. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 864, p. 161-167, 2008.
- DESHPANDE, A.D.; BAHETI, K.G.; CHATTERJEE, N.R. Degradation of β -lactam antibiotics. **Current Science**, v. 87, n. 12, p. 1684-1695, 2004.
- DHARUMAN, J.G.; VASUDEVAN, M. Reliability-targeted HPLC–UV method validation — A protocol enrichment perspective. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 228-236, 2014.
- DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; WINOKUR, P.L.; GALES, A.C.; SADER, H.S.; KUGLER, K.; BEACH, M. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 595-607, 1999.
- DOĞAN, A.; NEMUTLU, E.; ÖZEK, M.A.; EROĞLU, H.; KIR, S.; BEKSAÇ, M.S. The pharmacokinetic profiles of pre-operative prophylactic cefepime application in pregnant and non-pregnant women undergoing surgical interventions using a fully validated liquid chromatographic method. **Chromatographia**, v. 76, p. 1513-1519, 2013.

DUAN, W.; XIA, D.; GUO, T. Determination of cefepime in human plasma by HPLC. **Zhongguo Yaofang**, v. 19, n. 29, p. 2262-2264, 2008.

ELAZAZY, M.S.; SHALABY, A. Validated spectrophotometric assay of cefepime hydrochloride and cefuroxime sodium using a tetrazolium salt. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 2261-2267, 2012.

ELKADY, E.F.; ABBAS, S.S. Development and validation of a reversed-phase column liquid chromatographic method for the determination of five cephalosporins in pharmaceutical preparations. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 5, p. 1440-1446, 2011.

EL-RABBAT, N.A.; ABDEL-WADOOD, H.M.; SAYED, M.; MOUSA, H.S. High-performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetic study of cefepime in goat plasma and milk after pre-column derivatization with Hg(I). **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 2599-2609, 2010.

EL-RABBAT, N.A.; ABDEL-WADOOD, H.M.; SAYED, M.; MOUSA, H.S. Spectrophotometric analysis of cefepime through its Hg(I) complex. **Bulletin of Pharmaceutical Science**, v. 35, p. 55-65, 2012.

EL-SHABOURY, S.R.; SALEH, G.A. MOHAMED, F.A.; RAGEH, A.H. Analysis of cephalosporin antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 1-19, 2007.

EL-HEWAITY, M. Influence of flunixin on the disposition kinetic of cefepime in goats. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

EP. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 7th ed. Council of Europe, 2011.

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.

EVAGELOU, V.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; KOUPPARIS, M. Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and cefpirome using UV spectrometry and pH potentiometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 1119-1128, 2003.

FARINA, A.; PORRÀ, R.; COTICHINI, V.; DOLDO, A. Stability of reconstituted solutions ceftazidime for injections: na HPLC and CE approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 521-530, 1999.

FARMACOPEA Argentina. 8. ed. Buenos Aires: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (A.N.M.A.T), 2009.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. Primeiro Suplemento. 5. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016.

FARMACOPEIA Portuguesa. 8. ed. Lisboa: Imprensa Nacional, 2005.

FARTHING, C.; FARTHING, D.; BROPHY, D.F.; LARUS, T.; MAYNOR, L.; FAKHRY, I.; GEHR, T.W.B. High-performance liquid chromatographic determination of cefepime and ceftazidime in human plasma and dialysate. **Chromatographia**, v. 67, p. 365-368, 2008.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of chromatographic methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1994.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: **Analytical Procedures and Methods Validation**. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, 2000.

FERDOUS, S.; SULTAN, M.Z.; BASHAR, T.; RAHMAN, A.; ISLAM, M.S. In vitro and in vivo studies of drug-drug interaction between metformin and cefepime. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 348, p. 1-5, 2015.

FIGUEIREDO, A.L. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de aztreonam**. 2014. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

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. 8, p. 101-104, 2012.

FRAU, J.; COLL, M.; DONOSO, J.; MUÑOZ, F.; VILANOVA, B; GARCÍA-BLANCO, F. Alkaline and acidic hydrolysis of the β -lactam ring. **Electronic Journal of Theoretical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 56-65, 1997.

FUKUTSU, N.; KAWASAKI, T.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Application of high-performance liquid chromatography hyphenated techniques for identification of degradation products of cefepime. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 153-159, 2006.

FUBARA, J.O.; NOTARI, R.E. Influence of pH, temperature and buffers on cefepime degradation kinetics and stability predictions in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 12, p. 1572-1576, 1998.

GARDNER, S.Y.; PAPICH, M.G. Comparison of cefepime pharmacokinetics in neonatal foals and adult dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, p. 187-192, 2001.

GOUDAH, A.; MOUNEIR, S.M.; SHIM, J.H.; ABD EL-ATY, A.M. Influence of endotoxin induced fever on the pharmacokinetics of intramuscularly administered cefepime in rabbits. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, p. 151-155, 2006.

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

GUO, Y.; YUE, Z. Determination of cefepime content in cefepime dihydrochloride and arginine by HPLC. **Heilongjiang Yiyao**, v. 19, n. 5, p. 338, 2006.

HALLIGAN, N.G.; BROWN, R.F.; SPRY, D.O.; BLASZCZAK, L.C. Radical rearrangement: a strategy for conversion of cephalosporin to 1-carba(dethia)cephalosporin. **Tetrahedron**, v. 56, n. 31, p. 5679-5685, 2000.

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

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, 2148p.

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

HIGUCHI, K.; IKAWA, K.; IKEDA, K.; OHGE, H.; SUEDA, T.; HOUCHI, H.; MORIKAWA, N. Peritoneal pharmacokinetics of cefepime in laparotomy patients with inflammatory bowel disease, and dosage considerations for surgical intra-abdominal infections based on pharmacodynamic assessment. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 14, p. 110-116, 2008.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZB, K-L., Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, p.109-118, 1999.

HIRTE, K.; SEIWERT, B.; SCHÜÜRMAN, G.; REEMTSMA, T. New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater. **Water Research**, v. 88, p. 880-888, 2016.

HOSNY, M.M. Development of simple green spectrophotometric method for determination of cefoperazone sodium and cefepime hydrochloride in bulk, pharmaceutical dosage forms and human urine. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 1, p. 145-150, 2014.

HU, J.; XIE, L.; XIAO, D.; FAN, H.; WANG, R.; QIAN, W.; LIU, X. HPLC method for the determination of cefepime in human plasma and its pharmacokinetics. **Zhongguo Xiandai Yinyong Yaoxue**, v. 24, n. 1, p. 53-56, 2007.

HUANG, H.; HUANG, S.; ZHU, P.; XI, X. Continuous versus intermittent infusion of cefepime in neurosurgical patients with post-operative intracranial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 68-72, 2014.

IBRAHIM, R.B.; LIU, C.Y.; CRONIN, S.M.; MURPHY, B.C.; CHA, R.; SWERDLOW, P.; AVILA, T.; SMITH, S.T.; LEWIS, R.A.; EDWARDS, D.J. Influence of plasma exchange on the disposition of the fourth generation cephalosporin cefepime. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 15, n. 4, p. 217-222, 2009.

ICH – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**. ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

IKAWA, K.; MORIKAWA, N.; HAYATO, S.; IKEDA, K.; OHGE, H.; SUEDA, T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiling of cefepime in plasma and peritoneal fluid of abdominal surgery patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 270-273, 2007.

IQBAL, M.S.; BAHARI, M.B.; DARWIS, Y.; VENKATESH, G.; GILLANI, S.W.; KHAN, A.H.; SHESHALA, R. A RP-HPLC-UV method with solid phase extraction for determination of cefepime in total nutrient admixtures: application to stability studies. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, p. 68-74, 2012.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, **Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

ISLA, A.; ARZUAGA, A.; MAYNAR, J.; GASCÓN, A.R.; SOLINÍS, M.A.; CORRAL, E.; PEDRAZ, J.L. Determination of ceftazidime and cefepime in plasma and dialysate-ultrafiltrate from patients undergoing continuous veno-venous hemodiafiltration by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 996-1005, 2005.

ISO - International Standard Organization. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**, ISO/IEC 17025, 1999.

JABALAMELI, F.; MIRSALEHIAN, A.; KHORAMIAN, B.; ALIGHOLI, M.; KHORAMROOZ, S.S.; ASADOLLAHI, P.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1192-1197, 2012.

JACQUELINE, C.; TATTEVIN, P. Ceftaroline, nouvelle céphalosporine active sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline: données expérimentales et cliniques, perspectives thérapeutiques. **Journal des Anti-infectieux**, v. 14, p. 3-10, 2012.

JAGADEESH KUMAR, V.; BADARINADH GUPTA, P.; PAVAN KUMAR, K.S.R.; PRASADA RAO, K.V.V.; RAO, K.R.; PRASANNA, S.J.; KUMAR SHARMA, H.; MUKKANTI, K. Identification and characterization of new degradation products of cefepime dihydrochloride monohydrate drug substance during stress stability studies. **Analytical Sciences**, v. 26, p. 1081-1086, 2010.

JANASEK, D.; FRANZKE, J.; MANZ, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. **Nature**, v. 442, p. 374-380, 2006.

JANE, J.; PRASHANT, K.D.; SUBRAHMANYAM, E.V.S. HPLC and colorimetric methods for estimation of cefepime. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 3, p. 102-105, Journal, 2010

JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel: Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1992.

JIANG, M.; WANG, L.; JI, R. Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment. **Chemosphere**, v. 80, p. 1399-1405, 2010.

JIMÉNEZ PALACIOS, F.J.; CALLEJÓN MOCHÓN, M.; JIMÉNEZ SÁNCHEZ, J.C.; BELLO LÓPEZ, M.Á.; GUIRÁUM PÉREZ, A. Validation of an HPLC method for determination of cefepime (a fourth-generation cephalosporin). Determination in human serum, cerebrospinal fluid, and urine. Pharmacokinetic profiles. **Chromatographia**, v. 62, p. 355-361, 2005.

JOSHI, S; SHARMA, A.; RAWAT, M.S.M.; DHIMAN, C. Development of conditions for rapid thin layer chromatography of β -lactam antibiotics. **Journal of Planar Chromatography**, v. 22, n. 6, p. 435-437, 2009.

JP. JAPANESE PHARMACOPOEIA. 16th ed. Tokyo Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011. p. 557-560.

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.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p.3, 11, 12.

KHAN, A.U.; IQBAL, J.; KHATTAK, S. Kinetics of degradation of cefepime hydrochloride in various aqueous based solutions. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v. 4, p. 4079-4089, 2012.

KIM, Y.; YIM, D.; LEE, D.; LEE, S. A simple and sensitive assay for cefepime in human plasma using high performance liquid chromatography. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 247-250, 2003.

KLAUSON, D.; BABKINA, J.; STEPANOVA, K.; KRICHEVSKAYA, M.; PREIS, S. Aqueous photocatalytic oxidation of amoxicillin. **Catalysis Today**, v. 151, n. 1-2, p. 39-45, 2010.

KODYM, A.; PAWŁOWSKA, M.; RUMIŃSKI, J.K.; BARTOSIŃSKA, A.; KIELIBA, A. Stability of cefepime in aqueous eye drops. **Pharmazie**, v. 66, p. 17-23, 2011.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v. 33, p. 1-6, 2013.

KOGAWA, A.C.; AGUIAR, F.A.; GAITANI, C.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of darunavir in tablets and comparison with the of infrared absorption spectroscopic method. **World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 283-297, 2014.

KOGAWA, A.C.; MELLO, N.P.; SALGADO, H.R.N. Quantification of doxycycline in raw material by an eco-friendly method of infrared spectroscopy. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 7, n. 2, p. 463, 2016.

- KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quantification of rifaximin in tablets by spectrophotometric method ecofriendly in ultraviolet region. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometry in infrared region: a new, low cost and green way to analyze tablets of rifaximin. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 13, p. 1-5, 2017.
- KOUFOPOULOU, S.-A.; PISTOS, C.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Application of the ion pair concept to the *n*-octanol–water partitioning of cefepime and ceftiofime. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, p. 52-57, 2006.
- KRICKA, L.J. Miniaturization of analytical systems. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2008-2014, 1998.
- KUMAR, V.J.; GUPTA, P.B.; KUMAR, K.S.R.P.; RAO, K.V.V.P; RAO, K.R.; PRASANNA, S.J.; SHARMA, H.K.; MUKKANTI, K. Identification and characterization of new degradation products of cefepime dihydrochloride monohydrate drug substance during stress stability studies. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 10, p. 1081-1086, 2010.
- KUSABA, T. Safety and efficacy of cefazolin sodium in the management of bacterial infection and in surgical prophylaxis. **Clinical Medicine: Therapeutics**, v. 1, p. 1607-1615, 2009.
- LAMY, B.; LAURENT, F.; KODJO, A.; ROGER, F.; JUMAS-BILAK, E.; COLBVH STUDY GROUP, MARCHANDIN, H. Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using *Enterobacteriaceae* breakpoints. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 2369-2377, 2012.
- LA ROCA, M.F.; SOARES Sobrinho, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM Neto, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.
- LI, D.; YANGA, M.; HUB, J.; ZHANGA, Y.; CHANGB, H.; JINB, F.; Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. **Water Research**, v. 42, p. 307-317, 2008.
- LI, H.; XING, J.; LIU, Z.; LIU, S. Analysis of cephalosporins by electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry. **Journal of Chinese Mass Spectrometry Society**, v. 26, n. 4, p. 198-202, 2005.
- LI, J.; ZHANG, D.S.; CHONG, X.M.; HU, C.Q. Influence of substituent groups at the 3-position on the mass spectral fragmentation pathways of cephalosporins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 2143-2150, 2010.
- LI, J.; ZHANG, D.S.; HU, C.Q. Characterization of impurities in cefpodoxime proxetil using LC-MSⁿ. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 4, p. 322-332, 2014.
- LING, B.; ALCORN, J. Acute administration of cefepime lowers L-carnitine concentrations in early lactation stage rat milk. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 7, p. 1317-1322, 2008.

LIU, H.; SANDERLAND, V.B. Validated method for simultaneous determination of cefepime and L-Arginine in cefepime for injection by capillary zone electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 27, n. 19, p. 3065-3076, 2004a.

LIU, H.; SANDERLAND, V.B. Determination of *N*-Methylpyrrolidine in cefepime for injection by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Chromatographia**, v. 59, p. 653-657, 2004b.

LIU, Q.; XU, L.; YU JIN, Y.K.; ZHANG, F.; LIANG, X. Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 623-628, 2011.

LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of bioassay UV-spectrophotometry and high performance liquid chromatographic determination of gatifloxacin in tablets. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1831-1835, 2008.

LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Development of a validated stability-indicating LC assay and stress degradation studies of linezolid in tablets. **Chromatographia Supplement**, v. 69, p. S129-S135, 2009.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MADDOX, F.C.; STEWART, J.T. HPLC determination of an aqueous cefepime and metronidazole mixture. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 22, n. 18, p. 2807-2813, 1999.

MARKENS, U. Conducting stability studies – recent changes to climatic zone IV. **Pharma Times**, v. 42, n. 7, p. 13-14, 2010.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in tablets. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 136-137, 1999.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Performance characteristic of bioassay, UV-spectrophotometry and high performance liquid chromatographic determination of sparfloxacin in tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 171-175, 2001a.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in pharmaceutical formulations using bromothymol blue. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 3, p. 501-504, 2001b.

MARSHALL, L.E.; BLAIR, J.E. The cephalosporins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, p. 187-195, 1999.

MARRAPU, A.; VEENAEESH; SIRIPURAPU, K.; KUMAR.G., M. Simultaneous estimation of cefepime HCl and tazobactam sodium in injection dosage form by using RP-HPLC. **International Journal of Pharmacy and Biological Science**, v. 3, n. 4, p. 188-192, 2013.

MARTIN, S.I.; KAYE, K.M. Beta-lactam antibiotics: newer formulations and newer agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 603-619, 2004.

MARTÍNEZ, L.G.; FALCÓ, P.C.; CABEZA, A.S. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 3, p. 405-423, 2002.

MASOUD, M.S.; ALI, A.E.; GHAREEB, D.A.; NASR, N.M. Synthesis, molecular spectroscopy and thermal analysis of some cefepime complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1107, p. 189-201, 2016.

MAXCEF[®]. **Bula cloridrato de cefepima**. Revisão 0214. São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.bristol.com.br/Files/Bulas/MAXCEF_PO_INJ_VP6_Rev0214.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2016.

MEYER, V.R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 15. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2010. p.17.

MIRSALEHIAN, A.; FEIZABADI, M.; NAKHJAVANI, F.A.; JABALAMELI, F.; GOLI, H.; KALANTARI, N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. **Burns**, v. 36, n. 1, p. 70-74, 2010.

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.

MOHAMED, F.A.; SALEH, G.A.; EL-SHABOURY, S.R.; RAGEH, A.H. Selective densitometric analysis of cephalosporins using Dragendorff's reagent. **Journal of Chromatography**, v. 68, n. 5/6, p. 365-374, 2008.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009.

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 of a new high-performance liquid chromatographic method for determination of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 739-743, 2008.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Rapid and selective UV spectrophotometric method for the analysis of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 820-823, 2009.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Desenvolvimento de metodologia qualitativa para identificação de ceftazidima. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 165-173, 2010.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Comparison of high performance liquid chromatography and three titrimetric methods for the determination of ceftazidime in pharmaceutical formulations. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 6-13, 2012a.

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

MOSTAFA, N.M.; ABDEL-FATTAH, L.; WESHAHY, S.A.; HASSAN, N.Y.; BOLTIA, S.A. Stability-indicating spectro uorometric method for the determination of some cephalosporin drugs via their degradation products. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 2, p. 361-370, 2015.

MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.; MUNK, A.; WIESE, M. Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 803, p. 273-278, 1998.

NÄGELE, E.; MORITZ, R. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSⁿ and accurate mass determination by ESI TOF. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 10, p. 1670-1676, 2005.

NANDA, R.K.; NAVATHAR, D.A.; KULKARNI, A.A.; PATIL, S.S. Simultaneous spectrophotometric estimation of cefepime and tazobactam in pharmaceutical dosage form. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 1, p. 152-156, 2012.

NATORI, J.S.H.; TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a green analytical method for the determination of norfloxacin in raw material by FTIR spectrophotometry. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 6, p. 1533-1536, 2016.

NAWAL, A.; EL-HANAA, M.; ABDEL-WADOOD, M.S.; MOUSA, H. Spectrophotometric analysis of cefepime through its Hg(I) complex. **Bulletin Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 55-65, 2012.

NEELIMA, K.; RAJENDRA PRASAD, Y.; APPALRAJU, N.; SELINA, S.; NIKHILA, R. Analytical method development and validation of cefepime hydrochloride and tazobactam sodium in bulk and sterile dry powder for injection by gradient RP-HPLC. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 10, p. 8400-8407, 2013.

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

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NING, C.; YIJUN, C. Study on the determination of high molecular polymers in cefepime hydrochloride. **Guangdong Yaoxueyuan Xuebao**, v. 27, n. 6, p. 613-616, 2011.

NOGUEIRA, K.S.; DAUR, A.V.; REASON, I.T.; GALES, A.C.; COSTA, L.M. Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 167-169, 2011.

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.

NOLIN, T.D.; LAMBERT, D.A.; OWENS JR, R.C. Stability of cefepime and metronidazole prepared for simplified administration as a single product. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, p. 179-184, 2006.

OCAÑA GONZÁLEZ, J.A.; JIMÉNEZ PALACIOS, F.J.; CALLEJÓN MOCHÓN, M.; BARRAGÁN DE LA ROSA, F.J. Simultaneous determination of cefepime and grepafloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 117-123, 2004.

OCAÑA GONZÁLEZ, J.A.; CALLEJÓN MOCHÓN, M.; BARRAGÁN DE LA ROSA, F.J. Simultaneous determination of cefepime and the quinolones garenoxacin, moxifloxacin and levofloxacin in human urine by HPLC-UV. **Microchimica Acta**, v. 151, p. 39-45, 2005.

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

OHMORI, T.; SUZUKI, A.; NIWA, T.; USHIKOSHI, H.; SHIRAI, K.; YOSHIDA, S.; OGURA, S.; ITOH, Y. Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1038-1042, 2011.

PAGE, N.; STEVENSON, R.; POWELL, M. Analysis of *N*-methylpyrrolidine in cefepime hydrochloride by ion chromatography using suppressed conductivity detection with solid-phase extraction pre-treatment. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1248-1253, 2014.

PAPAGORAS, D.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; KANARA, M.; DOURIDAS, G.; PARASKEVOPOULOS, I.; ANTZAKLIS, G.; KARAYANNACOS, P.; GIAMARELLOU, H. Pancreatic concentrations of cefepime in experimental necrotizing pancreatitis. **Journal of Chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 43-46, 2003.

PAPANNA, R.K.; KRISHNEGOWDA, J.B.; NAGARAJA, P. Spectrophotometric method for the determination of cefepime, cefazolin sodium and cefalothin sodium in pure and pharmaceutical dosage forms by using ninhydrin. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 194-199, 2015.

PATANI, K.; PATEL, U.; BHAVSAR, S.; THAKER, A.; SARVAIYA, J. Single dose pharmacokinetics of cefepime after intravenous and intramuscular administration in goats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 159-162, 2008.

PATEL, U.D.; BHAVSAR, S.K.; THAKER, A.M. Pharmacokinetics and dosage regimen of cefepime following single dose intravenous administration in calves. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 127-130, 2006.

PATEL, U.G.; MODY, S.K.; TRADA, B.S. HPLC analysis and pharmacokinetics of cefepime in sheep following single dose intravenous administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Toxicology**, v. 5, n. 1-2, p. 43-46, 2006.

PATEL, B.; PATEL, J.; PARMAR, K.; PATEL, M. Spectrophotometric estimation of fourth generation cephalosporin: cefepime in pharmaceutical dosage forms. **IJPI's Journal of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 7-11, 2011.

PATEL, H.B.; PATEL, N.N.; PATEL, S.D.; DEWDA, S.; PATEL, J.H.; BHAVSAR, S.K.; THAKER, A.M. Effect of ketoprofen co-administration and febrile state on pharmacokinetic of cefepime in goats. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 1, p. 46-53, 2012a.

PATEL, N.N.; PATEL, H.B.; PATEL, S.D.; PATEL, J.H.; BHAVSAR, S.K.; THAKER, A.M. Effect of ketoprofen co-administration and febrile state on pharmacokinetic of cefepime in sheep. **Veterinarski Arhiv**, v. 82, n. 5, p. 473-481, 2012b.

PATEL CHAHANA, A.; PATEL HARSHA, U.; PATEL CHHAGANBHAI, C. Estimation of cefepime hydrochloride in injectable dosage form by difference spectrophotometry. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 4, n. 5, p. 6-8, 2013.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage learning, 2010. 700p.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of cefazolin sodium by UV-spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, v. 3, p. 11-20, 2013.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium pharmaceutical dosage form by high performance liquid chromatography to be applied for quality control in pharmaceutical industry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 213-223, 2014a.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a microbiological assay by turbidimetry to determine the potency of cefazolin sodium in the lyophilized powder form. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1391-1396, 2014b.

PEDROSO, T.M.; MEDEIROS, A.C.D.; SALGADO, H.R.N. RP-HPLC HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. **Talanta**, v. 160, p. 745-753, 2016.

PENG, C.; ZHANG, J.; GUO, J. Determination of cefepime in human plasma by SEP-HPLC. **Zhongguo Yaoshi**, v. 15, n. 9, p. 1258-1260, 2012.

PETRIKKOS, G.; KASTANAKIS, M.; MARKOGIANNAKIS, A.; KASTANAKIS, S.; BASTOUNIS, E.; ANTONIOS, P.; DAIKOS, G.L.; KATSILAMBROS, N. Pharmacokinetics of cefepime in bile and gall bladder tissue after prophylactic administration in patients with extrahepatic biliary diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 331-334, 2006.

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.

PISTOS, C.M.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; KOUPPARIS, M. The effect of ion pairing reagents in the retention profile of zwitterionic cephalosporins. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 26, p. 937-952, 2003.

PITKIN, D.; ACTOR, P.; HOLL, W.; POST, A.; WEISBACH, J.A. Semiautomated turbidimetric microbiological assay for determination of cefazolin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, n. 3, p. 223-227, 1974.

PRASANNA, S.J.; SHARMA, H.K.R.; MUKKANTI, K.; KUMAR, V.J.; RAJA, G.; SIVAKUMARAN, M. Validation of capillary electrophoresis method for determination of N-methylpyrrolidine in cefepime for injection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 10, p. 830-834, 2010.

RABOUAN-GUYON, S.M.; GUET, A.F.; COURTOIS, P.Y.; BARTHES, D.M.C. Stability study of cefepime in different infusion solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 185-190, 1997.

RAMBABU, C.; JYOTHIRMAYEE, C.A.; NAGA RAJU, K. Spectrophotometric analytical study for the charge-transfer complex formation of cefepime. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 417-418, 2012.

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.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829p.

REYGAERT, W.C. Ceftobiprole: An emerging therapeutic option for resistant and complicated infections. **Clinical Medicine Insights: Therapeutics**, v. 3, p. 57-66, 2011.

RFE. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. 3. ed. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2005.

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.L.V.; 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.

ROBERTS, J.A.; ULLDEMOLINS, M.; ROBERTS, M.S.; MCWHINNEY, B.; UNGERER, J.; PATERSON, D.L.; LIPMAN, J. Therapeutic drug monitoring of β -lactams in critically ill patients: proof of concept. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 4, p. 332-339, 2010.

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.

RÓDENAS, V.; PARRA, A.; GARCIA-VILLANOVA, J.; GÓMEZ, M.D. Simultaneous determination of cefepime and L-arginine in injections by second-derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, n. 9, p. 1095-1099, 1995.

RODRIGUES, D.F.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a green analytical method of RP-HPLC for quantification of cefepime hydrochloride in pharmaceutical dosage form: simple, sensitive and economic. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 12, p. 306-314, 2016.

RUGANI, K.S.; SALGADO, H.R.N. Stability-indicating LC method for the determination of cephalothin in lyophilized powder for injection. **Analytical Methods**, v. 6, p. 4437-4445, 2014.

SACHER, F., LANGE, F.T., BRAUCH, H-J., BLANKENHORN, I., Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 199-210, 2001.

SADER, H.S.; FRITSCHKE, T.R.; JONES, R.N. Accuracy of three automated systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1101-1104, 2006.

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.

SALGADO, H.R.N.; MORENO, P.R.H.; BRAGA, A.L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Photodegradation of sparfloxacin and isolation of its degradation products by preparative HPLC. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 2005.

SALGADO, H.R.N.; MORENO, A.H.; GARG, S. LC-DAD Determination of fleroxacin in bulk and pharmaceutical dosage forms. **Chromatographia Supplement**, v. 69, p. S237-S250, 2009.

SALGADO, H.R.N.; OLIVEIRA, C.L.C.G. Development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of gatifloxacin in tablets. **Die Pharmazie**, v. 60, n. 4, p. 263-264, 2005.

SALGADO, H.R.N.; TOZO, G.C.G. Microbiological assay for cefoxitin sodium in dosage form. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 452-455, 2007.

SAMANIDOU, V.F.; HAPESHI, E.A.; PAPADOYANNIS, I.N. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporins antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. **Journal of Chromatography**, v. 788, p. 147-158, 2003.

SANDERS, W.E. JR.; TENNEY, J.H.; KESSLER, R.E. Efficacy of cefepime in the treatment of infections due to multiply resistant *Enterobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 454-461, 1996.

SENZEL, A.J. Miniaturization in analytical instrumentation. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 79A-81A, 1970.

SHAMSIPUR, M.; TALEBPOUR, Z.; BIJANZADEH, H.R.; TABATABEI, S. Monitoring of ampicillin and its related substances by NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1075-1085, 2002.

SHEN, K.; LU, Y.; YU, Z.; WANG, Q.; ZHOU, J.; LI, D.; ZHAO, Z. HPLC determination of cefepime in human plasma and cerebrospinal fluid. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v. 25, n. 3, p. 263-266, 2005.

SHUKLA, A.K.; FUTRELL, J.H. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 9, p. 1069-1090, 2000.

SIDDIQUI, M.R.; TARIQ, A.; REDDY, K.D.; NEGI, P.S.; YADAV, J.; BHATNAGAR, A.; CHAUDHARY, M.; SINGH, R. High performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of cefepime and sulbactam in pharmaceutical formulation (supime) and biological samples. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 271-277, 2010.

SILVA, L.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Chromatographic Science**, v. 0, p. 1-8, 2012.

SILVA, L.M.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to potency evaluation of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Microbiological Methods**, v. 110, p. 49-53, 2015.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. p. 70-122.

SINGH, G.S. Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheams, oxacepheams, penams and sulbactam. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 93-109, 2004.

SINGH, P.S.; SHAH, G.; BHARTI, R. To formulate the fixed dose combination of cefepime and amikacin. **International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences**, v. 1, p. 279-293, 2011.

SINGH, S.; RIYAZ, M.; RAJ, V.; KUMAR, A. Newer method to estimate cefepime in bulk and pharmaceutical formulation by ultraviolet spectroscopy. **International Journal of Pharmacy and Integrated Life Sciences**, v. 1, n. 4, p. 149-158, 2013.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SMITH, R.W.; COX, L.B.; YUDIN, A.; REYNOLDS, J.C.; POWELL, M.; CREASER, C.S. Rapid determination of *N*-methylpyrrolidine in cefepime by combining direct infusion electrospray ionisation-time-of-flight mass spectrometry with field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, p. 34-39, 2015.

SOUZA, M.J.; KULMANN, R.R.; SILVA, L.M.; NOGUEIRA, D.R.; ZIMMERMANN, E.S.; SCHMIDT, C.A. Development and in-house validation of a microbiological assay for determination of cefepime in injectable preparations. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 5, p. 1367-1372, 2006.

STOCKA, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M.; NAMIEŚNIK, J. Green aspects of techniques for the determination of currently used pesticides in environmental samples. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 7785-7805, 2011.

SUBRAMANIAN, N.H.; THYAGARAJAN, S.; MANIGANDAN, P.; JEEVAN, R.G.; RADHAKRISHNAN, G. An improved ion chromatographic method for fast and sensitive determination of *N*-methylpyrrolidine in cefepime hydrochloride. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 7, p. 549-552, 2009.

SUJITH, M.; ABRAHAM, S.; DIVAKAR, M.C. Visible spectrophotometric method for the estimation of cefepime. **Hygeia Journal of Drugs and Medicines**, v. 2, n. 2, p. 32-37, 2010.

SUNITHA, N.; SINDHURA, L.; THANGABALAN, B.; MANOHAR BABU, S. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of cefepime and tazobactam in injection formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 4, p. 131-137, 2013.

SWEETMAN, S.C. (Ed). **Martindale: The Complete Drug Reference**. 36th ed. London: RPS Publishing, 2009. 3694 p.

TAMBOLI, S.R.; PATIL, D.D. RP-HPLC method for simultaneous estimation of cefepime hydrochloride and tazobactam sodium in bulk and pharmaceuticals. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

TIEGANG, Z. Determination of cefepime hydrochloride residue in eluting solution of equipment by HPLC. **Heilongjiang Yiyao**, v. 22, p. 604-606, 2009.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 943-951, 2009.

TORRES, I.M.S.; BENTO, E.B.; ALMEIDA, L.C.; MARTINS DE SÁ, L.Z.C.; LIMA, E.M. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 984-992, 2012.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 103-108, 2012.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an economic, environmental friendly and stability-indicating analytical method for determination of ampicillin sodium for injection by RP-HPLC. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 1928-1943, 2014.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. A green approach for the quantification of daptomycin in pharmaceutical formulation by UV spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 811-821, 2015a.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1276-1285, 2015b.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in lyophilized powder. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 106-121, 2015c.

TOZO, G.C.G; SALGADO, H.R.N. Determination of lomefloxacin in tablet preparations by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 5, p. 1305-1308, 2006.

TRIVEDI, H.K.; KSHTRI, N.; PATEL, M.C. A rapid, validated RP-HPLC method for the simultaneous determination of cleaning validation and cross-contamination of 12 beta-lactam compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, p. 151-165, 2013.

USLU, B.; OZKAN, S.A.; ZUMAN, P. Contribution to the alkaline degradation of cefepime. **Microchemical Journal**, v. 76, p. 61-63, 2004.

USP 37. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 32). 37th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention, 2014.

VALASSIS, I.N.; PARISSI-POULOU, M.; MACHERAS, P. Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 721, p. 249-255, 1999.

VADAS, E.B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A.R. Remington's: **The science and practice of pharmacy**. 20. ed. Easton: Mack Publishing Company, 2000. p. 986-994.

VEDEL, G. Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 657-664, 2005.

VERA LÓPEZ, K.J.; FARIA BERTOLUCI, D.; VICENTE, K.M.; DELL'AQUILLA, A.M.; JORGE SANTOS, S.R.C. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 860, p. 241-245, 2007.

VERDIER, M.C.; TRIBUT, O.; TATTEVIN, P.; TULZO, Y.L.; MICHELET, C.; BENTUÉ-FERRER, D. Simultaneous determination of 12 β -Lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4873-4879, 2011.

VIEIRA, D.C.M.; SALGADO H.R.N. Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical products. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 508-511, 2011.

VIEIRA, D.C.M.; RICARTE, P.C.; SALGADO H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of cefuroxime sodium in powder for injection by infrared spectroscopy. **Advances in Analytical**, v. 2, p. 80-87, 2012a.

VIEIRA, D.C.M.; RICARTE, P.C.; SALGADO H.R.N. Validation of microbiological assay for determination of cefuroxime in injectable preparations. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 746-750, 2012b.

VIEIRA, D.C.M.; FIUZA, T.; SALGADO H.R.N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of cefuroxime sodium in powder for dissolution for injection. **Pathogens**, v. 3, p. 656-666, 2014.

VIMAL, D.M. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of cefepime hydrochloride and amikacin sulphate in injection dosage form. **Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research**, v. 2, p. 138-143, 2012.

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

WAGNER, R.D.; JOHNSON, S.J.; CERNIGLIA, C.E.; ERICKSON, B.D. Bovine intestinal bacteria inactivate and degrade ceftiofur and ceftriaxone with multiple β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4990-4998, 2011.

WANG, X. Determination of cefepime hydrochloride and its related substances by HPLC. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v. 40, n. 12, p. 938-940, 2005.

WANG, J.; RUAN, D.; SHAN, W. Separation and characterization of the impurities and isomers in cefmenoxime hydrochloride by HPLC-UV-MSⁿ. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 36, n. 15, p. 2125-2141, 2013.

WANG, J.; WANG, Q.; ZHAO, L.; SHI, G.; ZHOU, J. Blood-brain barrier penetration of cefepime after neurosurgery. **Chinese Medical Journal**, v. 120, n. 13, p. 1176-1178, 2007.

WOLFF, F.; DEPREZ, G.; SEYLER, L.; TACCONE, F.; HITES, M.; GULBIS, B.; VINCENT, J.; JACOBS, F.; COTTON, F. Rapid quantification of six β -lactams to optimize dosage regimens in severely septic patients. **Talanta**, v. 103, p. 153-160, 2013.

WRIGHT, G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, p. 4055-4061, 2011.

- YAN, S.; SONG, W. Photo-transformation of pharmaceutically active compounds in the aqueous environment: a review. **Environmental Science Processes and Impacts**, v. 16, n. 4, p. 697-720, 2014.
- YAN, X.; HU, X.; CAO, G.; HE, X. Simultaneous determination of cefepime HCl and its related substances by RP-HPLC. **Zhongguo Xinyao Zazhi**, v. 13, n. 1, p. 47-49, 2004.
- YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. **The Association of Official Analytical Chemistry**. v. 33, Washington, DC, 1975.
- XIA, D.; GUO, T.; CHEN, Y.; QIN, H. Determination of the content of cefepime in human plasma by HPLC method. **Yaoxue Fuwu Yu Yanjiu**, v. 7, n. 2, p. 117-119, 2007.
- ZAID, A.N.; AL-RAMAHI, R.; GHOUSH, A.A.; MALKIEH, N.; KHAROAF, M. Influence of physical factors on tablet splitting, weight and content uniformity of atenolol tablets. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 5, p. 229-234, 2012.
- ZAJĄC, M.; MUSZALSKA, I. Mechanism of ceftriaxone degradation in aqueous solution. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 55, n. 1, p. 35-39, 1998.
- ZAJĄC, M.; SIWEK, J.; MUSZALSKA, I. The mechanism of ceftazidime degradation in aqueous solutions. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 55, n. 4, p. 275-278, 1998.
- ZALEWSKI, P.; SKIBINSKI, R.; CIELECKA-PIONTEK, J. Stability studies of ceftiofime sulfate in the solid state: identification of degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 92, p. 22-25, 2014.
- ZHANG, G.; TAO, W.; XU, Y.; GE, W. Determination of cefepime hydrochloride for injection by HPLC. **Huaxi Yaoxue Zazhi**, v. 23, n. 4, p. 470-471, 2008.
- ZHANG, X.; FENG, Y.; HU, C. Feasibility and extension of universal quantitative models for moisture content determination in beta-lactam powder injections by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, n. 2, p. 131-140, 2008.
- ZHU, J.; ZHANG, H.; HU, C. Optimal mode of capillary electrophoresis for the impurity analysis of β -lactam antibiotics. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 19, p. 285-292, 2010.