



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

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS DE CEFTRIAXONA SÓDICA

MESTRANDA: PATRÍCIA VIDAL DE ALÉSSIO
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA – SP

2012

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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES
INJETÁVEIS DE CEFTRIAXONA SÓDICA**

PATRÍCIA VIDAL DE ALÉSSIO

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

2012

PATRÍCIA VIDAL DE ALÉSSIO

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES
INJETÁVEIS DE CEFTRIAXONA SÓDICA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado
Orientador e Presidente

Profª Dra María Segunda Aurora Prado

Profª Dra Taís Maria Bauab

Aprovado em

24/02/2012

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo.”

Vinicius de Moraes.

Dedico este trabalho de pesquisa à minha família (meus pais, minha querida irmã e meu querido marido), toda minha gratidão pela imensurável dedicação, compreensão, força, carinho e amor durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Finalizar esta dissertação de mestrado é um momento importante na minha vida, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo.

Todas as palavras que conheço são muito pouco, para expressar toda minha gratidão a todos os que participaram desta jornada, mas este é meu humilde reconhecimento:

Primeiramente a Deus, pelo dom precioso da vida. Devemos tudo Àquele que nos deu sabedoria para descobrirmos nossa vocação, força para superarmos os obstáculos, tornando um sonho realidade.

À minha família, meus pais Aléssio e Lydia, minha irmã Lígia e meu marido João Otávio, sem vocês nada seria possível. Agradeço por todo o apoio, confiança que tiveram em mim. Amo muito vocês.

À Prof^a Dr^a Hérica Regina Nunes Salgado, obrigada pela oportunidade de tê-la tido como minha orientadora, por sua exigência, por sua paciência, por sua competência e por seu amor pelo que faz.

À minha amiga Lucélia Magalhães Silva que me ajudou na realização deste trabalho, esteve presente nas horas mais difíceis dando seu apoio e proporcionando uma luz no fim do túnel, terei para sempre uma enorme gratidão pelo seu apoio, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade: Lucas, Ana Carolina, Flávia Fiorentino, Eliane, Josilene, Edith Cristina e Rudy por estarem comigo sempre neste árduo processo de amadurecimento, pelo apoio, pela convivência e companheirismo todo esse tempo, sentirei saudades.

À Maria de Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico, amizade e colaboração.

Às estagiárias: Andressa, Bruna e Jéssica, não só pela contribuição dentro do laboratório, mas também pela sólida amizade construída.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela contribuição em minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira por ceder as dependências do laboratório para a realização de análises por espectrofotometria ultravioleta.

Aos colegas do Laboratório de Farmacotécnica, especialmente ao Gustavo, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio e paciência na utilização do espectrofotômetro.

À Profa. Dra. Chung Man Chin por ceder as dependências do laboratório para a realização de análises por espectrofotometria infravermelho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara.

À empresa União Química (Pouso Alegre – MG) pela gentil doação dos medicamentos analisados neste trabalho.

Às instituições de apoio à pesquisa, PADC-FCF, FUNDUNESP, FAPESP e CNPq pelos incentivos aos projetos do laboratório de controle de qualidade.

À Fapesp pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para que este trabalho se concretizasse.

RESUMO

A ceftriaxona sódica é um agente antimicrobiano β -lactâmico de uso parenteral, pertencente ao grupo das cefalosporinas de terceira geração. Foi produzida pelo Laboratório Roche, Suíça, sob a sigla RO 13-9904. Possui maior atividade contra bacilos Gram-negativos aeróbios e é utilizada no tratamento de escolha de meningite causada por bactérias Gram-negativas e outras multi-resistentes da família Enterobacteraceae, não é absorvida por via oral, apresenta meia-vida de 7-8 horas e pode ser injetada a cada 24 horas. A ceftriaxona sódica, assim como outras cefalosporinas, age inibindo a síntese de parede celular bacteriana é altamente estável à maioria das β -lactamases, tanto cefalosporinases quanto penicilinases destes microorganismos. Apesar de ser uma substância altamente estudada e pesquisada com relação à sua atividade antimicrobiana, farmacocinética, farmacodinâmica, estabilidade, métodos analíticos em fluidos biológicos, há poucos estudos na literatura em relação ao desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação desta cefalosporina, pó para preparação injetável. Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para análise qualitativa e quantitativa do pó de ceftriaxona sódica para preparações injetáveis. Para análise qualitativa estudaram-se os métodos por espectrofotometria nas regiões do infravermelho e ultravioleta, e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possibilitando a identificação da amostra. Para quantificação do fármaco em preparação injetável validaram-se os métodos: (1) espectrofotometria na região do UV a 241 nm com faixa de concentração 10,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando água como solvente, com exatidão de 101,28% e teor de 100,38%; (2) doseamento microbiológico, método de difusão em ágar na faixa de concentração de 15,0 a 60,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 9371 IAL 1027, com exatidão de 100,53% e teor de 98,33%; (3) cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV a 241 nm, utilizando acetonitrila:água (40:60) pH 7,0 ajustado com trietilamina como fase móvel, faixa de concentração de 8,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, vazão de 0,6 mL/min, com exatidão de 100,43% e teor de 98,57% e tempo médio de retenção de 2,5 minutos. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para nível de significância de 5%, portanto, os métodos propostos demonstraram ser equivalentes.

Palavras-chave: ceftriaxona sódica, métodos analíticos, controle de qualidade, ensaio microbiológico, espectrofotometria, CLAE, validação

ABSTRACT

Ceftriaxone sodium is a β -lactam antimicrobial agent for parenteral use, belonging to the group of third-generation cephalosporins. It was produced by Roche, Switzerland, under the code RO 13-9904. It has greater activity against Gram-negative aerobic and is used in the treatment of choice for meningitis caused by Gram-negative bacteria and other multi-resistant Enterobacteraceae family, is not absorbed orally, has a half-life of 7-8 hours and can be injected every 24 hours. Ceftriaxone sodium, such as other cephalosporins, acts by inhibiting cell wall synthesis is highly stable to most β -lactamases, both penicillinase and cephalosporinases from these microorganisms. Despite being a substance is highly studied and researched in relation to its antimicrobial activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics, stability, analytical methods in biological fluids, there are few studies in the literature regarding the development of analytical methodology for this order cephalosporins analysis time, cost, feasibility and ease of implementation of the method. In this work we developed methods for qualitative and quantitative analysis for ceftriaxone sodium. For qualitative analysis spectrophotometry in the infrared and ultraviolet regions and high performance liquid chromatography (HPLC) were studied to enabling the identification of the sample. Three methods were validated to quantitative ceftriaxone sodium: (1) UV spectrophotometry at 241 nm with a concentration range from 10.0 to 20.0 $\mu\text{g/mL}$ using water as solvent, with an accuracy of 101.28% and content of 100.38%, (2) microbiological assay, agar diffusion method in the concentration range from 15.0 to 60.0 $\mu\text{g/mL}$ from *Bacillus subtilis* ATCC 9371 ITB 1027, with 100.53% accuracy and content of 98.33%, (3) high efficiency liquid chromatography with UV detection at 241 nm using acetonitrile: water (40:60) pH 7.0 adjusted with triethylamine as mobile phase, concentration range 8.0 to 20,0 $\mu\text{g/mL}$, flow rate 0.6 mL/min, with 100.43% accuracy and potency of 98.57% and mean retention time of 2.5 minutes. The developed methods showed no statistical difference for significance level of 5%.

Keywords: ceftriaxone sodium, analytical methods, quality control, microbiological assay, spectrophotometry, HPLC, validation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
4	DESCRIÇÃO	37
5	ANÁLISE QUALITATIVA	39
5.1	Material e método	40
5.1.2	Resultados e discussão	40
5.2	Determinação do ponto de fusão	40
5.2.1	Considerações gerais	40
5.2.2	Material e métodos	40
5.2.3	Resultados e discussão	40
5.3	Determinação de umidade	41
5.3.1	Considerações gerais	41
5.3.2	Material e métodos	41
5.3.3	Resultados e discussão	42
5.4	Determinação da solubilidade	42
5.4.1	Considerações gerais	42
5.4.2	Material e métodos	42
5.4.3	Resultados e discussão	43
5.5	Espectrofotometria de absorção na região infravermelho	44
5.5.1	Considerações gerais	44
5.5.2	Material e métodos	44
5.5.3	Resultados e discussão	44
5.6	Espectrofotometria de absorção na região ultravioleta	46
5.6.1	Considerações gerais	46
5.6.2	Material e métodos	46
5.6.3	Resultados e discussão	47
6.	ANÁLISE QUANTITATIVA	50
6.1	Espectrofotometria na região ultravioleta	51
6.1.1	Considerações gerais	51
6.1.2	Material e métodos	51

6.1.2.1	Preparo da solução de ceftriaxona sódica SQR	52
6.1.2.2	Preparo da solução de ceftriaxona sódica na forma farmacêutica	52
6.1.3	Curva de Ringbom	52
6.1.4	Obtenção da curva analítica	53
6.1.4.1	Cálculo do teor de ceftriaxona sódica	54
6.1.5	Validação do método	55
6.1.6	Resultados	57
6.1.6.1	Curva de Ringbom	57
6.1.6.2	Linearidade	59
6.1.6.3	Precisão	62
6.1.6.4	Exatidão	62
6.1.6.5	Especificidade	63
6.1.6.6	Limites de Detecção e de Quantificação	64
6.1.6.7	Robustez	64
6.1.7	Discussão	65
6.2	Ensaio Microbiológico – Difusão em Ágar	67
6.2.1	Considerações gerais	67
6.2.2	Ensaio preliminar para o estabelecimento dos parâmetros analíticos	67
6.2.3	Execução do ensaio	69
6.2.4	Material	69
6.2.5	Preparo do meio de cultura	70
6.2.6	Preparo do inóculo	70
6.2.7	Preparo da solução de ceftriaxona sódica SQR	70
6.2.8	Preparo da solução de ceftriaxona sódica na forma farmacêutica	70
6.2.9	Ensaio	71
6.2.10	Obtenção da curva analítica	71
6.2.11	Cálculo da potência de ceftriaxona sódica	72
6.2.12	Validação do método	73
6.2.12.1	Linearidade	74
6.2.12.2	Precisão	74
6.2.12.3	Exatidão	74
6.2.12.4	Cálculo do teste de recuperação	74
6.2.12.5	Robustez	75

6.2.13	Resultados	75
6.2.13.1	Linearidade	76
6.2.13.2	Precisão	78
6.2.13.3	Exatidão	79
6.2.13.4	Robustez	80
6.2.14	Discussão	80
6.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	82
6.3.1	Considerações gerais	82
6.3.2	Ensaio preliminares	83
6.3.3	Material	83
6.3.4	Preparo das fases móveis	83
6.3.5	Preparo da solução de ceftriaxona sódica SQR	84
6.3.6	Preparo da solução de ceftriaxona sódica na forma farmacêutica.....	84
6.3.7	Método	84
6.3.8	Validação do método analítico por CLAE	85
6.3.9	Teste de performance do sistema cromatográfico	89
6.3.10	Resultados	90
6.3.10.1	Especificidade e estudos de degradação forçada	90
6.3.10.2	Linearidade	93
6.3.10.3	Precisão	96
6.3.10.4	Exatidão	97
6.3.10.5	Limites de Detecção e de Quantificação	97
6.3.10.6	Robustez	97
6.3.10.7	Adequabilidade do sistema	98
6.3.11	Discussão	99
7.	ANÁLISE COMPARATIVA	102
7.1	Análise comparativa	103
7.2	Discussão	104
8.	CONCLUSÕES	105
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo estrutural das cefalosporinas	25
Figura 2. Estrutura química da ceftriaxona sódica (CAS 104376-79-6)	29
Figura 3. Espectro na região de infravermelho de amostra de ceftriaxona sódica em pastilhas de KBr	45
Figura 4. Espectro na região de infravermelho da substância de referência de ceftriaxona sódica em pastilhas de KBr	45
Figura 5. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentração de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente	47
Figura 6. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentração de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente	47
Figura 7. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentração de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,1M como solvente	48
Figura 8. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentração de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente	48
Figura 9. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de ceftriaxona sódica	59
Figura 10. Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftriaxona sódica pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 241 nm	61

Figura 11. Delineamento 3x3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P1(15 µg/mL P2 (30 µg/mL); P3 (60 µg/mL) e A1 (15 µg/mL); A2 (30 µg/mL); A3 (60 µg/mL) ..	72
Figura 12. Placa de Petri com os halos de inibição de crescimento do micro-organismo <i>B. subtilis</i> ATCC 9371 IAL 1027, obtidos com as diferentes doses de ceftriaxona sódica SQR e forma farmacêutica	75
Figura 13. Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de ceftriaxona sódica SQR e amostra, em concentrações de 15,0; 30,0 e 60,0 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico de difusão em ágar	77
Figura 14. Cromatograma típico de ceftriaxona sódica SQR (14 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto.....	90
Figura 15. Cromatograma da degradação de ceftriaxona sódica (14 µg/mL) em meio oxidativo (peróxido de hidrogênio 3%) após 15 minutos	91
Figura 16. Cromatograma da degradação de ceftriaxona sódica (14 µg/mL) em meio ácido (HCl 0,1 M) após 2 horas a 70 °C	91
Figura 17. Cromatograma da degradação de ceftriaxona sódica (14 µg/mL) em meio básico (NaOH 0,1 M) após 24 horas a 70 °C	92
Figura 18. Cromatograma da degradação de ceftriaxona sódica (14 µg/mL) na luz ultravioleta UVC no tempo zero e após 24 horas	92
Figura 19. Cromatograma da degradação de ceftriaxona sódica (14 µg/mL) em meio neutro (água) no tempo zero e após 24 horas a 70 °C	93
Figura 20. Curva analítica da ceftriaxona sódica SQR obtida pelo método cromatográfico	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	36
Tabela 2	Ensaio necessários para a validação do método analítico segundo sua finalidade	36
Tabela 3	Valores de ponto de fusão obtidos para amostra de ceftriaxona sódica	41
Tabela 4	Valores do teor de umidade da amostra de ceftriaxona sódica	42
Tabela 5	Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade para determinações feitas à temperatura de 25°C	43
Tabela 6	Solubilidade da ceftriaxona sódica em diferentes solventes a 25°C	43
Tabela 7	Absorção de ceftriaxona sódica espectro de infravermelho em dispersão de KBr	46
Tabela 8	Obtenção da curva de Ringbom de ceftriaxona sódica por espectrofotometria no ultravioleta a 241 nm	53
Tabela 9	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV	56
Tabela 10	Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para ceftriaxona sódica SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 241 nm	58
Tabela 11	Valores das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftriaxona sódica por espectrofotometria na região de ultravioleta a 241 nm	60

Tabela 12 Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ceftriaxona sódica SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV	61
Tabela 13 Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico para análise de ceftriaxona sódica	62
Tabela 14 Determinação da exatidão do método analítico para análise ceftriaxona sódica por espectrofotometria na região do ultravioleta	63
Tabela 15 Análise das variâncias entre a ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica na forma farmacêutica	63
Tabela 16 Comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão e amostra, para avaliação da especificidade do método espectrofotométrico	64
Tabela 17 Resultados da avaliação da robustez do método analítico para análise de ceftriaxona sódica por espectrofotometria	65
Tabela 18 Parâmetros utilizados para a avaliação de ceftriaxona sódica por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar	68
Tabela 19 Parâmetros fixados na padronização da solução de ceftriaxona sódica no ensaio microbiológico – método de difusão em ágar	69
Tabela 20 Diâmetros dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico para avaliação de ceftriaxona sódica em produtos farmacêuticos– método difusão em Ágar	76
Tabela 21 Análise de variância das medidas dos halos de inibição determinados na obtenção das curvas analíticas de ceftriaxona sódica, utilizando o método de difusão em ágar	78

Tabela 22 Valores determinados de potência de ceftriaxona sódica na avaliação da precisão do método de difusão em ágar	79
Tabela 23 Resultados obtidos no teste de recuperação do método de difusão em ágar	79
Tabela 24 Parâmetros determinados na avaliação da robustez do método microbiológico para análise de ceftriaxona sódica por difusão em ágar	80
Tabela 25 Parâmetros otimizados para a determinação de ceftriaxona sódica pelo método CLAE	85
Tabela 26 Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico	88
Tabela 27 Valores das áreas referentes ao pico de ceftriaxona sódica SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico	94
Tabela 28 Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ceftriaxona sódica SQR, utilizando o método por CLAE....	95
Tabela 29 Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de ceftriaxona sódica por CLAE	96
Tabela 30 Determinação da exatidão do método analítico para análise ceftriaxona sódica por CLAE	97
Tabela 31 Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ceftriaxona sódica por CLAE	98
Tabela 32 Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de ceftriaxona sódica	99

Tabela 33 Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando espectrofotometria na região do ultravioleta, doseamento microbiológico pelo método por difusão em ágar e CLAE	103
Tabela 34 Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de ceftriaxona sódica, pelos métodos propostos	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

ANOVA: Análise da variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI: Brain-heart Infusion Agar

BV: Balão Volumétrico

CAS: Chemical Abstracts Service

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CQ: Controle de Qualidade

CV: Coeficiente de variação

DPR: Desvio padrão relativo

e.p.m: Erro padrão da média

Fcal: Valor de F calculado

FM: Fase móvel

Ftab: Valor de F tabelado

GL: Graus de liberdade

QM: Quadrados Médios

R: Reagente

r: Coeficiente de correlação linear

Rf: Fator de retenção

SQR: Substância química de referência

SQ: Soma dos Quadrados

TEA: Trietilamina

UV: Ultravioleta

V/V: Volume em volume

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O aparecimento de muitas doenças infecciosas principalmente de origem bacteriana, mediante as circunstâncias durante o período da Segunda Guerra Mundial, estimulou o desenvolvimento e a busca de novos fármacos antimicrobianos para o controle destas doenças. Estes e outros fatores levaram ao surgimento de inúmeros fármacos (EL-SHABOURY et al., 2007).

As doenças infecciosas são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade em muitos países e têm sido alvo de inúmeras pesquisas por atingirem grandes contingentes populacionais, além de representarem elevados custos sociais e econômicos (JONES & VARNAM, 2002).

Na medicina existem vários grupos de antimicrobianos, dentre eles há um importante grupo que se destaca por sua eficácia no tratamento de infecções causadas pela maioria dos cocos Gram-positivos e Gram-negativos, que são as cefalosporinas (SALEH et al., 2009).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, as cefalosporinas representam o maior número de inovações no tratamento antimicrobiano (PICHICHERO & CASEY, 2007; JONES et al., 2007). Representam, sem dúvida, um importante e crescente grupo de antibióticos na medicina atual, visto que esta classe de antimicrobianos está entre as mais seguras (PÉHOURCQ & JARRY, 1998).

As cefalosporinas são agentes antimicrobianos β -lactâmicos clássicos que apresentam as mesmas características estruturais das penicilinas; são utilizadas no tratamento de diversas infecções como faringites, otites, infecções urinárias, de pele, de ossos, pneumonia, meningites e septicemia (SILVA, 2006).

Dentre as cefalosporinas, a ceftriaxona sódica tem destacado no mercado nacional, principalmente no âmbito hospitalar. É um agente antimicrobiano β -lactâmico de uso parenteral, pertencente ao grupo das cefalosporinas de terceira geração, produzida pelo Laboratório Roche, Suíça, sob a sigla RO 13-9904. Possui maior atividade contra bacilos Gram-negativos aeróbios, utilizada no tratamento de escolha de meningite causada por bactérias Gram-negativas e outras multi-resistentes da família Enterobacteraceae (TAVARES, 1996; SALEM & SALEH, 2002; SILVA, 2006; SALEH et al., 2009).

A ceftriaxona sódica é uma substância altamente estudada e pesquisada com relação à sua atividade antimicrobiana, farmacodinâmica, farmacocinética (IIDA et al., 2009; LEVISON & LEVISION, 2009; FUKOMOTO et al., 2009; ORDONEZ et al., 2009; KOOMANACHI et al., 2010; HARB et al., 2010) estudos de estabilidade, métodos analíticos propostos em fluidos biológicos e preparações farmacêuticas como a cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo realizados no grupo da cefalosporinas (PÉHOURCQ & JARRY, 1998; TOZO & SALGADO, 2006; MORENO & SALGADO, 2008; NEMUTLU & KIR, 2008; LIU & QIU, 2002; HIREMANTH & MRUTHYUNJAYASWAMY, 2009; NEMUTLU et al., 2009; MCWHINNEY et al., 2010), espectrofotometria, voltametria (AL-MOMANI, 2001; AMIN & RAGAB, 2004; SANKAR et al., 2006; EL-SHABOURY et al., 2007; PASHA & NARAYANA, 2008; EL-SHABOURY et al., 2009). O método microbiológico provou ser um procedimento analítico extremamente importante para análise de quantificação de fármacos antimicrobianos, por causa de sua especificidade e sensibilidade (MARONTA & SCAAPORAL, 1998; GOMES & SALGADO, 2006; SALGADO & LOPES & LUCCHESI, 2006; TOZO & SALGADO, 2007; MORENO & SALGADO, 2007; CAZEDEY & SALGADO, 2011).

No entanto, há poucos métodos de análise padronizados para este fármaco a ceftriaxona sódica em pó para soluções injetáveis em compêndios oficiais. Na Farmacopeia Portuguesa (2005), British Pharmacopoeia (2010), Farmacopeia Européia (2011), USP 33 (2010) e O'NEIL (2006) existem apenas descritos métodos utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma fase móvel complexa e de alto custo, técnicas tradicionais de análises de pH, ponto de fusão e solubilidade. Portanto, pesquisas envolvendo métodos analíticos são essencialmente importantes e altamente relevantes para análises na indústria farmacêutica e para garantir a qualidade e a estabilidade do produto farmacêutico comercializado.

Tendo em vista a importância das cefalosporinas em geral e particularmente da ceftriaxona sódica pó liofilizado para solução injetável, desenvolver novas técnicas analíticas para o controle de qualidade é fundamental e importante para garantir a segurança, a qualidade e a eficácia terapêutica deste medicamento já comercializado no mercado, representando, desta forma, uma contribuição significativa para a área de medicamentos.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos gerais o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a quantificação de ceftriaxona sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis.

Dentre os objetivos específicos, destaca-se:

- 1- Realização de análises qualitativas de amostra de ceftriaxona sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis pelas técnicas tradicionais de controle de qualidade:
 - características organolépticas;
 - solubilidade;
 - faixa de fusão;
 - umidade;
 - espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)
 - espectrofotometria na região do infravermelho (IV)
- 2- Desenvolvimento e validação de método de análise de ceftriaxona sódica em pó liofilizado por de espectrofotometria na região de ultravioleta.
- 3- Desenvolvimento e validação de método de análise microbiológico de ceftriaxona sódica em pó liofilizado por do método difusão em ágar.
- 4- Desenvolvimento e validação de método de análise de ceftriaxona sódica em pó liofilizado por de cromatografia líquida de alta eficiência.
- 5- Realização da comparação dos métodos validados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas foram descobertas no período da Segunda Guerra Mundial mediante as exigências de encontrar novos antibióticos para controlar o surgimento de doenças infecciosas. Este grupo tem estrita relação com as penicilinas, pois apresenta as mesmas características estruturais das penicilinas (EL-SHABOURY et al., 2007).

O *Cephalosporium acremonium*, a primeira fonte de cefalosporinas, foi descoberto por acaso pelo professor Giuseppe Brotzu, no mar próximo a uma saída de esgoto na costa de Sardenha. Sua ideia de produzir antibióticos através de fungos deu origem a esta classe de antimicrobianos chamada cefalosporinas. Notou-se que este fungo *Cephalosporium acremonium* produziu três diferentes antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que foram denominados cefalosporinas P, N e C. Com o isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C, o ácido 7-aminocefalosporânico, e com o acréscimo de cadeias laterais, tornou-se possível produzir compostos semi-sintéticos com atividade antibacteriana muito maior que a da substância original (BRUNTON, L.L., 2010; HADLEY & FRITSCHÉ, 2007; EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR & ABDELMAGEED & ATTIA, 2009).

A estrutura química das cefalosporinas está representada na Figura 1.

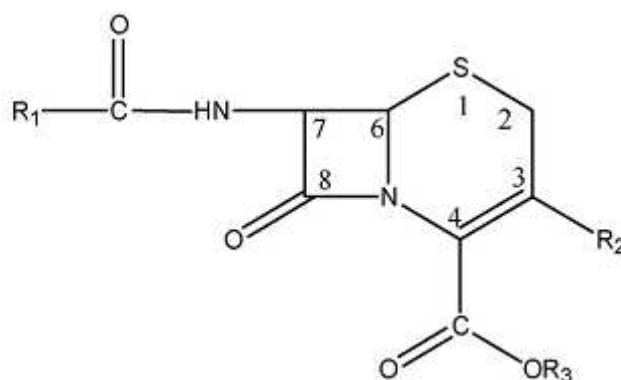


Figura 1: Modelo estrutural das cefalosporinas.

A maioria das cefalosporinas é encontrada na forma de sais hidrossolúveis ou anfóteros; sendo apenas a cefalosporina C encontrada na natureza. Com o decorrer do tempo, descobriu-se o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), que é produto da hidrólise da cefalosporina C, considerado estável em ácido diluído e resistente à penicilinase (KOROLKOVAS, 1988; AL-MOMANI, 2001; PASHA & NARAYANA, 2008).

A presença do radical aminotiazolilacetil ligado à cadeia lateral do carbono 7 do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) confere ao antimicrobiano aumento de sua atividade antibacteriana e estabilidade às β -lactamases (TAVARES, 1996).

Mediante o avanço no desenvolvimento da classe das cefalosporinas, fez-se necessário estabelecer uma classificação de acordo com características gerais da atividade antimicrobiana e de acordo com o desenvolvimento e ordem do espectro de ação, sendo então classificadas até o presente momento em quatro gerações (SILVA, 2006).

As cefalosporinas de *primeira geração* são representadas pela cefalotina, cefapirina, cefazolina, cefradina e cefadroxil; por ser a geração mais antiga de cefalosporinas têm melhor eficácia sobre bactérias Gram-positivas do que as gerações “novas”. Sua atividade contra bactérias Gram-negativas é relativamente moderada. São mais indicadas para infecções de pele e tecidos moles (BRUNTON, L.L., 2010).

As cefalosporinas de *segunda geração* são representadas por cefamandol, cefoxitina, cefaclor, ceftriaxona, cefonicida, ceforanida; apresenta um espectro mais amplo, sua atividade é melhorada contra as bactérias Gram-negativas. As de administração oral são muito utilizadas em infecções urinárias (BRUNTON, L.L., 2010).

As cefalosporinas de *terceira geração*, representadas pela cefotaxima, moxalactama, ceftizoxima, ceftriaxona sódica, cefoperazona, em geral, são menos ativas que as de primeira geração contra os cocos Gram-positivos, porém são muito mais ativos contra as enterobactérias, incluindo cepas produtoras de β -lactamase. São consideradas para tratamento de escolha no caso de infecções graves causadas por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Haemophilus*.

As cefalosporinas de *quarta geração* são representadas pela cefepima e a cefpiroma, apresentam sua atividade ampliada quando comparadas às cefalosporinas de terceira geração e possuem maior estabilidade à hidrólise por β -lactamase mediadas por plasmídeos e cromossomos. Apresentam como vantagem a menor frequência de doses necessárias à manutenção de níveis séricos terapêuticos, utilizadas no tratamento empírico de infecções hospitalares, pois antecede uma resistência a antimicrobianos, devido a β -lactamases de espectro ampliado ou β -lactamases induzidas por cromossomos (AMIN & RAGAB, 2004; BRUNTON, L.L., 2010).

A resistência das cefalosporinas pode estar relacionada a três mecanismos, primeiro, alteração da permeabilidade da parede celular pelos micro-organismos, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas Enterobacteriaceae, podem causar alterações nas funções ou no número de canais de porina causando assim a redução da permeabilidade da parede celular a varias cefalosporinas (LIVERMORE, 2005).

Segundo, por meio de mutações nas proteínas de ligação que são alvos das cefalosporinas, de modo que os antibióticos ligam-se com menor afinidade, isto acontece em algumas espécies de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* e em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MOELLERING & SENTOCHNIK, 1998).

Terceiro, sendo este o mecanismo mais importante, consiste na produção de β -lactamase, enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, inativando assim a cefalosporina. As cefalosporinas apresentam sensibilidade variável com relação às β -lactamases. Entre os agentes de primeira geração, a cefazolina é mais sensível à hidrólise pela β -lactamase do *S. aureus* do que a cefalotina. A cefoxitina, a ceftriaxona sódica e as cefalosporinas de segunda geração são mais resistentes à hidrólise pelas β -lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas do que as de primeira geração. As cefalosporinas de terceira geração, entre elas a ceftazidima e cefoperazona, são sensíveis à hidrólise por β -lactamases induzíveis e codificadas por cromossomos (tipo I). As cefalosporinas de quarta geração, como a cefepima, são indutoras fracas das β -lactamases do tipo I e são menos sensíveis à hidrólise por β -lactamases do tipo I do que os agentes de terceira geração (JONES & VARNAM, 2002; SAMANIDOU et al., 2003; KIMURA et al., 2004; BRUNTON, L.L., 2010; KIRATISIN et al., 2007).

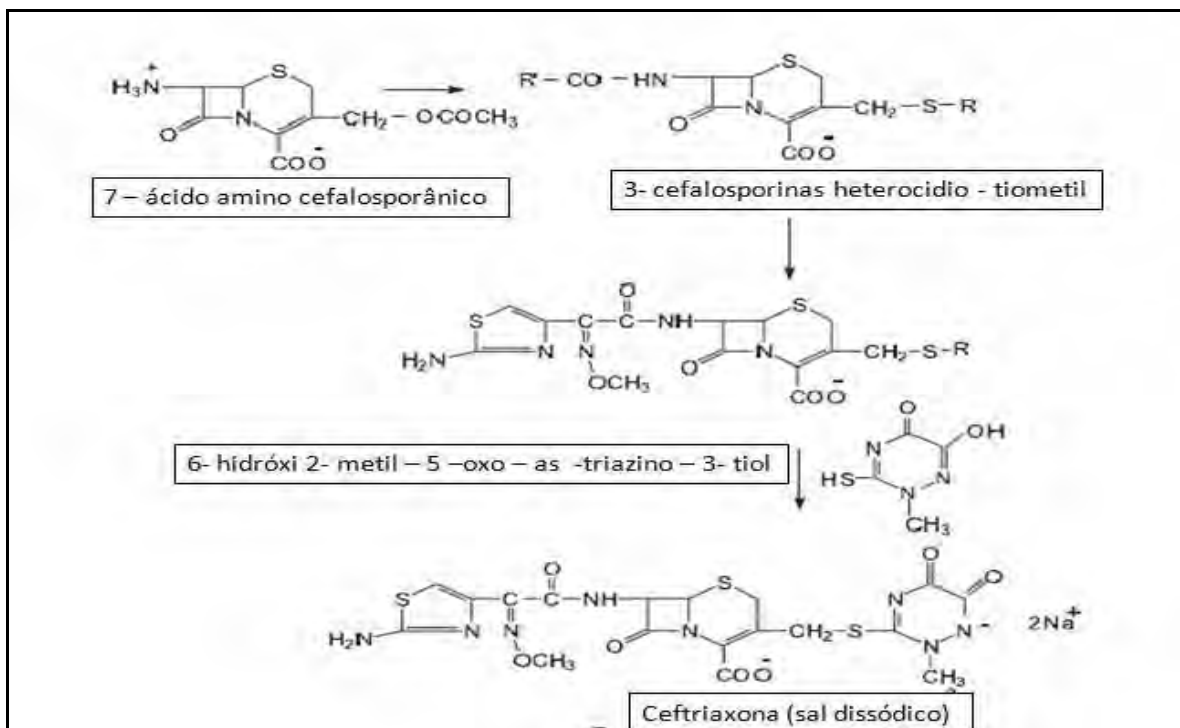
As cefalosporinas são bactericidas, ou seja, apresentam a capacidade de matar as bactérias sensíveis, para isso é necessário que o antimicrobiano penetre na parede celular externa do micro-organismo e ligue-se às proteínas ligadas à penicilina e permaneça estável à β -lactamase (AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 1992).

A excreção das cefalosporinas ocorre primariamente pelos rins; portanto, em casos de pacientes com insuficiência renal, é preciso acompanhar a dose a ser prescrita, sendo preciso modificar a posologia nestes pacientes. Os níveis séricos obtidos após administração parenteral são elevados e prolongados. Concentrações terapêuticamente ativas são detectadas no soro, 8 a 12 horas após a administração intramuscular ou endovenosa (SILVA, 2006; EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR & ABDELMAGEED & ATTIA, 2009; HIREMANTH & MRUTHYUNJAYASWAMY, 2009).

Em geral, o perfil de segurança ao uso de cefalosporinas é excelente. Os efeitos colaterais mais comuns são gastrointestinais, erupções cutâneas urticárias, reações de hipersensibilidade e a dor associada a injeções intramusculares. Para isso, pode-se adicionar lidocaína que reduz este desconforto provocado (MARSHALL & BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; SILVA, 2006).

3.2 Ceftriaxona sódica

Ceftriaxona sódica é um antimicrobiano β -lactâmico que foi sintetizado usando 7-amino-ácido cefalosporínico (7-ACA) como precursor. Este composto foi sintetizado com adição de uma molécula de acil na posição 7-amino e o deslocamento do grupo acetoxi por heterocíclicos tio-substituinte na posição 3-metil. Posteriormente, a substituição, do grupo R-álquil foi determinada pela adição de 6-hidróxi-2-metil-5-oxiastriazina-3tiol, enquanto o grupo RO-álquil foi substituído com o grupo 2-(2-amino-4-tiazolil)-2-amino- [(Z)-metoxilamino]-acetil para completar a síntese de ceftriaxona sódica (OWENS & DASH, 2003). O modelo da síntese da ceftriaxona sódica é ilustrado no esquema 1.



Esquema 1: Modelo de síntese da ceftriaxona sódica.

Fonte: Owens & Dash, 2003.

A fórmula empírica da ceftriaxona sódica é $C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3 \cdot 3 \frac{1}{2} H_2O$, com peso molecular de 662 g/mol, $pK_a=3,0$ (COOH), $pK_a=3,2$ (NH_3^+) e $pK_a=4,1$ (OH enólico) descrito em códigos oficiais como Farmacopeia Portuguesa (2005), British Pharmacopoeia (2010), Farmacopeia Europeia (2011), USP 33 (2010) e O'NEIL (2006). Seu aspecto é um pó cristalino, quase branco a amarelado, ligeiramente higroscópico, apresenta muita solubilidade na água, ligeiramente solúvel no metanol e muito pouco solúvel no etanol. Deve ser conservada em recipiente estéril hermético e de fecho inviolável (USP 33, 2010). A estrutura química da ceftriaxona sódica está representada na Figura 2.

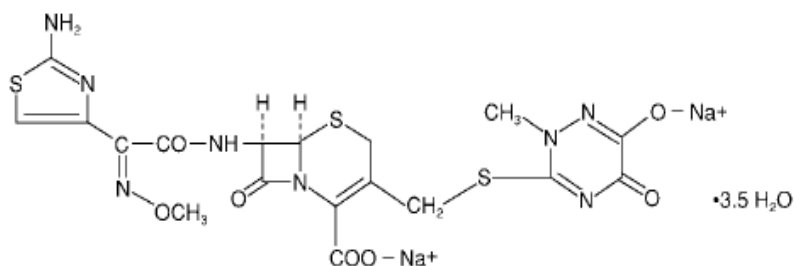


Figura 2. Estrutura química da ceftriaxona sódica (CAS 104376-79-6).

É comercializada no Brasil na forma de pó para solução injetável com o nome de Rocefin[®] pelo laboratório Roche; Ceftriaxona sódica genérica, pelos Laboratórios Sandoz, Eurofarma, EMS, Aurobindo Pharma, ABL – antibióticos; Amplosec[®] pelo Laboratório Biochimico, Keftron[®] pelo Laboratório ABL - antibióticos Triaxin[®] pelo Laboratório Eurofarma, Triaxon[®] pelo Laboratório Teuto, Triaxton[®] pelo Laboratório Ariston e Trioxina[®] pelo Laboratório União Química (GUIA REMÉDIOS, 2008; GUIA REMÉDIOS, 2009).

É indicada para caso de peritonites, infecções do trato gastrintestinal e biliar, infecções ósseas, articulares, tecidos moles, pele e feridas, infecções em imunodeprimidos (sendo neste caso, usado uma associação com aminoglicosídeo) infecções renais e do trato urinário, infecções respiratórias, particularmente pneumonia e infecções otorrinolaringológicas, infecções genitais, incluindo gonorreia, profilaxia de infecções pós-operatórias (DEF, 2006; DEF, 2007; BRASIL, 2007).

A ceftriaxona sódica pode ser administrada via parenteral, uma vez que não é absorvida por via oral; apresenta meia-vida de 7-8 horas e pode ser injetada a cada 24 horas, numa dose de 15-50 mg/kg/dia. A dose de 1 g diária é suficiente para a maioria das infecções graves e recomenda-se a administração de 4 g uma vez ao dia no tratamento de meningite. Penetra nos líquidos corporais e tecidos de modo satisfatório; atinge níveis no líquido cefalorraquidiano suficientes para inibir a maioria dos patógenos, exceto a *Pseudomonas*; é mais ativa contra cepas de pneumococos resistentes à penicilina. Sua excreção ocorre principalmente através do trato biliar, o qual não há necessidade de ajuste posológico na insuficiência renal (TAVARES, 1996; KATZUNG, 2005/2006; HIREMANTH; MRUTHYUNJAYASWAMY, 2009).

As principais vantagens terapêuticas de ceftriaxona sódica, compreendem em os pacientes poder receber em casa a dose única diária do antimicrobiano através da via intravenosa. As concentrações de ceftriaxona sódica no líquido cefalorraquidiano no tratamento de meningite bacteriana aguda em crianças, com dose recomendada de duas vezes ao dia, são muito mais elevados do que a sua concentração inibitória mínima (CIM) para *H. influenzae*. No entanto, a ceftriaxona sódica não tem atividade contra *Listeria*. Assim sendo, é ineficaz na população de recém-nascidos com meningite causada por este micro-organismo (OWENS & DASH, 2003).

Sua atividade bactericida ocorre devido à inibição da síntese de parede celular. A ceftriaxona sódica é altamente estável à maioria das β -lactamases, tanto cefalosporinases quanto penicilinases desses micro-organismos; possui ação sinérgica com os aminoglicosídeos. A ceftriaxona sódica apresenta reações adversas de hipersensibilidade, eventual superinfecção, e ainda pode ocorrer precipitação sob a forma de cálcio-ceftriaxona sódica, na vesícula biliar, sendo esta deposição transitória (TAVARES, 1996; KATZUNG, 2006).

De acordo com Grahame-Smith & Aronson (2004) e Silva (2006) a interação medicamentosa descrita é a nefrotoxicidade após uso concomitante com antimicrobianos aminoglicosídeos ou diuréticos potentes como a furosemida e também pelo ácido etacrínico. A ceftriaxona sódica apresenta também incompatibilidade química com soluções contendo cálcio. Portanto, não deve fazer uso concomitantemente com tais soluções e ainda o uso da ceftriaxona sódica juntamente com a fenitoína provoca aumento da concentração de fenitoína livre por deslocá-la da ligação às proteínas plasmáticas (SEIZI, BASILE & CARVALHO 2002).

Portanto, os antimicrobianos compõem uma porcentagem significativa de medicamentos no que diz respeito aos cuidados com a saúde (NUNES, 2006). O desenvolvimento de novas metodologias para melhorar o controle de qualidade destes medicamentos é de fundamental importância para aperfeiçoar a utilização de novos antimicrobianos.

3.3 Controle de Qualidade

Qualidade pode ser definida de maneira bem simples como um conjunto de atributos que se deseja para um determinado produto. Entretanto, a satisfação das expectativas dos clientes e o cumprimento dos aspectos técnicos são dois fatores determinantes neste conceito (WHO, 2003).

A aplicabilidade deste conceito para fármacos, segundo o ICH (International Conference on Harmonization, 2005) inclui: “A conformidade de uma substância ou produto deve estar de acordo com seu uso pretendido”. Este termo inclui atributos como identidade, pureza e caracterização (FDA, 1999).

O controle de qualidade tem objetivo de verificar se o produto está em conformidade com as especificações farmacopeicas. A não-conformidade

representa um somatório de atribuições para a empresa que podem resultar, além dos prejuízos decorrentes do retrabalho, a perda de credibilidade e até a cassação da licença de funcionamento e do registro do produto. Para o paciente, a falta de qualidade do medicamento ocasiona sérios transtornos com o comprometimento da sua saúde (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

Com a evolução industrial, tornou-se necessário a introdução de qualidade nos processos das rotinas de trabalho sob a forma de inspeções sobre determinados produtos. Após a Segunda Guerra Mundial, surgiram os gráficos de controle e amostragem estatística, que tiveram grande aplicação na indústria farmacêutica entre os anos 1930 e 1950 (PINTO & KANEKO & PINTO, 2010).

Na década de 1960, surgiram sistemas importantes de controle de qualidade, dentre eles o PDCA, a estratégia “benchmarking”, a metodologia dos seis sigma, o “Just in Time” (JIT), o “Material Requirements Planning” (MPR), o “Optimized Production Technology” (OPT), o “brainstorming”, o diagrama de Ishikawa, o plano de ação 5W2H, as folhas de verificação, incluindo as Boas Práticas de Fabricação, o Controle de Qualidade Total e a ferramenta 5S: *seiri* (utilização), *seiso* (limpeza), *seiton* (organização), *seiketsu* (asseio) e *shitsuke* (disciplina) (RIBEIRO, 2006; REBSAMEN, 2010).

No fim dos anos 1970, surge o termo denominado Garantia da Qualidade, atividade de prover toda e qualquer evidência essencial afim de que a função qualidade esteja ocorrendo de maneira adequada (JURAN, 1990).

Os conceitos de qualidade anteriores nunca foram invalidados, sempre foram aprimorados, no entanto, surge na década de 1980 uma denominada norma sistêmica para a qualidade, sistemas que envolvem certificações em normas internacionais, respaldados em normas ISO (International Standard Organization), particularmente a série 9000 que permanecem até os nossos dias. Esta teve uma excepcional influência, fazendo com que a “Food Drug Administration” (FDA) realizasse um trabalho de compatibilização entre o seu tradicional sistema de “Good Manufacturing Practices” (GMP) e a ISO 9000. As necessárias atualizações se fazem imprescindíveis, assim é usual a sigla cGMP (“current Good Manufacturing Practices”), cujo indicativo de atual (“Current”), expressa a constante revisão do sistema (MARANHÃO, 2006).

O modelo internacional ISO apresenta como objetivo promover, no mundo, o desenvolvimento da normalização e atividades relacionadas com a

intenção de facilitar o intercâmbio internacional de bens e de serviços e para desenvolver a cooperação nas esferas intelectual, científica, tecnológica e econômica. Quando usado um sistema de qualidade, os resultados obtidos do desempenho e eficácia do processo correspondem em melhoria, além de ser baseado em medições objetivas (ROCHA et al., 2008; PINTO & KANEKO & PINTO, 2010).

A qualidade de um produto pode ser considerada como um conjunto de características e propriedades que o tornam satisfatório para o atendimento as necessidades dos consumidores. Em vista disso, a avaliação da qualidade dos medicamentos na indústria farmacêutica representa uma etapa indispensável para a sua comercialização em condições adequadas, portanto o controle de qualidade garante a confiabilidade do produto (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

O sucesso de qualquer terapêutica a fim de restabelecer a saúde do paciente sempre será dependente da qualidade do medicamento. Tendo em vista este pensamento, tornam-se indispensáveis estabelecer padrões ou níveis de qualidade idealizados para cada produto, cujo modelo deve ser atingido em cada lote produzido, de forma que o profissional, ao prescrever uma medicação e, sobretudo o próprio paciente tenha segurança quanto ao seu efeito (ROCHA et al., 2008). O controle de qualidade dentro de uma empresa participa de todos os setores, ou seja, o pessoal, os recursos e instalações visando sempre à qualidade final de seu produto. Portanto, para que o controle de qualidade possa ter êxito, em suas atividades, todos colaboradores devem estar em adequabilidade à sua função.

O controle de qualidade envolve diversos setores entre eles são:

➤ **Etapa de fabricação**

- matéria-prima
- insumos farmacêuticos

➤ **Controle do processo**

- controle microbiológico
- controle físico-químico
- sanitização ambiental
- procedimentos para o trabalho
- equipamentos de produção
- matérias-primas

➤ **Produção**

- matérias-primas
- processo
- materiais de acondicionamento
- materiais de embalagens
- controle do produto
- durante operação de embalagem
- procedimentos gerais

➤ **Produtos terminados**

➤ **Auditoria**

➤ **Métodos analíticos**

➤ **Especificações**

➤ **Cadastro de equipamentos**

➤ **Boletim analítico**

➤ **Aspectos legais** (PINTO & KANEKO & PINTO, 2010)

Inúmeros são os relatos de falhas no controle de qualidade de medicamentos, quer nos aspectos físico-químicos, quer no controle biológico, com prejuízos incalculáveis a população, portanto o Controle de Qualidade é aspecto fundamental na Indústria Farmacêutica, além disso, a qualidade e a eficácia dos medicamentos são, cada vez mais, motivo de preocupação de milhares de pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Mediante a estas razões, é de grande relevância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados (LA ROCA *et al.*, 2007).

3.4 Validação

O primeiro registro que se tem do uso oficial do termo validação, encontra-se nas “Good Manufacturing Practices” - GMPs, as quais foram publicadas na Food and Drug Administration (FDA) em 1978. Porém, somente em 1980 recebeu a seguinte definição: “Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo especifica e permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado” (MORETTO & SHIB, 2000).

Atualmente, a validação de métodos analíticos é uma exigência legal para as agências, farmacopeias e comissões reguladoras, que fornece resultados de confiança e segurança de tal análise (ICH, 2005; CECMED, 2007).

A norma ABNT NBR ISO/IEC 9000 define o termo validação:

“comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.” (INMETRO, 2007).

A validação é um processo de realizações experimentais necessárias para estabelecer evidência documentada com o objetivo de atingir alto grau de segurança que um específico processo ou equipamento demonstre desempenho consistente em suas especificações e atributos de qualidade (BRASIL, 2003a).

A validação de metodologia analítica tem por objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003a).

Para garantir a qualidade analítica dos resultados obtidos, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados. Nenhum dos objetivos dos ensaios será devidamente alcançado se o teste não for confiável e apresentar, no mínimo, precisão, exatidão e repetitividade dos resultados. O conhecimento dos fatores que afetam os ensaios e seu controle favorece a obtenção de resultados reprodutíveis (RILEY & ROSANSKE, 1996; FDA, 1999).

Para validar uma nova técnica, um requisito é a realização de um conjunto de testes, que visam os parâmetros de precisão e exatidão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e faixa de linearidade, podendo ser exigidos ou não de acordo com as características do teste (FDA, 1999; BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007).

Os testes a serem realizados são classificados em quatro categorias conforme especificado na Tabela 1:

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do teste
I	<ul style="list-style-type: none"> • Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	<ul style="list-style-type: none"> • Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	<ul style="list-style-type: none"> • Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	<ul style="list-style-type: none"> • Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003a.

Para cada tipo de metodologia analítica a ser desenvolvida (categoria), um conjunto de testes é exigido de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

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

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003a

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

DESCRIÇÃO

4. DESCRIÇÃO

Nome genérico: Ceftriaxona sódica (CAS 104376-79-6)

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]-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo [4.2.0]-2-octeno-2-carboxilato dissódico

Fórmula química: C₁₈H₁₆N₈Na₂O₇S₃, 3.1/2 H₂O

Massa molecular: 662 g/mol

Propriedades físico-químicas: Fisicamente, a ceftriaxona sódica apresenta na forma de pó cristalino, quase branco a amarelado, ligeiramente higroscópico, muito solúvel na água, ligeiramente solúvel no metanol e muito pouco solúvel no etanol (FARMACOPEIA PORTUGUESA (2005), FARMACOPEIA EUROPEIA (2011), O'Neil (2006), BRITISH PHARMACOPOEIA (2010), USP 33 (2010).

Categoria: Antimicrobiano

Classe: Cefalosporinas

pH: 6,0 a 8,0 e pka₁ =3.0 (COOH), pka₂ =3.2 (NH₃⁺), pka₃ =4.1 (OH)

Substância química de referência (SQR): adquirida da Sigma Aldrich[®] (St. Louis, EUA) com pureza especificada de 100% - Lote: 129K063.

Amostras: frascos-ampola contendo pó para solução injetável gentilmente doados pela União Química (Pouso Alegre, MG), sob o nome comercial de Trioxina[®]. Cada frasco ampola contém ceftriaxona sódica correspondente a 1,0 g de ceftriaxona sódica – Lote: 812380.

Nomes comerciais no Brasil: Rocefin[®] (Roche), Ceftriaxona sódica[®] (Sandoz), Ceftriaxona sódica[®] (EMS), Ceftriaxona sódica[®] (Aurobindo Pharma), Amplosec[®] (Biochimico), Keftron[®] (ABL – antibióticos), Triaxin[®] (Eurofarma), Triaxon[®] (Teuto), Triaxton[®] (Ariston) e Trioxina[®] (União Química).

ANÁLISE QUALITATIVA

5. Análise Qualitativa

5.1 Características físicas

5.1.1 Material e métodos

A amostra de ceftriaxona sódica em pó liofilizado para preparação injetável, descrita no item 4, foi avaliada em relação ao aspecto, cor e odor.

5.1.2 Resultados e discussão

A ceftriaxona sódica apresenta-se sob a forma de pó, com odor leve e cor quase branca a amarelada. A descrição é condizente com a citada pelo fabricante e órgãos oficiais (O'NEIL, 2006; MARTINDALE, 2007; USP, 2010, BP, 2010).

5.2 Determinação do Ponto de Fusão

5.2.1. Considerações gerais

A faixa de fusão é importante tanto para a caracterização de compostos quanto para indicar pureza quando se compara com padrões de referência, pois a presença de impurezas, mesmo que em pequenas quantidades, pode alterar a faixa de fusão de um composto ou diminuir o seu ponto de fusão (GRAHAM, 1995).

5.2.2 Material e Método

A faixa de fusão foi determinada na amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparações injetáveis utilizando equipamento automático STUART Cientific SMP3 (Melting Point Apparatus). A amostra, previamente dessecada, foi colocada em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram introduzidos horizontalmente no equipamento.

5.2.3 Resultados e discussão

Foram realizadas três determinações da amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparações injetáveis (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de ponto de fusão obtidos para amostra de ceftriaxona sódica

	Mudança de cor	Carbonização
	(°C)	(°C)
amostra 1	240,0	265,0
amostra 2	240,5	260,0
amostra 3	240,2	262,0
média	240,2 ± 0,1	262,3 ± 0,9

O pó apresentou faixa de fusão em cerca de 240,2°C, com decomposição, evidenciada pela alteração de cor do composto. A mudança de cor apresentada pelo pó teve início em cerca de 240°C, aumentando progressivamente de intensidade até completa decomposição e fusão (branco-amarelo-marrom); o pó apresentou-se carbonizado.

Nas literaturas consultadas (O'NEIL, 2006; MARTINDALE, 2007; USP, 2010), o ponto de fusão da ceftriaxona sódica não é apresentado como valor exato; é descrito como sendo maior que 155 °C, apresentando mudança de cor até decomposição.

5.3 Determinação de Umidade

5.3.1 Considerações gerais

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a expressão *dessecação até peso constante* significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após uma hora de secagem adicional nas condições específicas.

5.3.2 Material e método

O teor de umidade foi determinado na amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado, utilizando balança Gehaka IV 2000 – Analisador de Umidade por Infravermelho, a amostra foi pesada em pesa-filtros em balança analítica e logo após a pesagem, foi analisada no analisador de umidade por infravermelho a

105°C por 1 hora. As análises foram realizadas em triplicata utilizando cerca de 1 g de ceftriaxona sódica pó liofilizado.

5.3.3 Resultados e discussão

As determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela British Pharmacopoeia (2010), Farmacopeia Portuguesa (2005), USP 33 (2010) e pela Farmacopeia Brasileira (2010) para dessecação de substâncias antibióticas (Método 1). O teor de umidade foi determinado em triplicata, estando os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores do teor de umidade da amostra de ceftriaxona sódica

Ensaio	Umidade (%) ± DPR
1	7,8
2	8,1
3	8,2
média	8,03 ± 2,59

Os resultados obtidos demonstraram estar em conformidade com o padrão farmacopeico, em média por perda de dessecação foi de 8,03%. De acordo com USP 33 (2010), o teor de umidade deve ser entre 8,0 – 11,0%.

5.4 Determinação da Solubilidade

5.4.1 Considerações gerais

A expressão *partes* refere-se à dissolução de 1,0 g de um sólido ou 1,0 mL de um líquido no número de mililitros de solvente estabelecido no número de *partes* (Farmacopeia Brasileira, 2010).

5.4.2 Material e Método

Foram pesados em balança analítica 10 mg de amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado e transferidos para tubos de ensaio acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, sob agitação até completa solubilização. O ensaio foi realizado a 25°C e a solubilidade indicada de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Os solventes utilizados foram: água, etanol

absoluto, hidróxido de sódio 0,1 M e metanol. Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

5.4.3 Resultados e discussão

O significado dos termos descritivos utilizados está descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade para determinações feitas à temperatura de 25°C

Termo descritivo	Solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

* segundo a Farmacopeia Brasileira (2010).

A Tabela 6 representa os dados obtidos no ensaio de solubilidade para ceftriaxona sódica em diferentes solventes.

Tabela 6. Solubilidade da ceftriaxona sódica em diferentes solventes a 25°C

Solvente	Termo descritivo
água	facilmente solúvel
etanol	pouco solúvel
metanol	ligeiramente solúvel
hidróxido de sódio 0,1M	facilmente solúvel

De acordo com os parâmetros avaliados, a amostra está dentro das especificações farmacopeicas de solubilidade para ceftriaxona sódica pó liofilizado (USP 33, 2010; BP, 2010).

5.5 Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho

5.5.1 Considerações gerais

A espectrofotometria no infravermelho situa-se entre as regiões do visível e das micro-ondas. Neste espectro, a correlação pico a pico é uma ótima evidência para a identidade da amostra. O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos de átomos originam picos de absorção que ocorrem em frequência próxima independentes da estrutura da molécula (SILVERSTEIN et al, 1994; 2006).

5.5.2 Material e Método

Foram pesados 10 mg de ceftriaxona sódica SQR e quantidade equivalente de ceftriaxona sódica amostra pó liofilizado para preparação injetável em pastilhas de 250 mg de brometo de potássio dessecado e analisadas em espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR-8300 (USP 33, 2010).

5.5.3 Resultados e discussão

Os espectros obtidos da amostra e da substância química de referência estão representados nas Figuras 3 e 4.

Os espectros obtidos com a amostra e a substância química de referência de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparações injetáveis estão de acordo entre si, não mostrando presença de impurezas ou de degradação da amostra, já que os picos obtidos em ambas as substâncias são quase idênticos.

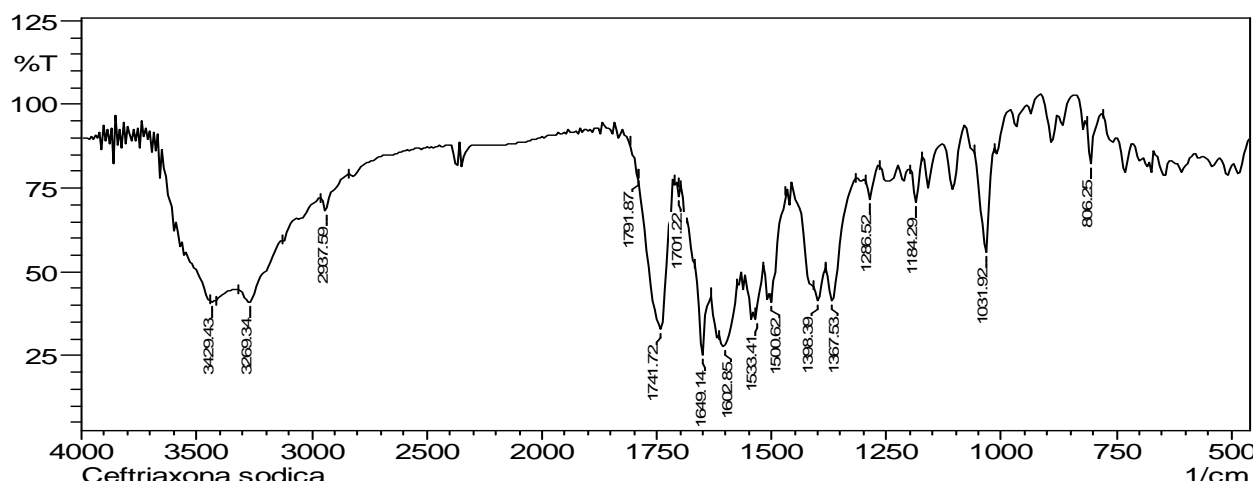


Figura 3. Espectro na região de infravermelho de amostra de ceftriaxona sódica em pastilhas de KBr.

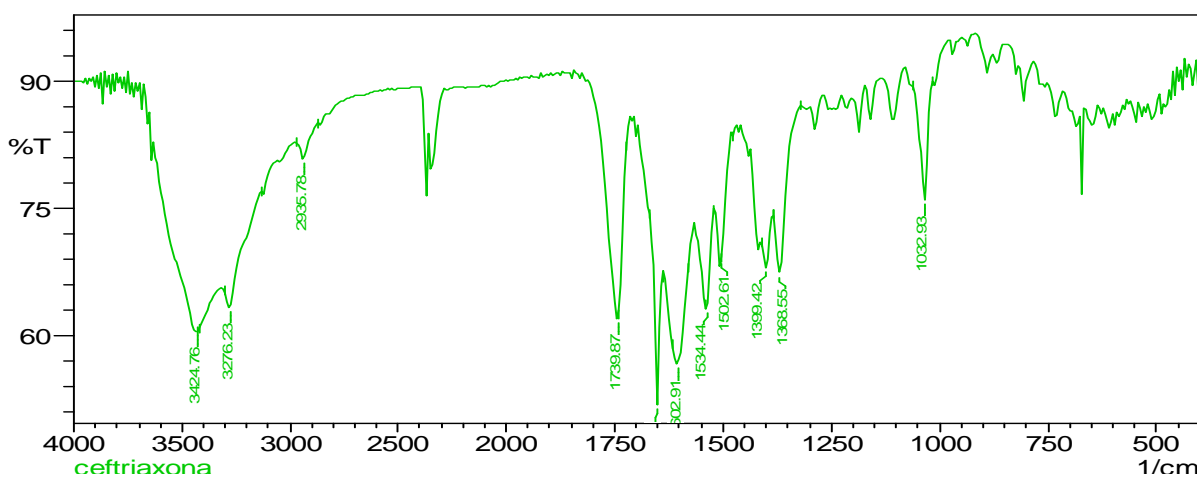


Figura 4. Espectro na região de infravermelho da substância de referência de ceftriaxona sódica em pastilhas de KBr.

Os espectros obtidos da SQR e da amostra apresentam as mesmas bandas de absorção quando comparados e analisados com dados apresentados na literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; BP, 2010).

O espectro de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentou bandas de absorção características de compostos cefalosporínicos apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Absorção de ceftriaxona sódica espectro de infravermelho em dispersão de KBr

Região de absorção (cm ⁻¹)	Tipo de ligação
3600-3250	Deformação axial de grupamentos N-H e C-H
2600-2550	Deformação axial de grupamento S-H do tiofenol
1750-1725	Estiramento do grupo carbonila C=O da carboxila
1600-1475	Deformação axial de grupamento C=C
1680-1630	Deformação axial do C=O da amida
1350-1000	Deformação axial de grupamento C-N

O espectro de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentou picos de absorção característicos de funções presentes na estrutura química da ceftriaxona sódica, demonstrando desta maneira os grupos funcionais presentes na molécula estudada.

5.6 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

5.6.1 Considerações gerais

A identificação de um fármaco pode ser feita através da análise de seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200-400 nm). Com a utilização de diferentes solventes (água, metanol, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M) visou-se observar as bandas de absorção máxima de ceftriaxona sódica, em suas características de absorção, com o objetivo de selecionar o melhor solvente para a determinação espectrofotométrica na região do UV da ceftriaxona sódica.

5.6.2 Material e Método

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV HEWLETT - PACKARD® KAYAK - XA utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizaram-se como solventes: água purificada (Milli-Q®), ácido clorídrico PA (Synth), hidróxido de sódio PA (Merck) e metanol PA (Synth).

Foram preparadas soluções de ceftriaxona sódica SQR, em água, metanol, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M, contendo 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL. Os espectros de absorção da SQR foram registrados em faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

5.6.3 Resultados e discussão

O espectro obtido da substância de referência ceftriaxona sódica pó liofilizado utilizando água como solvente está representado na Figura 5.

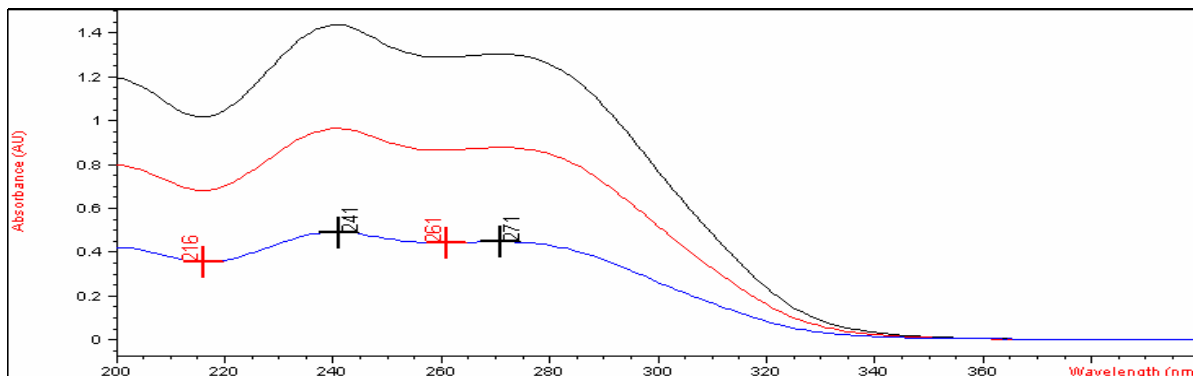


Figura 5. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentrações de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.

O espectro obtido da substância de referência ceftriaxona sódica pó liofilizado utilizando metanol como solvente está representado na Figura 6.

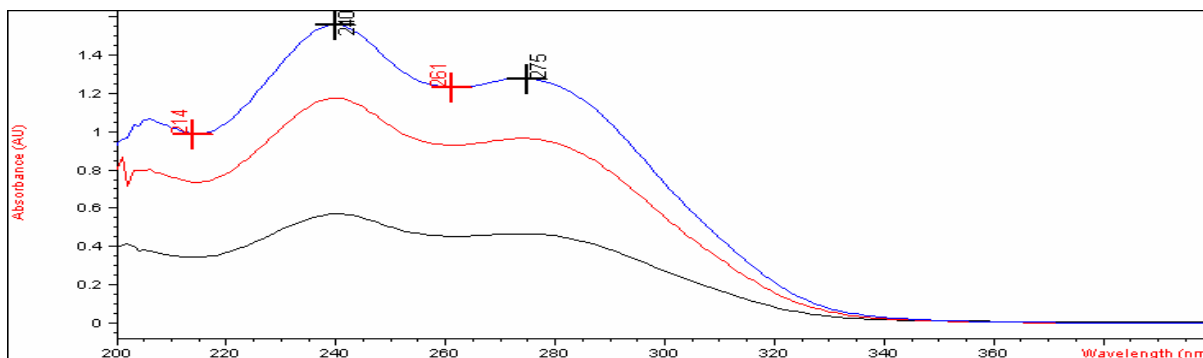


Figura 6. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentrações de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente.

O espectro obtido da substância de referência ceftriaxona sódica pó liofilizado utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente está representado na Figura 7.

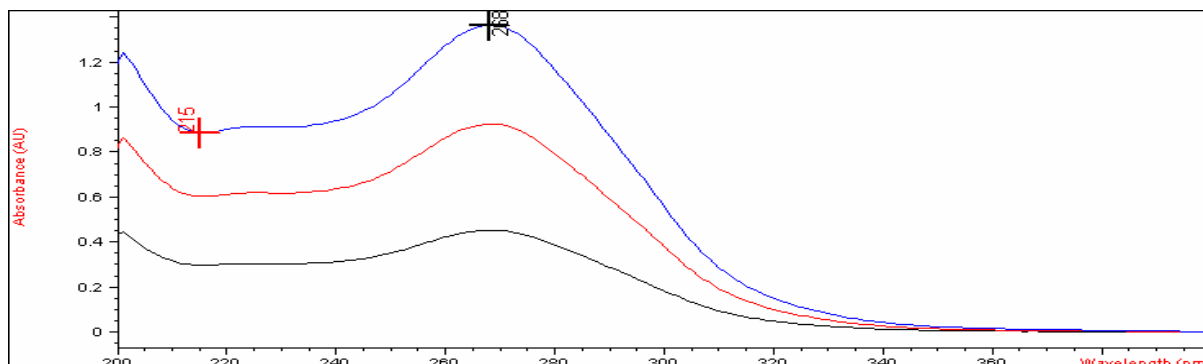


Figura 7. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentrações de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.

O espectro obtido da substância de referência ceftriaxona sódica pó liofilizado utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente está representado na Figura 8.

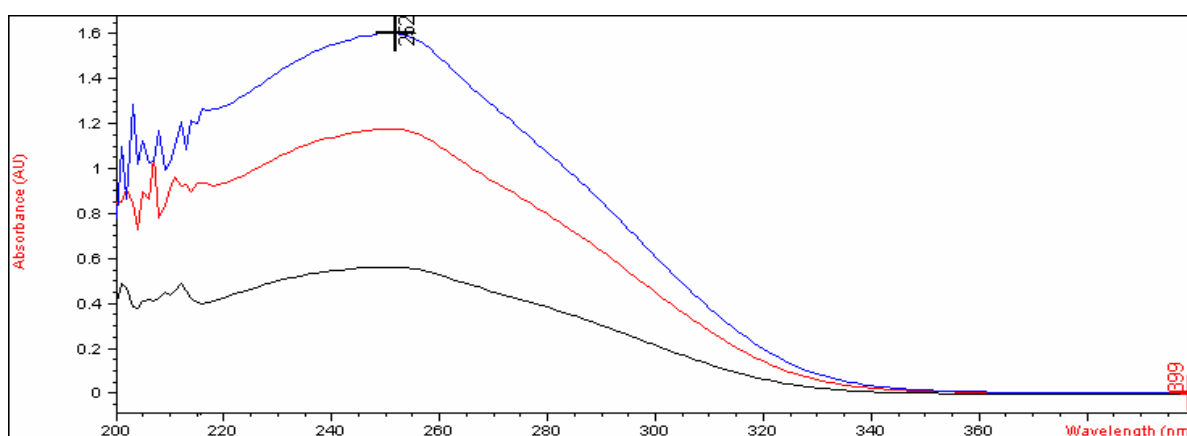


Figura 8. Espectro de absorção da solução de ceftriaxona sódica SQR com concentrações de 10,0 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.

A absorção molecular na região do ultravioleta do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula, assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes no espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 2006).

Ao analisar os espectros obtidos de absorção na região do ultravioleta para ceftriaxona sódica substância de referência em vários solventes, optou-se por trabalhar com as soluções aquosas, tendo máximo de absorvância no comprimento de onda de 241 nm, pelo fato de não utilizar solventes voláteis, por ser de fácil aquisição, baixo custo e fácil descarte. Portanto, este solvente é econômico e ecologicamente vantajoso.

ANÁLISE QUANTITATIVA

6. Métodos Quantitativos

6.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta

6.1.1 Considerações gerais

A espectrofotometria emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e emitir energia eletromagnética. Dessa forma, a absorção molecular na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A relação fotometria – luz se dá em termos de energia e não em termos de luz e cor e a energia apresenta relação inversa com o comprimento de onda. Esta técnica apresenta boa sensibilidade, boa exatidão, seletividade moderada e ampla aplicabilidade (MENDEZ et al., 2003).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde **A** é a absorvância, I^0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e **I** é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo **c** é a concentração (mol/L) da espécie absorvente e **b**, a distância (cm) percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA & TEIXEIRA, 2004).

6.1.2 Material e Método

O espectro na região ultravioleta foi obtido utilizando-se equipamento UV HEWLETT - PACKARD® KAYAK - XA e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foram preparadas soluções - mãe de ceftriaxona sódica SQR a 1000 µg/mL em água purificada, solvente escolhido durante a comparação dos espectros em vários solventes conforme descrito no item 5.6.3. Alíquotas da solução-mãe de ceftriaxona sódica foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL. Em

seguida, o volume foi completado para 25 mL com água, utilizando o solvente puro para zerar o aparelho. A leitura foi feita em 241 nm.

A substância química de referência e a amostra utilizadas foram descritas no item 4.

6.1.2.1 Preparo da solução de ceftriaxona sódica SQR

No preparo da solução de ceftriaxona sódica, foram pesados 10 mg de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparação injetável e transferidos para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com água purificada, obtendo solução de concentração de 1000 µg/mL, denominada de solução - mãe.

6.1.2.2 Preparo das soluções de ceftriaxona sódica na forma farmacêutica

O conteúdo de 20 frascos contendo 1 g de ceftriaxona sódica pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras pesou-se o equivalente a 10 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com água purificada, obtendo-se solução de 1000 µg/mL. Desta solução, retiraram-se 0,4 mL, que foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se solução de 16 µg/mL, após completar o volume com o mesmo solvente.

6.1.3 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada a fim de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região de ultravioleta obedece à linearidade. A partir da solução mãe, foram transferidas alíquotas para obtenção de curva de Ringbom com 18 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de pipetador automático. Os volumes foram completados com água purificada em balões volumétricos de 25 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 0,8 a 30,0 µg/mL de ceftriaxona sódica.

Os valores obtidos da curva de Ringbom estão representados na Tabela 8.

Tabela 8. Obtenção da curva de Ringbom de ceftriaxona sódica por espectrofotometria no ultravioleta a 241 nm

Pontos	Vol. da solução de ceftriaxona sódica (1000 µg/mL) mL*	Concentração teórica (µg/mL)
1	0,020	0,8
2	0,025	1,0
3	0,050	2,0
4	0,100	4,0
5	0,125	5,0
6	0,150	6,0
7	0,175	7,0
8	0,200	8,0
9	0,225	9,0
10	0,250	10,0
11	0,300	12,0
12	0,350	14,0
13	0,400	16,0
14	0,450	18,0
15	0,500	20,0
16	0,550	22,0
17	0,600	24,0
18	0,750	30,0

*diluída em balão volumétrico de 25 mL com água purificada

6.1.4 Obtenção da curva analítica

Após a obtenção da curva de Ringbom, determinou-se a faixa de concentração que obedece a lei de Lambert-Beer. Prepararam-se soluções de ceftriaxona sódica pó liofilizado substância de referência em concentrações que obedecem a linearidade para a determinação da curva analítica com 6 pontos.

Soluções de ceftriaxona sódica em triplicata foram preparadas em concentrações de 10, 12, 14, 16, 18 e 20 µg/mL, a partir da solução mãe de ceftriaxona sódica a 1000 µg/mL diluída com água purificada em balão volumétrico

de 10 mL. As leituras das soluções foram efetuadas em 241 nm tendo, água purificada como branco.

6.1.4. 1 Cálculo do teor de ceftriaxona sódica

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 241 nm. As soluções foram preparadas em triplicata.

O cálculo da concentração de ceftriaxona sódica foi realizado através das Equações 1 e 2.

$$C_A = A_A \cdot C_{SQR} / A_{SQR}$$

Equação 1

Em que:

C_A = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

A_A = absorvância da amostra

C_{SQR} = concentração da substância química de referência

A_{SQR} = absorvância da substância química de referência

O valor percentual de ceftriaxona sódica nas amostras foi calculado pela Equação 2:

$$C_A \% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Equação 2

Em que:

$C_A \%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de ceftriaxona sódica encontrado na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_T = Concentração teórica de ceftriaxona sódica na amostra

6.1.5 Validação do método

O método foi validado para determinação da linearidade, precisão, robustez e exatidão (ICH, 2005; USP 33, 2010; BP, 2010).

- **Linearidade:** para validar a linearidade do método, seis concentrações da SQR e seis concentrações da amostra de 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 e 20,0 µg/mL foram utilizadas para a realização de três curvas analíticas analisadas em 3 dias diferentes. O cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA (Tabela 10).

- **Precisão:** A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

- **Repetibilidade:** Seis soluções de ceftriaxona sódica SQR na concentração 16 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

- **Precisão intermediária:** Avaliou-se a precisão intermediária através de análises de soluções de ceftriaxona sódica, na concentração de 16 µg/mL, executadas por diferentes analistas e em diferentes dias. As análises foram realizadas triplicatas.

- **Interdias:** Prepararam-se, diariamente, solução de amostra, na concentração de 16 µg/mL, e analisaram-se três replicatas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

- **Entre-analistas:** Duas amostras, na concentração de 16 µg/mL foram preparadas e analisadas em três replicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

- **Exatidão:** A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada na amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 9, em triplicata.

Tabela 9. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	Ceftriaxona sódica amostra (1000 µg/mL) (mL)	Ceftriaxona sódica SQR (1000 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	0,5	-	10,0
R1	0,5	0,14	12,8
R2	0,5	0,30	16,0
R3	0,5	0,60	19,2
Padrão	-	0,50	10,0

*Balão volumétrico de 50 mL

A percentagem de ceftriaxona sódica recuperada foi calculada pela equação 3.

$$\%R = [(C_R - C_A) / C_P] \times 100$$

Equação 3

Em que:

C_R = concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

C_A = concentração encontrada da amostra (µg/mL)

C_P = concentração teórica adicionada da solução da SQR (µg/mL)

- **Especificidade:** a especificidade do método proposto foi avaliada qualitativamente, de acordo a legislação (BRASIL, 2003a), a fim de demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Comparou-se a resposta obtida entre a substância química de referência e a amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado, ambas não apresentaram em sua composição a presença de excipientes. Portanto, realizaram-

se três curvas analíticas da amostra, a fim de verificar a inexistência de alguma interferência. Para isso, aplicou-se teste *t* de Student para comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com solução de ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica na forma farmacêutica (amostra).

- **Limite de detecção (LD):** o limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A Equação 4 foi utilizada no cálculo.

- **Limite de quantificação (LQ):** O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. O cálculo foi realizado segundo a Equação 5.

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

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

Equação 4

Equação 5

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

- **Robustez:** A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados de teor de ceftriaxona sódica obtidos variando-se o comprimento de onda de absorção em 239 nm e 243 nm.

6.1.6 Resultados

6.1.6.1 Curva de Ringbom

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, realizada para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, para ceftriaxona sódica são demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para ceftriaxona sódica SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 241 nm

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)^a	Absorvância	100- T%
0,8	0,03793	8,3632
1,0	0,04588	10,0254
2,0	0,09283	19,2449
4,0	0,18215	34,2569
5,0	0,23319	41,5466
6,0	0,27315	46,6849
7,0	0,32198	52,3547
8,0	0,36438	56,7864
9,0	0,40992	61,0883
10,0	0,45890	65,2384
12,0	0,56483	72,7623
14,0	0,65098	77,6632
16,0	0,74063	81,8294
18,0	0,83094	85,2409
20,0	0,92284	88,0557
22,0	1,00540	90,1236
24,0	1,09940	92,0457
30,0	1,37610	95,7937

^a Balão volumétrico de 25 mL

A curva de Ringbom foi obtida plotando-se os valores de transmitância e de concentração em escala logarítmica conforme demonstrado na Figura 9.

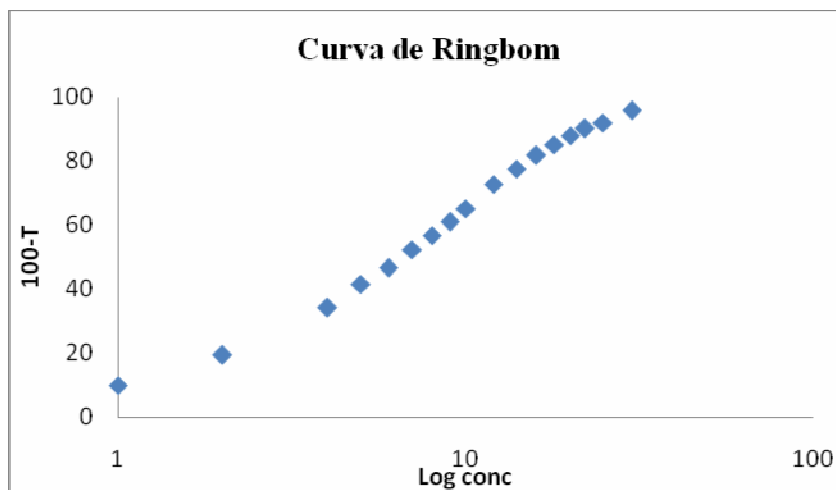


Figura 9. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de ceftriaxona sódica.

O espectro de absorção demonstrou pico máximo de absorção em 241 nm, utilizando solução aquosa de ceftriaxona sódica de 10 µg/mL. A curva de Ringbom determinou a faixa linear, e de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração linear foi de 10,0 a 20,0 µg/mL.

6.1.6.2 Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas da curva analítica de ceftriaxona sódica estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftriaxona sódica por espectrofotometria na região de ultravioleta a 241 nm

Pontos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Abs. média	DP	CV (%)
1	10	0,474370	0,472720	0,002379	0,50
		0,474900			
		0,470540			
2	12	0,562530	0,561093	0,001493	0,27
		0,561200			
		0,559550			
3	14	0,671080	0,666320	0,006282	0,94
		0,659200			
		0,668680			
4	16	0,756790	0,754390	0,011087	1,47
		0,742300			
		0,764080			
5	18	0,854480	0,857313	0,013357	1,56
		0,845600			
		0,871860			
6	20	0,945500	0,940450	0,01039	1,10
		0,928500			
		0,947350			

*média de três leituras

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

A curva analítica das soluções de ceftriaxona sódica em concentrações de 10, 12, 14, 16, 18 e 20 $\mu\text{g/mL}$ pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 241 nm, representados na Figura 10, foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

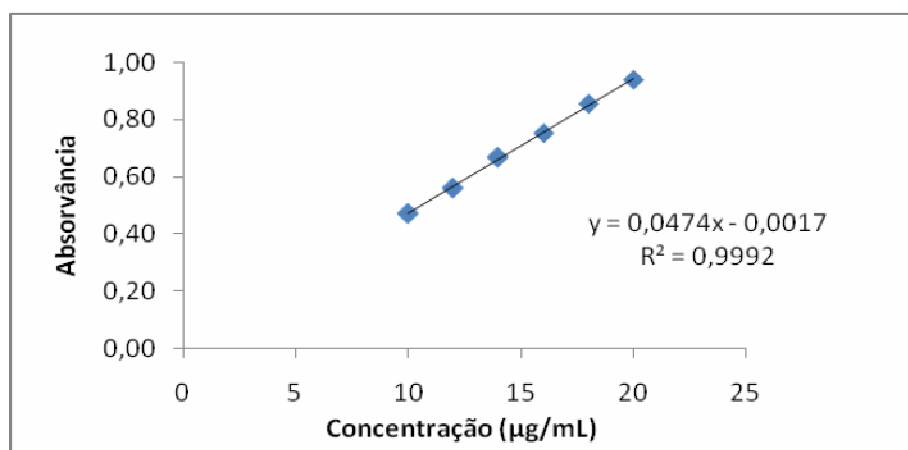


Figura 10. Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftriaxona sódica pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 241 nm.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ceftriaxona sódica é mostrada na Tabela 12.

Tabela 12. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ceftriaxona sódica SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,47066	0,09413	1236,30*	3,11
Regressão linear	1	0,47063	0,47063	6181,12*	4,75
Desvio da Linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,10	3,26
Resíduo	12	0,0009137	0,000076139	-	-
Total	17	0,47157	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05\%$

A eficácia do método (Tabela 12) proposto foi avaliada pelo cálculo do valor do teste-F e comparado com o método oficial (USP, 2010; BP, 2010). A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, no limite de confiança de 5%.

6.1.6.3 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), precisão interdias e entre-analistas, expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação. Seis soluções de ceftriaxona sódica SQR preparadas na concentração de 16 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram CV de 1,24%. As precisões interdias e entre-analista estão demonstradas na Tabela 13.

Tabela 13. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico para análise de ceftriaxona sódica

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (g/frasco)	Teor ^a (%)	CV ^b (%)		Teor ^a (g/frasco)	Teor ^a (%)	CV ^b (%)
	1	1,001	100,10		A	1,019	101,95	0,71
1	2	0,991	99,11	1,44	B	0,993	99,30	
	3	1,019	101,95					

^a média de três determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

6.1.6.4 Exatidão

São apresentados na Tabela 14 os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico, utilizando água purificada como solvente, a 241 nm.

Tabela 14. Determinação da exatidão do método analítico para análise ceftriaxona sódica por espectrofotometria na região do ultravioleta

	Ceftriaxona sódica SQR adicionada (µg/mL)	Ceftriaxona sódica SQR encontrada^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV^b (%)
R1	2,8	2,85	101,82		
R2	6,0	6,07	101,22	101,28	0,51
R3	9,2	9,27	100,79		

^a média de três determinações

^bCV = coeficiente de variação

6.1.6.5 Especificidade

A especificidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da análise da curva analítica do padrão e a curva analítica realizada com a amostra. A ANOVA calculada é demonstrada na Tabela 15. Além disso, a diferença entre os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas para ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica forma farmacêutica (amostra), comparadas pelo teste *t* de Student, não foi significativa. O resultado do teste está descrito na Tabela 16.

Tabela 15. Análise das variâncias entre a ceftriaxona sódica SQR e ceftriaxona sódica na forma farmacêutica.

RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Amostra	3	0,1468	0,048933	0,0000013233		
Padrão	3	0,142	0,047333	0,0000022533		

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,00000384	1	3,84E-06	2,147	0,216695	7,709
Dentro dos grupos	7,15333E-06	4	1,79E-06			
Total	1,09933E-05	5				

Tabela 16. Comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas de padrão e amostra, para avaliação da especificidade do método espectrofotométrico

Curva	Coeficientes angulares		T calculado	T tabelado
	Ceftriaxona sódica	Ceftriaxona sódica		
	SQR	amostra		
1	0,0474	0,0478		
2	0,0458	0,0489	1,46	2,77
3	0,0488	0,0501		

O desempenho do método foi determinado pelo cálculo do valor F conforma demonstrado na Tabela 15 e pelo cálculo do valor T demonstrado na Tabela 16. Os resultados mostraram que os valores calculados de F e t não excederam o valor teórico com 95% de confiança (RODRIGUES, 1986). Estes resultados indicam que o método proposto não difere significativamente do método oficial, ou seja, não existe diferença entre o padrão e a amostra analisados.

6.1.6.6 Limites de Detecção e de Quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados para LD e LQ, foram calculados a partir das equações 4 e 5 (item 5.1.5) descritas na literatura (ICH, 2005), foram 0,63 µg/mL e 2,10 µg/mL, respectivamente.

6.1.6.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do comprimento de onda. Os valores obtidos não apresentaram diferença significativa, portanto estão dentro do especificado (BRASIL, 2003a) (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados da avaliação da robustez do método analítico para análise de ceftriaxona sódica por espectrofotometria na região ultravioleta

Amostra	Comprimento de onda (nm)	Teor ^a (g/frasco)	Teor ^a (%)	CV ^b (%)
1	239	1,018	101,88	0,35
	241	1,018	101,80	
	243	1,015	101,59	

^a média de três determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

6.1.7 Discussão

A espectrofotometria na região do ultravioleta é um importante recurso utilizado na quantificação de substâncias, uma vez que está relacionada com a estrutura eletrônica da molécula. É utilizada para a identificação e quantificação de compostos químicos orgânicos incluindo fármacos (OHANNESIAN & STREETER, 2002).

O método proposto para a quantificação de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparação injetável foi desenvolvido utilizando água purificada como solvente baseado na boa intensidade de absorção do fármaco neste meio, assim como na simplicidade que representa a utilização de solvente de baixo custo e na pequena geração de resíduos.

Pela análise da curva de Ringbom, selecionou-se a faixa linear de concentração ótima para o método espectrofotométrico. Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de ceftriaxona sódica SQR apresentaram excelente correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, no intervalo utilizado. Foram plotados gráficos da concentração *versus* absorvância, os quais demonstraram haver linearidade adequada na faixa de 10 a 20 µg/mL. A equação da reta para o método foi: $y = 0,0474x - 0,0017$, com coeficiente de determinação de 0,9992 (R^2) e coeficiente de correlação de 0,9996 (R).

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). Foi obtida utilizando-se seis

determinações de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparação injetável, sendo cada preparação realizada em triplicata e as medidas realizadas de preparações distintas. Os resultados obtidos demonstraram a precisão do método, pois os coeficientes de variação foram menores que 2% (SHABIR, 2003).

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação obtendo-se a média de 101,28% para a ceftriaxona sódica. Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL, 2003a).

A robustez do método foi avaliada quanto ao parâmetro comprimento de onda. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na quantificação da amostra com as alterações realizadas, mesmo com a alteração desses parâmetros os valores encontrados em três determinações da ceftriaxona sódica no medicamento estão dentro do valor preconizado de 96 a 102 % do teor (BP, 2010).

De acordo com a comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas para ceftriaxona sódica SQR e para ceftriaxona sódica forma farmacêutica (amostra) e análise das variâncias (ANOVA) constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência no máximo de absorção de 241 nm.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir da equações 4 e 5 (item 5.1.5), baseados nas curvas analíticas produzidas em diferentes dias. Os valores encontrados para limites de detecção e de quantificação foram 0,63 µg/mL e 2,10 µg/mL, respectivamente, o que demonstra que a faixa utilizada encontra-se acima dos limites e, portanto, com valores adequados de concentração.

Portanto, o método espectrofotométrico na região do ultravioleta é adequado para quantificação da ceftriaxona sódica e atende todos os requisitos exigidos pelos órgãos oficiais (ICH, 2005; F. BRAS, 2010; USP 33, 2010).

6.2 Ensaio Microbiológico – Difusão em Ágar

6.2.1 Considerações gerais

Trata-se de um método físico, no qual um micro-organismo é usado como revelador. O método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, através do qual a substância teste se difunde. É essencial que se trabalhe com réplicas, de forma a compensar os desvios, inerentes ao ensaio ou acidentais (PINTO et al., 2010).

É um método específico para antibióticos antimicrobianos. Vem sendo utilizado em laboratórios clínicos desde a introdução de antibióticos e outros agentes antimicrobianos. Na terapêutica, muitos métodos de ensaio foram elaborados pela própria indústria farmacêutica para o controle das preparações comerciais (ANDREWS, 1999).

A partir de dados obtidos de outros antimicrobianos (GOMES & SALGADO, 2006, TOZO & SALGADO, 2007; MORENO & SALGADO, 2007), o objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento e validação de ensaio de quantificação de ceftriaxona sódica em pó liofilizado, utilizando método microbiológico de difusão em ágar, que relaciona o tamanho da zona de inibição com a concentração da substância aplicada.

6.2.2 Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para quantificação de ceftriaxona sódica pó liofilizado, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas, verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, concentrações do inóculo e do fármaco, temperatura de incubação e solução diluente (Tabela 18).

Tabela 18. Parâmetros estudados para a avaliação de ceftriaxona sódica pó liofilizado por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
• Micro-organismos	<p><i>S. aureus</i> ATCC 2593 IAL 1606</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 6538 IAL 1851</p> <p><i>S. epidermidis</i> ATCC 12228</p> <p><i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150</p> <p><i>B. subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027</p>
• Meios de cultura	<p>Camada base: meio nº 1: Grove Randall</p> <p>Camada semeada: meio nº 2: Grove Randall</p> <p>Camada semeada: meio nº 11: Grove Randall</p>
• Concentração do inóculo	0,5%, 1%, 2%
• Solução diluente	<p>Água purificada</p> <p>Tampão pH 6,0</p> <p>Tampão pH 8,0</p>
• Concentração da solução da amostra	<p>100, 200, 400 µg/mL</p> <p>50, 100, 200 µg/mL</p> <p>25, 50, 100 µg/mL</p> <p>20, 40, 80 µg/mL</p> <p>15, 30, 60 µg/mL</p>
• Temperatura de incubação	25 °C e 35°C

6.2.3 Execução do ensaio

De acordo com os resultados obtidos com os diferentes micro-organismos e meios de cultura foi possível estabelecer parâmetros para realização do doseamento microbiológico (Tabela 19). A padronização do ensaio foi realizada utilizando-se técnica descrita para outros agentes antimicrobianos (F. BRAS., 2010).

Tabela 19. Parâmetros fixados na padronização da solução de ceftriaxona sódica pó liofilizado no ensaio microbiológico – método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9371 IAL 1027
Meio de cultura	Camada base: meio 1: Grove Randall Camada semeada: meio 2: Grove Randall
Diluyente	Tampão pH 6,0
Concentração da solução padrão	15, 30 e 60 µg/mL
Concentração do inóculo	1,0%
Temperatura de incubação	35 ± 2 °C
Tempo de incubação	18 horas

6.2.4 Material

Para o doseamento microbiológico, foi utilizado o meio de cultura ágar Casoy (Acumedia) para manutenção da cepa do micro-organismo, caldo Casoy para preparo e padronização do inóculo, meio de cultura nº 1 de Grove Randall como camada base e meio nº2 de Grove Randall como camada semeada. Os meios de cultura, água purificada e ponteiros foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Foram utilizadas placas de Petri com 20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro, com papel de filtro nas tampas, para impedir que gotículas de condensação invalidem ou dificultem a leitura dos halos de inibição, além de *templates* de aço inoxidável. Os materiais e vidraria não volumétrica foram esterilizados em estufa a 180 °C por 1 hora. Utilizaram-se, na incubação, estufa

para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás[®]) e, para as leituras, paquímetro digital (Starret[®]).

6.2.5 Preparo do meio de cultura

Os meios de cultura foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

6.2.6 Preparo do inóculo

O micro-organismo *Bacillus subtilis* foi repicado para caldo Casoy e mantido por 24 horas, para seu crescimento, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0°C ± 2,0°C. Padronizou-se o inóculo à 580 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de 25,0% ± 2,0%. Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 1,0% (v/v) em meio nº2 de Grove-Randall. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (F. Bras. V, 2010).

6.2.7 Preparo da solução de ceftriaxona sódica SQR

Foram pesados 12,5 mg de ceftriaxona sódica pó liofilizado, transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com tampão fosfato pH 6,0, para a obtenção de solução com concentração de 500,0 µg/mL. Alíquotas de 300; 600 e 1200 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL que foram completados com tampão fosfato pH 6,0 para gerar soluções com concentrações finais de 15, 30 e 60 µg/mL.

6.2.8 Preparo das soluções de ceftriaxona sódica na forma farmacêutica

O conteúdo de três frascos contendo peso médio de 1,1 g ceftriaxona sódica pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras, o equivalente a 12,5 mg foi transferido para balão volumétrico de 25 mL,

obtendo-se solução de 500 µg/mL. Desta solução, alíquotas de 0,3, 0,6 e 1,2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações de 15, 30 e 60 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato pH 6,0.

6.2.9 Ensaio

Foram utilizadas 6 placas de Petri para avaliação da atividade de ceftriaxona sódica. Em capela de fluxo laminar, foram transferidos, com auxílio de pipetador automático, 20,0 mL de meio nº1 de Grove-Randall para a camada base em cada placa. Após a solidificação desta camada, foram adicionados por meio de pipetador automático, 5,0 mL de meio nº 2 de Grove-Randall com inóculo a 1,0% (v/v). Após a solidificação da camada semeada, foi distribuído um “template” de aço inoxidável em cada placa. Aplicou-se, com auxílio de pipetador automático, 200,0 µL das soluções descritas no item 6.2.7 e 6.2.8 em cada um dos orifícios. As placas foram incubadas a $35,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e, após 18 horas, realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição com auxílio de paquímetro digital.

6.2.10 Obtenção da curva analítica

Para a construção da curva analítica foram utilizados três pontos como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) para delineamento 3 x 3 e a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri são demonstradas pela Figura 11.

A curva analítica foi construída em gráfico logarítmico da concentração *versus* diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da SQR.

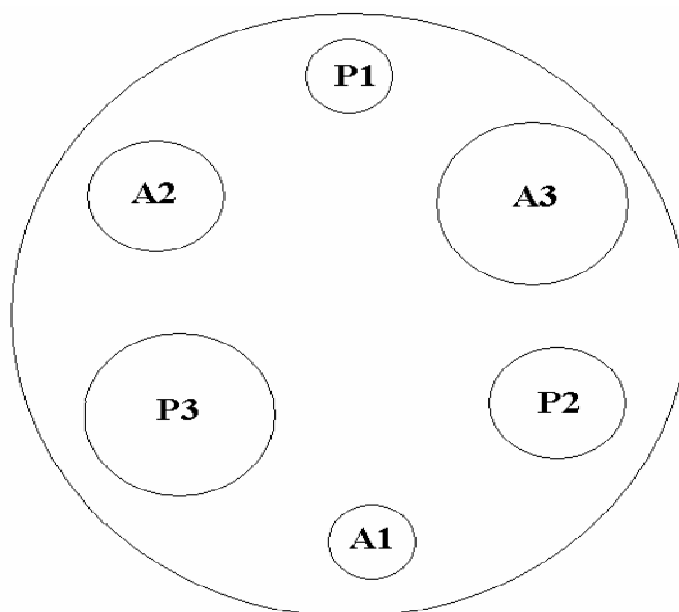


Figura 11. Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P1 (15 $\mu\text{g/mL}$); P2 (30 $\mu\text{g/mL}$); P3 (60 $\mu\text{g/mL}$) e A1 (15 $\mu\text{g/mL}$); A2 (30 $\mu\text{g/mL}$); A3 (60 $\mu\text{g/mL}$).

6.2.11 Cálculo da potência de ceftriaxona sódica

A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (1977). A equação 6 utiliza as médias dos halos de inibição obtidos com as três doses de ceftriaxona sódica SQR e forma farmacêutica, nas seis placas analisadas em cada ensaio.

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

$$M = F/b \quad b = E/l$$

Equação 6

em que:

$$F = 1/3 [(\bar{A}_1 + \bar{A}_2 + \bar{A}_3) - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2 + \bar{P}_3)]$$

l = logaritmo da razão das doses

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

6.2.12 Validação do método

6.2.12.1 Linearidade

A curva analítica foi construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, cada uma composta por seis placas, conforme descrito no item 6.2.9. 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 do paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.2.12.2 Precisão

A precisão foi avaliada pela realização de ensaios de doseamento de ceftriaxona sódica, durante quatro dias seguidos (item 6.2.10). Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.2.12.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação.

O teste de recuperação foi realizado com a finalidade de verificar a exatidão do método proposto da mesma forma que para o doseamento das soluções amostra, com a diferença que, a solução amostra estará adicionada de padrão, simulando a amostra de produto farmacêutico com potências de 80 (R1), 100 (R2) e 120 (R3)% em relação à ceftriaxona sódica SQR.

6.2.12.4 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) é calculada pela equação 7.

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{PR/PT}) \cdot 100$$

Equação 7

em que:

PR = potência encontrada nas amostras de recuperação

PT = Potência teórica

6.2.12.5 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições estabelecidas, tais como: tempo de incubação (18 e 24 horas), temperatura de incubação (25 e 30 °C), concentração do inóculo (1 e 1,2%) Realizou-se a análise de potência das amostras de ceftriaxona sódica em condições normais e alteradas paralelamente, avaliando a interferência das modificações no resultado final.

6.2.13 Resultados

Na determinação dos parâmetros para a padronização do ensaio microbiológico usando método de difusão em ágar para ceftriaxona sódica (Tabela 18), as cepas de *S. epidermidis* não apresentaram condições de utilização por apresentar crescimento menos intenso, halos mal delimitados e medidas irregulares nas faixas de concentração e diluentes testados. A cepa de *S. aureus* apresentou crescimento satisfatório, porém os halos de inibição formaram zonas duplas.

Portanto, optou-se por trabalhar com *Bacillus subtilis* ATCC 9371 IAL 1027, um modelo de bactéria esporulada, o crescimento do micro-organismo demonstrou-se bastante homogêneo e os halos de inibição formados apresentaram-se bem definidos, além da menor patogenicidade em relação aos outros micro-organismos.

Foi selecionado o meio nº 1 de Grove-Randall para a camada base e o meio nº 2 de Grove-Randall para camada superfície. A concentração do inóculo empregada deve ser suficiente para apresentar crescimento homogêneo do micro-organismo, propiciando um contraste com a zona de inibição de crescimento, sem apresentar colônias isoladas. Os melhores resultados e o crescimento mais uniforme foram obtidos com o inóculo com concentração de 1,0%, sendo a concentração de 0,5% insuficiente, considerando que a temperatura de incubação foi 35 ± 2 °C. Em soluções diluentes em diferentes pH, observou-se que em pH 6,0 os halos de inibição formados foram maiores e mais uniformes, sendo este pH compatível com o crescimento bacteriano e com a atividade do fármaco.

As concentrações do fármaco utilizadas na curva de dosagem devem estar em progressão geométrica, havendo relação linear entre o logaritmo da concentração e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento. As concentrações de 15, 30 e 60 µg/mL apresentaram excelentes resultados, avaliados através de análise estatística. Em relação à incubação, deve haver uma combinação entre tempo e temperatura para que o crescimento do micro-organismo seja uniforme e os halos formados de tamanho adequado. Os melhores resultados foram com 18 horas de incubação com temperatura de 35 ± 2 °C.

A Figura 12 mostra a fotografia da placa de Petri com os halos de inibição obtidos com as diferentes doses de ceftriaxona sódica SQR e forma farmacêutica.

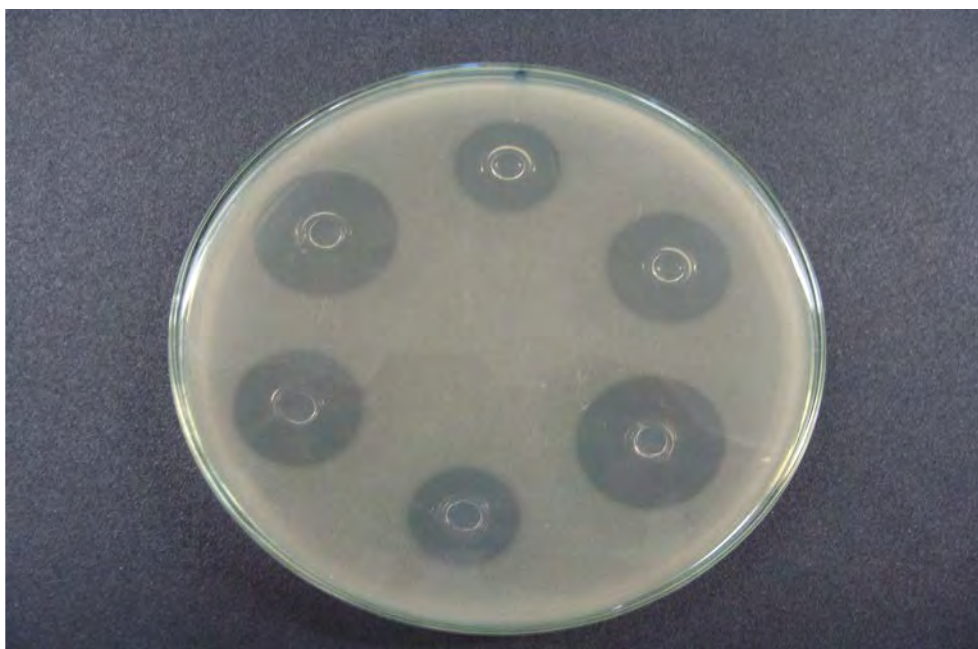


Figura 12. Placa de Petri com os halos de inibição de crescimento do micro-organismo *B. subtilis* ATCC 9371 IAL 1027, obtidos com as diferentes doses de ceftriaxona sódica SQR e forma farmacêutica.

6.2.13.1 Linearidade

Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções

em diferentes concentrações de ceftriaxona sódica SQR e forma farmacêutica encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20. Diâmetros dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico para avaliação de ceftriaxona sódica em produtos farmacêuticos – método difusão em ágar

	Diâmetro dos halos de inibição (mm) ^a					
	P1 (15 µg/mL)	P2 (30 µg/mL)	P3 (60 µg/mL)	A1 (15 µg/mL)	A2 (30 µg/mL)	A3 (60 µg/mL)
Dia 1	16,41	18,45	20,80	16,31	18,45	20,70
Dia 2	16,19	18,45	20,85	16,23	18,35	20,85
Dia 3	16,20	18,30	20,75	16,01	18,45	20,90
Diâmetro médio	16,27	18,40	20,80	16,18	18,42	20,82
CV%^b	0,76	0,47	0,24	0,96	0,31	0,50

^a média de seis determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

As curvas analíticas de ceftriaxona sódica SQR e amostra (Figura 13) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = 3,246 \ln(x) + 7,481$, com coeficiente de determinação (r^2) igual 0,9993, para a ceftriaxona sódica SQR e $y = 3,342 \ln(x) + 7,104$, com r^2 de 0,9999, para amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado.

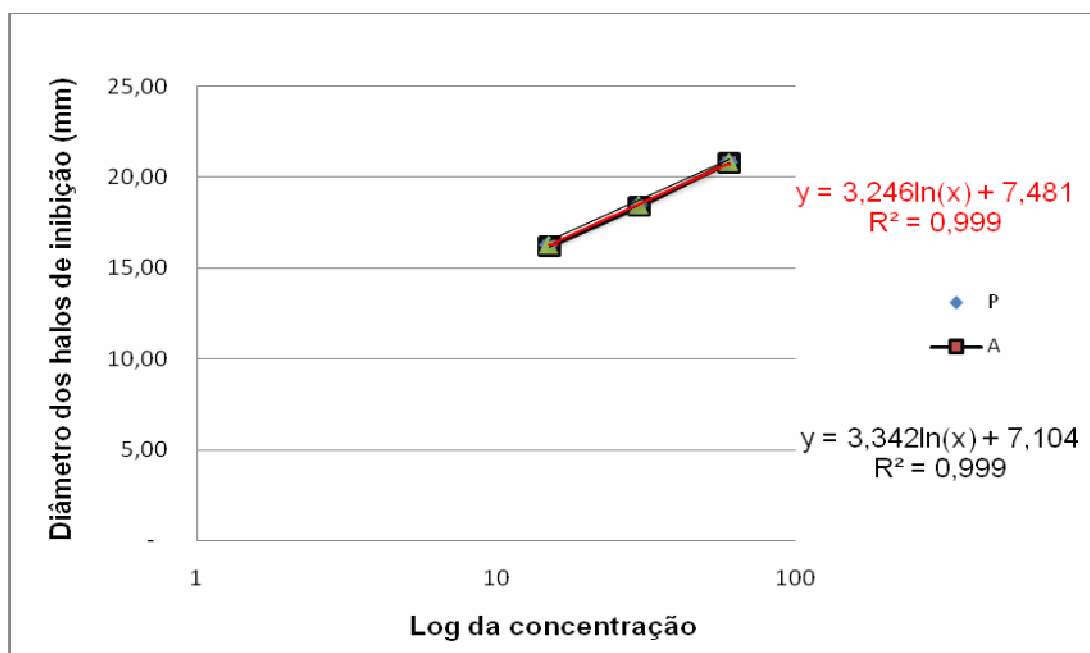


Figura 13. Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de ceftriaxona sódica SQR e amostra, em concentrações de 15,0; 30,0 e 60,0 $\mu\text{g/mL}$, obtidas pelo método microbiológico de difusão em ágar.

A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de ceftriaxona sódica é mostrada na Tabela 21.

Tabela 21. Análise de variância das medidas dos halos de inibição determinados na obtenção das curvas analíticas de ceftriaxona sódica, utilizando o método de difusão em ágar

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Preparação	1	0,0013	0,0013	0,1185	4,96
Regressão	1	63,0208	63,0208	5976,06*	4,96
Desvio de Paralelismo	1	0,0075	0,0075	0,71	4,96
Quadrático	1	0,0469	0,0469	4,45	4,96
Diferença de Quadrático	1	0,0025	0,0025	0,24	4,96
Entre doses	5	63,08	12,62	1196,31*	3,33
Entre placas	2	0,02	0,01	1,04	4,10
Dentro (erro)	10	0,105	0,01	-	-
Total	17	63,21	-	-	-

* Significativo para $p < 0,05$

De acordo com as farmacopeias britânica, europeia e brasileira, se o modelo de retas paralelas é utilizado, as duas linhas dose - resposta da amostra e da SQR devem ser paralelas e lineares nas concentrações utilizadas no cálculo.

Dentre as variáveis avaliadas no ensaio, aquelas que necessitam ser cumpridas para validar o método proposto estão à regressão linear e a variação entre doses, que devem ser significativas. A variação entre preparações, o desvio de paralelismo, desvio de linearidade e variação entre placas devem ser não-significativos (Tabela 21). Em todos os ensaios estas condições foram cumpridas.

6.2.13.2 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base nos coeficientes de variação para cada dose. Seis placas com três doses de ceftriaxona sódica SQR pó

liofilizado e de amostra foram analisadas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram coeficientes de variação inferiores a 0,96%. Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de uma amostra, em três dias consecutivos, obtendo-se valor experimental médio de potência de 98,95%, com CV de 1,61%. Os resultados obtidos na avaliação da precisão interdias são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores determinados de potência de ceftriaxona sódica na avaliação da precisão do método de difusão em ágar

Dia	Ceftriaxona sódica ^a		Potência média (%)	CV ^b (%)
	g/frasco	%		
1	0,9723	97,23	98,33	1,61
2	1,0015	100,15		
3	0,9761	97,61		

^a média de seis determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

6.2.13.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através do teste de recuperação. Utilizando a Equação 7, obteve-se valor médio de exatidão de 100,53%. Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados obtidos no teste de recuperação do método de difusão em ágar para determinação de ceftriaxona sódica pó liofilizado

	Ceftriaxona sódica SQR adicionada (µg/mL)	Ceftriaxona sódica SQR encontrada ^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV ^b (%)
R1	4,0	4,00	100,00	100,46	0,20
R2	10,0	10,05	100,50		
R3	16,0	16,14	100,88		

^a média de seis determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

6.2.13.4 Robustez

A robustez foi avaliada através de alterações no tempo e temperatura de incubação, bem como na concentração de inóculo. Na execução de análises do produto farmacêutico sob parâmetros alterados, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 1,28%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 24.

Tabela 24. Parâmetros determinados na avaliação da robustez do método microbiológico para análise de ceftriaxona sódica por difusão em ágar

Variável	Faixa Investigada	Ceftriaxona sódica ^a (g/frasco)	Ceftriaxona sódica ^a (%)	CV ^b (%)
Tempo de incubação (horas)	18	0,974	97,40	1,01
	24	0,992	99,23	
Temperatura de incubação (°C)	35	0,967	96,72	1,28
	30	0,962	96,29	
Concentração do inóculo (%)	1,0	0,980	98,03	1,12
	1,2	0,996	99,68	

^a média de seis determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

6.2.14 Discussão

O método microbiológico difusão em ágar utiliza o micro-organismo como revelador. O método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, através do qual a substância teste se difunde. É essencial que se trabalhe com réplicas, de forma a compensar os desvios, inerentes ao ensaio ou acidentais (PINTO & KANEKO & PINTO, 2010).

O ensaio microbiológico de antibióticos consiste na determinação da potência ou atividade biológica destes agentes; a quantificação de antibióticos por métodos químicos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e

espectrofotometria mostram-se precisos, porém não fornecem verdadeira indicação sobre a atividade biológica (ADAMS et al., 1998).

Este método apresenta como vantagem não requerer equipamentos especializados e dispendiosos, além de não utilizar solventes potencialmente tóxicos para o analista e para o meio ambiente. Os ensaios biológicos continuam sendo essenciais para o desenvolvimento e controle de qualidade de substâncias antimicrobianas (THOMPSON, 2000).

Na validação do método microbiológico de difusão em ágar, a análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de determinação de 0,9993 e 0,9999, para a substância química de referência e a amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado, respectivamente, foram satisfatórios para um ensaio biológico que possui conhecida variabilidade inerente. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra.

A precisão do método foi determinada através da avaliação de potência de ceftriaxona sódica, durante três dias consecutivos. O coeficiente de variação entre os teores foi 1,61%, sendo o teor médio de ceftriaxona sódica, calculado através da equação de Hewitt (1977), de 98,33%.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência foram adicionadas a amostra para quantificação da substância. A recuperação média foi de 100,46%, comprovando a exatidão do método proposto.

A análise estatística dos resultados de diâmetro dos halos obtidos foi matematicamente verificada pela análise da variância (ANOVA) e os resultados obtidos, com F significativo validam o método microbiológico para ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparações injetáveis (Tabela 21).

O método microbiológico proposto consiste em uma técnica que permite indicar a potência do fármaco estudado. Este método apresentou ser adequadamente sensível, linear, exato, preciso e robusto, segundo conceitos sobre validação apresentada na Farmacopeia Brasileira (2010) e por Riley & Rosanske (1997).

6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

6.3.1 Considerações gerais

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais modernas técnicas de separação e quantificação de substâncias em escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência, seletividade e sensibilidade.

Na indústria farmacêutica, é a maior e mais completa ferramenta de análise aplicada em todos os estágios de pesquisa, desenvolvimento e produção de fármacos (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

É um processo de separação em que os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases na coluna cromatográfica, uma fase móvel e outra fase estacionária. A fase estacionária pode ser sólida, porosa ou na forma de pequenas partículas. A fase móvel é sempre líquida, composta por solventes de diferentes polaridades (MEYER, 2010).

Sistemas em fase reversa são os mais comumente utilizados, sendo quase 90% das análises de amostras de baixo peso molecular. A elevada utilização se deve à habilidade de discriminar componentes muito semelhantes entre si e à facilidade de variação da retenção e seletividade (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A ceftriaxona sódica possui método oficial para análise por CLAE na Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010), USP (USP 33, 2010) e Farmacopeia Portuguesa (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005), as quais utilizam coluna C-18 (250 x 4,6 mm), fase móvel composta de 2,0 g de brometo de tetradecilamônio R e 2,0 g de brometo de tetra-heptilamônio R numa mistura de 440 mL de água R, 55 mL de solução tampão de fosfato de pH 7,0 (0,067 M) R, 5,0 mL de solução tampão de citrato de pH 5,0, preparada dissolvendo 20,17 g de ácido cítrico R em 800 mL de água R, ajustando o pH para 5,0 com solução concentrada de hidróxido de sódio R e completando com 1000,0 mL com água R, e 500 mL de acetonitrila R, sendo este o método recomendado por CLAE para determinação do fármaco em matéria-prima e em formas farmacêuticas.

Portanto, com o intuito de aperfeiçoar o sistema (melhorar a constituição da fase móvel, diminuir o desgaste da coluna, o tempo de análise, o gasto de

reagentes e, principalmente, minimizar a geração de resíduos) desenvolveu-se um novo método de análise para a determinação de ceftriaxona sódica pó liofilizado.

6.3.2 Ensaios preliminares

Diferentes sistemas cromatográficos foram testados com objetivo de encontrar condições favoráveis à quantificação do fármaco, redução dos danos à coluna, detecção qualitativamente de seus produtos de degradação.

6.3.3 Material

Foram utilizadas ceftriaxona sódica pó liofilizado SQR e amostra, descritas no item 4. Utilizaram-se como solventes: acetonitrila (JTBaker) e metanol (JTBaker) ambos grau HPLC; água purificada (Milli-Q); ácido fosfórico (Synth) grau analítico. Os reagentes utilizados foram solução aquosa de ácido acético, solução de ácido fosfórico, ácido tricloroacético diluído e trietilamina. As soluções foram filtradas através de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm (Sartorius) e degaseificadas em ultrassom (Unique) durante 30 minutos.

O sistema cromatográfico utilizado foi cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters® 2487. Foram utilizadas colunas Symmetry C18 Waters 5 µm (250 x 4,6 mm), Luna C₁₈ Phenomenex 5 µm (150 x 4,6 mm) e Agilent C₁₈ 5 µm (250 x 4,6 mm). As áreas dos picos foram integradas automaticamente usando o programa de *software* Empower 2.

6.3.4 Preparo das fases móveis

Para as fases móveis, preparam-se soluções aquosas de água e metanol, metanol e solução aquosa de ácido acético 1% e 0,5%, metanol e solução aquosa ácido acético 0,5% pH 3,5, metanol e solução aquosa ácido acético 0,5% pH 7,2, metanol e solução aquosa ácido acético 0,5% pH 6,8, metanol e água purificada pH 6,8 corrigido com TEA (trietilamina), metanol e água purificada pH 7,2 corrigido com TEA (trietilamina), acetonitrila e água purificada, acetonitrila e

solução aquosa ácido acético 0,5% pH 6,8, acetonitrila e água purificada pH 7,0 corrigido com TEA, acetonitrila e solução aquosa ácido fosfórico 0,025M pH 6,5, acetonitrila e solução aquosa ácido fosfórico 0,025M pH 2,5, acetonitrila e solução TEA 0,4% pH 6,9 ajustado com ácido tricloroacético. As fases móveis foram compostas de diferentes proporções das soluções e solventes e as misturas foram realizadas no equipamento. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom por 30 minutos para degaseificação antes do uso.

6.3.5 *Preparo da solução de ceftriaxona sódica SQR*

Foram pesados 10 mg de ceftriaxona sódica pó liofilizado SQR e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL para gerar soluções com a concentração final requerida.

6.3.6 *Preparo da solução de ceftriaxona sódica na forma farmacêutica*

O conteúdo de três frascos contendo 1 g ceftriaxona sódica pó liofilizado foi transferido para um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras, o equivalente a 10 mg de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparação injetável foi pesado e transferido para balão volumétrico de 50 mL, obtendo solução de 200 µg/mL. Partindo desta solução, volumes foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL. O cálculo da concentração e do teor de ceftriaxona sódica nas amostras foi realizado através das Equações 1 e 2.

6.3.7 *Método*

Ensaio preliminares foram efetuados utilizando os seguintes sistemas de fases móveis e colunas:

- 1- Água: metanol (80:20 v/v); coluna Agilent
- 2- Água: metanol (70:30 v/v); coluna Agilent
- 3- Água: metanol (40:60 v/v); coluna Agilent
- 4- Água: metanol (90:10 v/v); coluna Agilent
- 5- Metanol: solução de ácido acético 1% (80:20 v/v); coluna Agilent

- 6- Metanol: solução de ácido acético 0,5% (80:20 v/v); coluna Agilent
- 7- Metanol: solução de ácido acético 0,5% pH 3,5 (80:20 v/v); coluna Phenomenex
- 8- Metanol: solução de ácido acético 0,5% pH 7,2 (80:20 v/v); coluna Agilent
- 9- ACN: solução de ácido acético 0,5% pH 7,2 (70:30 v/v); coluna Agilent
- 10- ACN: solução de ácido acético 0,5% pH 6,8 (80:20 v/v); coluna Agilent
- 11-ACN: solução de ácido acético 0,5% pH 7,2 (70:30 v/v); coluna Phenomenex
- 12- ACN: solução de ácido fosfórico 0,025 M pH 5,0 (80:20 v/v); coluna Phenomenex
- 13- ACN: solução de ácido fosfórico 0,025 M pH 6,5 (80:20 v/v); coluna Phenomenex
- 14-ACN: solução de TEA 0,4% pH 6,9 (80:20 v/v); coluna Phenomenex
- 15-ACN: água pH 7,0 (80:20 v/v); coluna Waters
- 16-ACN: água pH 7,0 (70:30 v/v); coluna Waters
- 17-ACN: água pH 7,0 (40:60 v/v); coluna Waters

As condições cromatográficas otimizadas para a determinação de ceftriaxona sódica estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros otimizados para a determinação de ceftriaxona sódica pelo método CLAE

Fase móvel	Acetonitrila: água (40:60) v/v, pH 7,0 ajustado com TEA
Coluna	Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 µm
Deteção	241 nm
Vazão	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 ± 2 °C
Tempo de retenção	2,5 minutos

6.3.8 Validação do método analítico por HPLC

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (ICH, 2005; USP 33, 2010). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

- **Linearidade:** para validação do método, sete concentrações (8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 e 20,0 µg/mL) de ceftriaxona sódica pó liofilizado SQR e da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a ANOVA foi realizado (Tabela 27).

- **Seletividade:** A seletividade é a capacidade de um método analítico medir a resposta do analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005). Para análise qualitativa de seletividade/especificidade (teste de identificação) é necessário que o teste demonstre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes.

A capacidade indicadora de estabilidade do método foi determinada de modo qualitativo submetendo a solução amostra de ceftriaxona sódica pó liofilizado (14 µg/mL) à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica para avaliar a interferência na quantificação de ceftriaxona sódica pó liofilizado.

A solução da amostra foi preparada em HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M na hidrólise ácida e básica, respectivamente. Ambas as soluções foram aquecidas a 70 °C, resfriadas e neutralizadas. Para estudo da condição neutra, a amostra dissolvida em água foi aquecida a 70 °C. A degradação oxidativa foi induzida dissolvendo a amostra em solução de peróxido de hidrogênio 3%, mantendo por 15 minutos à temperatura ambiente. A fotodegradação foi induzida expondo as amostras à luz ultravioleta UVC (200 W h m²) por 48 horas. As hidrólises neutra, ácida e básica também foram avaliadas à temperatura ambiente.

- **Precisão:** repetibilidade e precisão (intermétodo) foram determinadas. A repetibilidade do método foi estudada pelas análises das amostras em seis determinações sucessivas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista. A precisão intermediária foi avaliada através de análises executadas por diferentes analistas e em diferentes dias, usando os mesmos lotes de amostras e método (Tabela 29).

A concentração de ceftriaxona sódica nas amostras foi obtida através da Equação 1:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Equação 1

Em que:

A_A = Área média absoluta das amostras

A_{SQR} = Área média absoluta da SQR

C_A = Concentração de ceftriaxona sódica na amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

O valor percentual de ceftriaxona sódica nas amostras foi calculado pela Equação 2.

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Equação 2

Em que:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de ceftriaxona sódica encontrado na amostra

C_T = Concentração teórica de ceftriaxona sódica na amostra

- **Exatidão:** A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 26, em triplicata.

Tabela 26. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico para ceftriaxona sódica pó liofilizado

	Ceftriaxona sódica amostra (50 µg/mL) (mL)	Ceftriaxona sódica SQR (50 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	1,6	-	8,0
R1	1,6	0,64	11,2
R2	1,6	1,20	14,0
R3	1,6	1,76	16,8
Padrão	-	1,60	8,0

*Balão volumétrico de 10 mL

A percentagem de ceftriaxona sódica recuperada foi calculada pela Equação 8 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(C_R - C_A) / C_P] \times 100$$

Equação 3

Em que:

C_R = concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

C_A = concentração encontrada da amostra (µg/mL)

C_P = concentração teórica adicionada da solução da SQR (µg/mL)

- **Robustez:** a robustez do método foi determinada pela variação dos parâmetros analíticos pH da fase móvel, vazão, a porcentagem de acetonitrila, comprimento de onda e a marca da acetonitrila. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao coeficiente de variação dos valores das áreas.

- **Limite de detecção:** foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A fórmula usada para o cálculo está representada na Equação 4.

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

Equação 4

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

- **Limite de quantificação:** foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em três replicatas. O cálculo foi realizado segundo a equação 5.

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

Equação 5

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.3.9 Teste de performance do sistema cromatográfico

Para assegurar o desempenho do cromatógrafo a líquido antes e durante a realização das análises, efetuaram-se sete injeções de ceftriaxona sódica SQR na concentração de 14 $\mu\text{g/mL}$, avaliando o coeficiente de variação percentual dos parâmetros de assimetria do pico, número de pratos, tempo de retenção e área do pico do padrão.

6.3.10 Resultados

O cromatograma típico obtido pelo método proposto, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente à ceftriaxona sódica pó liofilizado é demonstrado na Figura 14. O tempo de retenção observado (2,6 minutos) permitiu rápida determinação do fármaco, permitindo a sua aplicação em controle de qualidade.

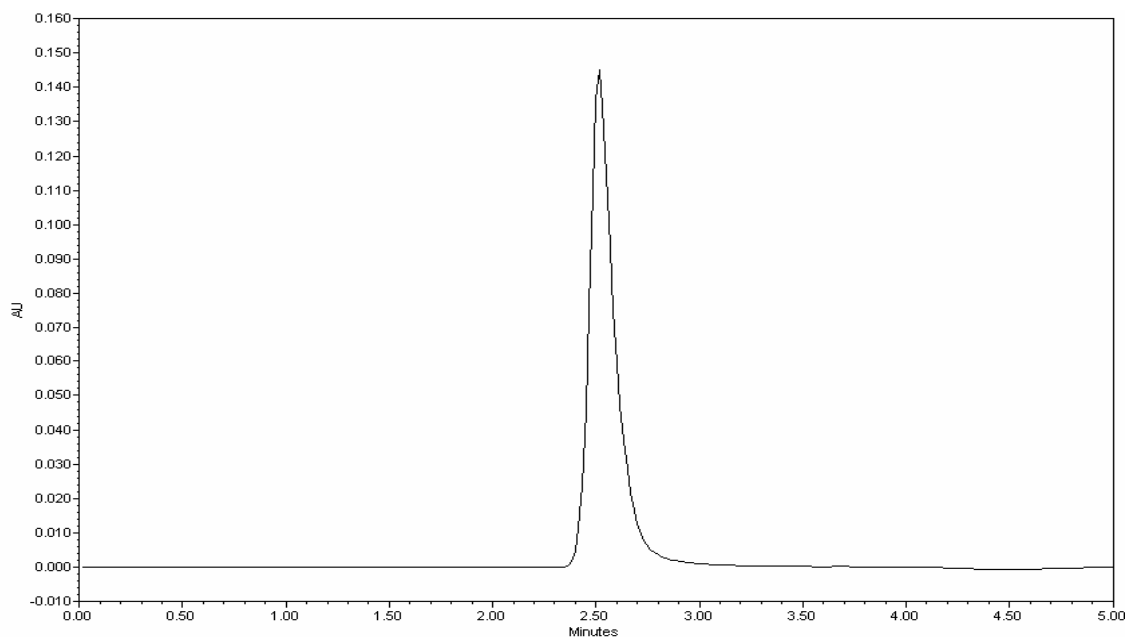


Figura 14. Cromatograma de ceftriaxona sódica SQR pó liofilizado (14 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 µm.

6.3.10.1 Seletividade e estudos de degradação forçada

A degradação forçada foi realizada para obter a indicação das propriedades indicadoras de estabilidade do método analítico de modo qualitativo. As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 mostram os cromatogramas obtidos após as degradações oxidativa, ácida, básica, fotolítica e neutra, respectivamente. Assim, demonstrou-se a seletividade do método proposto para a análise de produtos farmacêuticos de ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparações injetáveis.

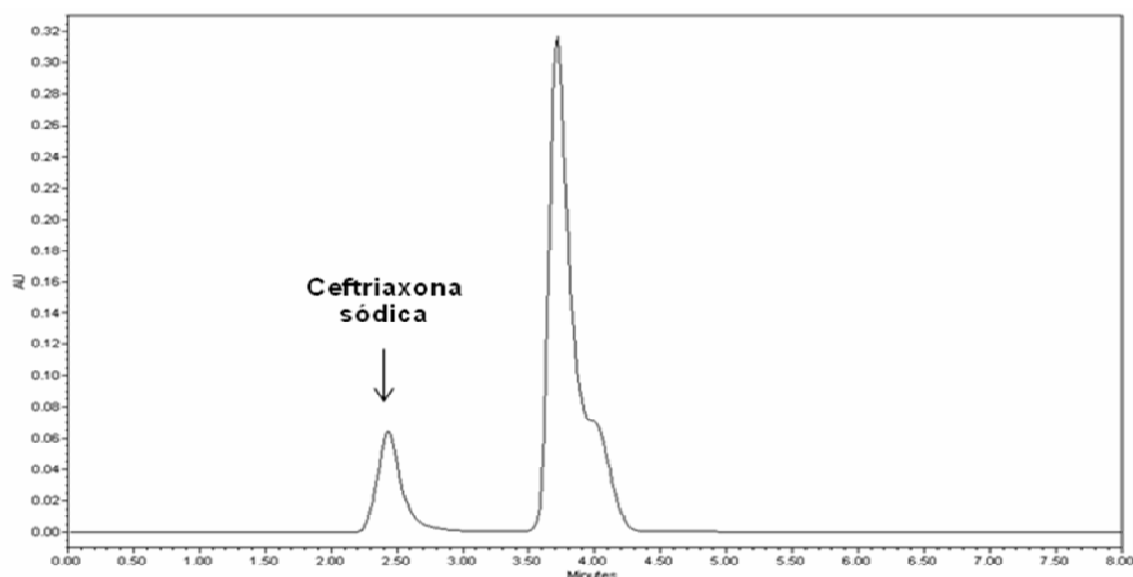


Figura 15. Cromatograma de ceftriaxona sódica pó liofilizado (14 $\mu\text{g/mL}$) submetida à degradação em meio oxidativo (peróxido de hidrogênio 3%) após 15 minutos. Fase móvel: acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 μm .

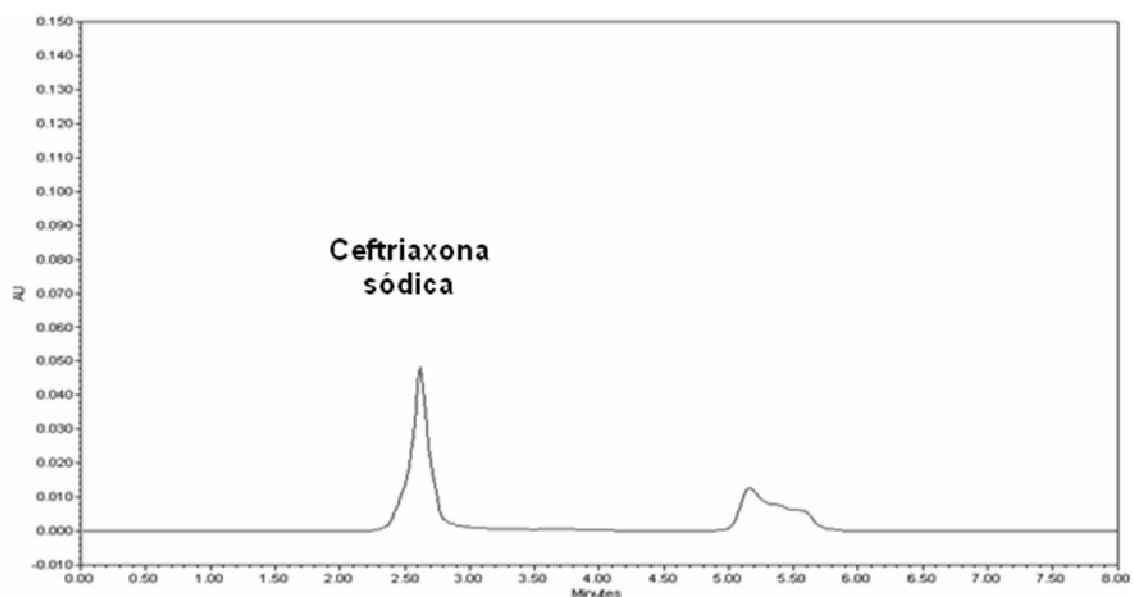


Figura 16. Cromatograma de ceftriaxona sódica pó liofilizado (14 $\mu\text{g/mL}$) submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) após 2 horas a 70 °C. Fase móvel: acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 μm .

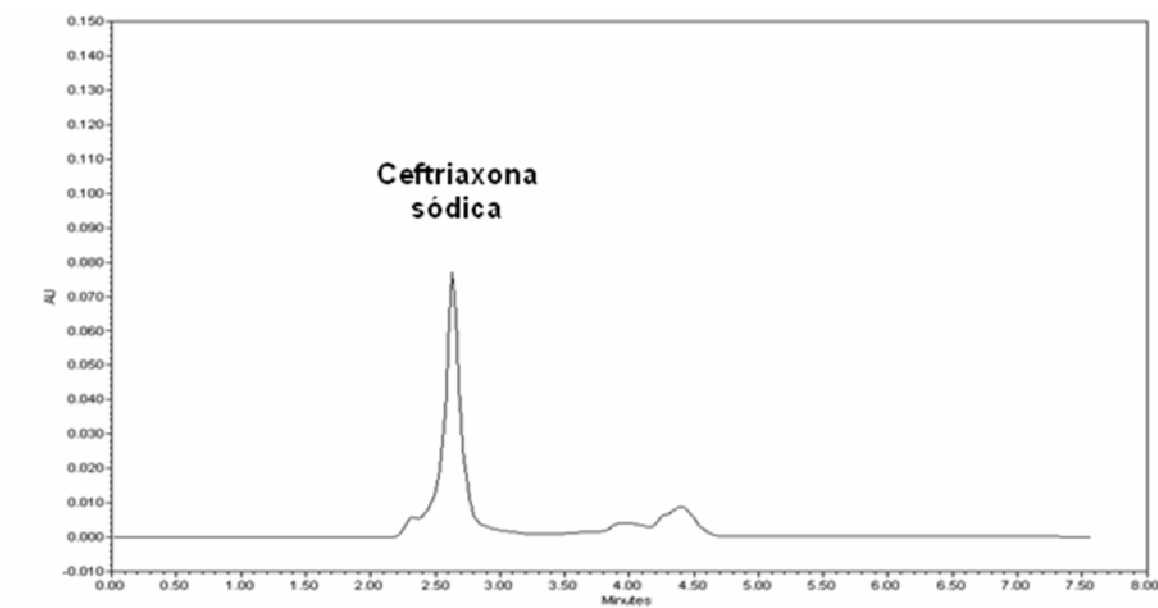


Figura 17. Cromatograma de ceftriaxona sódica pó liofilizado (14 $\mu\text{g/mL}$) submetida à degradação em meio básico (NaOH 0,1 M) após 24 horas a 70 °C. Fase móvel: acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 μm .

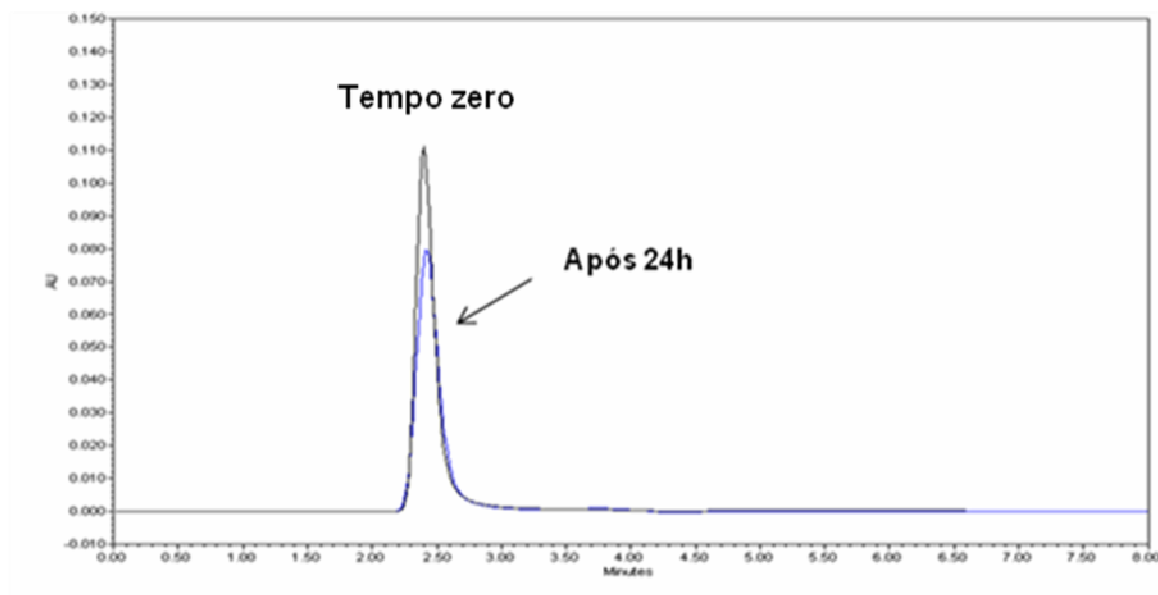


Figura 18. Cromatograma de ceftriaxona sódica pó liofilizado (14 $\mu\text{g/mL}$) submetida à degradação na luz ultravioleta UVC no tempo zero e após 24 horas. Fase móvel: acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 μm .

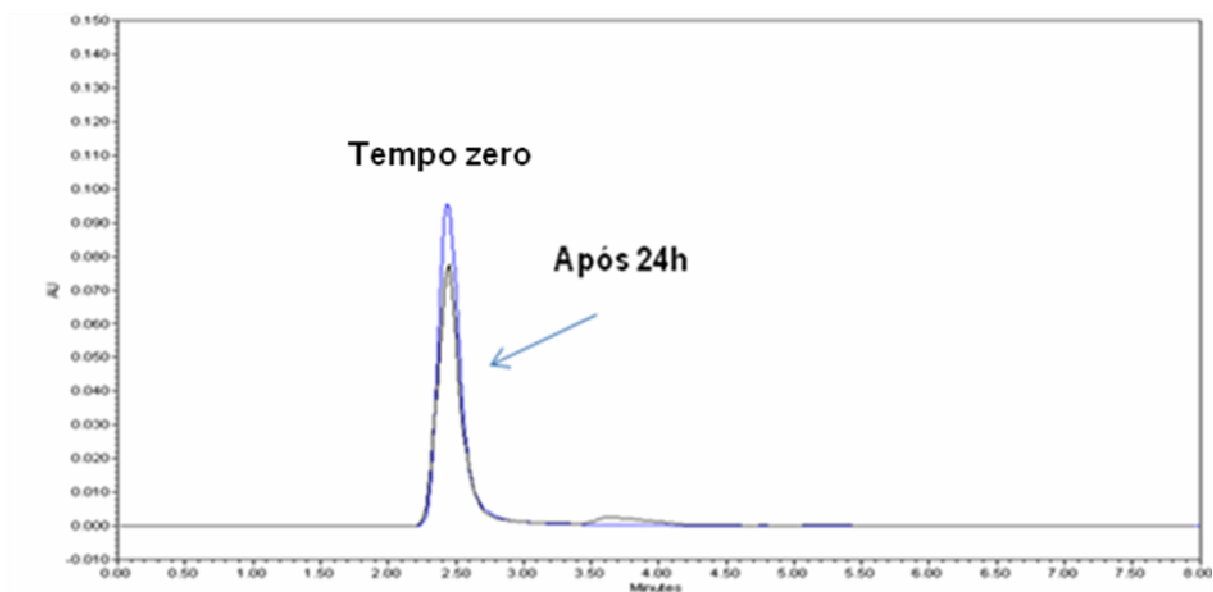


Figura 19. Cromatograma de ceftriaxona sódica pó liofilizado (14 µg/mL) submetida à degradação em meio neutro (água) no tempo zero e após 24 horas a 70 °C. Fase móvel: acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 µm.

6.3.10.2 Linearidade

Na Tabela 27 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de ceftriaxona sódica SQR.

Tabela 27. Valores das áreas referentes ao pico de ceftriaxona sódica SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área ^a (AU)	Área média \pm DP ^b	CV ^c (%)
8	655405 653056 645158	651207 \pm 5367,94	0,82
10	834178 820847 841687	832238 \pm 10554,85	1,26
12	1021624 1021266 1030742	1024544 \pm 5370,70	0,52
14	1195082 1185012 1206869	1195654 \pm 10939,91	0,91
16	1387674 1359815 1376338	1374609 \pm 14009,92	1,01
18	1559055 1532757 1576398	1556070 \pm 21973,23	1,41
20	1761380 1730767 1765161	1752436 \pm 18860,78	1,07

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cCV = Coeficiente de variação

Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foram plotados em relação à respectiva concentração, observando-se linearidade adequada na faixa de 8 a 20 $\mu\text{g/mL}$, conforme ilustrado na Figura 20.

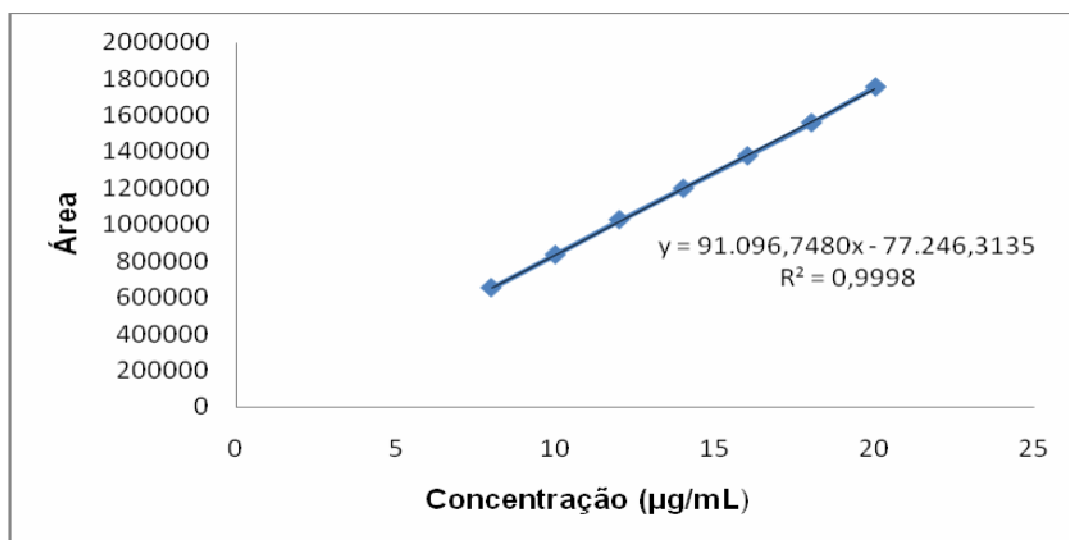


Figura 20. Curva analítica da ceftriaxona sódica SQR obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: acetonitrila:água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA. Fase estacionária: Symmetry C18 Waters (250 x 4,6 mm) 5 µm.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ceftriaxona sódica SQR é apresentada na Tabela 28

Tabela 28. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ceftriaxona sódica SQR, utilizando o método por CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	2792684157017	465447359503	2596,04*	2,85
Regressão linear	1	2791979306432	2791979306432	15572,32*	4,6
Desvio da Linearidade	5	704850585	140970117	0,79	2,96
Resíduo	14	2510076010	179291144		
Total	20	2795194233028			

*Significativo para $p < 0,05\%$

A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, no limite de confiança de 5%.

6.3.10.3 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação. Seis soluções de ceftriaxona sódica SQR preparadas na concentração de 14 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram CV de 0,51%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises do padrão e da amostra, em três dias consecutivos, obtendo-se valor experimental de teor médio de 98,58%, com CV de 1,9%. Na precisão entre-analistas avaliadas por dois analistas o valor experimental médio foi de 98,02%, com CV de 1,65%, conforme demonstrado na Tabela 29.

Tabela 29. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para de ceftriaxona sódica pó liofilizado por CLAE

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (g/frasco)	Teor ^a (%)	CV ^b (%)		Teor ^a (g/frasco)	Teor ^a (%)	CV ^b (%)
	1	0,980	98,04		A	0,991	99,17	1,65
1	2	1,006	100,66	1,90	B	0,968	96,88	
	3	0,970	97,03					

^a média de três determinações

^b CV% = coeficiente de variação percentual

6.3.10.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. Na Tabela 30 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método cromatográfico.

Tabela 30. Determinação da exatidão do método analítico para análise ceftriaxona sódica pó liofilizado por CLAE

	Ceftriaxona sódica SQR adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Ceftriaxona sódica SQR encontrado ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV ^b (%)
R1	3,2	3,19	99,70		
R2	6,0	6,04	100,73	100,43	0,60
R3	8,8	8,87	100,87		

^a média de três determinações

^bCV = coeficiente de variação

6.3.10.5 Limites de detecção e de quantificação

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico foi 0,46 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ calculado foi 1,4 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.10.6 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas modificações nos parâmetros do método, tais como: vazão, pH, concentração da acetonitrila da fase móvel, comprimento de onda e marca da acetonitrila. Na execução de análises de sob parâmetros alterados de modo isolado, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação obtiveram média de 0,85%,

comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 31.

Tabela 31. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ceftriaxona sódica por CLAE

Variável	Faixa Investigada	Ceftriaxona sódica ^a (g/frasco)	Ceftriaxona sódica ^a (%)	CV ^b (%)
pH da fase móvel	6,5	1,001	100,11	0,87
	7,0	1,001	100,17	
	7,5	1,016	101,62	
Vazão (mL/min)	0,5	1,011	101,13	0,89
	0,6	1,000	100,03	
	0,7	0,993	99,36	
Acetonitrila (%)	35	55,58	100,54	0,49
	40	55,03	100,37	
	45	55,65	101,31	
Comprimento de onda	239 nm	0,996	99,66	0,53
	241 nm	1,007	100,71	
	243 nm	1,000	100,01	
Marca da acetonitrila	J. T. Baker	0,995	99,56	1,60
	Tedia	1,018	101,85	

^a média de três determinações

^bCV = coeficiente de variação

6.3.10.7 Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi verificada pela análise quantitativa, através do cálculo dos coeficientes de variação da assimetria do pico, fator de capacidade, número de pratos da coluna, tempo de retenção e área do pico principal de seis replicatas de ceftriaxona sódica SQR. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 32.

Tabela 32. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de ceftriaxona sódica

Parâmetros avaliados					
	Assimetria ($\leq 2,0$)	Fator de Capacidade ($>2,0$)	Pratos (>2000)	Tempo de retenção (min)	Área
	1,10	2,12	2404,47	2,50	1191152
	1,10	2,11	2385,31	2,50	1215878
	1,11	2,15	2445,14	2,50	1207881
	1,10	2,13	2423,63	2,48	1237470
	1,10	2,10	2481,51	2,49	1247855
	1,10	2,12	2404,45	2,50	1227023
Média	1,10	2,13	2424,08	2,50	1221210
CV^a (%)	0,37	1,05	1,43	0,33	1,68

^a CV% = coeficiente de variação percentual.

6.3.11 Discussão

Dentre os métodos modernos de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

Na cromatografia líquida as espécies que estão sendo analisadas sofrem influência da fase estacionária, e ao mesmo tempo as suas propriedades destas são influenciadas pela fase móvel. Há necessidade de combinação de condições experimentais como: tipo de coluna, fase móvel e sua composição, vazão, temperatura e quantidade de amostra injetada (CIOLA, 1998).

A adequação do sistema (*system suitability*) visa verificar a validação do instrumento e da metodologia analítica simultaneamente e tem como objetivo mostrar que o método apresenta precisão e exatidão (LANÇAS, 2010).

Embora a ICH não estabeleça um número para este parâmetro, em geral considera-se que o número de pratos deve ser ≥ 2000 (FDA, 1999). O fator

de assimetria do pico cromatográfico deve ser ≤ 2 (FDA, 1999). À medida que este valor aumenta o procedimento de integração, e, por conseguinte, a exatidão e precisão do método são menos confiáveis (FDA, 1999; USP 33, 2010).

O método proposto cromatográfico por fase reversa foi validado de acordo com parâmetros de validação preconizados em guias internacionais (ICH, 2005). A separação foi alcançada com tempo de corrida de 2,5 min (Figura 21).

O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 8 a 20 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0,9998$. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV de 0,51% o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Pode ser observado na Tabela 30, o valor médio experimental de 100,43%, confirmando exatidão significativa.

As propriedades indicadoras de estabilidade do método são avaliadas por estudos de degradação forçada. Todas as condições avaliadas nos estudos de degradação forçada em diversas condições de estresse, ácida, básica, oxidativa e fotolítica, para verificar a estabilidade preliminar de ceftriaxona sódica pó liofilizado para solução injetável foi possível afirmar que houve degradação do fármaco e a presença de produtos de degradação nas Figuras 15,16 e17.

Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 0,46 e 1,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade ceftriaxona sódica pó liofilizado para preparações injetáveis.

A robustez foi avaliada pelos parâmetros de modo isolado e confirmou a robustez do método (Tabela 31). Por sua vez, os dados obtidos na verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico (Tabela 32) mostraram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, a qual sugere que a assimetria do pico deve ser ≤ 2 , o fator de capacidade > 2 e o número de pratos > 2000 .

Em geral, também é adotado como critério valor de CV% $\leq 2\%$ para todos os parâmetros testados (FDA, 1999; ICH, 2005; USP 33, 2010).

Portanto, o método proposto cumpre com os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregado para análise de ceftriaxona sódica pó liofilizado na indústria farmacêutica.

O método apresenta vantagens em relação aos encontrados em farmacopeias para a determinação de ceftriaxona sódica em pó liofilizado para preparação injetável, uma vez que não emprega tampões na fase móvel, a vazão utilizada é menor e a fase móvel é muito simples, baixo custo e baixa geração de resíduos. Estas vantagens associadas à alta exatidão e precisão, tornam o método adequado para o uso rotineiro no controle de qualidade.

ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

7.1 Análise comparativa dos métodos

É frequentemente necessária a comparação de métodos para determinar se a variabilidade dos procedimentos difere de forma significativa. Os ensaios de comparação devem prover dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP33, 2010).

Com o objetivo de estabelecer a comparação entre os métodos propostos para determinação de ceftriaxona sódica foi realizada análise estatística dos teores médios de ceftriaxona sódica obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos na determinação quantitativa de ceftriaxona sódica, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33. Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando espectrofotometria na região do ultravioleta, doseamento microbiológico pelo método por difusão em ágar e CLAE

Amostra	Métodos		
	CLAE	Ultravioleta	Difusão em ágar
1	100,66%	100,10%	100,15%
2	98,04%	99,11%	97,23%

Tabela 34. Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de ceftriaxona sódica, pelos métodos propostos

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamentos	2	0,8919	0,445	0,16	9,55
Resíduo	3	8,18545	2,7284		
Total	5	9,0773			

7.2 Discussão

Os resultados obtidos através de ANOVA demonstram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para o nível de significância de 5%. Desta forma, os métodos validados são equivalentes, ou seja, o resultado comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa do fármaco em pó liofilizado para preparações injetáveis.

Os resultados mostraram que os valores calculados de F e t não excederam o valor teórico com 95% de confiança (RODRIGUES, 1986). Estes resultados indicam que o método proposto não difere significativamente do método oficial, ou seja, não existe diferença entre os métodos analisados.

Todos os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamento oficiais, e apesar de demonstrarem intercambialidade, cada método possui características próprias. Entretanto, alguns métodos são mais específicos e adequados para análise de rotina em laboratórios.

O método espectrofotométrico é simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas pode não ser específico para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação na amostra.

Os ensaios microbiológicos são importantes, pois fornecem informação sobre a potência do produto farmacêutico, devendo ser aplicados em paralelo com métodos físicos, a fim de assegurar a eficácia terapêutica de antimicrobianos, entretanto, necessitam de maior tempo de execução.

O método cromatográfico é específico e apropriado para determinação de produtos de degradação e impurezas. No entanto, possui alto custo e maior formação de resíduos.

O desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade de fármacos e medicamentos envolve a busca constante da confiabilidade dos resultados, visto que as análises efetuadas são determinantes para a liberação ou rejeição de um produto farmacêutico.

Essa confiabilidade é alcançada a partir da validação dos métodos analíticos. A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida. As características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida (RILEY & ROSANSKE, 1996).

CONCLUSÕES

8. Conclusões

No presente trabalho foi possível desenvolver e validar novos métodos para determinação quantitativa de ceftriaxona sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis, verificando-se a importância dos parâmetros de validação realizados para a aceitabilidade de cada novo método proposto.

Os métodos para as análises qualitativas permitiram caracterizar o fármaco através dos métodos por espectrofotometria nas regiões do infravermelho e ultravioleta, mostrando-se adequados para a identificação do fármaco no produto farmacêutico.

As determinações de faixa de fusão, umidade, solubilidade e caracteres físicos permitiram verificar a possível presença de impurezas na SQR. A partir dos resultados obtidos, foi possível conhecer algumas características da ceftriaxona sódica, sendo possível estabelecer bases para identificação de ceftriaxona sódica em produtos farmacêuticos.

O método por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou ser preciso, linear, exato, robusto fornecendo resultados de acordo com os parâmetros preconizados para avaliação de fármacos em produtos farmacêuticos.

O método microbiológico por difusão em Agar foi validado e apresentou parâmetros adequados para determinação de potência de ceftriaxona sódica. O método microbiológico mostrou-se capaz de quantificar o fármaco em pó liofilizado através da sua atividade frente ao micro-organismo utilizado.

O método espectrofotométrico na região do ultravioleta demonstrou ser específico, preciso, exato e robusto, estando de acordo com os parâmetros preconizados na legislação para avaliação de fármacos em produtos farmacêuticos.

A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa de ceftriaxona sódica por CLAE, método microbiológico por difusão em ágar, espectrofotometria nas regiões do ultravioleta não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho contribuem para estabelecer bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica e procedimentos importantes para aprimorar o controle de qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica da ceftriaxona sódica em pó liofilizado para preparações injetáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

ADAMS, E.; LIU, L.; DIERICK, K.; GUYOMARD, S.; NABET, P.; RICO, S.; LOUIS, P.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography? **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, p. 757-766, 1998.

AL-MONANI, I.F. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.25, p.751-757, 2001.

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. **Drug Evaluation**: cephalosporins and related agents. Chicago (IL): AMA, 1992.

AMIN, A.S.; RAGAB, G.H. Spectrophotometric determination os certain cephalosporins in pure form and in pharmaceutical formulations. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 60, n12, p.2831-2835, 2004.

ANDREWS, J.M. Microbiological Assays. In: REEVES, D.S.; ISE, R.; ANDREWS, J.M.; HITE, L.O. (Ed). **Clinical antimicrobial assays**. New York: Oxford University, 1999. cap. 4. p. 35-44.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1

BRITISH Pharmacopeia. London: The Stationary Office, 2010. v.2. p.347, 348.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais- RENAME. 5.ed. Brasília, DF, 2007. 286p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução no 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, 02 jun. 2003.

BRUNTON, L.L. (Ed.) **GOODMAN & GILMAN**: The pharmacological basis of therapeutics. 11th. ed. New York: McGraw Hill, 2010. p.1028-1034.

CECMED. Centro para el control estatal de La ciudad de los medicamentos. Validation de metodos analiticos, regulación n^o 41. Ministerio de Salud Republica, Cuba, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo, Edgar Blucher, 1998.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. 33.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2006.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. 33.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2007. FARMACOPEIA brasileira. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

EL-SHABORURY, S.R.; SALEH, G.A.; MOHAMED, F.A.; RAGEH, A.H. Analysis of cephalosporin antibiotics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.45, p.1-19, 2007.

FARMACOPEIA EUROPEAN. 7.th. Council of Europe, 2011. v.2. p.1626-1627

FARMACOPEIA portuguesa. 6.ed. Lisboa: Imprensa Nacional, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Validation of chromatographic methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1999.

FUKOMOTO, K.; AINDA, S.; OISHI, T.; VENO, K. Pharmacokinetics of Ceftriaxone, a third-generation cephalosporin, in pediatric patients. **Bio. Pharm. Bull.**, p.1139-1141, 2009.

GUIA DE REMÉDIOS. São Paulo: Escala, 2008.

GUIA DE REMÉDIOS. São Paulo: Escala, 2009.

GRAHAME–SMITH, D.G.; ARONSON, J.K. **Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.472, 473.

GRAHAM, P.L. **Pharmaceutical chemistry**: an Introduction to medicinal chemistry. London, 1995. p.201-202.

GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for determination of lomefloxacin in coated tablets. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 4, p. 1077-1079, 2006.

HADLEY, J.A.; FRITSCH, T.R. The role of newer orally administered cephalosporins in contemporary outpatient practice. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 3, p. S1-S3, 2007.

HARB, G.; LEBEL, F.; BATTIKHA, J.; THACKARA, J. W. Safety and Pharmacokinetics of subcutaneous ceftriaxone administered with or without recombinant human hyaluronidase (rHuPH20) versus intravenous ceftriaxone administration in adult volunteers. **Curr. Med. Res. Opin.**, p.279-288, 2010.

HEWITT, W. **Microbiological assay**. New York: Academic Press, 1977. p.41-42.

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. **Anal. Letters**, v. 42, p. 2180-2190, 2009.

IIDA, S.; KINOSHITA, H.; KAWANISHI, T.; HAYASHI, M. The pharmacokinetics of ceftriaxone based on population pharmacokinetics and prediction of efficacy in Japanese adults **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v.34 n.2, p.107-115, 2009.

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

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures**: text and methodology Q2(R1). Geneva, 2005.

JONES, R.; SADER, H.S.; FRITSCH, T.R.; POTTUMARTHY, S. Comparisons of parenteral broad-spectrum cephalosporins tested against bacterial isolates from pediatric patients: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (1998–2004). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 1, p. 109-116, 2007.

JONES, R.N.; VARNAM, D.J. Antimicrobial activity of broad-spectrum agents tested against Gram-negative bacilli resistant to ceftazidime: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (North America, 2001). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 44, p. 379-382, 2002.

JURAN, J.M. **Planejando para qualidade**. São Paulo: Pioneira, 1990. 394 p.

KARCHMER, A.W. Cephalosporins. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Ed. **Principles and practice of infectious diseases**. 5.th. Philadelphia, Churchill-Livingstone, 2000. p. 274-291.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 11, p. 150-151.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica & clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.623,624.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 3, 11, 12.

KIMURA, S.; ISHIGURO, M.; ISHII, Y.; ALBA, J.; YAMAGUCHI, K. Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 1454-1460, 2004.

KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; SAIFON, P.; LAESRIPA, C.; KITPHATI, R.; MUNDY, L.M. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, n. 3, p. 349-355, 2007.

KOOMANACHI, P.; BULIK, C.C.; KUTI, J.L.; NICOLAU, D.P. Pharmacodynamic modeling of intravenous antibiotics against Gram-negative bactericide collected in The United States. **Clin. Therap.**, p.766-779, 2010.

KOROLKOVAS, A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

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

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 4. ed. São Carlos: RiMa, 2010.

LEVISON, M.E.; LEVISON, J.H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, p.791-815, 2009.

LIU, H.; QIU, S.L. Determination of ceftriaxone sodium by HPLC. **Chin. J. Antib.**, p.273-276, 2002.

LIVERMORE, D.M. Tigecycline: What is it, and where should it be used? **J. Antimicrob. Chem.**, v.56, p. 611-614, 2005.

MARANHÃO, M. **Iso Serie 9000 Versão 2000**. 8. ed. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2006.

MARSHALL, W.F.; BLAIR, J.E. The cephalosporins. **Mayo Clin. Proc.**, v.74, p.187-195, 1999.

MARTINDALE: **The Complete drug reference**. 35. th. London: Chicago Pharmaceutical Press, 2007.

MCWHINNEY, B.C.; WALLIS, S.C.; HILLISTER, T.; ROBERTS, J.A.; LIPMAN, J.; UNGENER, J.P.J. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 878, p. 2039-2043, 2010.

MENDEZ, A.S.L.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 33, p. 947-954, 2003.

MEYER, V.R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 15. th. West Sussex: John Wiley & Sons, 2010. p.17.

MOELLERING, R.C.; SENTOCHNIK, D.C. Cephalosporins. In: GORBACH SL, BARTLETT JG, BLACKLOW N.R., (Ed) **Infection. Disease**. 2.th. Philadelphia, WB Saunders, 1998, p. 185-197.

MORENO, A.H. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis contendo ceftazidima**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara. 2005.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **J. AOAC Int.**, v.90, n.5, p.1379-1382, 2007.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of HPLC method for determination of ceftazidime. **J. AOAC Int.**, v. 91, p. 739-743, 2008 a.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometric determination of ceftazidime in pharmaceutical preparations using neocuproin as a complexing agent. **Anal. Lett.**, v.41, n.12, p.2143-2152, 2008 b.

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

NEMUTLU, E.; KIR, S. Determination of the cephalosporins selected from third and forth generation in biological material originated from human by HPLC. **Hac. Univ. J. Fac. Pharm.**, v. 28 n2, p. 185-207, 2008.

NEMUTLU, E.; KIR, S.; KATLAN, 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 cefpirazone. **Talanta**, p.117-126, 2009.

NUNES, R.R. Profilaxia antibiótica em cirurgia urológica - proposta de protocolo simplificado. **Acta Urol.**, v. 23, n. 4, p. 91-99, 2006.

OHANNESIAN; S. **Handbook of pharmaceutical analysis**. New York: Informa HealthCare, 2002. p.47.

OMAR, M.A.; ABDELMAGEED, O.H.; ATTIA, T.Z. Kinetic spectrofluorimetric determination of certain cephalosporins in human plasma. **Talanta**, v. 77, p. 1394-1404, 2009.

ORDONEZ, A.A.L.; ORDONEZ, R.M.; ZAMPINI, I.C.; ISLA, M.I. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. **Int. J. Pharm.**, p.51-58, 2009.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck Index**: na encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14.th. Whitehouse Station: Merck, 2006. p.322,323.

OWENS, H.M.; DASH, A. Ceftriaxone sodium: Comprehensive Profile. **Elsevier**, v.30, p. 21-37, 2003.

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

PÉHOURCQ, F.; JARRY, C.; Determination of thirf-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies. **J. Chromatogr. A**, v.812, p.159-178, 1998.

PEIXOTO JUNIOR, M.M.; SANTOS, A.F.J.; SANTOS, C.A.; CAETITE, E.J. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA. **Rev. Pharm. Bras.**, n. 47, p. 69-73, 2005.

PICHICHERO, M.E.; CASEY, J.R. Bacterial eradication rates with shortened courses of 2nd and 3rd-generation cephalosporins versus 10 days of penicillin for treatment of group A streptococcal tonsillopharyngitis in adults. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 59, n. 2, p. 127-130, 2007.

- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3ed.São Paulo: Atheneu, 2010. p. 81-104; 261-286.
- REBSAMEN, M.; BOUCHEIX, J.M.; FAYOL, M. Quality control in the optical industry: From a Work analysis of lens inspection to a training programme, an experimental case study. **Appl. Ergon.**, v.41, p. 150-160, 2010.
- RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, H. **A Bíblia do 5S, da implantação à excelência**. Salvador: Casa da Qualidade, 2006.
- RILEY, C.M.; ROSANSKE, T.W. **Development and validation of analytical methods**. London: Pergamon, 1996. v. 3, 352 p.
- RILEY, C.M.; ROSANSKE, T.W. MicroAnalytica. **Anal. Chim. Acta**, n. 338, p. 362, 1997.
- ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.
- ROCHA, A.E.; MARINEIDE, S.R.; SILVA, S.B.; OLIVEIRA, Z.A.; AQUINO, D.M.C. Sistema de Gestão de Qualidade do serviço de farmácia hospitalar: um desafio na gestão pública. **Rev. Hosp. Univ. UFMA** v.9, p.30-34, 2008.
- RODRIGUES, P. C. **Bioestatística**. Rio de Janeiro: Universitaria, 1986. p. 98-100.
- SALEH, G.A.; EL-SHABORURY, S.R.; MOHAMED, F.A.; RAGEH, A.H. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins using oxidized quercetin reagent. **Spectroc. Acta Part.**, v.73, p.946-954, 2009.
- SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 40, p. 443-446, 2006.
- SALEM, H.; SALEH, G.A. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.28, p.1205-1213, 2002.
- SAMANIDOU, V.F.; HAPESHI, E.A.; PAPADOYANNIS, I.N. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic determination of four cephalosporins antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. **J. Chromatogr. B**, v.788, p.147-158, 2003.
- SANKAR, D.G.; SUJATHA, N.; KUMAR, B.A.; LATHA, P.V.M. UV – spectrophotometric determination of valaciclovir and a ceftriaxone sodium. **Chem. Asian. J.**, v.18, p.3244-3246, 2006.

SEIZI, O.; BASILE, A. C.; CARVALHO, M. F. **Guia Zanini-Oga de interações medicamentosas**: base teórica das interações. São Paulo: Atheneu, 2002. p.31,32.

SILVA, P. **Farmacologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.972, 973, 976.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos, 1994. p. 85-119.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, v. 987, n.1, p. 57-66, 2003.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p.325,329-331.

THOMPSON, C. Microbiological assay of antibiotics in pharmaceutical preparations. In: BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. **Handbook of microbiological quality control**: pharmaceuticals and medical devices. London: Taylor & Francis, 2000. p. 190-204.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. The Nacional Formulary (NF24). By authority of the United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2010. p.1697, 1698.

TOZO, G.C.G.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for cefoxitin sodium in dosage form. **J. AOAC Int.**, v.90, n.2, p.452-455, 2007.

TOZO, G.C.G.; SALGADO, H.R.N. Determination of lomefloxacin in raw material and tablet preparations by liquid chromatography. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 5, p. 1305-1308, 2006.

WHO. Good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. 2003. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 21 set 2011.