

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

MARIANA TEIXEIRA DA TRINDADE

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
ANÁLISE DE CEFTRIAXONA SÓDICA PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

ARARAQUARA

2018

MARIANA TEIXEIRA DA TRINDADE

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
ANÁLISE DE CEFTRIAXONA SÓDICA PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

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

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA-SP

2018

Ficha Catalográfica

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

T833d

Trindade, Mariana Teixeira da
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para análise de ceftriaxona sódica pó para
solução injetável / Mariana Teixeira da Trindade. – Araraquara, 2018.
70 f. : Il.

Dissertação (Mestrado) – 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. Ceftriaxona sódica. 2. F Controle de qualidade. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência.
4. Espectrofotometria na região do infravermelho. 5. Método microbiológico. 6. Validação.
7. Métodos analíticos. 8. Química analítica verde. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

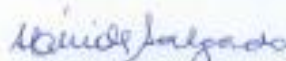


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

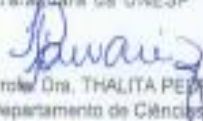
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE CEFTRIAXONA SÓDICA PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

AUTORA: MARIANA TEIXEIRA DA TRINDADE
ORIENTADORA: HERIDA REGINA NUNES SALGADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. HERIDA REGINA NUNES SALGADO
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof.ª Dra. THALITA PEIRONI FORMARIZ PILON
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. MARLLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 22 de janeiro de 2018

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas Graças a Deus, não somos o que éramos.”

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande mestre, por guiar todos os meus passos.

À minha família, meus pais, minha irmã, pelo apoio incondicional, compreensão e carinho, sem vocês nada seria possível!

Ao Decio, pelo companheirismo, incentivo, dedicação e paciência. Obrigada por tornar minha caminhada mais leve e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pela oportunidade, confiança, apoio e pelo exemplo de profissionalismo e amor a profissão, levo no coração todos os momentos vividos, sua sabedoria e a forma como a vida deve ser lindamente semeada. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. O saber se aprende com mestres e livros. A sabedoria, com o corriqueiro, com a vida e com os humildes. O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada. Caminhando e semeando, sempre se terá o que colher” (Cora Coralina).

À Maria de Fátima, pela amizade e dedicação. Obrigada por cuidar de todos nós!

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e do Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da UNESP pelos ensinamentos e contribuição em minha formação científica.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Controle de Qualidade Biológico, que compartilharam momentos e experiências inesquecíveis: Bia, Carol Kogawa, Carol Magnani, Danilo, Eliane, Felipe, Ivone, Ketylin, Livia, Rúbia, Tahisa e todos os estagiários.

A todos os meus queridos amigos que conquistei no decorrer da vida.

À Maria Diva, por me ajudar a enxergar o grande sentido da vida.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, por contribuírem direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

À empresa ABL Antibióticos do Brasil Ltda, pela gentil doação dos medicamentos analisados neste trabalho.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

RESUMO

A ceftriaxona sódica é um antimicrobiano semi-sintético de terceira geração, pertencente ao grupo das cefalosporinas, de uso parenteral. Atua impedindo a síntese da parede bacteriana, sendo altamente estável à maioria das β -lactamases. É o fármaco de escolha para o tratamento de infecções gonocócicas, também é indicado no tratamento de meningite, entre outras infecções. Há poucos estudos na literatura em relação ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação da ceftriaxona sódica, visando solventes ecologicamente recomendados, segurança ao analista, menor tempo de análise e custo, como também, viabilidade e facilidade de execução do método. Baseado nestas necessidades, o intuito do trabalho foi desenvolver e validar métodos quantitativos físico-químicos para a análise da ceftriaxona sódica pó para solução injetável empregando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do infravermelho, como também a determinação da potência do medicamento pelo método microbiológico por turbidimetria, sendo todos os métodos propostos indicativos de estabilidade. O método por espectrofotometria na região do infravermelho foi realizado obtendo-se pastilhas de brometo de potássio com massa total de 150 mg, na faixa de concentração de 0,40 a 1,20 mg/pastilha, o teor encontrado foi de 94,18% e a exatidão de 100,44%. O método por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado utilizando fase móvel constituída por água e ácido ortofosfórico na concentração de 0,20% e etanol 87:13 (v/v), na faixa linear avaliada de 20,00 a 120,00 $\mu\text{g/mL}$, o fármaco apresentou tempo de retenção médio de 4,40 minutos com detecção no UV em comprimento de onda de 260 nm, o teor encontrado foi de 98,11% e a exatidão 99,53%. O método microbiológico por turbidimetria foi validado na faixa de concentração de 100,00 a 196,00 $\mu\text{g/mL}$, utilizou-se *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 - IAL 2082 como micro-organismo, caldo BHI e água como diluente, apresentou potência de 98,94% e exatidão de 100,33%. Um estudo da estabilidade dos diluentes foi realizado utilizando os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência e microbiológico; desta forma, foi possível avaliar a estabilidade do fármaco após sua reconstituição. Todos os métodos validados cumpriram com os requisitos exigidos, de acordo com os guias do ICH e FDA e pela legislação brasileira, RE nº 899 e RDC nº 166 e apresentaram vantagens quando comparados aos métodos apresentados pela literatura por possuírem pouca geração de resíduos no meio ambiente, baixo uso de reagentes tóxicos e tempo de análise reduzido. Os métodos propostos não apresentaram diferença estatística significativa, demonstrando equivalência para a quantificação da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável.

Palavras-chave: Ceftriaxona sódica. Controle de qualidade. Cromatografia líquida de alta eficiência. Espectrofotometria na região do infravermelho. Método microbiológico. Métodos analíticos. Química analítica verde. Validação.

ABSTRACT

Ceftriaxone sodium is a third generation semi-synthetic antibiotic, belonging to the group of cephalosporins, for parenteral use. It acts to prevent the synthesis of the bacterial wall, being highly stable to most β -lactamases. It is the drug of choice for the treatment of gonococcal infections; it is also indicated in the treatment of meningitis, among other infections. There are few studies in the literature regarding the development and validation of analytical methods for the quantification of ceftriaxone sodium, aiming at environmentally-friendly solvents, analyst safety, less analysis time and cost, feasibility and easy method execution. Based on these needs, the aim of the work was to develop and validate quantitative physicochemical methods for the analysis of ceftriaxone sodium in powder solution for injection through the techniques of high-performance liquid chromatography and infrared spectroscopy, also the potency of the drug was determined by the microbiological method by turbidimetry, all proposed methods are indicative of stability. The method by infrared spectrophotometry was carried out with potassium bromide pellets with a total mass of 150 mg in the concentration range of 0.40 to 1.20 mg/pellet were prepared, the content found was 94.18% and accuracy of 100.44%. The high-performance liquid chromatography was validated using mobile phase constituted by water and orthophosphoric acid in the concentration of 0.20% and ethanol 87:13 (v/v), in the linear range evaluated from 20.00 to 120.00 $\mu\text{g/mL}$, the drug had a mean retention time of 4.40 minutes with UV detection at wavelength 260 nm, the content found was 98.11% and the accuracy of 99.53%. The microbiological method by turbidimetry was validated in the concentration range of 100.00 to 196.00 $\mu\text{g/mL}$, using *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 - IAL 2082 as microorganism, BHI broth and water as diluent; which presented potency of 98.94% and accuracy of 100.33%. A study of the stability of the diluents by high-performance liquid chromatography and microbiological methods was also carried out, this way it was possible to evaluate the stability of the drug after its reconstitution. All validated methods have met all the requirements according to ICH and FDA guidelines and Brazilian legislation, RE 899 and RDC 166 and presented advantages when compared to the methods presented in the literature because they have low generation of residues in the environment, low use of toxic reagents and reduced analysis time. The proposed methods did not present significant statistical difference, demonstrating equivalence for the quantification of ceftriaxone sodium in the powder for injectable solution.

Keywords: Ceftriaxone sodium. Quality control. High-performance liquid chromatography. Infrared spectrophotometry. Microbiological method. Analytical methods. Green analytical chemistry. Validation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Antimicrobianos β -lactâmicos	22
3.2 Cefalosporinas	23
3.2.1 História	23
3.2.2 Estrutura química e classificação das cefalosporinas	23
3.2.3 Mecanismo de ação	25
3.2.4 Mecanismos de resistência bacteriana	26
3.3 Ceftriaxona sódica.....	27
3.3.1 Farmacocinética.....	28
3.3.2 Espectro de ação e uso clínico	28
3.3.3 Interações medicamentosas.....	29
3.3.4 Contra-indicações	29
3.4 Métodos analíticos.....	30
3.5 Controle de qualidade.....	38
3.6 Validação de métodos analíticos.....	39
3.7 Química analítica verde	42
4. DESCRIÇÃO	44
4.1 Descrição geral	44
4.2 Substância química de referência (SQR)	44
4.3 Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável	45
5. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	46
5.1 Considerações gerais	46
5.2 Material e método.....	46
5.2.1 Validação do método	48
5.2.1.1 Seletividade	48
5.2.1.2 Linearidade.....	48
5.2.1.3 Precisão	49
5.2.1.4 Exatidão.....	49
5.2.1.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	50
5.2.1.6 Robustez	51

5.2.2	Determinação do teor de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável	52
5.2.2.1	Preparo das pastilhas.....	52
5.2.2.2	Cálculo do teor de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável	52
5.3	Resultados	53
5.3.1	Desenvolvimento do método	53
5.3.2	Validação do método analítico.....	54
5.3.2.1	Seletividade	55
5.3.2.2	Linearidade	56
5.3.2.3	Precisão	58
5.3.2.4	Exatidão.....	59
5.3.2.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	59
5.3.2.6	Robustez	60
5.3.3	Determinação do teor de ceftriaxona sódica pó para solução injetável	61
5.4	Discussão.....	62
6.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	64
6.1	Considerações gerais	64
6.2	Material e método.....	64
6.2.1	Desenvolvimento do método	65
6.2.1.1	Adequabilidade do sistema	66
6.2.2	Validação do método	68
6.2.2.1	Seletividade	68
6.2.2.2	Linearidade	69
6.2.2.3	Precisão	69
6.2.2.4	Exatidão.....	70
6.2.2.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	70
6.2.2.6	Robustez	70
6.3	Determinação do teor da cetriaxona sódica pó para solução injetável	72
6.3.1	Preparo das soluções.....	72
6.3.2	Cálculo do teor de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável	72
6.4	Estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável	73
6.5	Resultados	73
6.5.1	Desenvolvimento do método	73
6.5.1.1	Adequabilidade do sistema	75
6.5.2	Validação do método	76
6.5.2.1	Seletividade	76
6.5.2.2	Linearidade	80

6.5.2.3	Precisão	82
6.5.2.4	Exatidão.....	82
6.5.2.5	Limite de detecção e limite de quantificação	83
6.5.2.6	Robustez	83
6.5.3	Determinação do teor da ceftriaxona sódica pó para solução injetável	84
6.5.4	Estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável.....	85
6.6	Discussão.....	86
7.	ENSAIO MICROBIOLÓGICO TURBIDIMÉTRICO	90
7.1	Considerações gerais	90
7.2	Material e método.....	90
7.2.1	Desenvolvimento do método	91
7.2.2	Determinação da potência da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável	92
7.2.3	Validação do método	92
7.2.3.1	Seletividade	92
7.2.3.2	Linearidade	93
7.2.3.3	Precisão	93
7.2.3.4	Exatidão.....	93
7.2.3.5	Robustez	94
7.2.4	Análise da estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes	94
7.3	Resultados	95
7.3.1	Desenvolvimento do método	95
7.3.2	Validação do método analítico.....	95
7.3.2.1	Seletividade	95
7.3.2.2	Linearidade	96
7.3.2.3	Precisão	97
7.3.2.4	Exatidão.....	98
7.3.2.5	Robustez	98
7.3.3	Determinação da potência da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável	100
7.3.4	Análise da estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes	101
7.4	Discussão.....	101
8.	ANÁLISE COMPARATIVA.....	103
8.1	Resultados	103

8.2 Discussão.....	103
9. CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grupos de antimicrobianos β -lactâmicos	22
Figura 2: Estrutura química básica das cefalosporinas	24
Figura 3: Modelo da síntese da ceftriaxona sódica.....	27
Figura 4: Estrutura molecular da ceftriaxona sódica	28
Figura 5: Estrutura química da ceftriaxona sódica com a ligação referente à banda no espectro utilizada na quantificação do método por espectrofotometria na região do infravermelho	47
Figura 6: Espectro de absorção na região do infravermelho obtido com a ceftriaxona sódica SQR com a banda em destaque utilizada na análise quantitativa	48
Figura 7: Espectro de absorção na região do infravermelho obtido com a ceftriaxona sódica SQR apresentando suas respectivas bandas características.....	54
Figura 8: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável	55
Figura 9: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho na degradação fotolítica da ceftriaxona pó para solução injetável nos tempos zero e 3 horas	55
Figura 10: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho na degradação térmica da ceftriaxona pó para solução injetável nos tempos zero e 2 horas	56
Figura 11: Representação gráfica da curva analítica referente à ceftriaxona sódica SQR pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	58
Figura 12: Gráfico de resíduos padronizados referente à ceftriaxona sódica SQR pelo o método por espectrofotometria na região do infravermelho	58

Figura 13: Gráfico de Pareto referente às interações das variáveis para o parâmetro robustez pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho.....	61
Figura 14: Medidas realizadas para o cálculo dos parâmetros de assimetria do pico e fator de cauda para a adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência	67
Figura 15: Representação da medida da largura do pico à meia altura para o cálculo do número de pratos para a adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	68
Figura 16: Espectro de absorção no UV para a ceftriaxona sódica em solução aquosa na concentração de 50 µg/mL para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	73
Figura 17: Cromatograma obtido com a solução de ceftriaxona sódica SQR 50 µg/mL no desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ , fase móvel água pH ajustado com ácido acético 1% e etanol (83:17, v/v), vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 260 nm	74
Figura 18: Cromatograma obtido com a solução de ceftriaxona sódica SQR 50 µg/mL durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel água pH ajustado com ácido fórmico 0,1% e etanol (85:15, v/v), vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 260 nm.....	74
Figura 19: Sobreposição dos cromatogramas obtidos através das soluções de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável na concentração de 60 µg/mL nas condições analíticas estabelecidas para o método por cromatografia líquida de alta eficiência	75
Figura 20: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T0 e T1h para a degradação ácida para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 260 nm	77

Figura 21: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e T_{1h30m} para a degradação alcalina para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm.....78

Figura 22: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e T_{2h} para a degradação oxidativa para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm78

Figura 23: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e $T_{2h30min}$ para a degradação aquosa para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm.....79

Figura 24: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e $T_{5h30min}$ para a degradação fotolítica para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm.....79

Figura 25: Representação gráfica da curva analítica referente à ceftriaxona sódica SQR para o método por cromatografia líquida de alta eficiência81

Figura 26: Gráfico de resíduos padronizados referente à ceftriaxona sódica SQR pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência81

Figura 27: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para as variações inferiores84

Figura 28: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para as variações superiores84

Figura 29: Representação gráfica das curvas analíticas referentes à ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável para o parâmetro linearidade pelo método microbiológico por turbidimetria96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica	32
Tabela 2: Parâmetros a serem considerados na validação analítica.....	40
Tabela 3: Preparo das pastilhas de ceftriaxona sódica em brometo de potássio para o teste de recuperação do método por espectrofotometria na região do infravermelho	50
Tabela 4: Planejamento fatorial 2^3 para o parâmetro robustez do método por espectrofotometria na região do infravermelho	51
Tabela 5: Matriz de planejamento dos ensaios para o parâmetro robustez do método por espectrofotometria na região do infravermelho	51
Tabela 6: Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^3	52
Tabela 7: Comparação das bandas de absorção apresentadas no espectro da ceftriaxona sódica SQR com dados da literatura	54
Tabela 8: Valores das absorvâncias referentes à altura dos picos na região de 1800 a 1700 cm^{-1} das pastilhas de brometo de potássio contendo ceftriaxona sódica SQR para a elaboração da curva analítica pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	57
Tabela 9: Análise da variância dos valores de absorvância obtidos na construção da curva analítica da ceftriaxona sódica SQR pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	58
Tabela 10: Determinação da precisão por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	59
Tabela 11: Determinação da precisão intermediária (entre analistas) pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	59

Tabela 12: Determinação do parâmetro exatidão pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	59
Tabela 13: Determinação do parâmetro robustez pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	60
Tabela 14: Análise de variância para o parâmetro robustez pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	61
Tabela 15: Determinação do teor de ceftriaxona sódica, em porcentagem, pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho	62
Tabela 16: Parâmetros testados no desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação de ceftriaxona sódica pó para solução injetável.....	66
Tabela 17: Preparo das soluções para a avaliação do parâmetro exatidão do método por cromatografia líquida de alta eficiência	70
Tabela 18: Parâmetros utilizados no teste de Youden para a determinação do parâmetro robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência	71
Tabela 19: Variações dos parâmetros utilizadas no teste de Youden	72
Tabela 20: Condições analíticas estabelecidas para o método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica	75
Tabela 21: Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico calculados após a definição das condições analíticas do método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica	76
Tabela 22: Percentual de degradação no estudo de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável para avaliação do parâmetro seletividade do método por cromatografia líquida de alta eficiência	77

Tabela 23: Parâmetros para a avaliação da pureza do pico no teste de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável obtidos através do <i>software</i> Empower 3	80
Tabela 24: Valores das áreas referentes às soluções de ceftriaxona sódica SQR para a elaboração da curva analítica para o método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica	80
Tabela 25: Análise de variância dos valores das áreas dos picos obtidos na construção da curva analítica da ceftriaxona sódica SQR pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência	81
Tabela 26: Determinação do parâmetro precisão por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica	82
Tabela 27: Determinação do parâmetro precisão intermediária (entre analistas) pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica.....	82
Tabela 28: Determinação do parâmetro exatidão pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica	82
Tabela 29: Teores, em porcentagem, encontrados para a ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos ensaios 1 e 2 para o parâmetro robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica	83
Tabela 30: Efeitos calculados para os ensaios através das variações inferiores e superiores para determinação do parâmetro robustez por cromatografia líquida de alta eficiência.....	84
Tabela 31: Determinação do teor de ceftriaxona sódica, em porcentagem, pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência	85
Tabela 32: Percentual de degradação determinado no estudo de estabilidade de ceftriaxona sódica SQR em solução aquosa	85

Tabela 33: Percentual de degradação determinado no estudo de estabilidade de estabilidade da ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes	86
Tabela 34: Parâmetros analíticos testados durante o desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica	92
Tabela 35: Preparo das soluções de ceftriaxona sódica para o ensaio de recuperação pelo método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica.....	94
Tabela 36: Parâmetros analíticos estabelecidos para o método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica.....	95
Tabela 37: Teor de ceftriaxona sódica determinada no estudo de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável para avaliação do parâmetro seletividade do método microbiológico por turbidimetria	95
Tabela 38: Valores das absorvâncias determinadas para a elaboração das curvas analíticas para a ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável pelo método microbiológico por turbidimetria	96
Tabela 39: Análise de variância dos valores de absorvância obtidos na construção das curvas analíticas da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável para o método microbiológico por turbidimetria.....	97
Tabela 40: Determinação do parâmetro precisão por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) pelo método microbiológico por turbidimetria	97
Tabela 41: Determinação do parâmetro precisão intermediária (entre analistas) pelo método microbiológico por turbidimetria.....	98
Tabela 42: Teste de recuperação para a determinação do parâmetro exatidão do método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica	98
Tabela 43: Valores de absorvância para a determinação do parâmetro robustez para método microbiológico por turbidimetria.....	99

Tabela 44: Análise estatística para a determinação do parâmetro robustez para método microbiológico por turbidimetria.....100

Tabela 45: Determinação da potência de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável pelo método microbiológico por turbidimetria100

Tabela 46: Valores obtidos da potência em porcentagem de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável em seus diluentes compatíveis pelo método microbiológico por turbidimetria101

Tabela 47: Valores obtidos na quantificação da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável através dos métodos por espectrofotometria na região do infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico por turbidimetria103

Tabela 48: Análise de variância dos resultados para a quantificação da ceftriaxona sódica pelos métodos por espectrofotometria na região do infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico por turbidimetria103

LISTA DE ABREVIATURAS

7- ACA	Ácido 7-aminocefalosporânico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Assimetria do pico
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPR%	Desvio padrão relativo em porcentagem
FC	Fator de cauda
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	Graus de liberdade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
k'	Fator de retenção
N	Número de pratos
QM	Quadrados médios
r	Coefficiente de correlação
r²	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a resistência antimicrobiana passou a ser uma realidade com importante relevância visto que, a partir do século XXI este fato deixou de ser restrito a ambientes hospitalares (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013). A busca por novos fármacos, novas classes de antimicrobianos e seu uso racional são alternativas que podem minimizar a disseminação das bactérias resistentes (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; BRITO; CORDEIRO, 2012; QUEIROZ et al., 2012; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013; BROOKS; BROOKS, 2014; OLDFIELD; FENG, 2014).

A qualidade dos medicamentos é uma preocupação crescente nas indústrias farmacêuticas, pois está diretamente relacionada à saúde do indivíduo (LA ROCA et al., 2007; HALEEM et al., 2015; KOGAWA; SALGADO, 2016). Análises confiáveis realizadas através de métodos validados tornaram-se cada vez mais exigidas nas indústrias farmacêuticas, pois resultados duvidosos podem gerar prejuízos irreparáveis à saúde pública e à indústria (RIBANI et al., 2004; BONFILIO; ARAÚJO; SALGADO, 2010; KOGAWA; SALGADO, 2016).

A importância da validação dos métodos analíticos é destacada por BONFILIO et al., 2012; KOGAWA; SALGADO, 2016; novos métodos que visam diminuir os impactos ao meio ambiente estão ganhando espaço; a tendência é a implantação de métodos que não utilizem solventes tóxicos ou que apresentem concentração reduzida (ANASTAS, 1999; NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006; KOGAWA; SALGADO, 2016).

Considerando a importância dos antimicrobianos, uma classe de medicamentos amplamente utilizada, faz-se necessário seu controle de qualidade apropriado e confiável, visando garantir sua segurança e eficácia terapêutica e também proporcionar benefícios à indústria farmacêutica, como por exemplo, diminuição de custos e desenvolvimento de análises mais rápidas. Desta forma, o processo de validação dos métodos de análises é fundamental para garantir a qualidade analítica, proporcionando confiabilidade nos resultados obtidos (RIBANI et al., 2004; LA ROCA et al., 2007; KOGAWA; SALGADO, 2016).

Desde 1970 as cefalosporinas, que constituem a segunda maior classe de antimicrobianos β -lactâmicos, estão entre os mais potentes agentes anti-infecciosos amplamente utilizados. Esta classe de antimicrobiano possui amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013). São classificadas em gerações de acordo com as características gerais de atividade antimicrobiana. Existem cinco

gerações de cefalosporinas, classificadas em relação ao espectro de ação, estabilidade a β -lactamases, farmacocinética, estabilidade e reações adversas (VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

A ceftriaxona sódica é uma cefalosporina semi-sintética de terceira geração, derivada de um produto de fermentação, de uso parenteral, sendo este grupo de extrema importância, pois são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, visto que as gerações anteriores não possuem essa capacidade (TAVARES, 1996; AMIN; RAGAB, 2004; RANG et al., 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MANFIO et al., 2013). Atua sobre bactérias Gram-positivas e negativas, porém apresenta maior atividade contra bactérias Gram-negativas (TAVARES, 1996; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013; LOURENÇO et al., 2013; MANFIO et al., 2013; ALI; ELBASHIR; ABOUL-ENEIN, 2015).

As literaturas que apresentam características, propriedades e métodos de análise para uma determinada matéria-prima são de extrema importância, pois servem de subsídio para a continuidade de estudos que buscam a otimização de técnicas analíticas (MARONA, 2000; SILVA; SALGADO, 2010; CORRÊA; SALGADO, 2011; SILVA; SALGADO, 2012; CORRÊA et al., 2014a; KOGAWA et al., 2014; TÓTOLI; GARG; SALGADO, 2015; CURBETE; SALGADO, 2016a; PEDROSO; SALGADO, 2016; CONSORTTI; SALGADO, 2017a; MARCO et al., 2017a; MARCO; SALGADO, 2017b; SVERSUT et al., 2017; TRINDADE; KOGAWA; SALGADO, 2017).

A maioria dos métodos analíticos apresentados pela literatura para a determinação do teor de ceftriaxona sódica não contemplam a química verde. Devido à importância deste fármaco, pesquisas envolvendo métodos analíticos ambientalmente recomendados, que forneçam análises rápidas, menores riscos ao operador e baixo custo são de fundamental importância e indispensáveis para otimizar sua análise na indústria farmacêutica e garantir qualidade e eficácia terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho objetivou o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos alternativos para a quantificação da ceftriaxona sódica pó para solução injetável visando à redução da geração de resíduos, segurança ao operador e a rapidez das análises.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar novo método analítico alternativo quantitativo para a ceftriaxona sódica pó para solução injetável por meio de espectrofotometria de absorção na região do infravermelho;
- Desenvolver e validar novo método analítico quantitativo e indicativo de estabilidade para a ceftriaxona sódica pó para solução injetável por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Desenvolver e validar novo método analítico para a determinação da atividade antimicrobiana da ceftriaxona sódica pó para solução injetável empregando o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

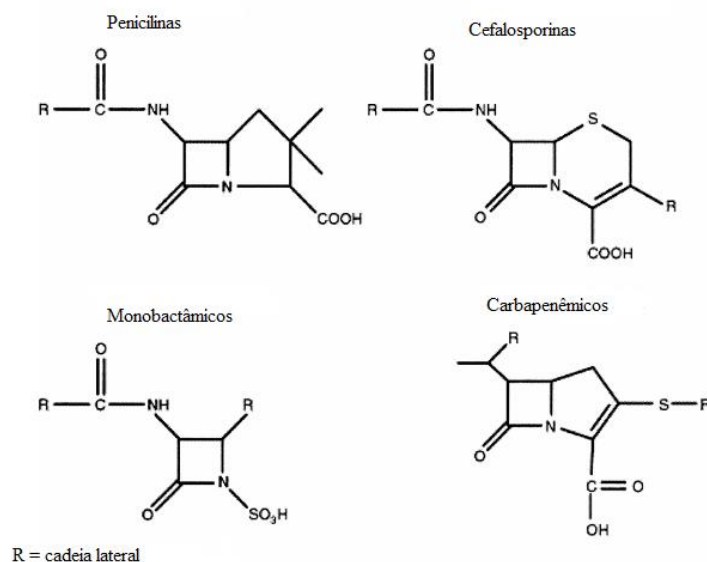
3.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antimicrobianos em uso clínico e a classe dos β -lactâmicos constitui a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; DOUGHERTY; PUCCI, 2012). Esta classe de antimicrobianos foi originada a partir da descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, porém, somente em 1940 seu efeito antibacteriano foi comprovado e este antimicrobiano passou a ser administrado em humanos (RANG et al., 2007; FUCHS; WANNMACHER, 2010).

Atuam na enzima transpeptidase, conferindo excelente perfil de segurança e baixa toxicidade, visto que esta enzima se encontra somente em bactérias. A maioria dos grupos de antimicrobianos β -lactâmicos apresentam um sistema bicíclico, constituído por um anel de quatro membros (β -lactâmico) associado a outro anel com cinco ou seis membros, dando origem ao sistema bicíclico, denominado núcleo β -lactâmico, fundamental para a atividade antibacteriana (SUÁREZ; GUDIOL, 2009; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A adição de diferentes cadeias lineares no núcleo β -lactâmico resulta nos diferentes grupos desta classe de antimicrobianos, sendo estes: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Figura 1) (SUÁREZ; GUDIOL, 2009; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Figura 1: Grupos de antimicrobianos β -lactâmicos



Fonte: adaptado de WILLIAMS, 1999

O principal mecanismo de resistência bacteriana dos antimicrobianos β -lactâmicos é através da produção de enzimas β -lactamases, as quais são capazes de promover a abertura do anel β -lactâmico. Após o aparecimento das cepas resistentes, os grupos carbapenêmicos e monobactâmicos foram desenvolvidos, com o intuito de melhorar o espectro de ação e a eficácia antimicrobiana (ARIAS et al., 1998; RANG et al., 2007; SUÁREZ; GUDIOL, 2009; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; QUEIROZ et al., 2012).

3.2 Cefalosporinas

3.2.1 História

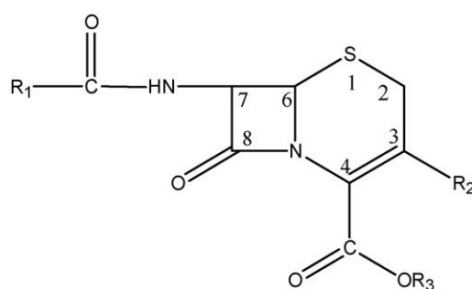
Desde 1970, as cefalosporinas estão entre os agentes anti-infecciosos mais potentes e mais utilizados (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013). Constituem a segunda maior classe de antimicrobianos β -lactâmicos, os quais possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O fungo *Cephalosporium acremonium* foi responsável pela descoberta da primeira cefalosporina em 1945, na Itália. A precursora, denominada cefalosporina C foi isolada pela primeira vez pelo italiano Giuseppe Brotzu, próximo a um canal de esgoto na costa da Sardenha (ASBEL; LEVISON, 2000; DELUCIA et al., 2007; DOUGHERTY; PUCCI, 2012).

Em 1961 a estrutura química da cefalosporina C foi elucidada, denominada ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), após a comprovação da sua atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sua estrutura química foi alterada mediante o acréscimo de cadeias laterais, com o intuito de aumentar o espectro de ação e a atividade antimicrobiana, dando origem aos fármacos semi-sintéticos (DELUCIA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; DOUGHERTY; PUCCI, 2012).

3.2.2 Estrutura química e classificação das cefalosporinas

A estrutura química básica de uma cefalosporina é representada por um sistema bicíclico, contendo um anel β -lactâmico de quatro membros unidos a um anel de diidrotiazina de seis membros (7-ACA) (Figura 2) (ASBEL; LEVISON, 2000; EL-SHABOURY et al., 2007).

Figura 2: Estrutura química básica das cefalosporinas

Fonte: EL-SHABOURY et al., 2007.

Os substituintes em C3, C4 e C7 presentes no 7-ACA são fatores importantes para a atividade biológica da molécula (EL-SHABOURY et al., 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Sugere-se que alterações em C3 ocasionam mudanças no metabolismo e na farmacocinética do fármaco (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012); alterações em C7 estão relacionadas com controle da hidroflicidade/hidrofobicidade dos fármacos (EL-SHABOURY et al., 2007; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012); já o ácido carboxílico presente em C4 não pode ser substituído (EL-SHABOURY et al., 2007). Desta forma, as alterações nas posições representadas por R1 (carbono 7) e/ou R2 (carbono 3) dão origem às diferentes gerações das cefalosporinas (RANG et al., 2007).

As cefalosporinas são solúveis em água e relativamente estáveis em soluções ácidas (SILVA, 2006; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012); são classificadas em gerações de acordo com as características gerais de atividade antimicrobiana. Atualmente, existem cinco gerações de cefalosporinas, nas quais sua evolução está associada ao alargamento do espectro contra micro-organismos Gram-negativos, diminuição da atividade contra Gram-positivos e maior resistência às β -lactamases (EL-SHABOURY et al., 2007; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

A primeira geração das cefalosporinas é representada pela cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefapirina, cefadroxil e cefradina (KATZUNG, 2010). Possuem boa atividade contra bactérias Gram-positivas incluindo pneumococos, estreptococos e estafilococos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; KATZUNG, 2010; DOUGHERTY; PUCCI, 2012), exceto enterococos e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SILVA, 2006) e atividade relativamente moderada contra micro-organismos Gram-negativos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; KATZUNG, 2010; DOUGHERTY; PUCCI, 2012).

As cefalosporinas de segunda geração, quando comparadas com às da primeira geração, possuem menor atividade contra bactérias Gram-positivas e melhor espectro de ação contra bactérias Gram-negativas (SILVA, 2006; KATZUNG, 2010; FUCHS; WANNMACHER, 2010) e maior resistência às β -lactamases (DELUCIA et al., 2007). Não possuem ação contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Providencia* e *B. fragilis* (SILVA, 2006); como exemplo de fármacos pertencentes a esta geração é possível citar cefaclor, cefuroxima, cefoxitina e cefamandol (SILVA, 2006; DELUCIA et al., 2007; KATZUNG, 2010; FUCHS; WANNMACHER, 2010).

A terceira geração das cefalosporinas compreende antimicrobianos como, ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima. Quando comparada com os fármacos de primeira e segunda geração, apresentam maior atividade contra micro-organismos Gram-negativos aeróbios, como *Enterobacteriaceae* e *Haemophilus influenzae* (SILVA, 2006; DELUCIA et al., 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), também são efetivos contra *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (SILVA, 2006). Devido a seu espectro de ação e pela capacidade de atingir concentrações significativas no Sistema Nervoso Central são utilizadas no tratamento de meningites e septicemias causadas por micro-organismos Gram-negativos (DELUCIA et al., 2007; PATRICK, 2009).

Os fármacos cefepima e cefpiroma constituem a quarta geração das cefalosporinas (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013); apresentam atividade contra *Enterobacter* e *Citrobacter* (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013), maior atividade contra estafilococos quando comparados aos fármacos de terceira geração (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013) e grande atividade contra *Haemophilus* e *Neisseria* (KATZUNG, 2010).

As cefalosporinas de quinta geração foram desenvolvidas especialmente para combater as cepas resistentes das bactérias. O ceftobiprol e a ceftarolina são exemplos de fármacos pertencentes a esta classe de cefalosporinas que apresentam eficácia contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

3.2.3 Mecanismo de ação

As cefalosporinas atuam interferindo na síntese da parede celular bacteriana (DELUCIA et al., 2007; RANG et al., 2007), que se apresenta como uma estrutura rígida, totalmente permeável e fundamental para a estabilidade osmótica da bactéria, permitindo a sobrevivência da bactéria em diversas condições, como variações de pH e temperatura (DELUCIA et al., 2007; PATRICK, 2009).

O peptidoglicano constitui a parede celular bacteriana; este complexo polímero proporciona estabilidade mecânica rígida devido à sua estrutura entrelaçada com alto índice de ligação cruzada (DELUCIA et al., 2007; RANG et al., 2007; KATZUNG, 2010). Os micro-organismos Gram-negativos apresentam em sua parede uma a duas camadas de peptidoglicanos, enquanto que nos Gram-positivos a parede celular pode apresentar entre 50 a 100 camadas (PATRICK, 2009; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012).

A composição do peptidoglicano consiste em filamentos lineares de dois aminoaçúcares, denominados N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos por ligações cruzadas de cadeias de peptídeos (RANG et al., 2007; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012). No final da biossíntese do peptidoglicano, ou seja, no término da ligação cruzada, ocorre a reação de transpeptidação, catalisada pela enzima transpeptidase, a alanina terminal é removida para formar uma ligação cruzada com o peptídeo adjacente, resultando em uma parede celular rígida (PATRICK, 2009; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; KATZUNG, 2010).

Os antimicrobianos β -lactâmicos atuam inibindo esta última etapa, na qual o fármaco liga-se de maneira irreversível ao sítio ativo das transpeptidases, impedindo a catalisação da síntese das ligações, bloqueando a síntese de peptidoglicano e, conseqüentemente, ocasionando a morte celular (RANG et al., 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; KATZUNG, 2010).

3.2.4 Mecanismos de resistência bacteriana

A partir do século XXI, a resistência bacteriana deixou de ser específica a ambientes hospitalares, podendo estar associada a diferentes ambientes e até atingir indivíduos saudáveis, tornando-se um problema de saúde mundial (ALANIS, 2005; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O mecanismo de resistência mais comum envolvendo as cefalosporinas é a inativação do fármaco causada pelas β -lactamases, através da clivagem do anel β -lactâmico (DELUCIA et al., 2007; RANG et al., 2007). Alterações nas proteínas presentes nas bactérias que se ligam aos fármacos e a incapacidade de atingir o local de ação, também são mecanismos utilizados pelas bactérias para se manterem resistentes à ação do fármaco (CRAIG; STITZEL, 2004; DELUCIA et al., 2007).

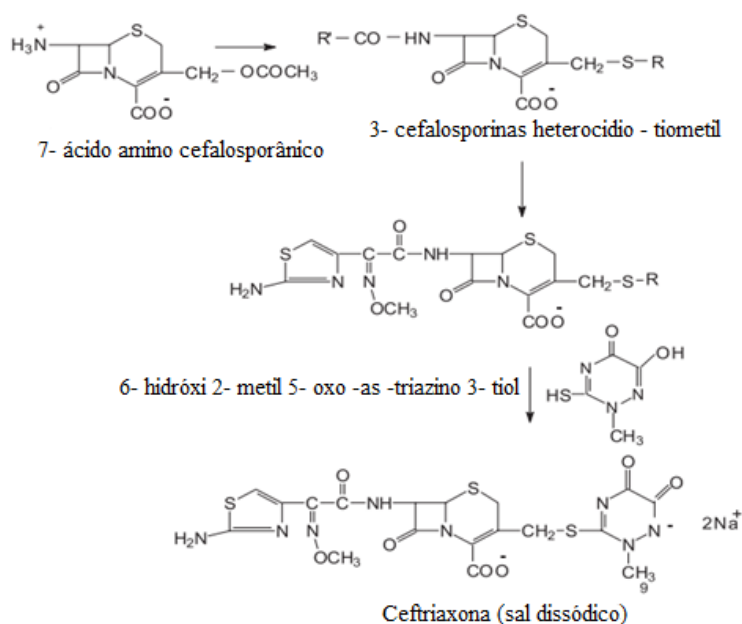
A conscientização da população em relação ao uso indiscriminado dos antimicrobianos, como também, a prescrição do medicamento correto para o tratamento, a descoberta de novos antimicrobianos e o controle de qualidade eficaz dos medicamentos são maneiras de minimizar a resistência bacteriana (GRIGGS; MARONA; PIDDOCK, 2003;

GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; QUEIROZ et al., 2012; KOGAWA; SALGADO, 2016).

3.3 Ceftriaxona sódica

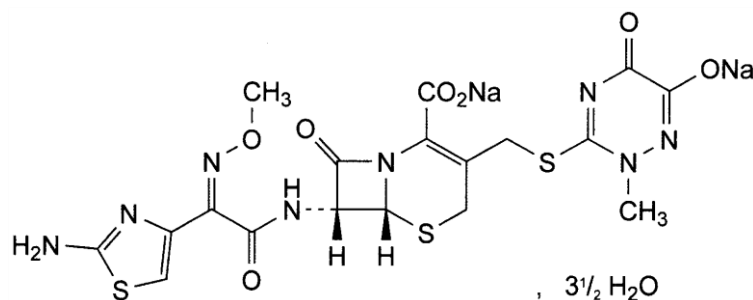
A ceftriaxona sódica foi sintetizada através do precursor 7-ACA. A síntese ocorreu pela adição de uma molécula de acil na posição 7-amino e o deslocamento do grupo acetoxi por heterocíclicos tio-substituinte na posição 3- metil. Em seguida, a substituição, do grupo R-alquil foi determinada pela adição de 6-hidróxi-2-metil-5-oxiastriazina-3tiol, o grupo RO-alquil foi substituído pelo grupo 2-(2-amino-4-tiazolil)-2-amino-[(Z)-metoxilamino]-acetil completando a síntese de ceftriaxona sódica (OWENS; DASH, 2003). O modelo da síntese da ceftriaxona sódica é ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Modelo da síntese da ceftriaxona sódica



Fonte: adaptado de Owens; Dash, 2003.

Apresenta-se na forma dissódica hemieptaidratada e sua estrutura molecular é observada na Figura 4 (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005; FE, 2005; IP, 2007; JP, 2011; BP, 2014; EP, 2014; USP, 2016).

Figura 4: Estrutura molecular da ceftriaxona dissódica hemieptaidratada

Fonte: Farmacopeia Britânica, 2014.

3.3.1 Farmacocinética

A ceftriaxona sódica é administrada pela via parenteral, podendo ser intramuscular ou intravenosa, não possui absorção pela via oral (BRAYFIELD, 2014). A duração prolongada da ação da ceftriaxona sódica é atribuída à alta ligação as proteínas plasmáticas e pela excreção urinária lenta (HIREMATH; MRUTHYUNJAYASWAMY, 2009).

Apresenta meia-vida entre 6-9 horas, podendo ser prolongada em neonatos (BRAYFIELD, 2014) e devido à sua meia-vida longa é possível sua administração em dose única diária (KOROLKOVAS, 2014).

Possui penetração satisfatória nos líquidos corporais e tecidos; atinge níveis no líquido cefalorraquidiano suficientes para inibir a maioria dos patógenos (KOROLKOVAS, 2014; ANVISA, 2017e). Não possui biotransformação (KOROLKOVAS, 2014) e apresenta alta ligação às proteínas plasmáticas, aproximadamente 85 a 95% (BRAYFIELD, 2014). Consegue atravessar a placenta e baixas concentrações foram encontradas no leite materno (ANVISA, 2017e). A ceftriaxona é excretada na forma inalterada pela urina (40 a 65%), o restante ocorre através do trato biliar (BRAYFIELD, 2014) e é eliminada pelas fezes na forma de metabólitos inativos (KOROLKOVAS, 2014).

3.3.2 Espectro de ação e uso clínico

É altamente estável à maioria das β -lactamases, apresenta maior atividade contra bactérias Gram-negativas, sendo também capaz de agir contra bacilos Gram-negativos resistentes às cefalosporinas de primeira e segunda geração; sua atividade contra bactérias Gram-positivas é sensivelmente menor em relação às cefalosporinas de primeira geração. É eficaz contra *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, como também *Citrobacter*, *Serratia marcescens* e *Providencia*. Possui ação sinérgica com os aminoglicosídeos (TAVARES, 1996; KATZUNG, 2010; ALI et al., 2015).

As doses são expressas em termos de equivalência, em que 1,19 g de ceftriaxona sódica equivalem a 1 g de ceftriaxona. A dose diária usual varia entre 1 a 2 g, podendo ser administrada em dose única ou fracionada a cada 12 horas (BRAYFIELD, 2014; KOROLKOVAS, 2014). A dose máxima é dependente da gravidade da infecção, podendo chegar em até 4 g diárias (KOROLKOVAS, 2014).

A ceftriaxona é indicada para casos de septicemia (neonatal e em adultos) (ANVISA, 2017e). É o fármaco de escolha para o tratamento de infecções gonocócicas disseminadas em adultos, crianças e recém-nascidos (KOROLKOVAS, 2014). Nos casos de meningite em adultos e crianças, é indicada no tratamento empírico em crianças acima de um ano associado à ampicilina (KOROLKOVAS, 2014; ANVISA, 2017e); também indicada no tratamento da Borreliose de Lyme disseminada (doença de Lyme), nos estágios iniciais e tardios da doença. Em mulheres grávidas, crianças e adolescentes com infecções renais e no trato urinário sua eficácia e segurança também foram demonstradas. Mostrou-se eficaz no tratamento de infecções do trato respiratório, particularmente pneumonia em crianças, adultos e idosos e também em infecções otorrinolaringológicas. Na profilaxia perioperatória de infecções, a administração em dose única no pré-operatório tem eficácia superior ou igual a outros antimicrobianos administrados em múltiplas doses (BPR, 2014; ANVISA, 2017e).

3.3.3 Interações medicamentosas

Há evidências sobre o potencial aumento na toxicidade renal com o uso concomitante com aminoglicosídeos. Em estudos *in vitro* foram observados efeitos antagônicos com uso combinado com cloranfenicol (ANVISA, 2017e). Também é incompatível com amsacrina, fluconazol, labetalol e vancomicina (BRAYFIELD, 2014).

Diluentes que contêm cálcio, como as soluções de Ringer ou Hartmann, não devem ser utilizados para a reconstituição de ceftriaxona sódica ou para diluições posteriores de soluções reconstituídas para administração intravenosa, como também com soluções que contêm cálcio no mesmo acesso de administração intravenosa, pois pode ocorrer a formação de precipitado. O uso concomitante com antagonistas da vitamina K pode aumentar o risco de sangramentos (KOROLKOVAS, 2014; ANVISA, 2017e).

3.3.4 Contra-indicações

A administração da ceftriaxona não é indicada para pacientes que apresentem hipersensibilidade às cefalosporinas e às penicilinas. Também é contra-indicada para neonatos prematuros e recém-nascidos com hiperbilirrubinemia, neste caso ocorre risco de encefalopatia bilirrubínica (ANVISA, 2017e).

3.4 Métodos analíticos

Os compêndios oficiais que contemplam métodos de análises padronizados para a matéria-prima ceftriaxona sódica e para o produto acabado são Farmacopeia Portuguesa (2005), Farmacopeia Espanhola (FE, 2005), Farmacopeia Indiana (IP, 2007), Farmacopeia Japonesa (JP, 2011), Farmacopeia Britânica (BP, 2014), Farmacopeia Europeia (EP, 2014) e Farmacopeia Americana (USP, 2016). Estas monografias oficiais apresentam métodos com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando em sua fase móvel solventes orgânicos e soluções tamponantes, os quais não são considerados ecologicamente recomendados (CUE; ZHANG, 2009; PRAT; HAYLER; WELLS, 2014).

Métodos analíticos em fluidos biológicos e preparações farmacêuticas foram propostos pela literatura para a ceftriaxona sódica utilizando a cromatografia líquida. Tais métodos utilizam solventes que não são considerados ecologicamente recomendados, que podem gerar resíduos tóxicos e causar danos ao operador; soluções tamponantes também são utilizadas, as quais diminuem a vida útil do equipamento (SHRESTHA, BHUYAN; SINHA, 2012; SHAH, SHAHKHAN, 2013; GERGS et al., 2014; KRATZER et al., 2014). Métodos por espectrofotometria na região do visível também foram apresentados, porém, a maioria encontra-se em associação com outros fármacos antimicrobianos (AL-MOMANI, 2001; AMIN; RAGAB, 2004; PASHA; NARAYANA, 2008; RAGEH et al., 2010). SHAH e colaboradores (2013) utilizaram um método por fluorimetria para a análise da ceftriaxona sódica no produto acabado e no plasma, utilizando ortoftaldeído e solução tampão.

Métodos microbiológicos utilizando a técnica difusão em ágar para análises quantitativas também foram encontrados na literatura (ALÉSSIO; SALGADO; 2012; LOURENÇO et al., 2013; MANFIO et al., 2013); esses métodos foram validados, sendo de extrema importância para a avaliação da potência deste fármaco, pois apresentaram-se sensíveis e específicos, entretanto necessitam de, no mínimo, 16 horas de incubação.

A Tabela 1 apresenta os métodos analíticos encontrados na literatura e nos compêndios oficiais, apresentando suas condições de análise para a determinação da ceftriaxona sódica.

Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos inovadores em relação aos existentes, que sejam rápidos, não utilizem solventes tóxicos ou apresentem menor concentração com o intuito de minimizar riscos frente ao meio ambiente, ao operador, como também, diminuição de gastos na produção do medicamento (ARMENTA; GARRIGUES; GUARDIA, 2008).

A revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a determinação da ceftriaxona sódica originou em um artigo que foi aceito em periódico de circulação internacional:

TRINDADE, M.T.; SALGADO, H.R.N. A critical review of analytical methods for determination of ceftriaxone sodium. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. 2018. Doi 10.1080/10408347.2017.1398063. No prelo.

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica

Método	Condição	Tempo de análise (min)	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: dissolver 2 g de brometo de tetradecilamônio e 2g de brometo de tetraheptilamônio na mistura de 440 mL de água, 55 mL tampão fosfato 0,067 M pH 7, 5,0 mL tampão citrato pH 5 e 500 mL de acetonitrila; vazão 1,5 mL/min; volume de injeção 20 µL.	Não informado	254 nm	Matéria-prima e pó para injeção	FE, 2005, Farmacopeia Portuguesa, 2005; IP, 2007; BP, 2014; EP, 2014; USP 2016
CLAE-EM/EM	Coluna Acquity UPLC Beh C ₁₈ (50 mm × 2,1 mm; 1,7 µm) 35°C. Fase móvel: ácido fórmico 0,1% em água ultrapurificada e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (gradiente); vazão 0,4 mL/min (UPLC) e 20 µL/min (MS/MS); volume de injeção 10 µL.	Não informado	Ionização por <i>electrospray</i> operado em modo positivo usando monitoramento de reações múltiplas (MRM)	Águas residuais	YU et al., 2016
CLAE-EM	Coluna Cosmosil Packed HILIC (150 mm x 2,0 mm), 30°C. Fase móvel: acetonitrila e acetato de amônia 10 mM/ L (7:3), vazão 0,5 mL/min; volume de injeção 10 µL.	Não informado	Ionização por <i>electrospray</i> operado em modo negativo	Pó para solução injetável	TANGE et al., 2016
CLAE-UV	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: dissolver 3,2 g de brometo de tetraheptilamônio em 400 mL de acetonitrila, adicionar 44 mL de tampão fosfato pH 7 e 4 mL de tampão citrato pH 5 e adicionar água em quantidade suficiente para 1000 mL; vazão 2 mL/min.	Não informado	270 nm	Solução para injeção	USP, 2016
CLAE-UV	Coluna Sphere-Image 80-5 ODS 2 (250 mm), 30°C. Fase móvel: acetonitrila e tampão citrato 0,1 M com perclorato de amônio 5 mM e hidrogenossulfato tetrabutilamônio 2 mM (11:89 v/v); vazão 1,2 mL/min.	Não informado	265 nm	Plasma e ossos	GERGS et al., 2014
CLAE-UV	Coluna Waters XBridge C ₁₈ BEH (50 mm × 3 mm; 2,5 µm), 40°C. Fase móvel: ácido ortofosfórico 100 mM ou dihidrogenofosfato de sódio com NaOH pH 2,55 e acetonitrila (100:12 v/v).	Não informado	260 nm	Plasma	KRATZER et al., 2014

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica

CLAE-UV	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), 25°C. Fase móvel: acetonitrila, metanol e tampão trietilamina pH 7 (1:1:2 v/v); vazão 0,6 mL/min; volume de injeção 20 µL.	10	240 nm	Amostra biológica e comercial	SHAH et al., 2013
CLAE-UV	Coluna C ₁₈ (30 mm x 4,6 mm; 2,5 µm), temperatura ambiente. Fase móvel: acetonitrila e tampão fosfato 50 mM pH 2,4 (8:92 v/v); vazão 1 mL/min; volume de injeção 25 µL.	10	260 nm	Plasma humano	BRISCOE et al., 2012
CLAE-UV	Coluna Acclaim 120 C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: metanol, tampão fosfato de potássio (pH 7) e trietilamina (23:77:0,2 v/v/v); vazão 1,15 mL/min; volume de injeção 20 µL.	8	230 nm	Pó para solução injetável	SHRESTHA, BHUYAN SINHA, 2012
CLAE-UV	Coluna Kromasil C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: dihidrogenofosfato de potássio 1,5 mM (pH 4,5 ajustado com ácido ortofosfórico) com 0,0125% trietilamina-metanol (70:30, v/v); vazão 1 mL/min; volume de injeção 20 µL.	Não informado	247 nm	Urina humana	SUN; WANG; GE, 2012
CLAE-UV	Coluna Hypersil ODS (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), 50°C. Fase móvel: acetonitrila: água: tampão brometo tetraheptilamônio pH 7: tampão brometo tetraheptilamônio pH 5 (39–55–5.5–0.5); vazão 1,5 mL/min; volume de injeção 20 µL.	Não informado	254 nm	Resíduos em superfície de aço inoxidável de equipamentos farmacêuticos	AKL; AHMED; RAMADAN, 2011
CLAE-UV	Coluna C ₁₈ Atlantis (150 mm x 4,6 mm; 3 µm) 35°C. Fase móvel: tampão fosfato monopotássico 50 mM e acetonitrila (gradiente); vazão 1 mL/min.	Não informado	274 nm	Ossos	GARAZZINO et al., 2011

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica

CLAE-UV	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 10 µm). Dissolver 5,796 g hidrogeno fosfato de sódico anidro e 3,522 g de dihidrogeno fosfato de potássio em água em quantidade suficiente para 1000 mL (solução A); dissolver 20,256g de ácido cítrico e 7,840 g de hidróxido de sódio em água em quantidade suficiente para 1000 mL (solução B); dissolver 4 g de brometo de tetra-n-heptilamônio em 450 mL de acetonitrila e 490 mL de água, adicionar 55 mL da solução A e 5 mL da solução B; volume de injeção 10 µL.	Não informado	254 nm	Matéria-prima	JP, 2011
CLAE-UV	Coluna Lichrocart C ₁₈ (100 mm; 5 µm) temperatura ambiente. Fase móvel: solução tamponante de hidróxido de tetrabutilamônio 0,012 M com hidrogenofosfato de potássio 0,01 M e acetonitrila (70:30% v/v); vazão 0,8 mL/ min; volume de injeção 20 µL.	Não informado	220 nm	Pó para solução injetável	GANDHIMATHI; SARAVANAKUMAR; RAVI; 2010
CLAE-UV	Coluna C ₁₈ (30 mm × 4,6 mm; 2,5 µm), temperatura ambiente. Fase móvel: acetonitrila e tampão fosfato 50 mM pH 2,4 (8:92 v/v); vazão 1mL/min; volume de injeção 10 µL.	Não informado	260 nm	Plasma humano	MCWHINNEY et al., 2010
CLAE-UV	Coluna Waters XTerra RP-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: 0,1 M acetato de trietilamônio e acetonitrila (60:40 v/v); vazão 1 mL/min; volume de injeção 20 µL.	5	240 nm	Fármaco e pó liofilizado para injeção	HIREMATH; MRUTHYUNJAYASWAM, 2009
CLAE-UV	Coluna XTerra C ₁₈ (250 mm × 4,6 mm; 5 µm) 32°C. Fase móvel: solução tamponante de fosfato 40 mM pH 3,2 e metanol (gradiente); vazão 0,85 mL/min; volume de injeção 20 µL.	30	Não informado	Plasma humano e líquido amniótico	NEMUTLU et al., 2009
CLAE-UV	Coluna Hypersil ODS C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); 25°C. Fase móvel: acetonitrila e solução tamponante de hidróxido de tetrabutilamônio pH 7 ajustado com ortofosfórico (70:30 v/v); vazão 1,5 mL/min; volume de injeção 10 µL.	15	220 nm	Pó para solução injetável	SHRIVASTAVA et al., 2009

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica

CLAE-UV	Coluna Spherisorb ODS C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 10 µm). Fase móvel: solução tamponante de fosfato monopotássico pH 2,5 e metanol (70:30 v/v); vazão 1 mL/min; volume de injeção 10 µL.	6	254 nm	Forma farmacêutica	DOADRIO et al., 2001
CLAE-UV	Coluna Nova-Pak C ₁₈ (100 mm x 8 mm; 4 µm). Fase móvel: solução tamponante de fosfato de potássio dibásico 10 mM, com and 10 mM brometo de cetiltrimetilamônio (pH 6.5) e acetonitrila (73:27 v:v) (gradiente).	25	274 nm	Plasma	AL-RAWITHI, et al., 2000
CLAE-UV	Coluna C ₁₈ Hypersyl (200 mm x 2,1 mm; 5 µm); temperatura ambiente. Fase móvel: para a análise do medicamento em solução aquosa: metanol-acetonitrila- solução tamponante de fosfato, pH 7,4 (20:20:60, v/v/v); para a análise do plasma e líquido cefalorraquidiano: (30:40:30, v/v/v); vazão 0,5 mL/min.	10	270 nm	Amostras biológicas em coelhos	OWENS; DESTACHE; DASH, 1999
CLAE-UV	Coluna Schimpack GLC-ODS (150 mm x 6 mm; 5 µm); temperatura ambiente. Fase móvel: acetonitrila e solução acetato de amônio 0,1 M (10:90 v/v) pH 7,5 ajustado com solução de amônia; vazão 1,5 mL/min; volume de injeção 50 µL.	Não informado	270 nm	Pó para solução injetável	ABDEL-HAMID, 1998
CLAE-UV	Coluna p-Bondapak C ₁₈ . Fase móvel: acetato de sódio 0,07 M e acetonitrila (56:44, v/v), pH 5,7 ajustado com ácido acético; vazão 1 mL/min.	Não informado	270 nm	Plasma e urina	PARADIS et al., 1992
CLUE-EM/EM	Coluna C ₁₈ Waters Acquity T3 (50 mm x 2,1 mm; 1,7 µm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1% em água e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (gradiente); vazão 0,4 mL/min; volume de injeção 5 µL.	Não informado	Ionização por <i>electrospray</i> operado em modo positivo usando monitoramento de reações múltiplas (MRM)	Sangue	PAGE-SHARP et al., 2016

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica

CLUE-UV	Coluna Acquity UPLC BEH C ₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm). Fase móvel: Solução A: solução tamponante de dihidrogenofosfato de potássio (pH ajustado para 6,5 ± 0,2 com ácido ortofosfórico), tampão ácido cítrico (pH ajustado para 5,0 ± 0,2 com solução de hidróxido de sódio) e acetonitrila; solução B: brometo de tetradecil amônio, brometo de tetraheptil amônio e acetonitrila. Solução A: Solução B (65:35 v/v); vazão 0,3 mL/min.	6	230 nm	Pó para solução injetável	PANCHAL; DESAI; DAVE, 2014
CLUE-UV	Coluna Purospher Star C ₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 2 μm). Fase móvel: Diidrogeno ortofosfato de sódio di-hidratado 0,05 M; acetonitrila (86:14 v/v) ajustado para pH 4,5 com ácido ortofosfórico 0,1 M ou hidróxido de sódio 0,1 M; vazão 0,4 mL/min.	3	254 nm	Pó para solução injetável	NIRAV et al., 2012
CLUE-UV	Coluna Acquity UPLC BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm). Fase móvel: acetonitrila e ácido oxálico 10 mM (gradiente); vazão 0,35 mL/min; volume de injeção 5 μL.	Não informado	268 nm	Resíduos no leite bovino	WANG; LI, 2009
Espectrofotometria na região do visível	Faixa de concentração 20 a 80 μg/mL Hidrólise em meio alcalino em temperatura elevada com 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, desenvolvendo coloração amarela.	Não aplicável	390 nm	Forma farmacêutica	RAGEH et al., 2010
Espectrofotometria na região do visível	Faixa de concentração 0,2 a 7,0 μg/mL. Hidrólise através de hidróxido de sódio e reação com iodato de potássio, a absorvância foi medida na faixa de pH entre 4,0 a 4,2.	Não aplicável	556 nm	Pó para solução injetável	PASHA; NARAYANA, 2008
Espectrofotometria na região do visível	Faixa de concentração 20 a 100 μg/mL. Derivatização através 4-dimetilaminobenzaldeído, em tampão acetato pH 5,0.	Não aplicável	397 nm	Forma farmacêutica	RIND et al., 2008
Espectrofotometria na região do visível	Faixa de concentração 0,2 a 28,0 μg/mL. Oxidação do reagente cromo metálico com dicromato de potássio na presença do fármaco em meio ácido, gerando a reação de complexação.	Não aplicável	520 nm	Pó para solução injetável	AMIN; RAGAB, 2004

Tabela 1: Métodos analíticos descritos na literatura e compêndios oficiais para a determinação da ceftriaxona sódica

Espectrofotometria na região do visível	Hidrólise do fármaco em meio alcalino, sob aquecimento e oxidação com ferro (III) em meio com ácido sulfúrico após, complexação com <i>o</i> -fenantrolina em solução tamponante citrato pH 4,2 formando complexo vermelho.	Não aplicável	510 nm	Forma farmacêutica	AL-MOMANI, 2001
Espectrofotometria na região do ultravioleta	Faixa de concentração 5 a 50 µg/mL, utilizando água destilada como diluente e soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio 0,1 M e peróxido de hidrogênio a 5% para as degradações ácida, alcalina e oxidativa, respectivamente.	Não aplicável	241 nm	Pó para solução injetável	ETHIRAJ et al., 2014
Espectrofluorimetria	Reação com ortoformaldeído na presença de sulfito de sódio em meio tamponado pH 10 com solução tamponante de borato de sódio.	Não aplicável	Máximo 386 nm e após a excitação 324 nm	Pó para solução injetável e plasma	SHAH et al., 2013
Microbiológico – difusão em ágar	Método de cilindros em placas, através do delineamento 3x3 utilizando <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 e concentração de fármaco entre 2,6 a 6,3 µg/mL.	18 h de incubação	Não aplicável	Pó para solução injetável	LOURENÇO et al., 2013
Microbiológico - difusão em ágar	Método de cilindros em placas, através do delineamento 3x3 utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P e concentração de fármaco entre 16,0 a 64,0 µg/mL.	16 h de incubação	Não aplicável	Pó para solução injetável	MANFIO et al., 2013
Microbiológico – difusão em ágar	Método de cilindros em placas, através do delineamento 3x3 utilizando <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9371 IAL 1027 e concentração de fármaco entre 15,0 a 60,0 µg/mL.	18 h de incubação	Não aplicável	Pó para solução injetável	ALÉSSIO; SALGADO, 2012

CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; CLAE-EM/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; CLUE-EM/EM: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; CLUE-UV: Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por ultravioleta.

3.5 Controle de qualidade

A busca em aperfeiçoar, desenvolver e superar limites durante atividades produtivas sempre foi inerente ao ser humano, independentemente da atividade exercida (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). De acordo com Juran, a qualidade de um produto pode ser definida como sua condição de adequação ao uso, sob o ponto de vista do consumidor (JURAN; GRZYNA, 1991; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015), quando relacionada a medicamentos, trata-se das características benéficas que o consumidor pretende encontrar no produto, como eficácia terapêutica e segurança (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Por volta de 1960 iniciou-se na indústria farmacêutica o emprego das práticas regulatórias pela *Food and Drug Administration* (FDA), denominadas Boas Práticas de Fabricação, juntamente com a prática do Controle de Qualidade Total (ISHIKAWA, 1993; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Na década de 1970 surgiu a Garantia da Qualidade, baseada no planejamento das atividades e investimento em procedimentos, técnicas, atitudes e posturas preventivas, seguidos da implantação do sistema *International Standard Organization* (ISO), com o intuito de aumentar a satisfação do cliente através de melhorias contínuas do desempenho, com o emprego de certificações e padronização da organização dos estabelecimentos prestadores de serviços (HALLEM et al., 2013; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

O Controle da Qualidade Total é uma forma de alcançar a qualidade, através do Sistema da Garantia da Qualidade, das Boas Práticas de Fabricação e do Controle de Qualidade, juntamente com os Procedimentos Operacionais Padrão. As associações destas ferramentas envolvem desde o planejamento e gerenciamento das atividades a partir da aquisição de um princípio ativo, incluindo todos os processos de produção do medicamento, até sua chegada ao indivíduo (JURAN; GRZYNA, 1991; ISHIKAWA, 1993; BRASIL, 2010; HALEEM et al., 2015).

O Controle de Qualidade está compreendido nas Boas Práticas de Fabricação e seu objetivo é garantir, a qualquer momento, que a produção dos lotes de medicamentos e demais produtos satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza e inocuidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Desta forma, o Controle de Qualidade torna-se uma prática essencial na indústria farmacêutica, pois garante que somente os processos e as análises relevantes sejam executados e que os insumos farmacêuticos, fármacos e medicamentos sejam somente liberados para sua utilização/comercialização após a confirmação da qualidade satisfatória (BRASIL, 2010).

3.6 Validação de métodos analíticos

A qualidade na indústria farmacêutica está sendo cada vez mais exigida; a consciência dos riscos representados pelos medicamentos aliada à necessidade em mostrar qualidade nos resultados obtidos nas análises de rotina está intimamente relacionada com o controle de qualidade e esta é uma prática inserida nas Boas Práticas de Fabricação na indústria farmacêutica (RIBANI et al., 2004; LA ROCA et al., 2007; BRASIL, 2010; HALEEM et al. 2015).

Métodos analíticos eficazes e confiáveis tornaram-se fundamentais. Desta forma, a etapa de validação de métodos analíticos é indispensável, pois apresenta impacto direto sobre a qualidade dos dados analíticos gerados (LA ROCA et al., 2007). Portanto, o desenvolvimento de novos métodos analíticos bem definidos e documentados implica em melhorias nas condições para o controle de qualidade e conseqüentemente na garantia da segurança e eficácia dos medicamentos (RIBANI et al., 2004; LA ROCA et al., 2007).

Para conseguir alcançar a qualidade é necessária a implantação de um sistema de garantia de qualidade que incorpore as normas de Boas Práticas de Fabricação (LA ROCA et al., 2007; BRASIL, 2010). O Brasil possui a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), dois órgãos credenciados que avaliam a competência dos laboratórios (RIBANI et al., 2004); estas duas instituições apresentam guias de validação, utilizados como referência para a validação dos métodos analíticos. A ANVISA possui a resolução RE nº 899 e recentemente publicou a RDC nº 166, que entra em vigor e revoga a RE nº 899 em 180 dias após sua data de publicação, ou seja, dia 24 de janeiro de 2018 (BRASIL, 2017), as quais contemplam os requisitos fundamentais em uma validação analítica. O INMETRO possui um guia de orientação DOQ-CGCRE-008, com a última revisão em agosto de 2016 (INMETRO, 2016). Os órgãos internacionais também apresentam seus guias, os quais também são utilizados no Brasil, como a *International Conference on Harmonization (ICH)*, que apresenta o ICH Q2(R1) - *Validation of Analytical Procedures: text and methodology* (ICH, 2005) e a Farmacopeia Americana (USP, 2016).

Os métodos analíticos apresentados pelos compêndios oficiais não necessitam de validação completa, apenas parcial, a qual deve avaliar pelo menos os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017). Já os métodos não descritos necessitam da avaliação de todos os parâmetros, sendo estes: seletividade, linearidade, intervalo linear, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2017), além da adequabilidade do sistema para

métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (ICH, 2005; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; USP, 2016).

Métodos analíticos indicativos de estabilidade são exigidos para controlar o monitoramento da estabilidade dos produtos acabados, os quais contribuem com a garantia da qualidade pela avaliação das características físico-químicas do medicamento, como também com a eficácia e segurança relacionadas à dosagem dos fármacos nos medicamentos e à formação de produtos de degradação (BRASIL, 2005).

Segundo a RDC nº 166, os parâmetros utilizados na validação dos métodos analíticos dependem do ensaio a ser realizado, conforme apresenta a Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetro avaliado	Identificação	Testes de Impureza		Doseamento - Dissolução (quantificação) - Uniformidade de conteúdo - Potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim ⁽¹⁾	Não	Sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não ⁽³⁾	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não ⁽³⁾
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

⁽¹⁾ Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

⁽²⁾ Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

⁽³⁾ Pode ser necessário em alguns casos.

Desta forma, segue a descrição de cada parâmetro analítico (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2017):

- Especificidade/Seletividade: é a capacidade do método em identificar ou quantificar exatamente a substância analisada mesmo na presença de outros componentes que podem ser impurezas, produtos de degradação, excipientes e adjuvantes;
- Linearidade: este parâmetro demonstra a capacidade do método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, compreendida em um intervalo especificado;
- Intervalo: é a faixa que compreende os limites de quantificação superior e inferior do método, sendo estabelecido através da confirmação dos resultados dos parâmetros de linearidade, precisão e exatidão;
- Precisão: avalia a proximidade dos resultados através de diversas medições de uma amostragem. É representada em três níveis:

- Precisão por repetibilidade (intradia): procedimento analítico realizado pelo mesmo analista, com as mesmas condições de análise, mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo;
- Precisão intermediária (interdia): a concordância dos resultados é avaliada no mesmo laboratório, porém obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;
- Precisão por reprodutibilidade: a concordância dos resultados é avaliada em laboratórios diferentes (geralmente em estudos colaborativos, aplicados para padronização de métodos analíticos).
- Exatidão: avalia a proximidade dos resultados obtidos através do método em estudo em relação ao valor verdadeiro, pode ser avaliada das seguintes formas:
 - Para análise do fármaco: pode ser analisada através de uma metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou através da comparação dos resultados obtidos com os resultados de um segundo método bem caracterizado e com exatidão já estabelecida;
 - Para análise da forma farmacêutica: pode ser obtida pela adição de uma quantidade conhecida de fármaco em uma mistura dos componentes do medicamento (placebo fortificado) ou, a análise pode ser realizada através do método de adição do padrão, caso os componentes do medicamento estejam indisponíveis;
 - Para análise de impurezas: pode ser realizada através do método de adição de padrão ou, caso haja indisponibilidade de determinadas impurezas e/ou produtos de degradação, é possível a comparação dos resultados obtidos com um método bem caracterizado (presente em compêndio oficial ou outro procedimento analítico validado).
- Limite de detecção: é caracterizado pela menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que pode ser detectada, porém, não obrigatoriamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas;
- Limite de quantificação: é caracterizado pela menor concentração de uma substância presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas;
- Robustez: é um parâmetro que deve ser considerado durante o desenvolvimento do método, determina a capacidade do método em resistir a pequenas e determinadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiança do método durante o uso na rotina.

- Para métodos desenvolvidos por cromatografia líquida é exigido pelo ICH (2005) e pela FDA (2004) a adequabilidade do sistema, com o intuito de apresentar resultados confiáveis e aceitáveis. Alguns parâmetros baseados no pico cromatográfico são avaliados, como: número de pratos, resolução, fator de cauda, fator de assimetria, fator de retenção e precisão (repetibilidade) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Uma ferramenta indispensável para a realização do tratamento dos resultados é a análise estatística, como exemplos: análise de variância (ANOVA), teste *t* Student e o coeficiente de variação, auxiliam no embasamento científico-matemático dos experimentos realizados (LA ROCA et al., 2007).

3.7 Química analítica verde

A química verde consiste em procedimentos que reduzem riscos aos seres humanos e ao meio ambiente, através de técnicas que visam reduzir ou eliminar o uso de insumos, produtos, solventes e reagentes, como também minimizar a geração de resíduos tóxicos (ANASTAS, 1999; GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013).

Segundo Anastas e Warner, a química verde baseia-se em 12 princípios, sendo estes (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013):

1. Técnicas analíticas diretas, com o intuito de evitar o tratamento da amostra.
2. Uso de quantidades mínimas de amostra.
3. Medições *in situ* devem ser realizadas.
4. Processos analíticos e operações que economizem energia e reduzam a utilização de reagentes.
5. Uso de métodos automatizados e miniaturizados
6. Evitar a derivatização.
7. Evitar a geração de grandes volumes de resíduos e efetuar o tratamento adequado dos mesmos.
8. Métodos multianalitos e multiparâmetros devem ser escolhidos ao invés da utilização de um analito de cada vez.
9. Minimizar a utilização de energia.
10. Dar preferência a reagentes obtidos a partir de fontes renováveis.
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos.
12. Aumentar a segurança em relação ao operador.

A maioria dos princípios é passível de ser executada na rotina de trabalho e os procedimentos realizados devem ser considerados desde o processo de amostragem até a

eliminação do resíduo final (ARMENTA; GARRIGUES; GUARDIA, 2008; GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013).

Os solventes orgânicos são comumente utilizados em análises de rotina nas indústrias farmacêuticas, e a maioria dos resíduos químicos são atribuídos a eles. Desta forma, o uso de solventes ambientalmente recomendados é uma forma de contribuir para a química verde (RAVIKIRAN; PRASAD; ANOOP, 2015). Como exemplo é possível citar a água, etanol, 2-propanol, 1-butanol, acetato de etila, anisol e sulfolano, que são considerados solventes verdes (PRAT; HAYLER; WELLS, 2014) e podem substituir os orgânicos, como: metanol, acetona, acetonitrila, tolueno, ácido fórmico e piridina (PRAT; HAYLER; WELLS, 2014; WELTON, 2016).

A busca pelo consumo sustentável, por métodos considerados ecologicamente recomendados e conseqüentemente as publicações de trabalhos científicos envolvendo a química verde encontram-se cada vez mais em evidência, contribuindo para a implantação de ações ambientais nas indústrias, com o intuito de reduzir danos ao meio ambiente.

4. DESCRIÇÃO

4.1 Descrição geral

Nome: ceftriaxona sódica.

CAS: 104376-79-6 (BP, 2014).

Nome químico: (6R,7R)-7-[[[(Z)-(2-Aminotiazol-4-il)(metoxiimino)- acetil]amino]3-[[[(2-metil-5-oxo-6-oxido-2,5-di-hidro-1,2,4-triazina-3-il)sulfanil]metil]-8oxo-5-tia-1 azabicyclo [4.2.0] -2-octeno-2-carboxilato dissódico (BP, 2014).

Fórmula molecular: C₁₈H₁₆N₈Na₂O₇S₃, 3½ H₂O (USP, 2016).

Massa molecular: 661,60 g/mol (USP, 2016).

Propriedades físico-químicas: A ceftriaxona sódica apresenta-se na forma de pó cristalino, quase branco ou amarelado, ligeiramente higroscópico (JP, 2011; BP, 2014; EP, 2014), é muito solúvel em água, pouco solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol (BP, 2014; EP, 2014). Seu ponto de fusão é superior a 155°C (O'NEIL, 2013).

pH: entre 6,0 a 8,0 em solução aquosa na concentração de 10% (USP, 2016).

pka: pka₁ 3,0 (COOH), pka₂ 3,2 (NH₃⁺) e pka₃ 4,1 (OH) (O'NEIL, 2013).

Categoria: antibacteriano cefalosporínico (BP, 2014).

Classe: cefalosporina de terceira geração.

Comercialização no Brasil: é comercializada sob a forma de pó para solução injetável, como medicamento de referência pelo laboratório Roche com o nome de Rocefim[®] (ANVISA, 2017b), como ceftriaxona sódica genérica pelos laboratórios Eurofarma, EMS, Aurobindo, Antibióticos do Brasil, Halex Istar, Pharma Limirio, Blau (ANVISA, 2017c) e como similar, Ceftriax[®] (Sigma Pharma), Keftron[®] (Antibióticos do Brasil), Triaxin[®] (Momenta Farmacêutica), Triaxton[®] (Blau Farmacêutica) e Amplopec[®] (Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica) (ANVISA, 2017d).

Diluentes: água para injetáveis apresenta os seguintes diluentes compatíveis: cloreto de sódio 0,9%, glicose 5%, glicose 10% e glicose 5% em cloreto de sódio 0,45% (ANVISA, 2017e).

4.2 Substância química de referência (SQR)

Foi adquirida através da empresa Sigma-Aldrich[®], identificada pelo lote LRAA9170, com teor declarado de 99,6% e validade até 31/12/2020.

4.3 Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável

Foram utilizadas amostras de frascos-ampola contendo ceftriaxona sódica pó para solução injetável, via intravenosa, gentilmente fornecidas pelo Laboratório Farmacêutico ABL Antibióticos do Brasil®, lote 106180C e validade: 02/2018. Cada frasco-ampola contém o equivalente a 1 g de ceftriaxona e não possui adjuvantes.

5. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

5.1 Considerações gerais

A espectrofotometria na região do infravermelho localiza-se entre as regiões do visível e das micro-ondas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). As moléculas possuem movimentos vibracionais em suas ligações químicas, através da absorção da radiação infravermelha esses movimentos são ampliados, ocasionando a formação de picos característicos no espectro do infravermelho, correspondente a cada grupo funcional da molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; PAVIA et al., 2010). Cada molécula apresenta um espectro específico, permitindo a interpretação dos picos obtidos mesmo nos casos onde há semelhança entre estruturas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PAVIA et al., 2010). Portanto, é possível verificar se as substâncias analisadas são idênticas ou não através da análise de seus espectros, pico a pico, como também, é possível obter informações estruturais da molécula analisada (PAVIA et al., 2010).

O espectrômetro de transformada de Fourier é o mais utilizado e possui maior sensibilidade, pois através dele é possível medir todos os comprimentos de onda simultaneamente e de acordo com a luz transmitida, é possível verificar a quantidade de energia absorvida em cada comprimento de onda (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; PAVIA et al., 2010).

Esta técnica é muito utilizada para identificação na indústria farmacêutica. Porém, estudos recentes também apresentam métodos analíticos quantitativos, possuindo vantagens, pois não utiliza solventes orgânicos, desta forma, não gera resíduos tóxicos e apresenta baixo custo. Também é indicada para fármacos que apresentam problemas com solubilidade, visto que pastilhas podem ser preparadas a partir da forma farmacêutica sólida (MORENO; SALGADO, 2012; TÓTOLI; SALGADO, 2012; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012; KOGAWA; SALGADO, 2013; ALI; SHERAZI; MAHESAR, 2014; CORRÊA; SALGADO, 2014b; MALLAH et al., 2015; KOGAWA; MELLO; SALGADO, 2016; MARCO; SALGADO, 2016; NATORI; TÓTOLI; SALGADO, 2016; CONSORTTI; SALGADO, 2017b).

5.2 Material e método

Para as análises por espectrofotometria na região do infravermelho foram utilizadas ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica pó para solução injetável, conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. As pastilhas foram confeccionadas utilizando brometo de

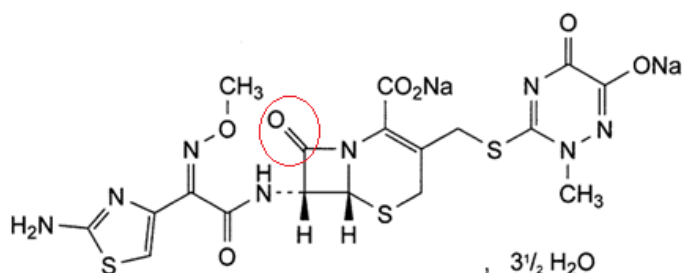
potássio (KBr) de grau analítico da marca Neon[®]. Primeiramente o KBr foi pulverizado em gral de ágata e dessecado em estufa (Fanem[®], modelo 315 SE) a 105°C até massa constante.

Foram preparadas pastilhas com massa total de 150 mg. Massas determinadas de ceftriaxona sódica (SQR e pó para solução injetável) foram diluídas em brometo de potássio na proporção 1:10 (m/m). A mistura de pós foi submetida a uma pressão de 80 kN por 10 minutos para a obtenção das pastilhas. A leitura das pastilhas foi realizada em espectrômetro (Shimadzu[®] com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21) na região correspondente ao infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹), utilizando-se resolução de 2 cm⁻¹. Os espectros foram digitalizados em arquivos eletrônicos.

Os resultados foram obtidos com o auxílio do *software IR Solution*, pela análise da absorvância correspondente à altura do pico na região compreendida entre 1800 a 1700 cm⁻¹, referente à ligação entre o carbono e o oxigênio do grupo carbonila presente na molécula da ceftriaxona sódica (Figura 5), cuja região do espectro utilizada para a quantificação está destacada na Figura 6.

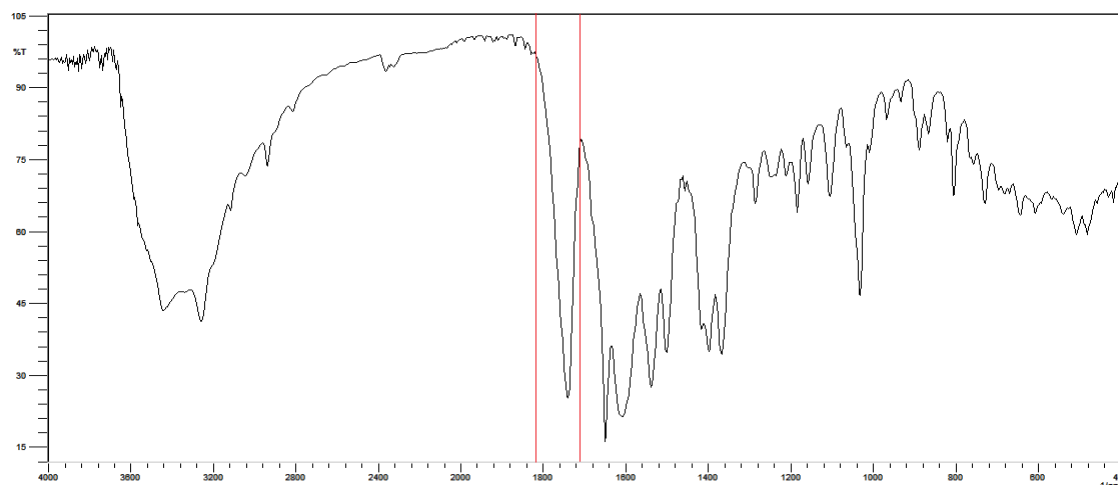
As análises estatísticas juntamente com a curva analítica realizada no desenvolvimento e na validação do método analítico foram realizadas através do *software Microsoft Excel* (2016).

Figura 5: Estrutura química da ceftriaxona sódica com a ligação referente à banda no espectro utilizada na quantificação do método por espectrofotometria na região do infravermelho



Fonte: Farmacopeia Britânica, 2014.

Figura 6: Espectro de absorção na região do infravermelho obtido com a ceftriaxona sódica SQR com a banda em destaque utilizada na análise quantitativa



5.2.1 Validação do método

O método foi validado mediante a determinação dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação, de acordo com o recomendado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

5.2.1.1 Seletividade

A seletividade do método foi comprovada através da sobreposição dos espectros obtidos na análise da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável, como também, através da degradação forçada nas condições fotolítica e térmica.

Foram realizados ensaios de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável na diluição 1:10. Para a condição fotolítica, o fármaco previamente diluído foi submetido à exposição em câmara com espelhos com lâmpada UV (254 nm) com potência de 20 W durante 3 horas e para a degradação térmica, sofreu exposição em estufa a 105°C durante 2 horas.

Amostras foram coletadas em intervalos de tempos pré-determinados, as pastilhas foram confeccionadas na concentração de 0,8 mg/pastilha e o ensaio foi interrompido quando a banda referente ao fármaco apresentou degradação entre 5 e 20% (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; BLESSY et al., 2014).

5.2.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada em três dias diferentes, através da obtenção da curva analítica construída com os valores de absorvâncias adquiridos pelas leituras das pastilhas

contendo ceftriaxona sódica SQR nas concentrações entre 0,4 a 1,2 mg/pastilha. A análise dos resultados foi avaliada pelo cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados, pelo valor do coeficiente de correlação e pelo gráfico de resíduos padronizados.

5.2.1.3 Precisão

A precisão foi determinada através da repetibilidade (intradia) e pela precisão intermediária (interdias e entre analistas). A repetibilidade foi avaliada pela análise de 6 pastilhas na concentração de 0,8 mg/pastilha de ceftriaxona sódica pó para solução injetável, preparadas pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, nas mesmas condições de trabalho e no mesmo dia. Em seguida foi calculado o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das absorvâncias obtidas.

Na precisão intermediária interdias a análise foi realizada da mesma maneira como na intradia, porém em três dias diferentes. Também foi avaliado o DPR% das absorvâncias obtidas. A precisão entre analistas foi realizada por dois analistas diferentes, em dias diferentes e no mesmo laboratório, a análise estatística foi comprovada através do teste F (Snedecor) e teste t (Student).

5.2.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, em que quantidades conhecidas de ceftriaxona sódica SQR foram adicionadas em quantidades conhecidas do pó para solução injetável, em três níveis de concentração 80, 100 e 120%, R1, R2 e R3, respectivamente, considerando o intervalo linear do método. O ensaio foi realizado em triplicata e está representado na Tabela 3.

Tabela 3: Preparo das pastilhas de ceftriaxona sódica em brometo de potássio para o teste de recuperação do método por espectrofotometria na região do infravermelho

Pastilha	Ceftriaxona sódica pó para solução injetável diluída ¹ (mg)	Ceftriaxona sódica SQR diluída (mg)	Brometo de potássio ² (mg)	Concentração teórica final (mg/pastilha)
Amostra	4,0	-	146,0	0,40
R1	4,0	2,4	143,6	0,64
R2	4,0	4,0	142,0	0,80
R3	4,0	5,6	140,4	0,96
SQR	-	4,0	146,0	0,40

¹Diluição 1:10 (m/m) com brometo de potássio.

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

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 1, conforme preconizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2002).

$$R (\%) = \left[\frac{(C_f - C_u)}{C_s} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

R (%): recuperação (em porcentagem);

C_f: concentração da ceftriaxona sódica no pó liofilizado fortificado com a SQR (mg/pastilha);

C_u: concentração da ceftriaxona sódica no pó liofilizado (mg/pastilha);

C_s: concentração teórica da ceftriaxona sódica SQR adicionada (mg/pastilha).

5.2.1.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente, a partir da obtenção das três curvas analíticas.

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto;

IC = inclinação da curva analítica.

5.2.1.6 Robustez

A robustez do método foi analisada através do planejamento fatorial 2^3 . Foi avaliada a influência de três fatores em dois níveis (BARROS NETO et al., 2010). A Tabela 4 apresenta os fatores e suas respectivas variações.

Tabela 4: Planejamento fatorial 2^3 para o parâmetro robustez do método por espectrofotometria na região do infravermelho

Fatores	(-)	(+)
1: Tempo de compressão (min)	8	12
2: Força de compressão (kN)	76	84
3: Marca do brometo de potássio	Neon [®]	Synth [®]

Após a definição dos parâmetros a serem avaliados, dezesseis pastilhas contendo ceftriaxona sódica pó para solução injetável na concentração de 0,8 mg/pastilha foram confeccionadas de acordo com a Tabela 5. Foram analisadas duas pastilhas para cada ensaio.

Tabela 5: Matriz de planejamento dos ensaios para o parâmetro robustez do método por espectrofotometria na região do infravermelho

Ensaio	Fatores		
	1	2	3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

A avaliação estatística foi realizada pela análise da variância, calculada com o *software* Assistat 7.7 beta e por meio da avaliação da significância dos efeitos (coeficientes de contraste), demonstrada através do gráfico de Pareto.

Os efeitos foram calculados de acordo com a Tabela 6. Após a obtenção da média das absorvâncias de cada ensaio, os efeitos foram calculados pela subtração da média dos

valores médios de absorvância do nível superior (+) com os valores médios de absorvância do nível inferior (-) (MONTGOMERY, 2009; BARROS NETO et al., 2010).

Tabela 6: Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2³

Ensaio	Média	Interações						
		1	2	3	12	13	23	123
1	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	+	-	-	-
5	+	-	-	+	+	-	-	+
6	+	+	-	+	-	+	-	-
7	+	-	+	+	-	-	+	-
8	+	-	+	+	+	+	+	+

5.2.2 Determinação do teor de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável

5.2.2.1 Preparo das pastilhas

As pastilhas de ceftriaxona sódica SQR foram preparadas na concentração de 0,8 mg/pastilha, ou seja, pesando-se a quantidade do diluído referente a 0,8 mg de fármaco e 142,0 mg de brometo de potássio.

Um *pool* com o conteúdo de vinte frascos-ampola do medicamento foi utilizado para a confecção das pastilhas de ceftriaxona sódica pó para solução injetável, pesou-se 8,0 mg da quantidade do *pool* diluído e 142,0 mg de brometo de potássio. As determinações foram realizadas em triplicata.

5.2.2.2 Cálculo do teor de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável

A concentração de ceftriaxona sódica no medicamento e o seu teor percentual foram calculados de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente.

$$Ca = C_{SQR} \times \frac{Aa}{AsQR}$$

Equação 4

$$C_a (\%) = C_a \times \frac{100}{C_t} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

C_a : concentração de ceftriaxona sódica pó para solução injetável na pastilha (mg/pastilha);

C_{SQR} : concentração de ceftriaxona sódica SQR na pastilha (mg/pastilha);

A_a : absorvância da pastilha de ceftriaxona sódica pó liofilizado;

A_{SQR} : absorvância da pastilha de ceftriaxona sódica SQR;

$C_a\%$: concentração de ceftriaxona sódica pó para solução injetável (em porcentagem);

C_t : concentração teórica de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável na pastilha (mg/pastilha).

5.3 Resultados

5.3.1 Desenvolvimento do método

O espectro de absorção da ceftriaxona sódica SQR apresentou bandas características (Figura 7) que foram comparadas com a literatura (Tabela 7) (PAVIA et al., 2010).

Figura 7: Espectro de absorção na região do infravermelho obtido com a ceftriaxona sódica SQR apresentando suas respectivas bandas características

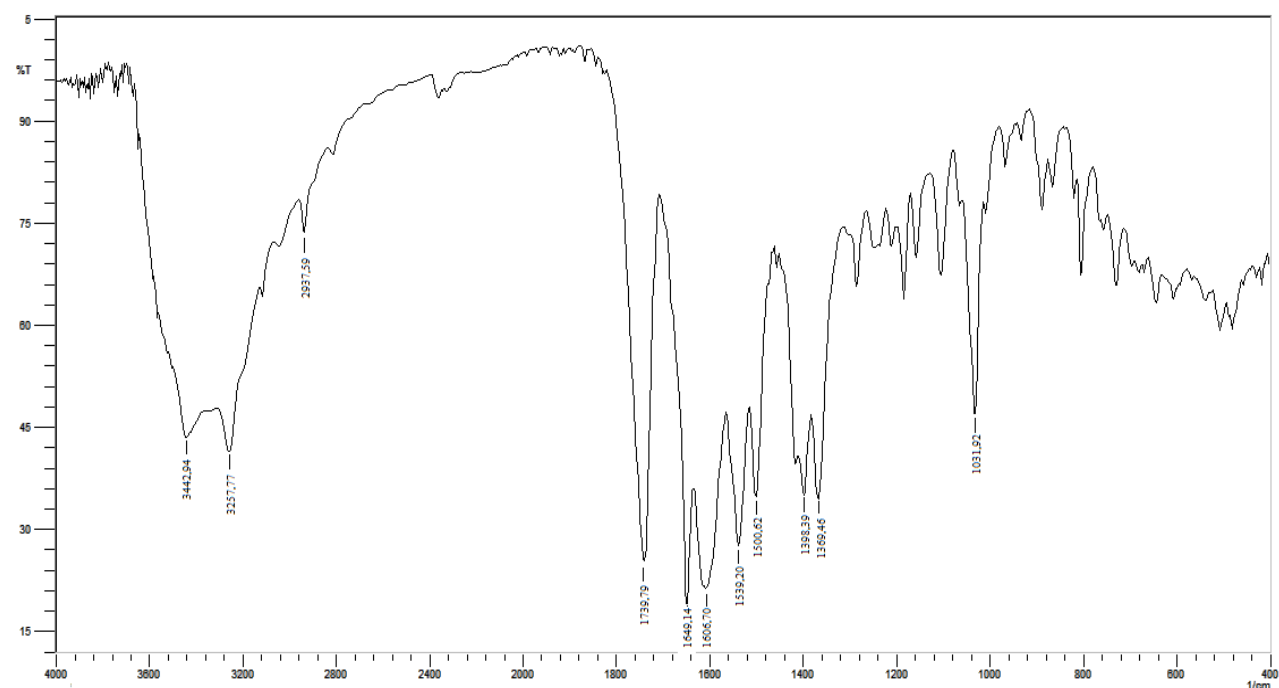


Tabela 7: Comparação das bandas de absorção apresentadas no espectro da ceftriaxona sódica SQR com dados da literatura (PAVIA et al., 2010)

Frequência visualizada (cm ⁻¹)	Frequência referência (cm ⁻¹)*	Vibrações e grupamentos
3442-3257	3500-3300	Estiramento do grupamento N-H da amina
2937	3000-2840	Estiramento da ligação C-H do Csp ³
1739	1745	Estiramento da ligação C=O da lactama
1649	1680-1630	Estiramento da ligação C=O da amida
1606	1640-1550	Dobramento da ligação C-N da amida
1539-1500	1600-1400	Estiramento do grupamento carboxilato (COO ⁻)
1398-1369	~1400	Dobramento da ligação C-H das metilas
1031	1300-1000	Estiramento da ligação C-O do éter

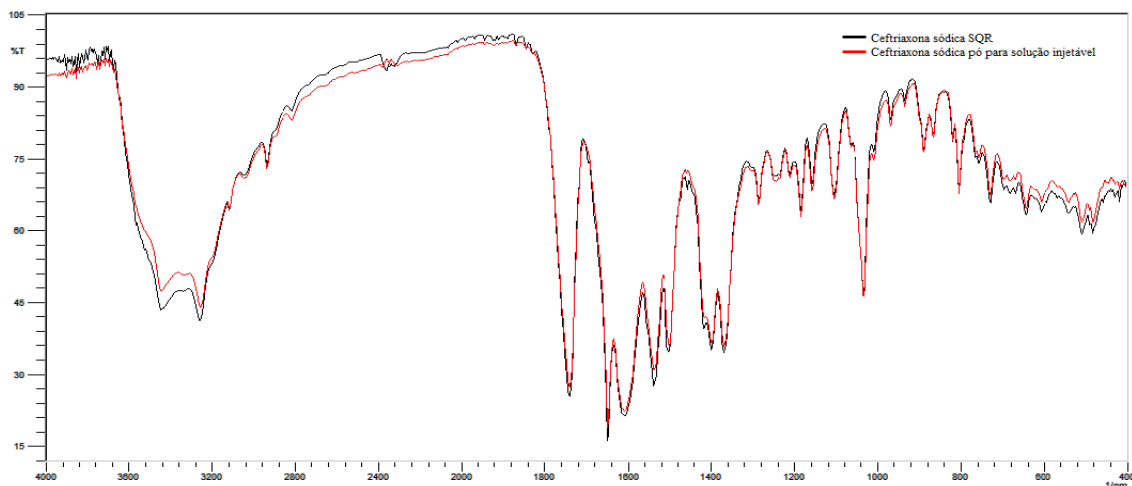
5.3.2 Validação do método analítico

O método foi validado de acordo com os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, conforme estabelecido pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

5.3.2.1 Seletividade

A Figura 8 apresenta a sobreposição dos espectros obtidos da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável.

Figura 8: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável



Na degradação fotolítica do fármaco o pico referente à carbonila apresentou decréscimo de 19,82% após 3 horas de exposição e na degradação térmica houve um decréscimo de 19,88% após 2 horas de exposição. Os espectros obtidos através da degradação fotolítica e térmica estão representados pelas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho na degradação fotolítica da ceftriaxona pó para solução injetável nos tempos zero e 3 horas

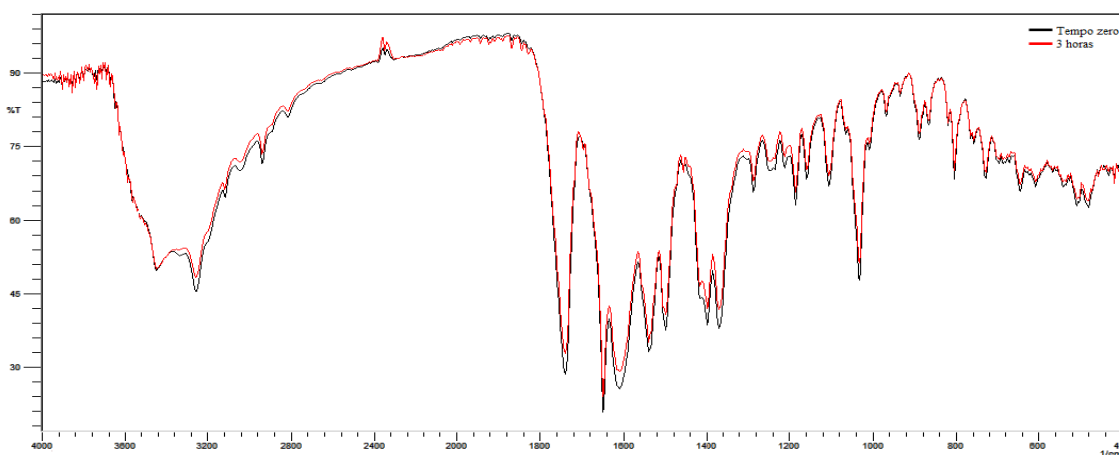
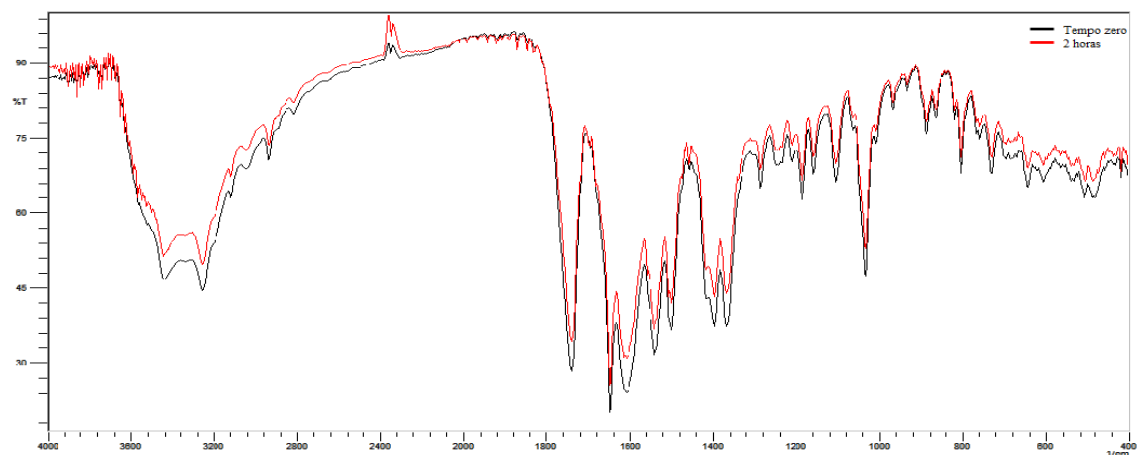


Figura 10: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho na degradação térmica da ceftriaxona pó para solução injetável nos tempos zero e 2 horas



5.3.2.2 Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas através da leitura das pastilhas de ceftriaxona sódica SQR para a curva analítica estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores das absorvâncias referentes à altura dos picos na região de 1800 a 1700 cm^{-1} das pastilhas de brometo de potássio contendo ceftriaxona sódica SQR para a elaboração da curva analítica pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

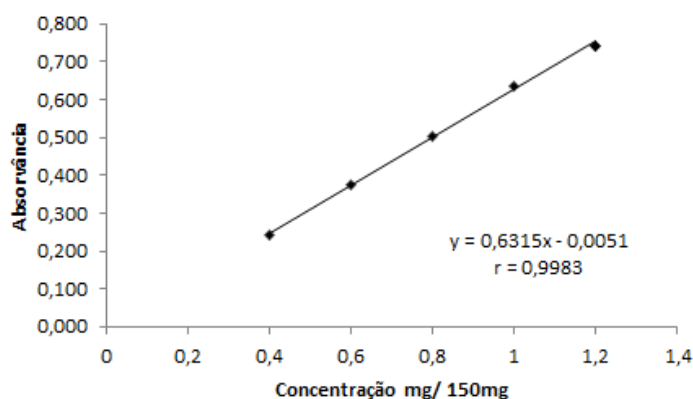
Concentração (mg/ pastilha)	Absorvância	Absorvância média \pm DP ¹	DPR ² (%)
	0,245		
0,4	0,241	0,241 \pm 0,0045	1,87
	0,236		
	0,384		
0,6	0,370	0,377 \pm 0,0070	1,86
	0,376		
	0,509		
0,8	0,515	0,505 \pm 0,0124	2,47
	0,491		
	0,645		
1,0	0,634	0,636 \pm 0,0086	1,36
	0,628		
	0,725		
1,2	0,761	0,743 \pm 0,0180	2,42
	0,742		

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

A curva analítica para a ceftriaxona sódica SQR foi construída pela relação entre as médias dos valores das absorvâncias e suas respectivas concentrações, representada pela Figura 11.

Figura 11: Representação gráfica da curva analítica referente à ceftriaxona sódica SQR pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho



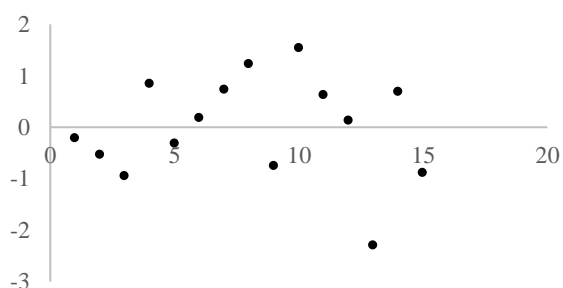
A ANOVA e o gráfico de resíduos padronizados estão representados na Tabela 9 e na Figura 12, respectivamente.

Tabela 9: Análise da variância dos valores de absorvância obtidos na construção da curva analítica da ceftriaxona sódica SQR pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	0,47935	0,11984	959,72*	3,48
Regressão linear	1	0,47802	0,47802	3828,24*	4,96
Desvio da linearidade	3	0,00133	0,00044	3,54	3,71
Resíduo	10	0,00125	0,00012	-	-
Total	14	0,48060	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Figura 12: Gráfico de resíduos padronizados referente à ceftriaxona sódica SQR pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho



5.3.2.3 Precisão

Os resultados obtidos para a precisão intradia e interdias estão apresentados na Tabela 10. A precisão intermediária entre analistas está representada na Tabela 11.

Tabela 10: Determinação da precisão por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

Precisão	Absorvância						Absorvância média \pm DP ¹	DPR ² (%)
Repetibilidade intradia	0,495	0,490	0,510	0,521	0,489	0,512	0,503 \pm 0,0132	2,64
Intermediária Interdias	0,495	0,490	0,510	0,521	0,489	0,512	0,516 \pm 0,0233	4,53
	0,488	0,507	0,509	0,490	0,513	0,492		
	0,541	0,537	0,562	0,544	0,542	0,539		

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

Tabela 11: Determinação da precisão intermediária (entre analistas) pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

Precisão intermediária entre analistas	Absorvância						Teste F: duas amostras para variância	Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Analista 1	0,495	0,490	0,510	0,521	0,489	0,512	$F_{\text{cal}} 2,53 < F_{\text{tab}} 6,39$ $P_{\text{valor}} 0,20 > 0,05$	$t_{\text{cal}} 0,78 < t_{\text{tab}} 2,23$ $P_{\text{valor}} 0,45 > 0,05$
Analista 2	0,498	0,501	0,519	0,500	0,513	0,517		

5.3.2.4 Exatidão

Os resultados obtidos pelo teste de recuperação para o parâmetro exatidão estão representados através da Tabela 12.

Tabela 12: Determinação do parâmetro exatidão pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

	Ceftriaxona sódica SQR adicionada (mg)	Ceftriaxona sódica SQR encontrada (mg)	Recuperação (%)	DPR ¹ (%)	Recuperação média (%)
R1	0,240	0,241	100,41	1,09	
R2	0,400	0,401	100,33	0,84	100,44
R3	0,560	0,563	100,57	2,13	

¹Desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação).

5.3.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação foram 0,016 mg e 0,049 mg, respectivamente.

5.3.2.6 Robustez

A Tabela 13 apresenta as absorvâncias encontradas nos oito ensaios realizados para o parâmetro robustez, a análise da variância foi avaliada no nível de significância de 5% e está representada na Tabela 14. A Figura 13 apresenta o gráfico de Pareto.

Tabela 13: Determinação do parâmetro robustez pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

Ensaio	Absorvância	Absorvância média \pm DP ¹	DPR ² (%)
1	0,544 0,514	0,529 \pm 0,0212	4,01
2	0,516 0,518	0,517 \pm 0,0014	0,27
3	0,511 0,525	0,518 \pm 0,0098	1,91
4	0,515 0,513	0,514 \pm 0,0014	0,28
5	0,532 0,512	0,522 \pm 0,0141	2,71
6	0,545 0,551	0,548 \pm 0,0042	0,77
7	0,515 0,528	0,522 \pm 0,0091	1,76
8	0,530 0,511	0,521 \pm 0,0134	2,58

¹Desvio padrão.

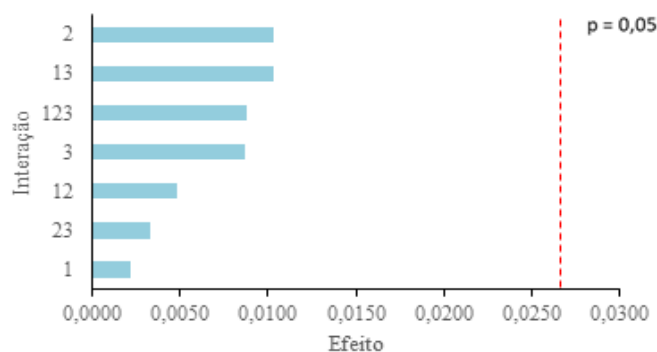
²Desvio padrão relativo.

Tabela 14: Análise de variância para o parâmetro robustez pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

Fonte de variação	Gl	SQ	QM	F	F tabelado	valor-P*
Fator 1	1	0,00002	0,00002	0,1565	5,3177	0,7026
Fator 2	1	0,00044	0,00044	3,4087	5,3177	0,1019
Fator 3	1	0,00029	0,00029	0,6975	5,3177	0,4277
Interação fatores 1 e 2	1	0,00009	0,00009	2,2338	5,3177	0,1732
Interação fatores 1 e 3	1	0,00042	0,00042	3,2483	5,3177	0,1090
Interação fatores 2 e 3	1	0,00005	0,00005	0,3787	5,3177	0,5552
Interação fatores 1, 2 e 3	1	0,00031	0,00031	2,3672	5,3177	0,1623
Tratamentos	7	0,00162	0,00023	1,7844	3,5005	0,2173
Resíduos	8	0,00103	0,00013	-	-	-

*Significativo para $p > 0,05$

Figura 13: Gráfico de Pareto referente às interações das variáveis para o parâmetro robustez pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho



5.3.3 Determinação do teor de ceftriaxona sódica pó para solução injetável

Os valores obtidos para a determinação do teor da ceftriaxona sódica no produto acabado estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Determinação do teor de ceftriaxona sódica, em porcentagem, pelo método por espectrofotometria na região do infravermelho

	Absorvância da ceftriaxona sódica SQR	Absorvância da ceftriaxona sódica pó para solução injetável	Concentração (%)
	0,557	0,519	93,18
	0,536	0,512	95,46
	0,579	0,543	93,89
Média	0,557	0,525	94,18
DPR* (%)	3,86	3,100	1,240

*Desvio padrão relativo.

5.4 Discussão

O método foi desenvolvido e validado buscando simplicidade e otimização em relação aos existentes, visando diminuir os impactos ambientais, pois não utiliza solventes tóxicos e apresenta baixo custo.

Inicialmente, no desenvolvimento do método analítico, o espectro referente à ceftriaxona sódica SQR apresentou bandas características de compostos cefalosporínicos (Figura 7), em que se sugeriu a atribuição dos valores de frequência das bandas presentes no espectro com os valores apresentados pela literatura (Tabela 7), as quais apresentaram concordância, resultando em um forte indício da identidade da molécula em análise.

A escolha da região do espectro utilizada para a quantificação foi baseada nas características do grupamento seletivo presente nas cefalosporinas. Desta forma, optou-se pela quantificação da carbonila pertencente ao anel β -lactâmico da molécula (Figura 6).

A seletividade foi comprovada com a sobreposição dos espectros apresentada pela Figura 8, nos quais apresentaram as mesmas bandas de absorção, possibilitando caracterizar a molécula em análise de acordo com o seu padrão de referência. O teste de degradação forçada foi realizado para confirmar a seletividade do método. A partir dos espectros obtidos nas degradações nas condições fotolítica (Figura 9) e térmica (Figura 10) foi possível verificar a diminuição da banda utilizada para a quantificação do fármaco, como também a ausência de novas bandas, desta forma, o método proposto também é indicativo de estabilidade.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as pastilhas de ceftriaxona sódica SQR analisadas apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, no intervalo utilizado e foram analisados estatisticamente pela determinação do coeficiente de correlação, o qual deve ser maior ou igual a 0,99, da análise da significância e através do gráfico de resíduos. Através do gráfico que correlaciona a concentração com a absorvância (Figura 11) obteve-se um valor de coeficiente de variação de 0,9983, demonstrando haver linearidade na faixa de 0,4 a 1,2 mg/pastilha. A análise da variância (Tabela 9) comprovou que não existe desvio de linearidade significativo, a um nível de

significância de 5%, pois apresentou valor de F calculado (3,54) inferior ao F tabelado (3,71). O gráfico de resíduos (Figura 12) apresentou distribuição homocedástica, possibilitando a comprovação da linearidade do método no intervalo das concentrações avaliadas.

A precisão do método foi adequada, a análise da precisão intradia e interdias (Tabela 10) apresentou valores de DPR% inferiores a 5%, 2,64 e 4,53%, respectivamente. A precisão entre analistas (Tabela 11), avaliada pelo teste *t* Student e apresentou o valor de *t* calculado (0,78) inferior ao *t* tabelado (2,23) demonstrando, desta forma, a um nível de significância de 5% que os valores não diferem estatisticamente. O método também se apresentou exato, obteve-se um valor médio de recuperação igual a 100,44%.

Os valores obtidos no limite de detecção e no limite de quantificação, 0,016 mg e 0,049 mg, respectivamente, demonstram a confiabilidade do método em detectar e quantificar a ceftriaxona sódica pó para solução injetável, pois a faixa de concentração utilizada se encontra acima dos limites calculados.

Na robustez do método, de acordo com a análise da variância de cada contraste (Tabela 14), foi possível constatar que as pequenas variações realizadas não interferiram significativamente na quantificação do fármaco, pois apresentou valores -P maiores que 0,05. Através do gráfico de Pareto (Figura 13) foi possível observar que nenhuma das interações apresentou valores de absorvância estatisticamente significativos para um valor -P igual a 0,05. Desta forma, nenhum dos fatores alterados interferiu significativamente no sinal do equipamento.

Após a validação do método, o teor da ceftriaxona sódica foi determinado no medicamento, e a média encontrada foi de 94,18%, apresentando-se de acordo com a monografia, que preconiza a faixa entre 90-115% (USP, 2016).

O método proposto por espectrofotometria de absorção no infravermelho atingiu todos os requisitos propostos pelos guias de validação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BRASIL, 2017), demonstrando ser adequado, apresentando simplicidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez e também indicativo de estabilidade, passível de ser empregado nas análises de rotina da ceftriaxona sódica pó para solução injetável na indústria farmacêutica.

O método validado foi publicado em periódico de circulação internacional:

TRINDADE, M.T.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a modern and stability-indicating method for the quantification of ceftriaxone sodium in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 7, n. 3, p 55-62, 2017.

6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

6.1 Considerações gerais

A cromatografia líquida é um processo físico químico de separação, baseada na distribuição dos componentes de uma amostra em duas fases imiscíveis, as quais são denominadas como fase móvel e estacionária (LANÇAS, 2009; CASS; DEGANI, 2013).

A CLAE, desenvolvida na década de 60 (CASS; DEGANI, 2013), apresenta alta precisão, diversas possibilidades de detecção e possibilita a utilização de uma ampla variedade de fases móveis e estacionárias (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). A indústria farmacêutica é um dos principais segmentos que, na maioria das vezes, utiliza esta técnica como sendo a de escolha em suas análises de rotina (DONG; GUILLARME, 2013).

O desenvolvimento do método analítico para a quantificação da ceftriaxona sódica pó para solução injetável através da técnica de CLAE foi embasado em trabalhos publicados que seguem a mesma linha de pesquisa (MORENO; SALGADO, 2008; BONFILIO et al., 2009; VIEIRA; SALGADO, 2011; PASSONI; SALGADO, 2012; BONFILIO et al., 2012; CHIERENTIN; SALGADO, 2013; SILVA; SALGADO, 2013; CAZEDEY; JUODINIS; SALGADO, 2014; FIORENTINO et al., 2014; PEDROSO; SALGADO, 2014a; RUGANI; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2015a; PEDROSO; MEDEIROS; SALGADO, 2016; RODRIGUES; SALGADO, 2016; MARCO; SALGADO, 2017c).

De acordo com os métodos propostos na literatura, diferentes condições cromatográficas foram testadas com o intuito de obter condições analíticas favoráveis visando um método mais simples, rápido e econômico, evitando utilizar solventes e soluções tamponantes que danifiquem a coluna cromatográfica e o equipamento, empregando solventes analíticos ecologicamente recomendados.

6.2 Material e método

Para as análises por CLAE foram utilizadas ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica pó para solução injetável, conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Todas as soluções e fases móveis desenvolvidas em meio aquoso foram preparadas com água ultrapura obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Milipore, USA). Utilizou-se etanol grau HPLC (Panreac®) e ácido ortofosfórico (Qhemis®) para o preparo da fase móvel. Todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram filtrados em membrana de nylon (0,45 µm) e degaseificados em banho ultrassônico modelo SC2800A (Unique®) durante 30

minutos. As soluções a serem analisadas foram filtradas com membrana de 0,45 μm (Macherey-Nagel[®]).

Para os estudos de degradação forçada foram utilizadas soluções aquosas de ácido clorídrico (Qhemis[®]) 0,001 M, solução de hidróxido de sódio (Synth[®]) 0,001 M e solução de peróxido de hidrogênio (Impex[®]) 1%.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo a líquido Waters[®], com módulo de separação modelo Alliance 2695, conectado a detector com arranjo de fotodiodos Waters[®] 2998 e injetor automático controlado pelo *software* Empower 3. As análises foram realizadas em condição isocrática e em fase reversa com coluna Zorbax-SB C₁₈ nas dimensões 4,6 x 150 mm, 5 μm (Agilent[®]). A pureza dos picos da ceftriaxona sódica nos cromatogramas da solução do pó para solução injetável, SQR e das condições de degradação forçada foi avaliada com auxílio do *software* Empower 3. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do software Microsoft Excel (2016).

Os seguintes equipamentos também foram utilizados: banho de aquecimento modelo Q334M (Quimis[®]), balança analítica modelo DV215CD - Classe I (OHAUS[®]); micropipetador modelo 100-1000 μL (Eppendorf[®]); câmara UV (10 x 10 x 100 cm) com espelhos em seu interior, equipada com lâmpada UVC (254 nm).

6.2.1 Desenvolvimento do método

Ensaio preliminares foram realizados com o intuito de se obter uma condição analítica favorável para a quantificação do fármaco, garantindo sua confiabilidade, eficácia e seletividade, visando, dentro das possibilidades, à redução de solventes tóxicos, danos ao equipamento e à coluna cromatográfica, como também, à baixa geração de resíduos. Desta forma, a Tabela 16 apresenta as condições testadas durante o desenvolvimento do método.

Tabela 16: Parâmetros testados no desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação de ceftriaxona sódica pó para solução injetável

Parâmetro	Descrição
Coluna cromatográfica	Luna C ₁₈ (150 x 4,6 mm - 5 µm) - Phenomenex® Zorbax SB C ₁₈ (150 x 4,6 mm - 5 µm) - Agilent®
Fase móvel	Etanol e água Etanol e água + ácido acético (pH's 2,5; 3; 4 e 5) Etanol e água + ácido fórmico (concentrações 0,1% e 0,2%) Etanol e água + ácido ortofosfórico (concentrações 0,1% e 0,2%)
Comprimento de onda	Determinação por varredura
Vazão (mL/ min)	0,5; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2
Volume de injeção	10 µL 20 µL

6.2.1.1 Adequabilidade do sistema

Para a análise da adequabilidade do sistema, foram preparadas e injetadas seis soluções de ceftriaxona sódica SQR na concentração de 60 µg/mL. As áreas dos picos referentes ao fármaco no cromatograma obtido e os tempos de retenção relativos, foram adquiridos através do *software* Empower 3.

Os seguintes parâmetros foram determinados (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; CASS; DEGANI, 2012; USP, 2016):

- Fator de retenção (k'): é a medida da retenção do analito na coluna cromatográfica, calculado de acordo com a Equação 6:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

k' : fator de retenção;

t_R : tempo de retenção do pico (minutos);

t_0 : tempo morto (minutos).

- Assimetria do pico (A_s) e fator de cauda (FC): estão associadas ao formato do pico, calculadas através das equações 7 e 8, respectivamente. A assimetria do pico refere-se às medidas realizadas a 10% da altura do pico e para o fator de cauda as medidas são referentes a 5% da altura do pico (Figura 14).

$$AS = \frac{B}{A} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

As: assimetria de pico;

B: medida do ponto médio do pico à parte anterior a 10% da altura do pico;

A: medida do ponto médio do pico à parte posterior 10% da altura do pico.

$$FC = \frac{(A+B)}{2A} \quad \text{Equação 8}$$

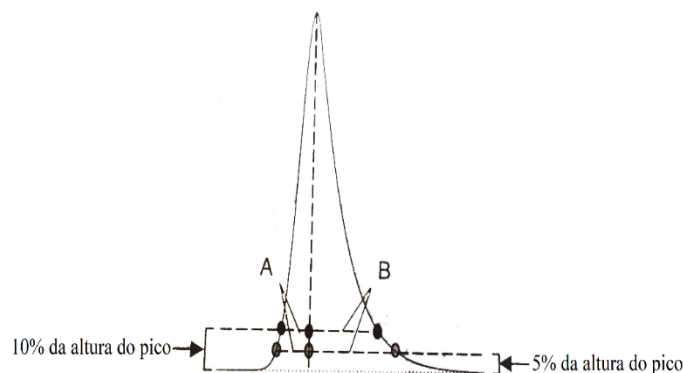
Em que:

FC: fator de cauda;

B: medida do ponto médio do pico à parte anterior a 5% da altura do pico;

A: medida do ponto médio do pico à parte posterior a 5% da altura do pico.

Figura 14: Medidas realizadas para o cálculo dos parâmetros de assimetria do pico e fator de cauda para a adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência



Fonte: adaptado de Snyder, Kirkland, Dolan, 2010.

- Número de pratos (N): refere-se à medida relativa à eficiência das condições cromatográficas, calculado de acordo com a Equação 9, utilizando a largura do pico à meia altura (Figura 15).

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Equação 9}$$

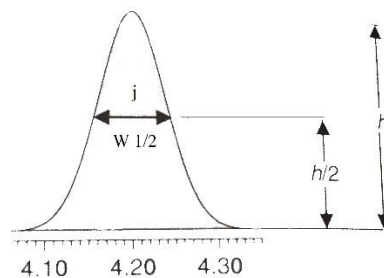
Em que:

N: número de pratos;

t_R : tempo de retenção (minutos);

$W_{1/2}$: largura do pico a meia altura (minutos).

Figura 15: Representação da medida da largura do pico à meia altura para o cálculo do número de pratos para a adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência



Fonte: adaptado de Snyder, Kirkland, Dolan, 2010.

Os parâmetros foram avaliados de acordo com as especificações estabelecidas pela FDA, 2004:

- Fator de retenção (k'): > 2 ;
- Precisão por repetibilidade: $DPR < 1$ para um número de replicatas ≥ 5 ;
- Fator de cauda (FC): ≤ 2 ;
- Número de pratos (N): > 2000 .

6.2.2 Validação do método

O método foi validado de acordo com as diretrizes BRASIL (2003), ICH (2005) e BRASIL (2017), por meio dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

6.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi analisada pela verificação da interferência de produtos da degradação forçada, submetendo soluções de ceftriaxona sódica pó para solução injetável na concentração de $60 \mu\text{g/mL}$ à degradação nas condições aquosa, alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica, utilizou-se o banho de aquecimento, quando necessário, com o intuito de acelerar o processo de degradação. Foram coletadas alíquotas das soluções em intervalos de tempos pré-determinados e a análise foi interrompida quando o pico referente ao fármaco apresentava degradação entre 5 a 20% (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; BLESSY et al., 2014).

Inicialmente, preparou-se a solução estoque de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em água ultrapura na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, em seguida, foram realizadas as diluições na concentração de trabalho ($60 \mu\text{g/mL}$) para cada condição, sendo estas:

- Ácida: a diluição foi preparada em solução de ácido clorídrico $0,001 M$ e a análise foi realizada em temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) por 1 hora;

- Alcalina: a diluição foi preparada em solução de hidróxido de sódio 0,001 M e a solução foi aquecida à 40° C durante 1 hora e 30 minutos;
- Oxidativa: a diluição foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio 1% e a análise foi realizada em temperatura ambiente (25°C ± 2°C) por 2 horas;
- Aquosa: a diluição foi preparada em água ultrapura e a solução foi aquecida à 40° C durante 2 horas e 30 minutos;
- Fotolítica: a diluição foi preparada em água ultrapura, a solução foi acondicionada em frasco de vidro incolor e colocada na câmara UV e temperatura ambiente (25°C ± 2°C) por 5 horas e 30 minutos.

A pureza do pico referente ao fármaco foi avaliada em todas as condições de degradação forçada pela análise com detector de arranjo de fotodiodos e com auxílio do *software* Empower. O pico foi considerado puro quando o parâmetro de *purity angle* foi menor que o parâmetro de *purity threshold*.

6.2.2.2 Linearidade

Para a avaliação deste parâmetro, inicialmente foi construída uma curva analítica referente à área do pico *versus* concentração, em triplicata e em três dias diferentes. Foi preparada solução estoque de ceftriaxona sódica SQR na concentração de 1000 µg/mL em balão volumétrico de 10 mL e, posteriormente, seis diluições foram realizadas a partir desta solução estoque em balão volumétrico de 5 mL nas concentrações 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL, respectivamente.

A análise estatística dos resultados obtidos pela curva analítica foi realizada pela avaliação do cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados, pelo valor do coeficiente de correlação e pela análise do gráfico de resíduos padronizados.

6.2.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada em diferentes níveis, por repetibilidade (intradia) e através da precisão intermediária (interdias e entre analistas). A precisão intradia foi realizada pela análise de seis injeções de ceftriaxona sódica pó para solução injetável na concentração de 60 µg/mL, realizada no mesmo dia, nas mesmas condições de trabalho e pelo mesmo analista, em seguida, foi calculado o DPR% das áreas dos picos do fármaco obtidos para cada concentração.

Na precisão interdias a análise foi realizada da mesma forma como na intradia, porém em três dias diferentes, também foi avaliado o DPR% das áreas dos picos. A precisão entre analistas foi avaliada por dois analistas diferentes, em dias diferentes e no mesmo

laboratório. A análise estatística foi comprovada através do teste F (Snedecor) e teste *t* (Student).

6.2.2.4 Exatidão

Para a avaliação do parâmetro exatidão foi empregado o ensaio de recuperação, na qual, quantidades conhecidas de ceftriaxona sódica SQR foram adicionadas em quantidades conhecidas do pó para solução injetável, em três níveis de concentração 80, 100 e 120%, representadas por R1, R2 e R3, respectivamente, as quais contemplaram o intervalo linear do método. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 17, em triplicata, e a porcentagem de ceftriaxona recuperada foi calculada através da Equação 1 (item 5.2.1.4).

Tabela 17: Preparo das soluções para a avaliação do parâmetro exatidão do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Solução	Ceftriaxona sódica pó para solução injetável (100 µg/mL) (mL)	Ceftriaxona sódica SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ¹
Amostra	1,0	-	20,0
R1	1,0	1,4	48,0
R2	1,0	2,0	60,0
R3	1,0	2,6	72,0
SQR	-	1,0	20,0

¹Balão volumétrico de 5 mL.

6.2.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3 (item 5.2.1.5).

6.2.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada através do teste de Youden, pois é um dos testes mais aplicados para este parâmetro em validações de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014), também recomendado pelo INMETRO (RIBEIRO et al., 2008). Este teste avalia a influência da variação de sete parâmetros do método analítico através de oito experimentos (YOUNDEN; STEINER, 1975; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Soluções de ceftriaxona sódica SQR e de pó para solução injetável foram preparadas na concentração de 60 µg/mL (conforme item 6.3.1), posteriormente, foi determinado o teor em porcentagem do fármaco para cada ensaio, de acordo com as Equações 10 e 11.

$$C_a (\%) = C_a \times \frac{100}{C_t} \quad \text{Equação 10}$$

$$C_a = C_{SQR} \times \frac{A_a}{A_{SQR}} \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

C_a : concentração de ceftriaxona sódica na solução de produto acabado ($\mu\text{g/mL}$);

C_{SQR} : concentração de ceftriaxona sódica na solução de SQR ($\mu\text{g/mL}$);

A_a : área do pico de ceftriaxona obtida com a solução de produto acabado;

A_{SQR} : área do pico de ceftriaxona obtida com a solução de SQR;

$C_a (\%)$: concentração de ceftriaxona no produto acabado (em porcentagem);

C_t : concentração teórica de ceftriaxona na solução de produto acabado ($\mu\text{g/mL}$).

A Tabela 18 foi utilizada para a realização do teste, a qual apresenta letras maiúsculas que correspondem às condições nominais e letras minúsculas que correspondem às condições com pequenas alterações. Dois testes de Youden foram realizados, um apresentando variações inferiores e outro com variações superiores em relação às condições nominais. A Tabela 19 apresenta as variações inferiores e superiores analisadas.

Tabela 18: Parâmetros utilizados no teste de Youden para a determinação do parâmetro robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetro	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Marca do etanol	A	A	A	A	a	a	a	A
Fonte de água	B	B	b	b	B	B	b	B
Proporção da fase móvel	C	c	C	c	C	c	C	C
% de ácido ortofosfórico na fase aquosa da fase móvel	D	D	d	d	d	d	D	D
Vazão	E	e	E	e	e	E	e	E
Temperatura	F	f	f	F	F	f	f	F
Comprimento de onda	G	g	g	G	g	G	G	G

Tabela 19: Variações dos parâmetros utilizadas no teste de Youden

Parâmetros	Condição normal	Alterações superiores e inferiores
Marca do etanol	A: Panreac	a: Merck
Fonte de água	B: Laboratório CB	b: Laboratório CFQ
Proporção da fase móvel	C: 87:13	c: 88:12 e 86:14
% de ácido ortofosfórico na fase aquosa da fase móvel	D: 0,20%	d: 0,22% e 0,18%
Vazão (mL/min)	E: 0,9	e: 1,0 e 0,8
Temperatura (°C)	F: 25	f: 27 e 23
Comprimento de onda (nm)	G: 260	g: 262 e 258

Os efeitos para cada variável foram calculados a partir da obtenção dos teores em porcentagem, através da subtração da média dos valores de teor da condição nominal com os valores de teor das condições alteradas. O método é considerado robusto quando os valores do efeito para cada parâmetro forem menores que duas vezes o desvio padrão das médias dos valores de teor de todos os experimentos (YOU DEN; STEINER, 1975; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

6.3 Determinação do teor da ceftriaxona sódica pó para solução injetável

6.3.1 Preparo das soluções

As soluções de ceftriaxona sódica SQR foram preparadas na concentração de 60 µg/mL. Para a solução de ceftriaxona sódica pó para solução injetável foi utilizado o *pool* com o conteúdo dos frascos-ampola de medicamento preparado no item 5.2.2.1. As determinações foram realizadas em triplicata.

6.3.2 Cálculo do teor de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável

A concentração de ceftriaxona sódica na amostra e seu teor em porcentagem foram calculados de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente, descritas no item 5.2.2.2.

6.4 Estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável

A estabilidade da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável em solução aquosa na concentração de 60 µg/mL foi realizada em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os diluentes compatíveis apresentados pela bula do medicamento também foram testados. Utilizou-se ceftriaxona sódica pó para solução injetável na concentração de 60 µg/mL e os seguintes diluentes: água, solução de cloreto de sódio 0,9%, solução de glicose 5%, solução de glicose 10% e solução de glicose 5% em cloreto de sódio 0,45% (ANVISA, 2017e). Alíquotas foram analisadas nos tempos zero, 3, 6 e 24 horas.

6.5 Resultados

6.5.1 Desenvolvimento do método

Primeiramente realizou-se uma varredura para a determinação do comprimento de onda a ser utilizado para o detector no UV. A Figura 16 apresenta o espectro da ceftriaxona sódica, na qual observou-se um pico máximo de absorção em 260,5 nm, desta forma, o comprimento de onda utilizado para as análises foi em 260 nm. Dois cromatogramas obtidos durante o desenvolvimento do método estão dispostos nas Figuras 17 e 18. De acordo com os resultados obtidos a partir dos diferentes parâmetros analisados foi possível estabelecer a condição analítica ideal para a quantificação da ceftriaxona sódica pó para solução injetável, apresentadas na Tabela 20. A Figura 19 apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos de acordo com as condições analíticas determinadas para o método.

Figura 16: Espectro de absorção no UV para a ceftriaxona sódica em solução aquosa na concentração de 50 µg/mL para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência

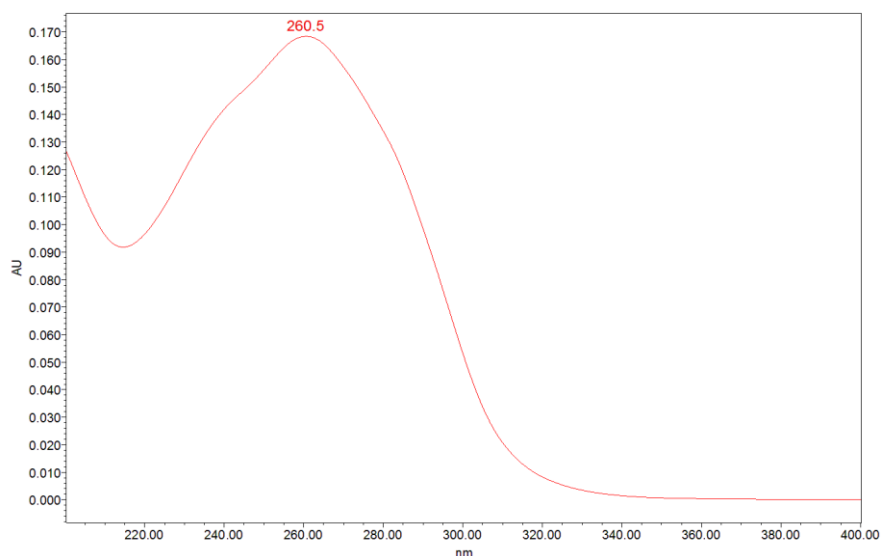


Figura 17: Cromatograma obtido com a solução de ceftriaxona sódica SQR 50 $\mu\text{g/mL}$ no desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Luna C_{18} , fase móvel água pH ajustado com ácido acético 1% e etanol (83:17, v/v), vazão de 0,9 mL/min e volume de injeção de 10 μL e comprimento de onda de 260 nm

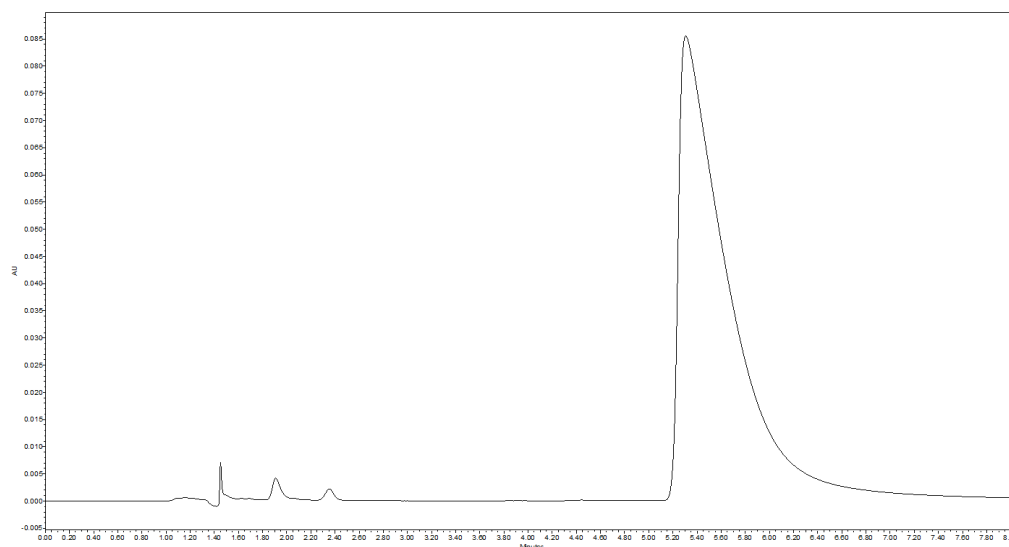


Figura 18: Cromatograma obtido com a solução de ceftriaxona sódica SQR 50 $\mu\text{g/mL}$ durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água pH ajustado com ácido fórmico 0,1% e etanol (85:15, v/v), vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 μL e comprimento de onda de 260 nm

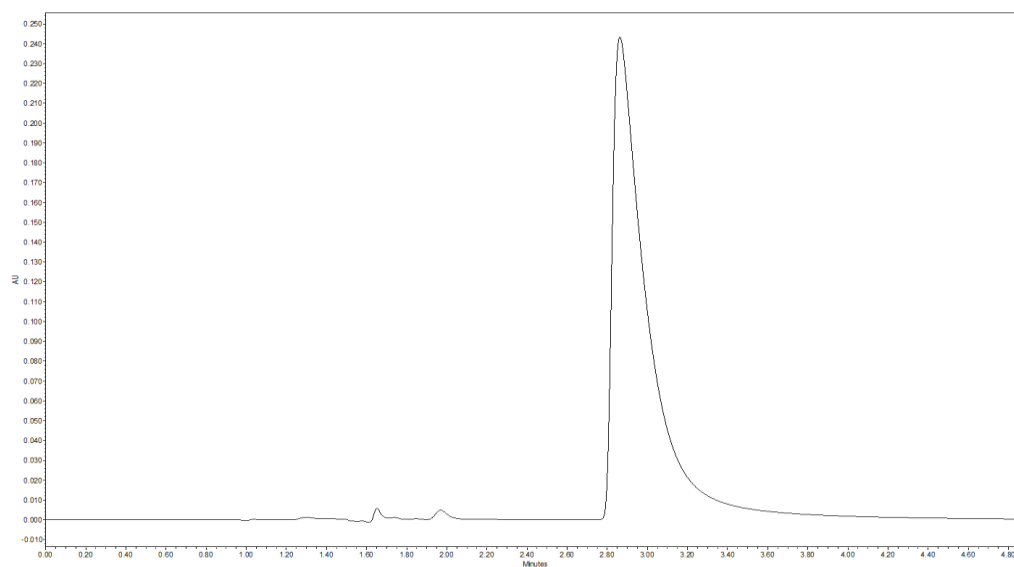
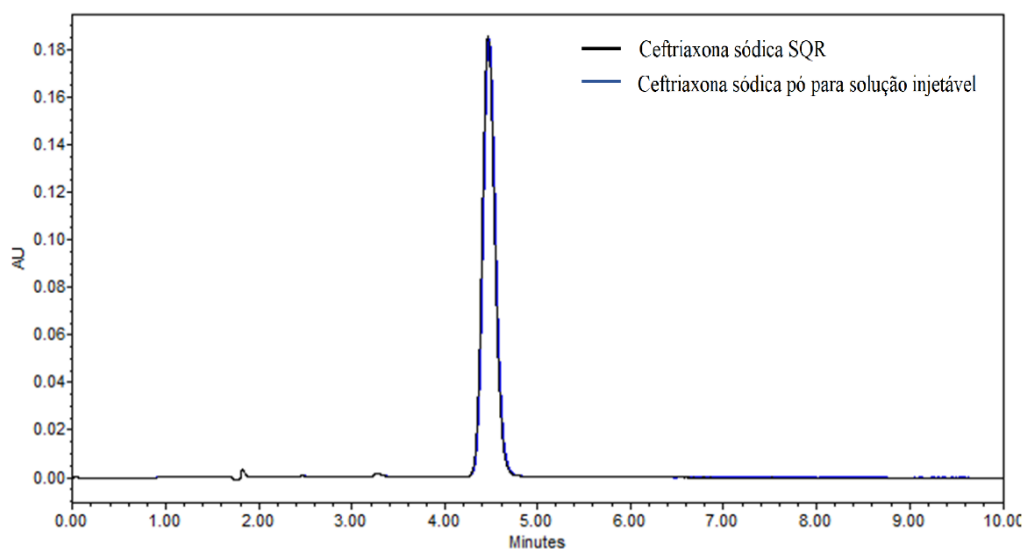


Tabela 20: Condições analíticas estabelecidas para o método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

Condição	Descrição
Coluna	Zorbax SB C ₁₈ (150 x 4,6 mm - 5 µm) - Agilent®
Detector	UV, 260 nm
Fase móvel	Água + ácido ortofosfórico 0,2% (pH ± 2,0) e etanol 87:13 (V/V)
Vazão	0,9 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Temperatura	25° C ± 2° C

Figura 19: Sobreposição dos cromatogramas obtidos através das soluções de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável na concentração de 60 µg/mL nas condições analíticas estabelecidas para o método por cromatografia líquida de alta eficiência



6.5.1.1 Adequabilidade do sistema

A Tabela 21 apresenta os valores da adequabilidade do sistema calculados após a determinação das condições analíticas utilizadas para a validação do método.

Tabela 21: Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico calculados após a definição das condições analíticas do método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

	Tempo de retenção (t_R)	Área	Fator de retenção (k')	Assimetria do pico (A_s)	Fator de cauda (FC)	Número de pratos (N)
	4,471	1760140	2,23	1,15	1,18	5267,23
	4,458	1754485	2,22	1,15	1,17	5236,65
	4,453	1752092	2,21	1,13	1,19	5224,91
	4,452	1749626	2,21	1,13	1,18	5222,56
	4,456	1748374	2,21	1,14	1,18	5304,87
	4,459	1747655	2,22	1,13	1,18	5239,00
Média	4,458	1752062	2,22	1,14	1,18	5249,20
DPR* (%)	0,15	0,27	0,34	0,86	0,54	0,60

*Desvio padrão relativo.

6.5.2 Validação do método

6.5.2.1 Seletividade

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos no teste de degradação forçada. As Figuras 20 a 24 são referentes aos cromatogramas obtidos no tempo inicial e final para cada condição do teste. A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos pelo *software* para cada parâmetro para a determinação da pureza do pico no teste de degradação forçada, onde todos os picos obtidos referentes à ceftriaxona sódica em todas as condições analisadas apresentaram-se puros.

Tabela 22: Percentual de degradação no estudo de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável para avaliação do parâmetro seletividade do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Condição	Tempo	Área	Degradação (%)
Ácida 0,001 M	T ₀	2146538	1,22
	T _{1h}	1828033	15,88
Alcalina 0,001 M, 40°C	T ₀	2260269	0,07
	T _{1h30min}	1878262	16,96
Oxidativa 1%	T ₀	2122389	2,33
	T _{2h}	1779935	18,09
Aquosa, 40°C	T ₀	2165818	0,00
	T _{2h30min}	1741959	19,57
Fotolítica	T ₀	2059241	0,00
	T _{5h30min}	1766281	14,23

Figura 20: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T₀ e T_{1h} para a degradação ácida para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C₁₈, fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 260 nm

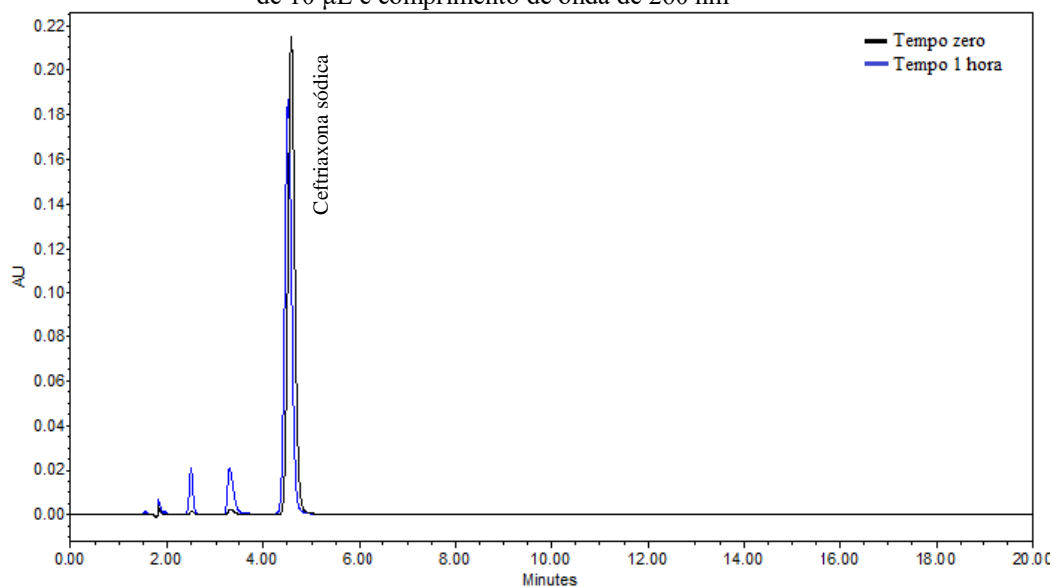


Figura 21: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e $T_{1h30min}$ para a degradação alcalina para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm

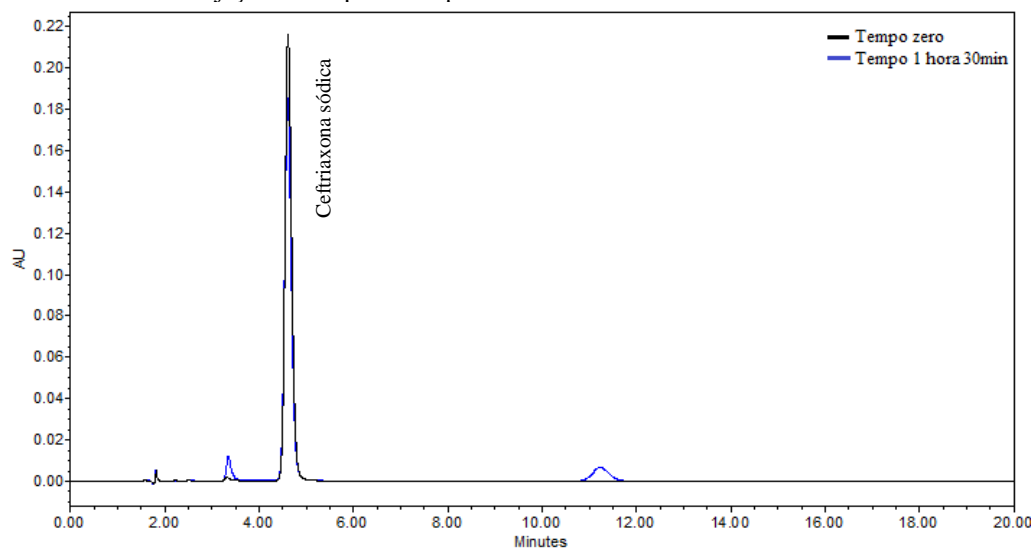


Figura 22: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e T_{2h} para a degradação oxidativa para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm

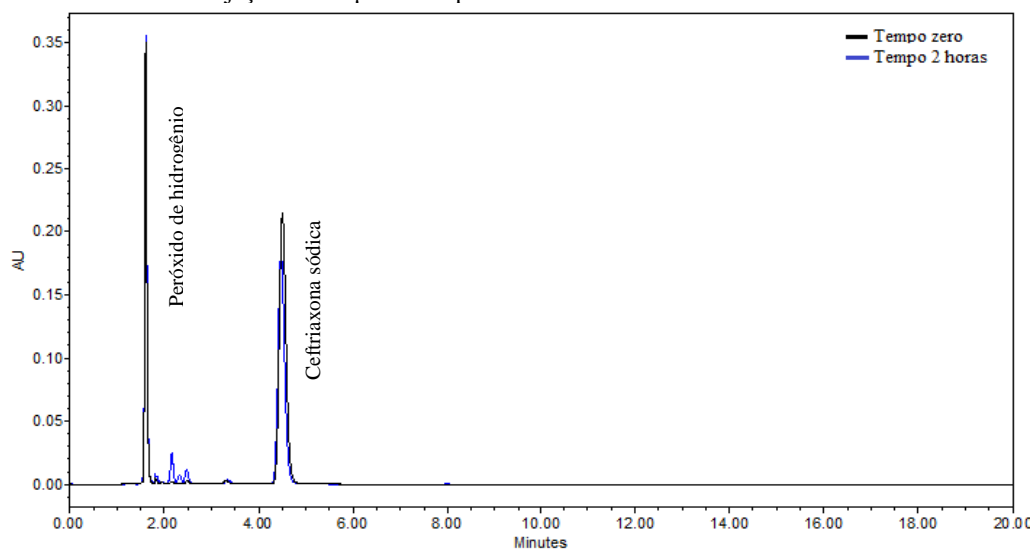


Figura 23: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e $T_{2h30min}$ para a degradação aquosa para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm

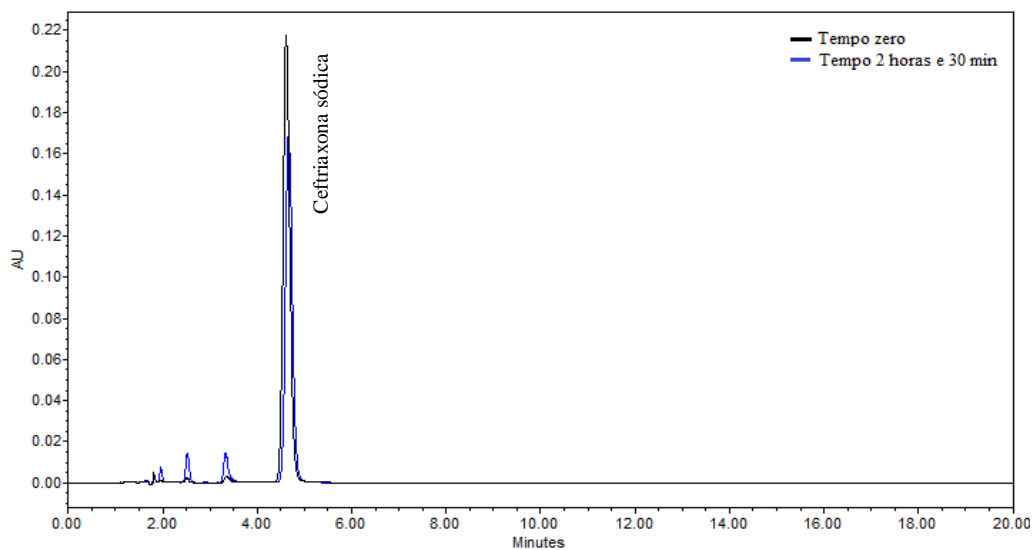


Figura 24: Cromatogramas da ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos T_0 e $T_{5h30min}$ para a degradação fotolítica para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel água + ácido ortofosfórico 0,2% e etanol 87:13 (v/v), vazão de 0,9 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 260 nm

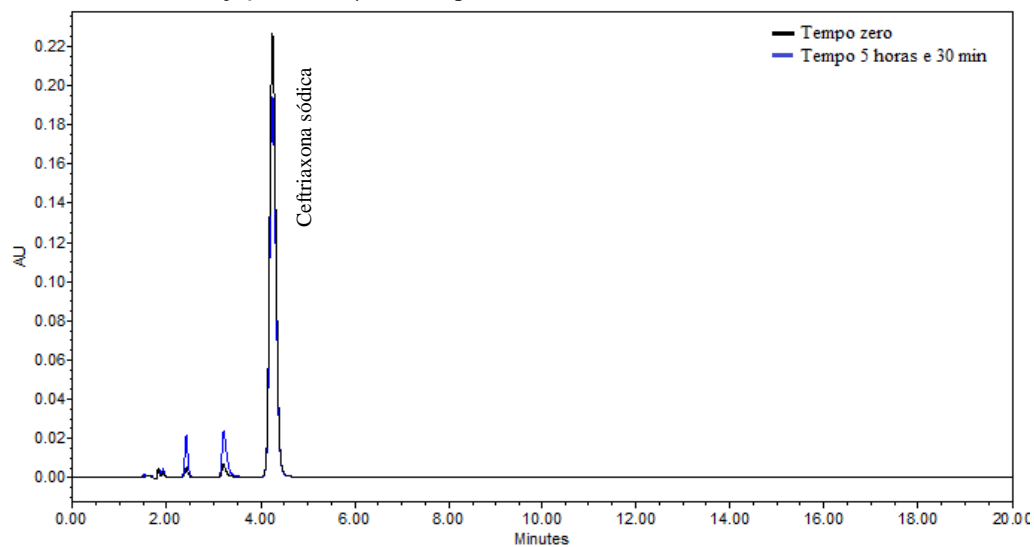


Tabela 23: Parâmetros para a avaliação da pureza do pico no teste de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável obtidos através do *software* Empower 3

Condição	Parâmetro	
	<i>Purity angle</i>	<i>Purity threshold</i>
Ácida	0,044	0,212
Alcalina	0,046	0,210
Oxidativa	0,042	0,211
Aquosa	0,068	0,205
Fotolítica	0,041	0,210

6.5.2.2 Linearidade

Os valores das áreas obtidas para a curva analítica da ceftriaxona sódica SQR estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Valores das áreas referentes às soluções de ceftriaxona sódica SQR para a elaboração da curva analítica para o método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

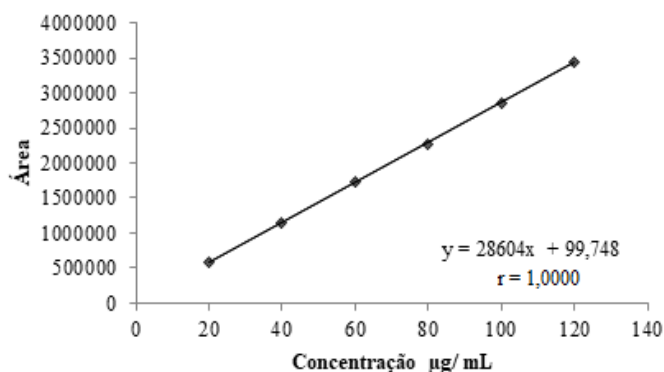
Concentração (µg/mL)	Área	Área média ± DP ¹	DPR ² (%)
20	576552		
	568381	571630 ± 4334,74	0,76
	569956		
40	1135754		
	1146272	1143883 ± 7236,16	0,63
	1149622		
60	1721251		
	1738667	1723800 ± 13770,82	0,80
	1711481		
80	2259952		
	2311683	2277773 ± 29380,15	1,29
	2261683		
100	2860540		
	2896556	2863451 ± 31749,73	1,11
	2833257		
120	3429441		
	3457016	3433610 ± 21625,59	0,63
	3414372		

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

A curva analítica para a ceftriaxona sódica SQR foi construída através da relação entre as médias dos valores das áreas dos picos e suas respectivas concentrações, representada pela Figura 25.

Figura 25: Representação gráfica da curva analítica referente à ceftriaxona sódica SQR para o método por cromatografia líquida de alta eficiência



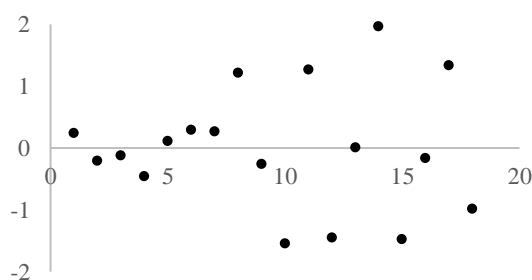
A ANOVA e o gráfico de resíduos padronizados estão representados na Tabela 25 e na Figura 26, respectivamente.

Tabela 25: Análise de variância dos valores das áreas dos picos obtidos na construção da curva analítica da ceftriaxona sódica SQR pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	17182122557912	3436424511582	660,93*	3,11
Regressão linear	1	17181047233283	17181047233283	3304,44*	4,75
Desvio da linearidade	4	1075324629	268831157	0,05	3,26
Resíduo	12	5199384862	433282072	-	-
Total	17	17187321942774	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Figura 26: Gráfico de resíduos padronizados referente à ceftriaxona sódica SQR pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência



6.5.2.3 Precisão

Os resultados obtidos para a precisão intradia e interdias estão apresentados na Tabela 26. A precisão intermediária entre analistas está representada na Tabela 27.

Tabela 26: Determinação do parâmetro precisão por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

Precisão	Área						Área média ± DP ¹	DPR ² (%)
Repetibilidade intradia	1720295	1720622	1722837	1722040	1730897	1729275	1724328	0,27
							± 4584,37	
Intermediária Interdias	1720295	1720622	1722837	1722040	1730897	1729275	1722986	0,76
	1738504	1740452	1737040	1738987	1736663	1731636	± 13172,44	
	1713647	1711238	1709558	1702205	1701834	1706023		

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

Tabela 27: Determinação do parâmetro precisão intermediária (entre analistas) pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

Precisão intermediária entre analistas	Área						Teste F: duas amostras para variância	Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Analista 1	1720295	1720622	1722837	1722040	1730897	1729275	$F_{cal} 1,23 < F_{tab} 5,05$ $P_{valor} 0,41 > 0,05$	$t_{cal} 0,62 < t_{tab} 2,23$ $P_{valor} 0,55 > 0,05$
Analista 2	1723360	1730998	1721249	1726281	1722913	1730606		

6.5.2.4 Exatidão

A Tabela 28 apresenta os valores obtidos no teste de recuperação.

Tabela 28: Determinação do parâmetro exatidão pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

	Ceftriaxona sódica SQR adicionada (µg/mL)	Ceftriaxona sódica SQR encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR ¹ (%)	Recuperação média (%)
R1	28,0	27,96	99,85	0,92	
R2	40,0	39,77	99,43	1,49	99,53
R3	52,0	51,64	99,31	0,52	

¹Desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação).

6.5.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores calculados obtidos para o limite de detecção e de quantificação foram 0,46 µg/mL e 1,39 µg/mL, respectivamente.

6.5.2.6 Robustez

A Tabela 29 apresenta os teores obtidos através das variações inferiores e superiores realizados para a determinação da robustez do método. Os efeitos calculados para os dois ensaios estão apresentados na Tabela 30 e a avaliação dos efeitos em relação ao seu critério de aceitação foram demonstrados graficamente nas Figuras 27 e 28.

Tabela 29: Teores, em porcentagem, encontrados para a ceftriaxona sódica pó para solução injetável nos ensaios 1 e 2 para o parâmetro robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

Experimento	Teor da variação inferior	Teor da variação superior
1	99,54	100,64
2	99,64	99,94
3	99,59	99,09
4	99,53	99,69
5	99,86	98,58
6	98,92	99,54
7	100,19	99,11
8	100,18	99,11
Média	99,61	99,51
DP* (%)	0,38	0,67

*Desvio padrão

Tabela 30: Efeitos calculados para os ensaios através das variações inferiores e superiores para determinação do parâmetro robustez por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ceftriaxona sódica

Variável	Efeito da variação inferior	Efeito da variação superior
Marca etanol	-0,21	0,62
Fonte de água	-0,38	0,43
Proporção da fase móvel	0,23	-0,21
Porcentagem de ácido ortofosfórico na fase aquosa da fase móvel	0,41	0,47
Vazão	-0,25	0,27
Temperatura	0,19	0,09
Comprimento de onda	-0,27	0,57

Figura 27: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para as variações inferiores

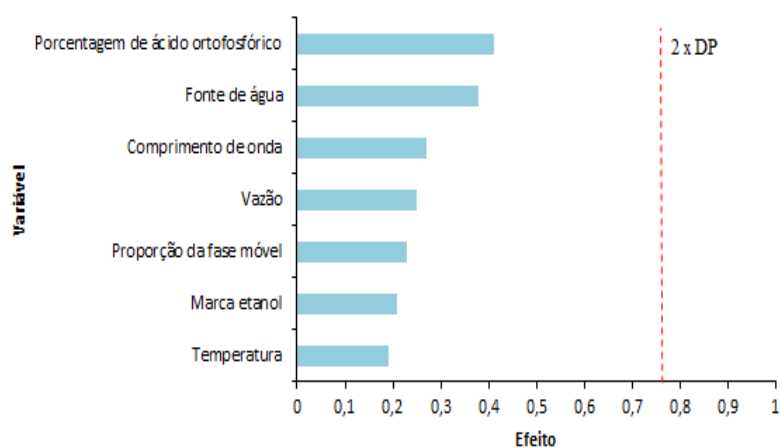
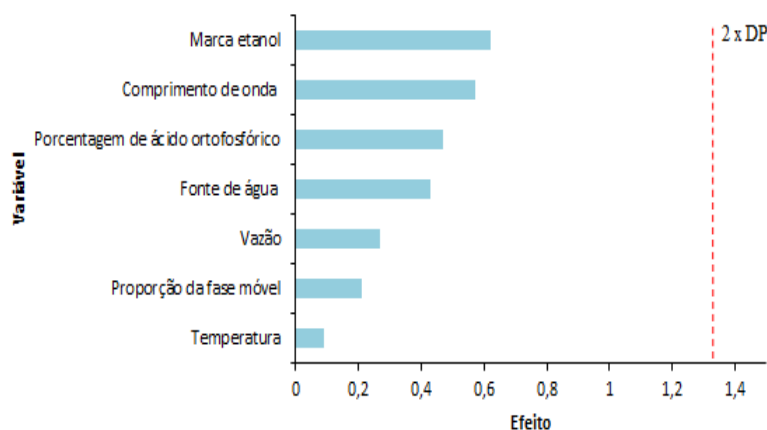


Figura 28: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para as variações superiores



6.5.3 Determinação do teor da ceftriaxona sódica pó para solução injetável

Os valores obtidos para a determinação do teor da ceftriaxona sódica no produto acabado estão apresentados na Tabela 31.

Tabela 31: Determinação do teor de ceftriaxona sódica, em porcentagem, pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência

	Área da ceftriaxona sódica SQR	Área da ceftriaxona sódica pó para solução injetável	Concentração (%)
	1783044	1765026	98,99
	1759456	1732667	98,48
	1769418	1713787	96,86
Média	1770639	1737160	98,11
DPR* (%)	0,67	1,49	1,13

*Desvio padrão relativo.

6.5.4 Estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável

Os valores obtidos durante a realização da estabilidade da solução aquosa de ceftriaxona sódica SQR encontram-se na Tabela 32 e os resultados da estabilidade da solução de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes encontram-se na Tabela 33.

Tabela 32: Percentual de degradação determinado no estudo de estabilidade de ceftriaxona sódica SQR em solução aquosa

Diluyente	Tempo (h)	Área	Degradação (%)
	0	1760799	0,00
Água	3	1755051	0,33
	6	1739801	1,19
	24	1650151	6,28

Tabela 33: Percentual de degradação determinado no estudo de estabilidade de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes

Diluyente	Tempo (h)	Área	Degradação (%)
Água	0	1733715	0,00
	3	1722130	0,67
	6	1715859	1,03
	24	1614779	6,86
Cloreto de sódio 0,9%	0	1737634	0,00
	3	1727952	0,56
	6	1719316	1,05
	24	1611945	7,23
Glicose 5%	0	1712964	0,00
	3	1708164	0,28
	6	1692418	1,20
	24	1512548	11,70
Glicose 10%	0	1771028	0,00
	3	1762090	0,50
	6	1740103	1,75
	24	747463	57,79
Glicose 5% em cloreto de sódio 0,45%	0	1762270	0,00
	3	1755535	0,38
	6	1740359	1,24
	24	861687	51,10

6.6 Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica amplamente utilizada pela indústria farmacêutica, seja na identificação ou na quantificação de compostos ativos ou produto acabado. Desta forma, neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método com o intuito de otimizar os existentes, visando melhorias em relação aos impactos ambientais, simplicidade no preparo das soluções e redução de custos.

Inicialmente, no desenvolvimento do método analítico, determinou-se o comprimento de onda a ser utilizado através do pico máximo de absorção observado no espectro obtido através da varredura (Figura 16), desta forma, utilizou-se o comprimento de onda de 260 nm.

Ensaio preliminares foram realizados utilizando diferentes colunas cromatográficas, proporções de fase móvel e vazões. Optou-se por utilizar uma fase móvel constituída por água e etanol, por serem solventes ecologicamente recomendados, desta forma, são menos tóxicos e apresentam baixa geração de resíduos e também por não existir nenhum método na literatura que utilize esta combinação de solventes.

Primeiramente testou-se a coluna Luna C₁₈, em diversas proporções de fase móvel e diferentes pH's, os quais foram ajustados com ácido acético, ácido fórmico e ácido ortofosfórico, porém, os resultados obtidos foram insatisfatórios, conforme exemplificado na Figura 17. A coluna testada de acordo com as especificações do fabricante (PHENOMENEX, 2017) apresenta grupamentos silanóis livres, é possível que estes grupamentos tenham interagido com o fármaco em estudo, ocasionando o alargamento dos picos cromatográficos (CASS; DEGANI, 2013).

Optou-se em testar a coluna Zorbax SB C₁₈, por não possuir grupamentos silanóis residuais livres e sim grupamentos isobutílicos ligados lateralmente nos átomos de sílica, conferindo melhores resultados em relação ao pico cromatográfico, esta coluna também possui maior estabilidade em pH ácido (AGILENT, 2017). Após diversas alterações envolvendo pH, proporção de fase móvel e vazão, foi possível estabelecer as condições analíticas utilizadas na validação do método (Tabela 20). De acordo com os resultados obtidos na adequabilidade do sistema (Tabela 21) e a comparação com as especificações estabelecidas pela FDA, foi possível assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estavam aptos para a validação do método.

O método apresentou-se seletivo e indicativo de estabilidade para o fármaco frente a todas as condições de estresse realizadas no teste de degradação forçada. Em todas as condições houve decréscimo do pico referente a ceftriaxona sódica; também foi possível comprovar a pureza destes picos, ou seja, a ausência de coeluição, através da comparação dos valores dos parâmetros *purity angle* e *purity threshold* (Tabela 23).

A linearidade foi comprovada no intervalo de 20,0 a 120,0 µg/mL, através do valor encontrado para o coeficiente de variação (1,0000) foi possível demonstrar a forte associação entre a concentração e a área do pico do fármaco (Figura 25). As análises estatísticas da variância, a um nível de significância de 5%, demonstraram que o método apresentou regressão linear significativa, com valor de F calculado superior ao valor de F tabelado (Tabela 25) e que não houve desvio significativo da linearidade, visto que o valor de F calculado (0,05) foi inferior ao valor de F tabelado (3,26). O gráfico de resíduos (Figura 26) apresenta distribuição homocedástica, confirmando a linearidade no intervalo de concentrações avaliado. Os valores de DPR% calculados para as áreas obtidas através das

soluções de ceftriaxona sódica SQR nas concentrações da curva analítica foram inferiores a 2%, conferindo a linearidade na faixa de concentração utilizada.

O método apresentou-se preciso nos dois níveis de avaliação (precisão por repetibilidade e intermediária), pois os valores de DPR% obtidos na precisão intradia (0,27%) e interdias (0,76%) apresentaram-se abaixo de 2% (Tabela 26) e na precisão entre analistas (Tabela 27), realizada através do teste *t* Student, o valor obtido para o *t* calculado (0,62) foi inferior ao valor obtido para o *t* tabelado (2,23), a um nível de significância de 5%, desta forma, os valores não diferem estatisticamente. O método também mostrou exatidão, devido apresentar valor médio de recuperação igual a 99,53%.

Os valores calculados para o limite de detecção e para o limite de quantificação foram de 0,46 e 1,39 µg/mL, respectivamente, confirmando a capacidade do método em detectar e quantificar a ceftriaxona sódica no produto acabado com segurança na faixa de concentrações utilizada.

O teste de Youden avaliou a robustez do método, através dos valores dos teores em porcentagem de ceftriaxona sódica nas soluções (Tabela 29), os efeitos foram calculados (Tabela 30) e comparados ao valor de duas vezes o valor encontrado do desvio padrão das médias dos valores dos teores, sendo estes, 0,76 e 1,34, referente aos ensaios de variações inferiores e superiores, respectivamente. Todos os valores relacionados aos efeitos calculados apresentaram-se inferiores aos valores de referência. Portanto, o método apresentou-se robusto para todas as variações propostas.

O método cromatográfico proposto cumpriu com todos os parâmetros exigidos para a validação de métodos analíticos, apresentou rapidez na análise, com tempo de corrida de 10 minutos, fase móvel simples, com redução de solventes tóxicos, além de ser um método que pode ser aplicado em análises de estabilidade, devido ser seletivo em relação aos produtos de degradação.

Após a validação do método analítico, determinou-se o teor da ceftriaxona sódica no produto acabado, o valor obtido foi de 98,11%; desta forma, o medicamento encontra-se de acordo com a especificação estabelecida pela monografia da ceftriaxona sódica pó para solução injetável, entre 90,0 a 115,0% (USP, 2016).

A solução aquosa de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável apresentaram uma porcentagem de degradação após 6 horas de 1,19% e 1,03% respectivamente (Tabelas 32 e 33). Este teste foi realizado para avaliar o período de tempo em que as soluções podem ser utilizadas nas análises, proporcionando confiabilidade nos resultados. Todos os diluentes compatíveis com a ceftriaxona sódica pó para solução injetável indicados pela bula do medicamento foram avaliados em relação a sua estabilidade, pois,

segundo a bula do medicamento, a solução reconstituída, independente do diluente utilizado apresenta estabilidade química e física, em temperatura ambiente, durante 6 horas, porém aconselha-se o uso imediato da solução após sua reconstituição (ANVISA, 2017e). Todos os diluentes apresentaram valores de porcentagem de degradação próximos em até 6 horas (Tabela 33) e a água foi o diluente que apresentou menor porcentagem de degradação em relação aos diluentes compatíveis, este é o diluente de escolha segundo a bula do medicamento. Nota-se que em 24 horas após a reconstituição das soluções em glicose 10% e glicose 5% em cloreto de sódio 0,45% apresentaram valores de porcentagem de degradação superiores a 50%, desta forma, podemos ressaltar a importância do controle do tempo após a reconstituição do medicamento para a sua administração.

7. ENSAIO MICROBIOLÓGICO TURBIDIMÉTRICO

7.1 Considerações gerais

O ensaio microbiológico por turbidimetria é uma técnica baseada na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados/sensíveis ao agente antimicrobiano, contidos em um determinado meio de cultura líquido. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Estudos apresentados pela literatura em análises quantitativas de antimicrobianos relatam a importância dos bioensaios, seja através do ensaio turbidimétrico ou difusão em ágar, em associação aos métodos físico-químicos, com o intuito de proporcionar maior avaliação do fármaco nas análises. Porém, a técnica turbidimétrica apresenta vantagens em relação a técnica de difusão em ágar, pois proporciona redução no tempo de análise, maior facilidade na execução e também não necessita da matriz de ágar, a qual pode influenciar na difusão do fármaco e conseqüentemente, na interação com o micro-organismo (ALÉSSIO; SALGADO, 2012; KOGAWA; SALGADO, 2012; CAZEDEY; SALGADO, 2013; LOURENÇO et al., 2013; MANFIO et al., 2013; TÓTOLI; SALGADO, 2013; PEDROSO; SALGADO, 2014b; VIEIRA et al., 2014; CHIERENTIN; SALGADO, 2015; SILVA; SALGADO, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2015b; CURBETE; SALGADO, 2016b).

Devido à inexistência na literatura de um método que utilize a técnica microbiológica por turbidimetria para a quantificação da ceftriaxona sódica pó para solução injetável e pelas vantagens que esta técnica oferece, foi desenvolvido e validado um método por turbidimetria para avaliar a potência do fármaco.

7.2 Material e método

Para as análises através da técnica por turbidimetria foram utilizadas ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica pó para solução injetável, conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

As cepas de micro-organismos utilizadas durante o desenvolvimento e a validação do método foram repicadas a cada 15 dias em ágar caseína soja (Difco®). Os materiais utilizados no ensaio, como, água destilada, ponteiras, tubos de ensaio devidamente vedados com tampão de algodão envoltos por gaze contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia®) e béqueres foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Lufenco®) a 121 °C, durante 15 minutos.

O método foi desenvolvido de acordo com o estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2010), utilizou-se o delineamento 3x3 de retas paralelas, no qual, preparou-se em triplicata em tubos de ensaio cada concentração de solução de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável, as quais respeitaram uma determinada progressão geométrica, como também, dois tubos correspondentes ao controle positivo e negativo.

A ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável utilizadas no preparo das soluções foram pesadas em balança analítica Ohaus[®] modelo DV215CD-Classe 1 e como diluente utilizou-se água purificada estéril. Após o preparo das soluções, 200 µL foram adicionados aos tubos de ensaio contendo os 10 mL de meio de cultura previamente esterilizado.

O inóculo foi preparado utilizando o repique do micro-organismo em caldo BHI e posterior incubação em estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás[®]) durante 18 a 24 horas em temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o inóculo foi padronizado com transmitância de $25,0 \pm 2,0\%$ em espectrofotômetro modelo DU530 (Beckman Coulter[®]) a 580 nm. Posteriormente, um determinado volume do inóculo previamente padronizado foi distribuído nos tubos de ensaio contendo o caldo BHI e suas respectivas soluções de ceftriaxona sódica. Os tubos de ensaio foram transferidos para a incubadora *shaker* modelo MA 420 (Marconi[®]) sob agitação durante 4 horas em temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em banho aquecido. Após, o crescimento microbiano foi interrompido com a adição de 500 µL de solução de formaldeído (LS Chemicals[®]) a 12% em cada tubo. A leitura da absorvância de cada tubo foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm com cubeta de vidro de caminho óptico de 10 mm. Os resultados foram avaliados estatisticamente através do *software Microsoft Excel* (2016).

7.2.1 Desenvolvimento do método

Diversos testes preliminares foram realizados, pela variação de alguns parâmetros, sendo estes, cepas de micro-organismos, concentrações das soluções de ceftriaxona sódica e concentração do inóculo, conforme apresentado na Tabela 34.

Tabela 34: Parâmetros analíticos testados durante o desenvolvimento do método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica

Parâmetro	Condição
Micro-organismo	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 - IAL 1027 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 - IAL 2082
Concentração do inóculo	4, 5, 6, 8, 9 e 10%
Concentrações das soluções de ceftriaxona sódica	3; 5; 6; 10; 12; 15; 20; 24; 30; 40; 48; 60 µg/mL (razão 2) 3; 12; 48 µg/mL (razão 4) 4; 6; 8; 9; 12; 18; 20; 30; 45; 76; 80; 84; 88; 114; 120; 126; 132; 171; 180; 189; 198 µg/mL (razão 1,5) 75; 120; 192 µg/mL (razão 1,6) 80; 100; 125 µg/mL (razão 1,25) 100; 140; 196 µg/mL (razão 1,4) 125; 150; 180 µg/mL (razão 1,2)

7.2.2 Determinação da potência da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável

A potência do medicamento foi calculada através da equação Hewitt (2004) (Equação 12).

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

Equação 12

$$M = \frac{F}{b} \quad B = \frac{E}{i}$$

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

$$E = 1/4 [(\bar{A}_3 + \bar{P}_3) - (\bar{A}_1 - \bar{P}_1)]$$

7.2.3 Validação do método

Os parâmetros analisados para a validação do método foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, conforme recomendado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005, BRASIL, 2017).

7.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi comprovada pela análise da interferência de produtos de degradação forçada na determinação da potência da ceftriaxona sódica pó para solução injetável, submetendo o fármaco nas mesmas condições de degradação utilizadas para a

determinação da seletividade na validação do método através da técnica por CLAE (item 6.2.2.1). Porém, a solução mãe de ceftriaxona sódica pó para solução injetável foi preparada em água purificada estéril em balão volumétrico de 25 mL na concentração de 1000 µg/mL, em seguida, foi diluída em soluções na concentração de 500 µg/mL em suas respectivas condições de degradação. Após o término de degradação de cada condição, soluções foram preparadas em água purificada estéril nas concentrações de 100, 140 e 196 µg/mL. Posteriormente, realizou-se o delineamento 3x3 (item 7.2) para a obtenção da potência da ceftriaxona sódica pó para solução injetável.

7.2.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da obtenção da curva analítica, construída a partir da média de três curvas realizadas em três dias diferentes. Inicialmente foram preparadas soluções estoque de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável na concentração de 1000 µg/mL em balão volumétrico de 10 mL e a partir destas soluções foram realizadas diluições em balão volumétrico de 5 mL nas concentrações de 100, 140 e 196 µg/mL, através do delineamento de retas paralelas 3x3 (item 7.2). As curvas analíticas foram construídas de acordo com os resultados obtidos com a leitura da absorvância da solução de cada tubo. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

7.2.3.3 Precisão

A precisão foi analisada em dois níveis: por repetibilidade e precisão intermediária (interdias e entre analistas). Para a precisão por repetibilidade (intradia) analisou-se seis tubos diferentes na concentração de 140 µg/mL de ceftriaxona pó para solução injetável, preparadas e analisadas no mesmo dia, com as mesmas condições de trabalho, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. Após, calculou-se o DPR% das absorvâncias obtidas.

A precisão interdias foi obtida conforme a precisão por repetibilidade, porém, em 3 dias diferentes e a análise estatística também foi através da obtenção do DPR%. A precisão entre analistas foi realizada através de dois analistas diferentes, em dias diferentes e no mesmo laboratório e utilizou-se o teste F (Snedecor) e teste t (Student) na análise estatística.

7.2.3.4 Exatidão

Foi realizada através do ensaio de recuperação, desta forma; quantidades conhecidas de ceftriaxona sódica SQR foram adicionadas em quantidades conhecidas do pó para solução

injetável, em três níveis de concentração (baixa, média e alta), contemplando o intervalo linear do método, conforme apresentado na Tabela 35. A análise foi realizada em triplicata e em três dias diferentes. A porcentagem de recuperação foi calculada de acordo com a Equação 1 (item 5.2.1.4).

Tabela 35: Preparo das soluções de ceftriaxona sódica para o ensaio de recuperação pelo método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica

Solução	Ceftriaxona sódica pó para solução injetável (1000 µg/mL) (µL)	Ceftriaxona sódica SQR (1000 µg/mL) (µL)	Concentração teórica final (µg/mL) ¹
Amostra	500	-	100
R1	500	100	120
R2	500	250	150
R3	500	400	180
SQR	-	500	100

¹Balão volumétrico de 5 mL.

7.2.3.5 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas variações nas condições estabelecidas para o método, sendo estas: volume do meio de cultura nos tubos de ensaio (9,7 e 10,3 mL), comprimento de onda utilizado na leitura dos tubos (528 e 532 nm), tempo de incubação (3 horas e 55 minutos e 4 horas e cinco minutos), volume do inóculo adicionado nos tubos (895 e 905 µL). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste F (Snedecor) e teste t (Student).

7.2.4 Análise da estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes

A estabilidade da ceftriaxona sódica pó para solução injetável foi analisada em temperatura ambiente. Todos os diluentes compatíveis apresentados pela bula do medicamento foram testados, sendo estes: água, solução de cloreto de sódio 0,9%, solução de glicose 5%, solução de glicose 10% e solução de glicose 5% em cloreto de sódio 0,45%, nas concentrações de 100, 140 e 196 µg/mL. Alíquotas foram analisadas nos tempos zero e 6 horas. Posteriormente, realizou-se o cálculo da potência em porcentagem da ceftriaxona sódica.

7.3 Resultados

7.3.1 Desenvolvimento do método

A Tabela 36 apresenta os parâmetros estabelecidos para o método microbiológico por turbidimetria.

Tabela 36: Parâmetros analíticos estabelecidos para o método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica

Parâmetro	Condição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 - IAL 2082
Meio de cultura	Caldo BHI
Diluyente	Água purificada
Concentração do inóculo	9%
Concentração das soluções	100, 140 e 196 µg/mL (razão 1,4)

7.3.2 Validação do método analítico

7.3.2.1 Seletividade

A Tabela 37 apresenta os resultados obtidos em relação a potência do fármaco no teste de degradação forçada.

Tabela 37: Teor de ceftriaxona sódica determinada no estudo de degradação forçada da ceftriaxona sódica pó para solução injetável para avaliação do parâmetro seletividade do método microbiológico por turbidimetria

Condição	Potência (%)
Ácida 0,001 M	79,87
Alcalina 0,001 M, 40°C	81,37
Oxidativa 1%	74,96
Aquosa, 40°C	85,01
Fotolítica	81,16

7.3.2.2 Linearidade

Os valores de absorvância obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável, estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38: Valores das absorvâncias determinadas para a elaboração das curvas analíticas para a ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável pelo método microbiológico por turbidimetria

Análise	Absorvância ¹					
	P1 (100 µg/mL)	P2 (140 µg/mL)	P3 (196 µg/mL)	A1 (100 µg/mL)	A2 (140 µg/mL)	A3 (196 µg/mL)
1	0,635	0,457	0,237	0,684	0,491	0,233
2	0,690	0,486	0,235	0,689	0,499	0,232
3	0,680	0,460	0,229	0,674	0,442	0,226
Média	0,668	0,468	0,234	0,682	0,477	0,230
DPR² (%)	4,40	3,43	1,86	1,10	6,52	1,63

¹Média de três determinações

²DPR: desvio padrão relativo

As curvas analíticas para ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável foram construídas a partir da relação da média dos valores das absorvâncias com as respectivas concentrações (Figura 29). Os resultados da análise de variância para verificação do delineamento das retas estão representados na Tabela 39.

Figura 29: Representação gráfica das curvas analíticas referentes à ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável para o parâmetro linearidade pelo método microbiológico por turbidimetria

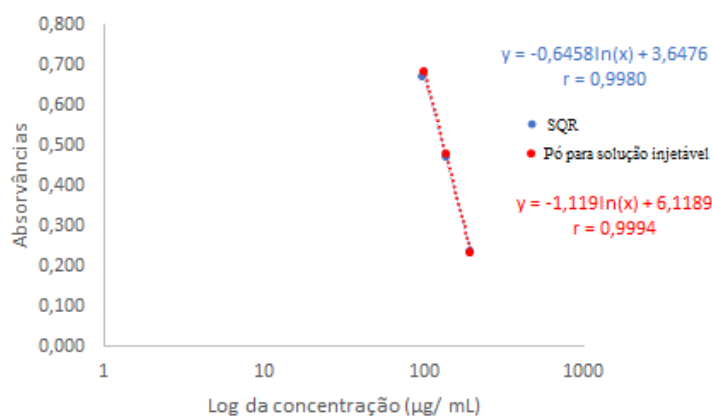


Tabela 39: Análise de variância dos valores de absorvância obtidos na construção das curvas analíticas da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável para o método microbiológico por turbidimetria

Fontes de variação	gl	SQ	MQ	F calculado	F tabelado
Preparação	1	0,0002	0,0002	0,69	4,96
Regressão	1	0,5893	0,5893	1954,69*	4,96
Paralelismo	1	0,0002	0,0002	0,75	4,96
Quadrático	1	0,0015	0,0015	4,82	4,96
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,05	4,96
Entre doses	5	0,59	0,12	392,20*	3,33
Entre tubos	2	0,00	0,00	2,22	4,10
Dentro (erro)	10	0,00	0,00	-	-
Total	17	0,60	-	-	-

*significativo para $p < 0,05$.

7.3.2.3 Precisão

Os resultados obtidos para a precisão intradia e interdias estão apresentados na Tabela 40. A precisão intermediária entre analistas está representada na Tabela 41.

Tabela 40: Determinação do parâmetro precisão por repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) pelo método microbiológico por turbidimetria

Precisão	Absorvância						Absorvância média \pm DP ¹	DPR ² (%)
Repetibilidade intradia	0,473	0,445	0,428	0,453	0,484	0,471	0,459 \pm 0,021	4,53
Intermediária interdias	0,473	0,445	0,428	0,453	0,484	0,471	0,457 \pm 0,018	3,85
	0,475	0,432	0,464	0,447	0,425	0,467		
	0,478	0,466	0,449	0,457	0,471	0,447		

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

Tabela 41: Determinação do parâmetro precisão intermediária (entre analistas) pelo método microbiológico por turbidimetria

Precisão intermediária entre analistas	Absorvância						Teste F: duas amostras para variância	Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Analista 1	0,473	0,445	0,428	0,453	0,484	0,471	$F_{\text{cal}} 1,43 < F_{\text{tab}} 5,05$ $P_{\text{valor}} 0,35 > 0,05$	$t_{\text{cal}} 0,69 < t_{\text{tab}} 2,23$ $P_{\text{valor}} 0,50 > 0,05$
Analista 2	0,440	0,429	0,416	0,473	0,468	0,473		

7.3.2.4 Exatidão

A Tabela 42 apresenta os resultados do teste de recuperação para o parâmetro de exatidão.

Tabela 42: Teste de recuperação para a determinação do parâmetro exatidão do método microbiológico por turbidimetria para a quantificação de ceftriaxona sódica

	Ceftriaxona sódica SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Ceftriaxona sódica SQR encontrada ¹ ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR ² (%)	Recuperação média (%)
R1	20,0	20,14	100,69	1,52	
R2	50,0	50,06	100,11	1,99	100,33
R3	80,0	80,17	100,21	0,88	

¹Média de três determinações.

²Desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação).

7.3.2.5 Robustez

Os valores obtidos na determinação da robustez estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 43: Valores de absorvância para a determinação do parâmetro robustez para método microbiológico por turbidimetria

Variável	Faixa investigada	Absorvância			Média	DPR¹ (%)
	9,7	0,455	0,434	0,431	0,440	3,86
Volume do meio de cultura (mL)	10,0	0,477	0,451	0,486	0,471	2,97
	10,3	0,493	0,405	0,457	0,452	9,80
	528	0,441	0,432	0,497	0,457	3,86
Comprimento de onda (nm)	530	0,477	0,451	0,486	0,471	7,71
	532	0,476	0,488	0,446	0,470	4,60
	3'55	0,404	0,448	0,439	0,430	5,40
Tempo de incubação (horas)	4'00	0,460	0,439	0,413	0,437	5,38
	4'05	0,407	0,480	0,438	0,442	8,30
	895	0,449	0,447	0,422	0,439	3,42
Volume do inóculo (µL)	900	0,478	0,466	0,449	0,464	3,14
	905	0,499	0,481	0,451	0,477	5,08

¹Desvio padrão relativo.

Após a obtenção dos valores de absorvância, a análise estatística foi realizada, comparando a condição normal do método e sua respectiva variação, através do teste F (Snedecor) e teste t (Student) (Tabela 44).

Tabela 44: Análise estatística para a determinação do parâmetro robustez para método microbiológico por turbidimetria

Variável	Faixa investigada	Teste F: duas amostras para variância	Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes
Volume do meio de cultura (mL)	9,7	$F_{cal} 1,93 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,34 > 0,05$	$t_{cal} 2,42 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,07 > 0,05$
	10,3	$F_{cal} 5,93 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,14 > 0,05$	$t_{cal} 0,71 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,52 > 0,05$
Comprimento de onda (nm)	528	$F_{cal} 3,75 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,21 > 0,05$	$t_{cal} 0,64 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,56 > 0,05$
	532	$F_{cal} 1,42 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,41 > 0,05$	$t_{cal} 0,08 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,94 > 0,05$
Tempo de incubação (horas)	3'55	$F_{cal} 1,03 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,49 > 0,05$	$t_{cal} 0,37 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,73 > 0,05$
	4'05	$F_{cal} 2,42 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,29 > 0,05$	$t_{cal} 0,17 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,87 > 0,05$
Volume do inóculo (μ L)	895	$F_{cal} 1,07 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,48 > 0,05$	$t_{cal} 2,07 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,11 > 0,05$
	905	$F_{cal} 2,77 < F_{tab} 19,00$ $P_{valor} 0,27 > 0,05$	$t_{cal} 0,78 < t_{tab} 2,78$ $P_{valor} 0,48 > 0,05$

7.3.3 Determinação da potência da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável

A Tabela 45 apresenta a determinação da potência da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável, em porcentagem.

Tabela 45: Determinação da potência de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável pelo método microbiológico por turbidimetria

Potência (%)	
	95,91
	99,56
	101,36
Média	98,94
DPR (%)*	2,80

*Desvio padrão relativo.

7.3.4 Análise da estabilidade das soluções de ceftriaxona sódica pó para solução injetável em seus diluentes

A Tabela 46 apresenta a potência em porcentagem dos diluentes compatíveis com a ceftriaxona sódica pó para solução injetável conforme indicado pela bula do medicamento.

Tabela 46: Valores obtidos da potência em porcentagem de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável em seus diluentes compatíveis pelo método microbiológico por turbidimetria

Diluyente	Potência (%) tempo zero	Potência (%) tempo 6 horas
Água	99,51	98,02
Cloreto de sódio 0,9%	98,14	97,93
Glicose 5%	98,80	97,79
Glicose 10%	96,67	96,46
Glicose 5% em cloreto de sódio 0,45%	95,33	94,39

7.4 Discussão

O método proposto demonstrou ser simples e rápido, quando comparado ao ensaio por difusão em ágar, tornando-se apropriado para as análises de rotina do controle de qualidade. Em relação ao controle de qualidade dos antimicrobianos é importante ressaltar a necessidade da avaliação físico-química associada a microbiológica, pois, os métodos físico-químicos não são capazes de avaliar a atividade biológica do medicamento, ou seja, é possível que na análise físico-química o método não seja capaz de analisar a integridade da molécula do medicamento em estudo responsável pela atividade antimicrobiana.

Testes preliminares utilizando diferentes cepas de micro-organismos foram realizados. O primeiro micro-organismo a ser testado foi o *Bacillus atrophaeus*, porém as soluções resultantes para a análise apresentaram-se heterogêneas e em sequência testou-se a *Escherichia coli*, o qual também apresentou resultados insatisfatórios, impedindo a leitura da turbidez no espectrofotômetro e como consequência os resultados de ambos micro-organismos foram irreprodutíveis e imprecisos. A cepa de *Staphylococcus aureus*, após diversos testes que incluíram concentração do inóculo e concentração do fármaco, foi a escolhida para a validação do método, pois apresentou resultados precisos e reprodutíveis.

Após a determinação das condições analíticas (Tabela 36), iniciou-se a validação do método, que se apresentou seletivo e indicativo de estabilidade para o fármaco em relação a

todas as condições de estresse submetidas no teste de degradação forçada. Desta forma, foi possível verificar a diminuição da potência em todas as condições de degradação (Tabela 37).

A linearidade foi comprovada estatisticamente pela ausência dos desvios de linearidade para as curvas de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável (Tabela 39), visto que os parâmetros “quadrático” e “diferença de quadrático” apresentaram valores de F calculado, 4,82 e 0,05, respectivamente, inferiores ao valor de F tabelado (4,96). Também foi possível comprovar estatisticamente que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável, através do parâmetro “paralelismo”, o qual apresentou valor de F calculado (0,75) inferior ao F tabelado (4,96). Os coeficientes de correlação (r) obtidos na curva de ceftriaxona sódica SQR e pó para solução injetável (Figura 29) foram, respectivamente, 0,9980 e 0,9994, também comprovando a linearidade do método devido a presença da forte correlação entre as variáveis (log da concentração e absorvância). As análises foram realizadas a um nível de significância de 5%.

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados (Tabela 40), na análise intradia obteve-se um valor de DPR% de 4,53 e na interdias, 3,85, estes valores encontram-se inferiores a 15%, conforme preconizado pela RDC n° 27 que dispõe sobre a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012). Na precisão entre analistas (Tabela 41), realizada através do teste *t* Student, o valor obtido para o *t* calculado (0,69) foi inferior ao valor obtido para o *t* tabelado (2,23), a um nível de significância de 5%, desta forma, os valores não diferem estatisticamente. O método também mostrou exatidão, devido apresentar valor médio de recuperação igual a 100,33%.

A análise estatística mostrou que não há diferença significativa para as pequenas variações efetuadas na avaliação do parâmetro robustez (Tabela 44), desta forma, o método apresentou-se robusto para todas as variações analisadas.

Todos os parâmetros avaliados na validação do método foram satisfatórios, de acordo com os guias utilizados, comprovando ser adequado para a quantificação da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável.

Após a validação do método analítico, determinou-se a atividade da ceftriaxona sódica no produto acabado, o valor médio obtido foi de 98,94%.

A estabilidade das soluções em seus diluentes compatíveis também foi analisada (Tabela 46). Após 6 horas de reconstituição todas as soluções apresentaram valores de teores próximos ao encontrado pelo método (98,94%), com exceção do diluente glicose 5% em cloreto de sódio 0,45%, este apresentou teores mais baixos nos tempos zero e 6 horas, 95,33% e 94,39%, respectivamente. Desta forma, é importante ressaltar a importância da escolha do diluente, pois este, também pode influenciar na potência do medicamento.

8. ANÁLISE COMPARATIVA

O intuito da análise é estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para a quantificação da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável, ou seja, analisar a equivalência analítica entre as técnicas propostas. As técnicas por espectrofotometria na região do infravermelho, CLAE e turbidimétrica foram avaliadas estatisticamente através dos resultados dos teores médios em porcentagem pela análise da variância (ANOVA), considerando um nível de significância de 5%.

8.1 Resultados

A Tabela 47 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor em porcentagem da ceftriaxona sódica em todos os métodos propostos. A análise estatística está apresentada na Tabela 48.

Tabela 47: Valores obtidos na quantificação de ceftriaxona sódica no pó para solução injetável através dos métodos por espectrofotometria na região do infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico por turbidimetria

	Métodos		
	Espectrofotometria na região do infravermelho	Cromatografia líquida de alta eficiência	Ensaio microbiológico por turbidimetria
	93,18	98,99	95,91
	95,46	98,48	99,56
	93,89	96,86	101,36
Média (%)	94,18	98,11	98,94
DPR* (%)	1,24	1,13	2,80

*Desvio padrão relativo

Tabela 48: Análise de variância dos resultados para a quantificação de ceftriaxona sódica pelos métodos por espectrofotometria na região do infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico por turbidimetria

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5,283267	2	2,641633	0,292317	0,756587	5,143253
Dentro dos grupos	54,22133	6	9,036889			
Total	59,5046	8				

8.2 Discussão

De acordo com os resultados obtidos através da análise estatística, os métodos propostos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, apresentando valor de F calculado (0,29) inferior ao valor de F tabelado (5,14), para o nível de significância de 5%.

Apesar da comprovação da intercambialidade dos métodos, é de extrema importância ressaltar as particularidades referentes a cada técnica apresentada.

O método proposto por espectrofotometria na região do infravermelho não utiliza solventes tóxicos; desta forma, não gera resíduos tóxicos e possui baixo custo, porém, devido ao tempo de preparo das pastilhas, em análises que necessitem de uma grande quantidade de amostras sugere-se a técnica por CLAE, o método cromatográfico validado apresenta redução de resíduos tóxicos, quando comparado aos descritos na literatura e conseqüentemente, redução de custos e impactos ao meio ambiente. Em relação ao custo dos equipamentos, o cromatógrafo líquido apresenta-se mais oneroso em relação ao espectrômetro. Apesar das vantagens apontadas pelos métodos físico-químicos, o ensaio microbiológico apresenta informações em relação à potência do antimicrobiano, ou seja, verifica a atividade antimicrobiana da molécula. Desta forma, destaca-se a importância da associação de ensaios físico-químicos e microbiológicos no controle de qualidade de antimicrobianos, pois, é possível a avaliação em diferentes aspectos da molécula analisada.

Os métodos propostos são passíveis de serem utilizados para a quantificação da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável e cabe a cada indústria, de acordo com as suas necessidades, a decisão da melhor técnica a ser introduzida em sua rotina de trabalho.

9. CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado um método analítico por espectrofotometria na região do infravermelho, conferindo baixo custo e baixa geração de resíduos para a quantificação da ceftriaxona sódica.
- Foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE, utilizando solventes menos tóxicos, para a quantificação da ceftriaxona sódica.
- Foi desenvolvido e validado um método microbiológico por turbidimetria, com tempo de análise reduzido, simples e de fácil execução para a determinação da potência da ceftriaxona sódica no pó para solução injetável.
- Os métodos propostos apresentaram estatisticamente resultados semelhantes, possibilitando a aplicação tanto do método por espectrofotometria ou por CLAE em associação ao método microbiológico no controle de qualidade da ceftriaxona sódica pó para solução injetável.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, M. E. FSQ spectrophotometric and HPLC analysis of some cephalosporins in the presence of their alkali-induced degradation products. **II Farmaco**, v. 53, p. 132-138, 1998.

AGILENT. Zorbax StableBond. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-stablebond#buy-products>. Acesso em: 18 de julho de 2017.

AKL, M. A.; AHMED, M. A.; RAMADAN, A. Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 2, p. 247-252, 2011.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-70, 2005.

ALÉSSIO, P.V.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a successful microbiological agar assay for determination of ceftriaxone sodium in powder for injectable solution. **Pharmaceutics**, v.4, p.334-342, 2012.

ALI, M; SHERAZI, S. T. H.; MAHESAR, S. A. Quantification of erythromycin in pharmaceutical formulation by transmission Fourier transform infrared spectroscopy. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 1104-1109, 2014.

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.

AL-RAWITHI, S.; HUSSEIN, R.; RAINES, D. A.; ALSHOWAIER, I.; KURDI, W. Sensitive assay for the determination of cefazolin or ceftriaxone in plasma utilizing LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 281-286, 2000.

AMIN, A. S.; RAGAB, G. H. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins in pure form and in pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, n. 12, p. 2831-2835, 2004.

ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 167-175, 1999.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos- Bases Teóricas e Uso Clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cefalosporinas3.htm>. Acesso em 09 de agosto de 2017a.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos de referência. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/350888/LISTA%2B%2BA%2BDE%2BMED%2BREFER%25C3%258ANCIA%2B17-03-2014.pdf/d5b91fd-60b3-4191-97b3-58c2e7ca2366>>. Acesso em 09 de agosto de 2017b.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos genéricos registrados na ANVISA. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/352400/Gen%C3%A9ricos+registrados+-+por+princípio+ativo+29-02-2016.pdf/9e4ce425-7915-4cc1-b870-05ee305c1a8f>>. Acesso em 09 de agosto de 2017c.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos similares. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Lista%2Bsite%2B26-01-16%2BEXCEL.pdf/b5e6d58d-5315-4a73-b1ed-25e289d1e2f5>>. Acesso em 09 de agosto de 2017d.

ANVISA. Bulário eletrônico. Ceftriaxona dissódica hemieptaidratada. ABL Antibióticos do Brasil. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16244842016&pIdAnexo=3376307>. Acesso em 09 de agosto de 2017e.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 18. ed. Gaithersburg: AOAC, Gaithersburg, MD, 2002.

ARIAS, E. R.; TORRES, M. L. H.; MUGUERCIA, H. L.; VALDÉS, D. L.; PÉREZ, D. L. Carbapenémicos y monobactámicos. **Acta Medica**, v. 8, n. 1, p. 66-70, 1998.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, L. M. Green Analytical Chemistry. **Trends Analytical Chemistry**, v.27, n.6, p.497-511, 2008.

ASBEL, L. E.; LEVISON, M. E. Cephalosporins, carbapenems and monobactams. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, n. 2, p. 435-447, 2000.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. 2. ed. New York: Informa Healthcare, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.

BONFILIO, R.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review. **WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 316-338, 2010.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in

pharmaceutical analysis: a practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 87-100, 2012.

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.

BP. BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2014.

BPR. GUIA DE REMÉDIOS. 12. ed. São Paulo: Escala, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 27, de 22 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de maio de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de abril de 2010.

BRAYFIELD, A. **Martindale: The Complete Drug Reference** 38. ed. London: Pharmaceutical Press, 2014.

BRISCOE, S.E.; MCWHINNEY, B.C.; LIPMAN, J.; ROBERTS, J.A.; UNGERER, J.P.J. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 178-184, 2012.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 247-249, 2012.

BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 14-27, 2014.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2012.

CASS, Q. B.; DEGANI, L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégia e validação**. São Carlos: EDUFScar, 2013.

CAZEDEY, E. C. L.; SALGADO, H. R. N. A novel and rapid microbiological assay for ciprofloxacin hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 5, p.382-386, 2013.

CAZEDEY, E. C. L.; JUODINIS, V. D. A.; SALGADO, H. R. N. A stability-indicating LC method for difloxacin in the presence of degradation products. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 45-56, 2014.

CHIERENTIN, L.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a simple, rapid and stability-indicating high performance liquid chromatography method for quantification of norfloxacin in a pharmaceutical product. **Journal of Chromatography Separation Techniques**, v. 4, p. 171-175, 2013.

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.

CONSORTTI, L. P.; SALGADO, H. R. N. A Critical Review of Analytical Methods for Quantification of Cefotaxime. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 4, 359-371, 2017a.

CONSORTTI, L. P.; SALGADO, H. R. N. Green method for quantification of sodium cefotaxime in lyophilized powder by infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences & Emerging Drugs**, v. 5, n. 1, 2017b.

CORRÊA, J. C. R.; D'ARCY, D.M.; SERRA, C. H. R.; SALGADO, H. R. N. A critical review of properties of darunavir and analytical methods for its determination. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 16-22, 2014a.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 270-279, 2011.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. A platform for designing quantitative infrared spectrophotometric method for drugs and pharmaceuticals analysis: a rediscover for a ecological and safer technique in the routine quality control laboratories. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 2056-2059, 2014b.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Modern pharmacology with clinical applications**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

CUE, B. W; ZHANG, J. Green process chemistry in the pharmaceutical industry. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 2, n. 4, p. 193-211, 2009.

CURBETE, M. M.; SALGADO, H. R. N. A Critical Review of Properties of Fusidic Acid and Analytical Methods for its Determination. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, p. 352-360, 2016a.

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

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M. C. W. **Farmacologia integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

DOADRIO, A. L.; MAYORGA, A.; MADRIGAL P.; ORENGA, R. Determinación de las constantes de la relación de hidrólisis de ceftriaxona por cromatografía de líquidos. **Anales de la Real Academia de Farmacia**, v. 67, p. 27-36. 2001.

DONG, M. W.; GUILLARME, D. Newer developments in HPLC impacting pharmaceutical analysis: a brief review. **American Pharmaceutical Review**, v. 16, n. 4, p. 36-46, 2013.

DOUGHERTY, T. J.; PUCCI, M. J. **Antibiotic discovery and development**. Switzerland: Basilea Pharmaceutica International, 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.

EP. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 8. ed. Council of Europe (EDQM), 2014.

ETHIRAJ, R.; THIRUVENGADAM, E.; SAMPATH, V. S.; VAHIG, A.; RAJ, J. Development and validation of stability indicating spectroscopic method for content analysis of ceftriaxone sodium in pharmaceuticals. **International Scholarly Research Notices**, 2014.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FE. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. 3. ed. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2005.

FARMACOPEIA PORTUGUESA. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005.

FDA. Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 2004.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 7-17, 2013.

FIORENTINO, F. A. M.; SANGOI, M. S.; STEPPE, M.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicating MEKC method for determination of flucloxacillin sodium in capsules. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 149-157, 2014.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GANDHIMATHI, M.; SARAVANAKUMAR, M.; RAVI, T. K. Validated ion pair HPLC method for simultaneous estimation of ceftriaxone sodium and tazobactam sodium in dosage form. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, p. 17-22, 2010.

GARAZZINO, S.; APRATO, A.; BAIETTO, L.; AVOLIO, A. D.; MAIELLO, A.; ROSA, F. G. D.; ALOJ, D.; SICCARDI, M.; BIASIBETTI, A.; MASSÈ, A.; PERRI, G. D. Ceftriaxone bone penetration in patients with septic non-union of the tibia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 415-421, 2011.

GERGS, U.; CLAUSS, T.; IHLEFELD, D.; WEISS, M.; PÖNICKE, K.; HOFMANN, G. O.; NEUMANN, J. Pharmacokinetics of ceftriaxone in plasma and bone of patients undergoing hip or knee surgery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1552-1558, 2014.

GRIGGS, D. J.; MARONA, H.; PIDDOCK, L. J. V. Selection of moxifloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* compared with five other fluoroquinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1403-1407, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HALEEM, R. M.; SALEM, M. Y.; FATAHALLAH, F. A.; ABDELFATTAH, L. E. Quality in the pharmaceutical industry - A literature review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 463-469, 2015.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis**: a rational approach. Boca Ration: Interpharm/CRC, 2004.

HIREMATH, B.; MRUTHYUNJAYASWAMY, B. H. M. Development and validation of a high performance liquid chromatographic determination of ceftriaxone sodium and its application to drug quality control. **Analytical Letters**, v. 42, p. 2180-2190, 2009.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

ICH - International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). Geneva, 2005.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE. Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, ver. 5, 2016.

IP. INDIAN PHARMACOPOEIA. 5. ed. Ghaziabad, Indian Pharmacopoeia Commission, 2007.

ISHIKAWA, K. **Controle de qualidade total**. Rio de Janeiro: Campus, 1993.

JP. JAPANESE PHARMACOPOEIA. 16. ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011.

JURAN, J. M.; GRYNA, F. M. **Controle da qualidade**: conceitos, políticas e filosofia da qualidade. 4. ed. São Paulo: Makron, Mc Graw Hill, 1991.

KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of chromatography A**, v. 1353, p. 131-139, 2014.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill, 2010.

KOGAWA, A. C.; AGUIAR, F. A.; GAITANI, C. M.; SALGADO, H. R. N. Characteristics, complexation and analytical methods of darunavir. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.4, n.11, p.1276-1286, 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. 07, p. 463-466, 2016.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Analytical methods need optimization to get innovative and continuous. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 5, n. 6, p. 240-244, 2016.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of doxycycline hyclate in tablets. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 316-321, 2012.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v. 3, p. 1-6, 2013.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 20. ed. 2014 /2015. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KRATZER, A.; LIEBCHEN, U.; SCHLEIBINGER, M.; KEES, M. G.; KEES, F. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. **Journal of Chromatography B**, v. 961, p. 97-102, 2014.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009.

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

LIN, C. C.; WU, Y. T.; YEN, J. C.; CHIANG, C. J.; TSUANG, Y. H.; TSAI, T. H. *In vitro* and *in vivo* methods to measure the ceftriaxone distribution into the rat tail intervertebral disc. **Analytical Sciences**, v. 26, p. 979-982, 2010.

LOURENÇO, F. R.; TRAPLE, M. A. L.; OKAMOTO, R. T.; PINTO, T. J. A. Development and validation of microbiological assay for ceftriaxone and its application in photo-stability study. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 1, p. 77-81, 2013.

MALLAH, M. A.; SHERAZI, S. T. H.; BHANGER, M. I.; MAHESAR, S. A.; BAJEER, M. A. A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 64-70, 2015.

MANFIO, M. L.; AGARRAYUA, D. A.; MACHADO, J. C.; SCHMIDT, C. A. A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 753-762, 2013.

MARCO, B. A.; NATORI, J. S. H.; FANELLI, S.; TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Characteristics, properties and analytical methods of amoxicillin: a review with green approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 267-277, 2017a.

MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Characteristics, properties and analytical methods of cefadroxil: a review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.47, n.2, p.93-98, 2017b.

MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a green RP-HPLC method for quantification of cefadroxil capsules. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 8, p. 2074-2091, 2017c.

MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Development and validation os a innovative method for the determination of cefadroxil monohidrate in capsules. **Physical Chemistry**, v. 6, p. 67-74, 2016.

MARONA, H.R.N. Sparfloxacin: chemical and pharmaceutical studies and characterization of resistant mutants. **Caderno de Farmácia**, v.16, n.1, p.22-24, 2000.

MCWHINNEY, B. C.; WALLIS, S. C.; HILLISTER, T.; ROBERTS, J. A.; LIPMAN, J.; UNGERER, J. P. J. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2039-2043, 2010.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009.

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. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 6-11, 2012.

NATORI, J. S. H.; TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a green analytical method for determination of norfloxacin in raw material by Fourier-Transform Infrared Spectrophotometry (FT-IR). **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 6, p. 1533-1536, 2016.

NEMUTLU, E.; KIR, S.; KATLANB, D.; BEKSAC, 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.

NIRAV, P. B.; ALPESH, A. C.; SNEHA, J. K.; VIPUL, M. D.; HEMANT, D. T. Development and validation of stability indicating method for simultaneous estimation of ceftriaxone and sulbactam injection using RP-UPLC method. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 29-37, 2012.

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, n. 2, p.118-124, 2006.

OLDFIELD, E.; FENG, X. Resistance-resistant antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 12, 2014.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

O'NEIL, M. J. (Ed.) **The Merck Index: An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. 15 ed. Cambridge: RSC Publishing, 2013.

OWENS, H. M.; DASH, A. K. Ceftriaxone sodium: comprehensive profile. **Profiles of Drug Substances Excipients, and Related Methodology**, v. 30, p. 31-37, 2003.

OWENS, H. M.; DESTACHE, C. J.; DASH, A. K. Simple liquid chromatographic method for the analysis of the blood brain barrier permeability characteristics of ceftriaxone in an experimental rabbit meningitis model. **Journal of Chromatography B**, v. 728, p. 97-105, 1999.

PAGE-SHARP, M.; NUNN, T.; SALMAN, S.; MOORE, B. R.; BATTY, K. T.; DAVIS, T. M. E.; MANNING, L. Validation and application of a dried blood spot ceftriaxone assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 14-23, 2016.

PANCHAL, V.J.; DESAI, H. T.; DAVE, A. G. Development and validation of stability indicating method for simultaneous estimation of ceftriaxone and tazobactam injection using RP-UPLC method. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, p. 2398-2405, 2014.

PARADIS, D. P.; VALLÉE, F.; ALLARD, S.; BISSON, C.; DAVIAU, N.; DRAPEAU, C.; AUGER, F.; LEBEL, M. Comparative study of pharmacokinetics and serum bactericidal activities of cefpirome, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2085-2092, 1992.

PASHA, C.; NARAYANA, B. A simple method for the spectrophotometric determination of cephalosporins in pharmaceuticals using variamine blue. **Eclética Química**, v. 33, p. 41-46, 2008.

PASSONI, M. H.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a new and rapid HPLC for determination of lyophilized teicoplanin. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1560-1564, 2012.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4th. ed. New York: Oxford University Press, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectrofotometria**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. A critical review of analytical methods for ertapenem sodium. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.46, n.1, p.15-21, 2016.

PEDROSO, T. M.; MEDEIROS, A. C. D; SALGADO, H. R. N. RP-HPLC X HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. **Talanta**, v. 160, p. 745-753, 2016.

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium by liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, 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 lyophilized powder. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1391-1396, 2014b.

PHENOMENEX. Luna C₁₈. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/luna>. Acesso em: 18 de julho de 2017.

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.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v.16, n.10, p. 4546- 4551, 2014.

QUEIROZ, G. A.; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis, **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132-138, 2012.

RAGEH, A. H.; EL-SHABOURY, S. R.; SALEH G. A.; MOHAMED F. A. Spectrophotometric method for determination of certain cephalosporins using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). **Natural Science**, v. 2, n. 8, p. 828-840, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale: Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAVIKIRAN, T. N.; PRASAD, Y. R.; ANOOP, K. Green Chemistry. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.4, p. 353-367, 2015.

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, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHENEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIND, F. M. A.; LAGHARI, M, G. H.; MEMON, A. H.; MUGHAL, U. R.; ALMANI, F.; MEMON, N.; Khuhawar, M. Y.; Maheshwari, M. L. Spectrophotometric determination of ceftriaxone using 4-dimethylaminobenzaldehyde. **Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 43-48, 2008.

RODRIGUES, D. F.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a green analytical method of RP-HPLC for quantification cefepime hydrochloride in pharmaceutical dosage

forms: simple, sensitive and economic. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 4, p. 306-3014, 2016.

RUGANI, K. S.; SALGADO, H. R. N. Stability-indicating LC method for determination of cephalotin in lyophilized powder for injection. **Analytical Methods**, v. 6, p. 4437-4445, 2014.

SHAH, J.; JAN, M. R.; SHAH, S.; INAYATULLAH. Development and validation of a spectrofluorimetric method for the quantification of ceftriaxone in pharmaceutical formulations and plasma. **The Journal of Biological and Chemical Luminescence**, v. 28, p. 516-522, 2013.

SHAH, J.; JAN, M. R.; SHAH, S.; KHAN, M. N. Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of ceftriaxone and cefaclor in commercial formulations and biological samples. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 57, p. 314-320, 2013.

SHRIVASTAVA, S. M.; SINGH, R.; TARIQ, A.; SIDDIQUI, M. R.; YADAV, J.; NEGI, P. S.; CHAUDHARY, M. A novel high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of ceftriaxone and sulbactam in sulbactamax. **International Journal of Biomedical Science**, v. 5, n. 1, p. 37-43, 2009.

SHRESTHA, B.; BHUYAN, N. R.; SINHA, B. N. Development and validation of a stability indicating hplc method for estimation of ceftriaxone and sulbactam in sterile powder for injection. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1660-1666, 2012.

SILVA, L. M.; SALGADO, H. R. N. Methacycline: a review of analytical methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.8, n. 1, p. 2-13, 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.

SILVA, L. M.; SALGADO, H. R. N. Tigecycline: a review of properties, applications and analytical methods. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 32, n. 3, p. 282-288, 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. 51, p. 192-199, 2013.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. G.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SUN, H.; WANG, H.; GE, X. Simultaneous determination of the combined drugs of ceftriaxone sodium, metronidazole, and levofloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 26, p. 486-492, 2012.

SVERSUT, R. A.; SILVA, A. A.; CARDOSO, T. F. M.; KASSAB, N. M.; AMARAL, M. S.; SALGADO, H. R. N. A critical review of properties and analytical methods for the determination of oxytetracycline in biological and pharmaceutical matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 154-171, 2017.

TANGE, M.; YOSHIDA, M.; NAKAI, Y.; UCHIDA, T. The role of an impurity in ceftriaxone sodium preparation for injection in determining compatibility with calcium-containing solutions. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, p. 207-214, 2016.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TÓTOLI, E. G.; GARG, S.; SALGADO, H. R. N. Daptomycin: physico-chemical, analytical and pharmacological properties. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, n. 6, p.699-710, 2015.

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 a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for solution for injection. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5923-5928, 2013.

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 Science**, v. 3, p. 1928-1943, 2014.

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, 2015a.

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, 2015b.

TRINDADE, M. T.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Metformin: A Review of characteristics, properties, analytical methods and impact in the green chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. No prelo.

TRINDADE, M.T.; SALGADO, H.R.N. A critical review of analytical methods for determination of ceftriaxone sodium. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. 2018. Doi 10.1080/10408347.2017.1398063. No prelo.

USP 39 - The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 34). 39th. ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2016.

VERDIER, M.C.; TRIBUT, O.; TATTEVIN, P.; TULZO, Y.L.; MICHELET, C.; FERRER, D. B. 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.; FIUZA, T. F. M.; 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.

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 Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 80-87, 2012.

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.

WANG, L.; LI, Y. Q. Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC. **Chromatographia**, v. 70, p. 253-258, 2009.

WELTON, T. Solvents and sustainable chemistry. **Proceedings of the Royal Society A**, v. 471, p. 1-26, 2016.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. S3-S7, 1999.

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

YU, X.; TANG, X.; ZUO, J.; ZHANG, M.; CHEN, L.; LI, Z. Distribution and persistence of cephalosporins in cephalosporin producing wastewater using SPE and UPLC–MS/MS method. **Science of the Total Environment**, v. 569-570, p. 23-30, 2016.