

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

LÍVIA PAGANINI CONSORTTI

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CEFOTAXIMA SÓDICA PÓ LIOFILIZADO
PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

ARARAQUARA-SP

2016

LÍVIA PAGANINI CONSORTTI

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CEFOTAXIMA SÓDICA PÓ LIOFILIZADO
PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

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

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA-SP

2016

Ficha Catalográfica

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

C755a Consortti, Livia Paganini
Análise químico-farmacêutica de cefotaxima sódica pó liofilizado para solução injetável /
Livia Paganini Consortti. – Araraquara, 2016.
132 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, área Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Hérica Regina Nunes Salgado.

1. Cefotaxima sódica. 2. Controle de qualidade. 3. Validação. 4. Cromatografia líquida de alta
Eficiência. 5. Espectroscopia no infravermelho. 6. Método microbiológico turbidimétrico I. Salgado,
Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

LÍVIA PAGANINI CONSORTTI

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CEFOTAXIMA SÓDICA PÓ LIOFILIZADO
PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Araraquara, 30 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado (FCFar - UNESP)
Presidente/orientadora

Prof. Dr. Marlus Chorilli (FCFar - UNESP)

Profa. Dra. Lisiane da Silveira Ev (UFOP)

ARARAQUARA-SP

2016

*Dedico este trabalho aos meus pais João e
Heloísa, que sempre estiveram ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos, por me conceder capacidade, perseverança e paciência para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, João e Heloísa e meu irmão, João Pedro, por todo apoio, incentivo, força, compreensão, paciência, carinho e amor. Serei eternamente grata!!

À Prof^a Dr^a Hérica Regina Nunes Salgado, pela confiança depositada, pela oportunidade de ser sua aluna, por sua contribuição com minha formação, pela dedicação e pelo exemplo.
Muito obrigada!!

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

Aos colegas e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade Biológico: Bárbara, Bruna, Caroline, Clarisse, Danilo, Eliane, Gabriel, Ivone, Josilene, Ketylin, Mayra, Nicolle, Rúbia, Tahisa e Vinícius pela contribuição com seus conhecimentos, por tornarem o dia-a-dia mais leve, e, especialmente a Bianca, Felipe, Mariana e Mariane pela troca de conhecimentos, pela ajuda, por compartilharem momentos bons e não tão bons, pela paciência, por todo apoio.
Muito obrigada!!

À Maria de Fátima, pela disposição, pelos conselhos, apoio, ensinamentos, amizade e comprometimento. Muito obrigada!!

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh e à Dra. Ana Carolina Kogawa, pela contribuição com meu trabalho em meu exame geral de qualificação.

À Profa. Dra. Lisiane da Silveira Ev e ao Prof. Dr. Marlus Chorilli por aceitarem compor minha banca de defesa de dissertação, pelas observações e sugestões pertinentes.

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

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas pela formação de qualidade, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação profissional e pessoal e que possibilitaram a concretização deste trabalho.

À Agilent Technologies pela doação da coluna cromatográfica utilizada neste trabalho.

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

RESUMO

A cefotaxima sódica é um fármaco semissintético pertencente à classe das cefalosporinas de terceira geração utilizado no tratamento de meningites e outras infecções no sistema nervoso central. O fármaco é considerado seguro por interferir na síntese de uma estrutura bacteriana específica e está disponível comercialmente na forma de pó liofilizado para solução injetável. A literatura traz métodos analíticos para a determinação do teor da cefotaxima sódica com geração de resíduos tóxicos e com o emprego de reagentes que danificam os equipamentos e respectivos consumíveis. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de validação de métodos analíticos mais seguros aos analistas, com menor geração de resíduos e ao mesmo tempo confiáveis para assegurar as características pertinentes ao medicamento e a efetividade e segurança do tratamento. A determinação do teor de cefotaxima foi realizada pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência e por espectroscopia no infravermelho e a potência foi determinada pelo método microbiológico turbidimétrico. O método por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido utilizando-se fase móvel constituída por água e ácido acético na concentração de 0,1% e etanol 87:13 (V/V), o fármaco apresentou tempo de retenção de 4,4 minutos com detecção no UV em comprimento de onda de 235 nm. Na validação, a linearidade foi comprovada no intervalo de concentrações de 70 a 130 µg/mL e o método apresentou exatidão igual a 100,45% e teor de 97,87%. No método por espectroscopia no infravermelho foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio massa total de 200 mg e a faixa de concentração avaliada na linearidade foi de 0,4 a 0,9 mg/pastilha. A exatidão apresentou valor de 101,00% e o teor de 98,73%. O método microbiológico foi validado utilizando-se o delineamento de retas paralelas 3x3, *Escherichia coli* ATCC 25922, caldo BHI e água como diluente para as soluções SQR e pó liofilizado. A linearidade foi comprovada para o intervalo de concentração de 5 a 80 µg/mL, a exatidão apresentou valor de 98,98% e a potência 101,52%. Os métodos desenvolvidos apresentaram vantagens quando comparados àqueles encontrados na literatura por terem baixa geração de resíduos ao meio ambiente, uso de reagentes danosos ao equipamento e tempo de análise reduzidos. Foram validados de acordo com o preconizado pela RE nº 899, pelo guia ICH e pela FDA. Os métodos foram comparados quando à quantificação da cefotaxima sódica e não apresentaram diferença estatisticamente significativa, o que possibilita seu emprego no controle de qualidade do fármaco com segurança, confiabilidade, precisão, robustez, simplicidade e rapidez.

Palavras-chave: Cefotaxima sódica. Controle de qualidade. Validação. Cromatografia líquida de alta eficiência. Espectroscopia no infravermelho. Método microbiológico turbidimétrico.

ABSTRACT

Sodium cefotaxime is a semisynthetic drug belonging to the class of third generation cephalosporins used in the treatment of meningitis and other infections in the central nervous system. The drug is considered safe by interfering with the synthesis of a specific bacterial structure and is commercially available as a lyophilized powder for injection. The literature provides analytical methods for the determination of cefotaxime sodium content with generation of toxic waste and using reagents that damage the equipment and relevant consumables. Therefore, this study had as aim the development and validation of safer analytical methods for analysts, with less waste and at the same time reliable to ensure the relevant characteristics to the drug and the effectiveness and safety of treatment. The determination of cefotaxime content was performed by high-performance liquid chromatography and infrared spectroscopy, and the drug activity was determined by turbidimetric microbiological method. The high-performance liquid chromatography was developed using a mobile phase consisting of water and acetic acid at a concentration of 0.1% and ethyl alcohol 87:13 (V/V) and the drug presented retention time of 4.4 minutes with UV detection at a wavelength of 235 nm. Linearity was proven in the concentrations 70 to 130 µg/mL, and the method accuracy was 100.45% and precision 97.87% for assay. The method by infrared spectroscopy was carried out with 200 mg pellets and the concentration range evaluated in linearity was 0.4 to 0.9 mg/tablet. The accuracy presented a value of 101.00% and the assay a value of 98.73%. Microbiological method was validated using the design of parallel straight 3x3, *Escherichia coli* ATCC 25922, BHI broth and water as a diluent for the lyophilized powder and RS solutions. The linearity was verified for the concentration range of 5 to 80 µg/mL showed the accuracy value of 98.98% and potency of 101.52%. The methods presented advantages when compared to those found in the literature because have low waste generation, use of harmful reagents to equipment and analysis time reduced, besides is according to the criteria of RE 899, ICH and FDA in the validation. Both methods were compared in quantification of cefotaxime sodium and they demonstrated no statistically significant difference, which enables the use of the same in drug quality control routine with security, reliability, accuracy, robustness, simplicity and quickness.

Keywords: Sodium cefotaxime. Quality control. Validation. High-performance liquid chromatography. Infrared spectroscopy. Turbidimetric microbiological method.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 Cefalosporinas	22
3.1.1 História	22
3.1.2 Estrutura química.....	23
3.1.3 Mecanismo de ação	24
3.1.4 Classificação e espectro de ação.....	25
3.1.5 Mecanismos de resistência bacteriana e as cefalosporinas.....	27
3.2 Cefotaxima sódica.....	28
3.2.1 Farmacocinética.....	28
3.2.2 Interações medicamentosas	29
3.2.3 Contra-indicações	30
3.2.4 Tratamento.....	30
3.2.5 Métodos analíticos.....	30
3.2.6 Aspectos gerais do fármaco.....	43
3.3 Controle de qualidade	44
3.4 Química analítica verde	45
3.5 Validação de métodos analíticos.....	47
4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	51
4.1 Considerações gerais.....	51
4.2 Material e método	51
4.2.1 Validação do método	53
4.2.1.1 Linearidade	53
4.2.1.2 Precisão	54
4.2.1.3 Exatidão	54
4.2.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	55
4.2.1.5 Robustez.....	56
4.2.2 Determinação do teor de cefotaxima sódica no pó liofilizado	57
4.3 Resultados.....	58
4.3.1 Desenvolvimento do método	58

4.3.2	Validação do método analítico	61
4.3.2.1	Linearidade	61
4.3.2.2	Precisão	62
4.3.2.3	Exatidão	63
4.3.2.4	Limite de detecção e limite de quantificação.....	63
4.3.2.5	Robustez.....	64
4.3.3	Determinação do teor de cefotaxima sódica no pó liofilizado	65
4.4	Discussão	66
5.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	69
5.1	Considerações gerais.....	69
5.2	Material e método	69
5.2.1	Desenvolvimento do método	70
5.2.1.1	Adequabilidade do sistema	71
5.2.2	Validação do método	74
5.2.2.1	Seletividade.....	74
5.2.2.2	Linearidade	76
5.2.2.3	Precisão	76
5.2.2.4	Exatidão	77
5.2.2.5	Limite de detecção e limite de quantificação.....	77
5.2.2.6	Robustez.....	77
5.3	Determinação do teor da cefotaxima sódica no pó liofilizado.....	79
5.3.1	Preparo das soluções.....	79
5.3.2	Estabilidade das soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado	79
5.3.3	Cálculos	80
5.4	Resultados.....	80
5.4.1	Desenvolvimento do método	80
5.4.1.1	Adequabilidade do sistema	82
5.4.2	Validação do método	83
5.4.2.1	Seletividade.....	83
5.4.2.2	Linearidade	88
5.4.2.3	Precisão	90
5.4.2.4	Exatidão	90
5.4.2.5	Limite de detecção e limite de quantificação.....	90
5.4.2.6	Robustez.....	91
5.4.3	Determinação do teor de cefotaxima no pó liofilizado.....	92

5.4.4	Estabilidade das soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado	93
5.5	Discussão	93
6.	ENSAIO MICROBIOLÓGICO TURBIDIMÉTRICO	98
6.1	Considerações gerais.....	98
6.2	Material e método	98
6.2.1	Desenvolvimento do método	99
6.2.2	Validação do método	100
6.2.2.1	Linearidade	100
6.2.2.2	Precisão	101
6.2.2.3	Exatidão	101
6.2.2.4	Robustez.....	102
6.2.3	Determinação da potência de cefotaxima sódica no pó liofilizado	103
6.2.3.1	Preparo das soluções	103
6.2.3.2	Cálculos	103
6.3	Resultados.....	104
6.3.1	Desenvolvimento do método	104
6.3.2	Validação do método analítico	104
6.3.2.1	Linearidade	104
6.3.2.2	Precisão	105
6.3.2.3	Exatidão	106
6.3.2.4	Robustez.....	106
6.3.3	Determinação da potência do pó liofilizado	108
6.4	Discussão	108
7.	ANÁLISE COMPARATIVA	112
7.1	Resultados.....	112
7.2	Discussão	112
8.	CONCLUSÕES.....	114
	REFERÊNCIAS	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da cefalosporina C.....	23
Figura 2: Estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico	23
Figura 3: Estrutura química geral das cefalosporinas	24
Figura 4: Estrutura dos peptidoglicanos constituintes da parede bacteriana.....	25
Figura 5: Estrutura química da cefotaxima sódica.....	28
Figura 6: Estrutura química da desacetilcefotaxima	29
Figura 7: Espectro na região do infravermelho obtido com a cefotaxima sódica SQR com a banda a ser utilizada na quantificação do fármaco no método por espectroscopia no infravermelho em destaque.....	53
Figura 8: Estrutura química da cefotaxima sódica com a ligação referente à banda no espectro utilizada na quantificação do método por espectroscopia no infravermelho	53
Figura 9: Espectros na região do infravermelho da cefotaxima sódica SQR e cefotaxima sódica pó liofilizado sobrepostos.....	58
Figura 10: Espectro na região do infravermelho referência para a cefotaxima sódica encontrado na Farmacopeia Japonesa XVI (2011).....	59
Figura 11: Espectro na região do infravermelho referência para a cefotaxima sódica encontrado na Farmacopeia Britânica (2014).....	59
Figura 12: Espectro na região do infravermelho obtido com a SQR com as respectivas bandas características.....	60
Figura 13: Representação gráfica da curva analítica referente à cefotaxima sódica para o método por espectroscopia na região do infravermelho.....	62
Figura 14: Gráfico de resíduos padronizados referente à cefotaxima sódica SQR obtido com a técnica de espectroscopia na região do infravermelho	62
Figura 15: Gráfico de Pareto das interações das variáveis para o parâmetro de robustez para o método por espectroscopia na região do infravermelho.....	65
Figura 16: Medidas realizadas para o cálculo dos parâmetros de assimetria de pico e fator de cauda para a adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	72

Figura 17: Representação da medida da largura do pico à meia altura para o cálculo do número de pratos da adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	73
Figura 18: Representação da medida da base do pico (W) para o cálculo da resolução na adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.	74
Figura 19: Espectro de absorção no UV para a cefotaxima em solução aquosa a 100 µg/mL no desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	80
Figura 20: Cromatograma obtido com a solução de cefotaxima sódica SQR 100 µg/mL durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ , fase móvel água pH ajustado para 6,0 com ácido acético e etanol (95:05, V/V), vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm	81
Figura 21: Cromatograma obtido com a solução SQR 100 µg/mL durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água e etanol (95:05, V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm.....	81
Figura 22: Cromatogramas das soluções de cefotaxima pó liofilizado e SQR a 100 µg/mL sobrepostos obtidos no desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm	82
Figura 23: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T ₀ e T _{6h} para a degradação ácida para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm.....	85
Figura 24: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T ₀ e T _{0,25h} para a degradação alcalina para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm.....	85
Figura 25: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T ₀ e T _{1h} para a degradação oxidativa para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm.....	86
Figura 26: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T ₀ e T _{14h} para a degradação fotolítica para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm.....	86

Figura 27: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T ₀ e T _{0,25h} para a degradação neutra para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C ₁₈ , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm	87
Figura 28: Curva analítica referente à cefotaxima sódica para o parâmetro de linearidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência	89
Figura 29: Gráfico de resíduos referente à curva analítica da cefotaxima sódica SQR obtida com o método por cromatografia líquida de alta eficiência	89
Figura 30: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações inferiores.....	92
Figura 31: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações superiores.....	92
Figura 32: Representação gráfica das curvas analíticas referentes à cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR para o ensaio microbiológico turbidimétrico no parâmetro de linearidade	105
Figura 33: Gráfico de Pareto das interações das variáveis para o parâmetro de robustez para o método microbiológico por turbidimetria.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de análise para os métodos por espectrofotometria no ultravioleta e no visível	33
Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura.....	36
Tabela 3: pKa's para a cefotaxima sódica encontrados na literatura	43
Tabela 4: Ensaios recomendados na validação de métodos analíticos, de acordo com a finalidade	48
Tabela 5: Preparo das pastilhas de brometo de potássio para o teste de recuperação do método por espectroscopia por infravermelho para a cefotaxima sódica.....	55
Tabela 6: Planejamento fatorial 2^3 para o parâmetro de robustez para o método por espectroscopia na região do infravermelho	56
Tabela 7: Matriz de planejamento de ensaios para o parâmetro de robustez no método por espectroscopia na região do infravermelho	56
Tabela 8: Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^3	57
Tabela 9: Comparação das bandas de absorção apresentadas no espectro da cefotaxima sódica SQR com dados da literatura.....	60
Tabela 10: Valores das absorbâncias referentes à altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} das pastilhas de brometo de potássio contendo cefotaxima sódica SQR para a elaboração da curva analítica por espectroscopia na região do infravermelho.....	61
Tabela 11: Análise de variância dos valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica da cefotaxima sódica utilizando método por espectroscopia na região do infravermelho.....	62
Tabela 12: Valores das absorbâncias referentes à altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} para a precisão por repetibilidade (analista 1) e para a precisão intermediária (analistas 1 e 2) pelo método por espectroscopia na região do infravermelho.....	63
Tabela 13: Valores das absorbâncias referentes à altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} relativos à exatidão para o método por espectroscopia na região do infravermelho.....	63
Tabela 14: Valores das absorbâncias encontradas para a altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} para a cefotaxima sódica pó liofilizado no parâmetro de robustez no método por espectroscopia na região do infravermelho	64

Tabela 15: Análise de variância para a robustez da validação do método por espectroscopia na região do infravermelho.....	65
Tabela 16: Determinação do teor de cefotaxima, em porcentagem, pelo método por espectroscopia na região do infravermelho.	66
Tabela 17: Parâmetros testados no desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado	71
Tabela 18: Preparo das soluções para a avaliação da exatidão do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	77
Tabela 19: Parâmetros utilizados no teste de Youden para a determinação de robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência	78
Tabela 20: Variações dos parâmetros utilizadas no teste de Youden.....	79
Tabela 21: Condições analíticas estabelecidas para o método de quantificação da cefotaxima por cromatografia líquida de alta eficiência	82
Tabela 22: Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico calculados após a definição das condições analíticas do método.....	83
Tabela 23: Teste de degradação forçada para a cefotaxima sódica SQR no desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência	84
Tabela 24: Parâmetros para a avaliação da pureza de pico da cefotaxima sódica obtidos com o <i>software</i> Empower 3	84
Tabela 25: Resoluções entre os pares de picos referentes aos cromatogramas de cada condição de degradação forçada.....	87
Tabela 26: Valores das áreas referentes às soluções de cefotaxima sódica SQR para a elaboração da curva analítica com o método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	88
Tabela 27: Análise de variância dos valores referentes às áreas utilizados para a construção da curva analítica da cefotaxima sódica SQR para o método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	89
Tabela 28: Valores encontrados na precisão por repetibilidade (analista 1) e precisão intermediária (analistas 1 e 2) pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	90
Tabela 29: Valores percentuais encontrados para o parâmetro de exatidão para o método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	90
Tabela 30: Teores, em porcentagem, encontrados para o produto acabado nos ensaios 1 e 2 para a robustez no método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	91

Tabela 31: Efeitos calculados para os ensaios com variações inferiores e superiores para a robustez por cromatografia líquida de alta eficiência.....	91
Tabela 32: Áreas encontradas para a determinação do teor de cefotaxima no produto acabado por cromatografia líquida de alta eficiência	93
Tabela 33: Valores encontrados para a estabilidade das soluções de cefotaxima sódica produto acabado e SQR	93
Tabela 34: Condições analíticas testadas durante o desenvolvimento do método microbiológico turbidimétrico para a determinação da potência do fármaco	100
Tabela 35: Preparo das replicatas dos tubos para o ensaio de recuperação do método microbiológico por turbidimetria para a determinação da potência da cefotaxima sódica no pó liofilizado.....	102
Tabela 36: Planejamento fatorial 2^3 para o parâmetro de robustez para o método microbiológico por turbidimetria.....	102
Tabela 37: Parâmetros de análise estabelecidos para o método microbiológico por turbidimetria	104
Tabela 38: Valores das absorvâncias referentes às soluções dos tubos para a elaboração das curvas analíticas para a cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR para o ensaio microbiológico turbidimétrico	104
Tabela 39: Análise de variância dos valores de absorvância obtidos na construção das curvas analíticas da cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR utilizando método microbiológico turbidimétrico	105
Tabela 40: Valores da precisão intermediária para o método microbiológico turbidimétrico	106
Tabela 41: Valores relativos à exatidão para o método microbiológico turbidimétrico	106
Tabela 42: Absorvâncias encontradas para a cefotaxima sódica pó liofilizado no parâmetro de robustez para o método microbiológico por turbidimetria	107
Tabela 43: Análise de variância para a robustez da validação método microbiológico por turbidimetria	107
Tabela 44: Determinação da potência do pó liofilizado, em porcentagem, pelo método microbiológico por turbidimetria.....	108
Tabela 45: Valores obtidos na quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado pelos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia no infravermelho e ensaio microbiológico por turbidimetria	112

Tabela 46: Análise de variância dos resultados para a quantificação da cefotaxima sódica pelos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia no infravermelho e ensaio microbiológico por turbidimetria 112

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Assimetria de pico
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPR%	Desvio padrão relativo em porcentagem
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	Graus de liberdade
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
k'	Fator de retenção
N	Número de pratos
QM	Quadrados médios
r	Coefficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rs	Resolução
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
BHI	Brain Heart Infusion

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos é um fenômeno que ocorre após um extenso contato da bactéria a antibióticos e à sua presença no meio ambiente. Até o século XX a resistência bacteriana restringia-se geralmente a ambientes hospitalares. Porém, existem relatos recentes de desenvolvimento de resistência em diversos ambientes, inclusive afetando indivíduos saudáveis (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Frente à alta taxa de resistência bacteriana aos antibióticos, assim como a redução do número de antimicrobianos aprovados por órgãos regulatórios nos últimos anos, faz-se necessária a aplicação de medidas na tentativa de minimizar a evolução desse processo. Algumas ferramentas são: descoberta de novos ativos, principalmente com mecanismo de ação diferindo daqueles fármacos em uso, assim como a adoção de novas estratégias terapêuticas e a incorporação de mudanças culturais (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; BROOKS; BROOKS, 2014; OLDFIELD; FENG, 2014). A classe de medicamentos que constitui os antimicrobianos possui grande relevância no campo da saúde, já que a infecção bacteriana constitui uma das principais causas de mortalidade no mundo (BRITO; CORDEIRO, 2012).

Tendo em vista a importância dos antibióticos mundialmente, torna-se indispensável a passagem desses medicamentos por um controle de qualidade adequado e confiável, com a finalidade de garantir a segurança para os pacientes e a eficácia de seu uso, tornando o tratamento efetivo (BRASIL, 2010). Além das precauções associadas à saúde da população, o investimento em qualidade também contribui com a diminuição de custos, tempo de produção de medicamentos e aumento de lucros da empresa (HALLEM et al., 2013).

Entre os antimicrobianos estão as cefalosporinas, constituindo a segunda maior classe de antibióticos β -lactâmicos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Atuando no impedimento da síntese da parede celular bacteriana, as cefalosporinas são consideradas antimicrobianos seguros e de baixa toxicidade, já que a estrutura em que atua o antimicrobiano é inexistente em células humanas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As cefalosporinas existentes são classificadas em 5 gerações considerando-se o espectro de ação, a estabilidade a β -lactamases, farmacocinética, estabilidade e reações colaterais (VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012; FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

A cefotaxima sódica está incluída na classe de cefalosporinas de terceira geração. As grandes evoluções em relação a cefalosporinas de gerações anteriores são a presença de uma ampliação na penetração dos fármacos em bactérias Gram-negativas, o que contribui com a

expansão do espectro de ação, e o desenvolvimento de maior afinidade pelo sítio de ação (PATRICK, 2009). Além disso, os antimicrobianos de terceira geração atingem o sistema nervoso central em concentrações significativas, permitindo o uso dos mesmos no tratamento de meningites e septicemias por micro-organismos Gram-negativos (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

Devido ao crescimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos com o passar do tempo, um controle de qualidade satisfatório para esses fármacos é cada vez mais requerido, já que garantir a adequação dos insumos farmacêuticos e medicamentos às especificações estabelecidas é uma das formas de minimizar a evolução dessa resistência. A conscientização em relação à redução da geração de resíduos e à preservação ambiental nos últimos anos foi intensificada, sendo assim, associar um controle de qualidade adequado à mínima utilização de compostos tóxicos e geração de resíduos nas análises é um tema que tem tomado maiores dimensões no campo industrial.

A literatura descreve inúmeros métodos analíticos para a determinação do teor da cefotaxima sódica, porém a grande maioria não se enquadra no conceito da química verde. Sendo crescente a conscientização sobre a necessidade de adoção de procedimentos ecologicamente corretos entre as indústrias farmacêuticas, assim como a realização de um controle de qualidade adequado, rápido e com redução de custos, destaca-se a necessidade da busca por métodos analíticos para o fármaco em estudo com baixa geração de resíduos, diminuição da utilização de solventes tóxicos e redução de custos e despesas com consumíveis e equipamentos.

Além de promover a segurança dos operadores, os métodos verdes contribuirão com a indústria farmacêutica no controle de qualidade da cefotaxima sódica e com a literatura científica de forma a diminuir a contaminação ambiental e a toxicidade para o operador, proporcionar a segurança e eficácia exigidas para um tratamento e conferir maior confiança na aplicação do medicamento na prática clínica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O trabalho teve por objetivo geral a validação e desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para a quantificação da cefotaxima sódica na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável considerando-se a redução da geração de resíduos.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Desenvolver e validar novo método analítico indicativo de estabilidade para quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Desenvolver e validar método analítico alternativo quantitativo para a cefotaxima sódica no pó liofilizado por meio de espectroscopia de absorção na região do infravermelho;
- Desenvolver e validar novo método analítico para a determinação da atividade entimicrobiana da cefotaxima sódica no pó liofilizado por ensaio microbiológico turbidimétrico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

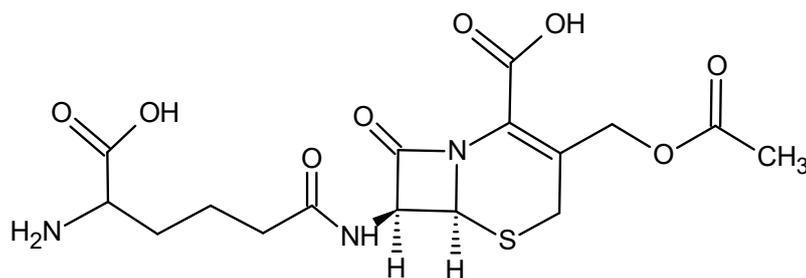
3.1 Cefalosporinas

3.1.1 História

A natureza antimicrobiana do primeiro β -lactâmico foi descrita em 1928 por Alexander Fleming (OLIVEIRA et al., 2009). Ao observar uma cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada com *Penicillium notatum*, Fleming notou a presença de uma substância sintetizada pelo fungo, a qual denominou penicilina, que causava a lise das células bacterianas. Apesar da grande relevância da descoberta, somente em meados de 1940 comprovou-se a capacidade de atuação como antimicrobiano da penicilina em infecções por estreptococos e estafilococos em organismos vivos (FERNANDES; AMADOR, PRUDÊNCIO, 2013).

Entre os antimicrobianos β -lactâmicos estão as cefalosporinas, constituindo a segunda maior classe dessas substâncias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). A descoberta da molécula precursora das constituintes da classe das cefalosporinas, a cefalosporina C (Figura 1), aconteceu na década de 1940, na Itália. A espécie responsável pela produção da cefalosporina C, o fungo *Cephalosporium acremonium*, foi isolada pela primeira vez pelo italiano Giuseppe Brotzu na costa da Sardenha (ASBEL; LEVISON, 2000).

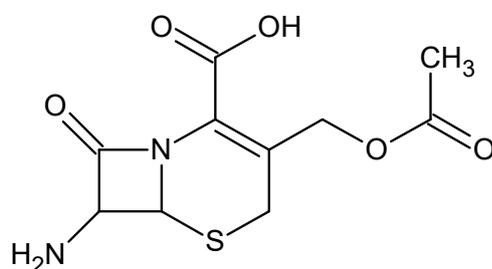
Posteriormente, foi comprovado que uma das principais substâncias produzidas pelo fungo, a cefalosporina C, possuía atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas a estrutura química da molécula foi definida somente 13 anos mais tarde. A estrutura química da molécula de cefalosporina C foi então modificada com a finalidade de ampliar o espectro de ação da molécula de origem mantendo a atividade antimicrobiana originando fármacos semi-sintéticos (PATRICK, 2009).

Figura 1: Estrutura química da cefalosporina C

3.1.2 Estrutura química

A estrutura química da cefalosporina C foi evidenciada em 1961 (OLIVEIRA et al., 2009). Derivados semi-sintéticos foram desenvolvidos a partir da molécula de cefalosporina C e apresentaram alterações significativas em relação à atividade bacteriana (BRUNTON, LAZO; PARKER, 2012), farmacocinética e ao espectro de ação quando comparados à molécula original (MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; DERAYEA et al., 2016).

A estrutura química básica de uma cefalosporina é constituída pelo ácido 7-aminocefalosporânico, sendo a mesma fundamental para que a molécula tenha atividade antimicrobiana (PATRICK, 2009). O ácido 7-aminocefalosporânico é composto por um sistema bicíclico, contendo um anel β -lactâmico de quatro membros unidos a um anel de diidrotiazina de seis membros (ASBEL LEVISON, 2000; EL-SHABOURY et al., 2007; LEMKE et al., 2013; DERAYEA et al., 2016). As moléculas que possuem o ácido 7-aminocefalosporânico (Figura 2) geralmente não são degradadas por β -lactamases e têm certa resistência a mudanças de pH e temperatura (SILVA, 2006).

Figura 2: Estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico

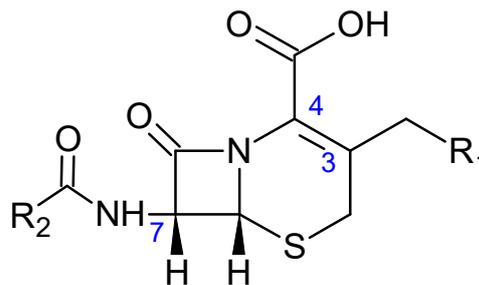
Apesar da importância do anel β -lactâmico para a atividade biológica destas moléculas, destaca-se que os substituintes em C3, C4 e C7 são fatores consideráveis para a atividade antimicrobiana (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012). A partir do ácido 7-

aminocefalosporânico surgiram inúmeros derivados semi-sintéticos por meio de substituições nos carbonos 3 e 7 (SILVA, 2006).

O grupamento em C3 parece interferir na atividade biológica das moléculas (SILVA, 2006; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012). O ácido carboxílico em C4 não pode ser substituído e a cadeia lateral acilamina em C7 geralmente é um grupamento essencial no controle da hidrofiliicidade/hidrofobicidade dos fármacos (EL-SHABOURY et al., 2007), ou seja, influencia no metabolismo e na farmacocinética da molécula (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012).

A partir da estrutura fundamental das cefalosporinas são permitidas algumas alterações, que geralmente ficam restritas às posições representadas por R₁ (carbono 3) e R₂ (carbono 7) (Figura 3) (ASBEL; LEVISON, 2000; RANG et al., 2007).

Figura 3: Estrutura química geral das cefalosporinas



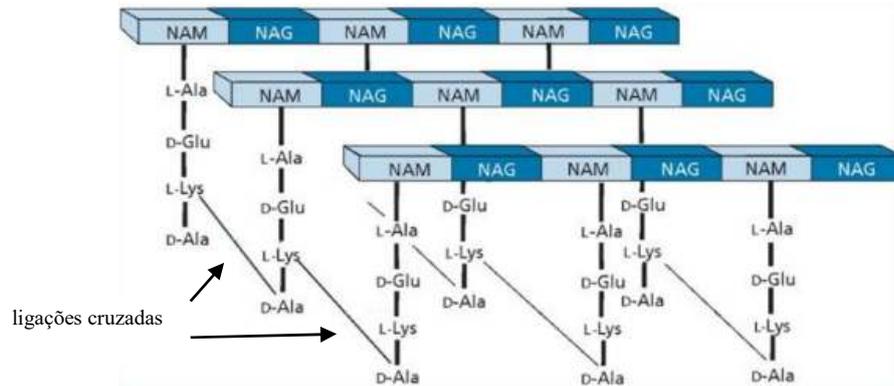
3.1.3 Mecanismo de ação

Os antimicrobianos constituintes da classe das cefalosporinas possuem como mecanismo de ação a interferência na síntese da parede bacteriana dos micro-organismos (HANG et al., 2007; KATZUNG, 2010). A parede celular é uma estrutura fundamental ao crescimento e desenvolvimento bacteriano, já que envolve a membrana citoplasmática, mantém o formato e integridade, impedindo a lise da bactéria em meios hipotônicos, (DELUCIA et al., 2007) e permite a sobrevivência em condições ambientais adversas, como variações de pH e temperatura (PATRICK, 2009).

A parede bacteriana é constituída por peptidoglicanos, que conferem estabilidade mecânica pelas ligações cruzadas presentes. Os peptidoglicanos são formados fundamentalmente por dois aminoácidos (N-acetilglicosamina ou NAG e ácido N-acetilmurâmico ou NAM) unidos por ligações cruzadas de cadeias de peptídeos (Figura 4). Em Gram-positivos, a parede é constituída por 50 a 100 camadas de peptidoglicanos, já em

Gram-negativos a estrutura é constituída por somente 1 ou 2 camadas (PATRICK, 2009; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012).

Figura 4: Estrutura dos peptídeoglicanos constituintes da parede bacteriana



Fonte: adaptado de Patrick, 2009.

Na síntese da parede bacteriana estão envolvidas três etapas (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012). A última delas, a finalização da ligação cruzada (união dos aminoácidos D-alanina e L-lisina), envolve as enzimas transpeptidases (CRAIG; STITZEL, 2004; PATRICK, 2009). A estrutura química das cefalosporinas assemelha-se à estrutura dos aminoácidos terminais presentes nos peptídeos do peptídeoglicano (CRAIG; STITZEL, 2004; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Então, o fármaco liga-se irreversivelmente ao sítio ativo das transpeptidases impedindo a catalisação da síntese das ligações cruzadas havendo conseqüente morte celular (KATZUNG, 2010) por meio de lise da célula bacteriana (HANG et al., 2007).

As cefalosporinas, portanto, apresentam-se como antagonistas competitivas (DELUCIA et al., 2007). Destaca-se que as cefalosporinas são bactericidas somente quando as células bacterianas estão em fase de crescimento ativo sintetizando a parede celular (HANG et al., 2007; KATZUNG, 2010).

3.1.4 Classificação e espectro de ação

As cefalosporinas são antimicrobianos classificados em gerações de acordo com as características gerais de atividade antimicrobiana. Atualmente são cinco as gerações de cefalosporinas existentes (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013). Entre as

características que diferem as gerações estão: o espectro de ação, a estabilidade a β -lactamases, a farmacocinética, a estabilidade química e as reações colaterais (SILVA, 2006).

É importante destacar que a classificação das cefalosporinas em gerações não indica superioridade, pois os representantes de cada geração são especificamente indicados de acordo com o espectro de ação e com a tradição de aplicação (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

Cefalexina, cefalotina e cefazolina estão incluídas na primeira geração de cefalosporinas. Segundo Patrick (2009), alguns fármacos desta classe possuem baixa taxa de absorção intestinal, sendo então constituintes de formas farmacêuticas de administração injetável. Possuem boa atividade contra Gram-positivos (FUCHS; WANNMACHER, 2010) exceto enterococos e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

A atividade contra Gram-negativos é moderada devido à maior efetividade de suas β -lactamases, comparada aos Gram-positivos. Nenhum dos fármacos de primeira geração atinge o sistema nervoso central, e geralmente não são de primeira escolha para o tratamento de infecções (PATRICK, 2009), sendo utilizados na profilaxia cirúrgica (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

As cefalosporinas de segunda geração possuem um espectro de ação que abrange todos os micro-organismos sensíveis àqueles de primeira geração, porém o espectro de ação de Gram-negativos é mais amplo (FUCHS; WANNMACHER, 2010) e possui maior resistência às β -lactamases (DELUCIA et al., 2007), incluindo alguns micro-organismos dos gêneros *Klebsiella* e *Proteus* indol-positivos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012). Alguns exemplos de cefalosporinas de segunda geração são cefoxitina, cefaclor e cefuroxima (DELUCIA, 2007).

As cefalosporinas de terceira geração evoluíram significativamente em relação às de segunda geração. Apesar da redução da dimensão do espectro de ação para Gram-positivos, a penetração dos fármacos em bactérias Gram-negativas foi aumentada (DELUCIA et al., 2007), possuindo maior atividade principalmente contra micro-organismos da família Enterobacteriaceae e contra *Haemophilus influenzae* (SILVA, 2006). Maior afinidade pelo sítio de ação das moléculas (enzima transpeptidase) também foi desenvolvida (PATRICK, 2009).

Os antimicrobianos de terceira geração também atingem concentrações significativas no sistema nervoso central e possuem maior atividade por micro-organismos aeróbios, permitindo o uso dos mesmos no tratamento de meningites e septicemias por micro-

organismos Gram-negativos (PATRICK, 2009). São fármacos de terceira geração cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima (LEMKE et al., 2013; DELUCIA et al., 2007).

Duas das cefalosporinas enquadradas na quarta geração são a cefepima e cefpiroma. Os constituintes desta classe tiveram atividade intensificada principalmente contra espécies dos gêneros *Enterobacter* e *Citrobacter* resistentes aos ativos de terceira geração (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013). A atividade contra estafilococos e o espectro de ação para Gram-negativos também foram aprimorados. As cefalosporinas de quarta geração também têm maior resistência às β -lactamases mediadas por cromossomos e plasmídeos em relação às de terceira geração (KATZUNG, 2010; LEMKE et al., 2013).

O desenvolvimento de cefalosporinas de quinta geração teve como principal objetivo o combate de cepas resistentes. O ceftobripol e a ceftarolina, por exemplo, possuem atividade contra as cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*). Antes do surgimento destes ativos, não existiam antimicrobianos tão eficazes em relação à capacidade de conter infecções pelos micro-organismos citados (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

3.1.5 Mecanismos de resistência bacteriana e as cefalosporinas

O primeiro caso de resistência bacteriana a antimicrobianos foi relatado em 1943. O problema vem tomando grandes dimensões, já que muitas vezes há a escolha incorreta do antibiótico mais adequado para o tratamento e da sua administração, além de sua utilização de modo profilático e, principalmente, do uso indiscriminado (DELUCIA et al., 2007).

A resistência bacteriana às cefalosporinas pode estar relacionada a alterações nas proteínas presentes nas bactérias que se ligam aos fármacos e permitem a sua atuação, à presença de β -lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos, inativando-os, ou à incapacidade do antibiótico em atingir os locais de ação (CRAIG; STITZEL, 2004; KATZUNG, 2006), com a diminuição da permeabilidade celular, principalmente em Gram-negativos (DELUCIA et al., 2007).

O mecanismo de resistência que prevalece entre as cefalosporinas é a inativação do fármaco por β -lactamases (KATZUNG, 2006). As cefalosporinas de terceira geração são as mais sensíveis às β -lactamases produzidas por indução, quando são utilizadas em tratamentos, e às β -lactamases codificadas por cromossomos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012). Portanto, o uso dessas cefalosporinas deve ser criterioso (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

Já as cefalosporinas de quarta geração, possuem menor capacidade de indução de produção de β -lactamases (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012).

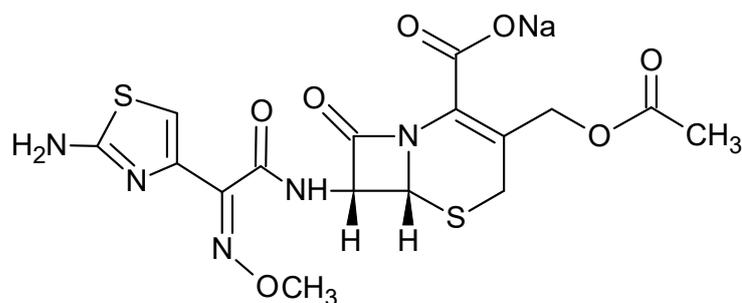
3.2 Cefotaxima sódica

A cefotaxima sódica é um fármaco antimicrobiano semissintético (BP, 2014) pertencente à terceira geração das cefalosporinas (DAHOT-FIZELIER et al., 2013). O fármaco está disponível comercialmente na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável (MC EVOY, 2010). Geralmente, é utilizado no tratamento de infecções bacterianas no sistema nervoso central (DAHOT-FIZELIER et al., 2013), já que atinge concentrações adequadas para o efeito bactericida no líquido (DELUCIA et al., 2007).

A cefotaxima é um fármaco resistente a várias β -lactamases e apresenta boa atividade contra vários micro-organismos aeróbios Gram-positivos e Gram-negativos. É utilizada em infecções graves e principalmente no combate a meningites causadas por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* sensível à penicilina e *Neisseria meningitidis* (SWEETMAN, 2011; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012).

A estrutura química da cefotaxima sódica está apresentada na Figura 5.

Figura 5: Estrutura química da cefotaxima sódica

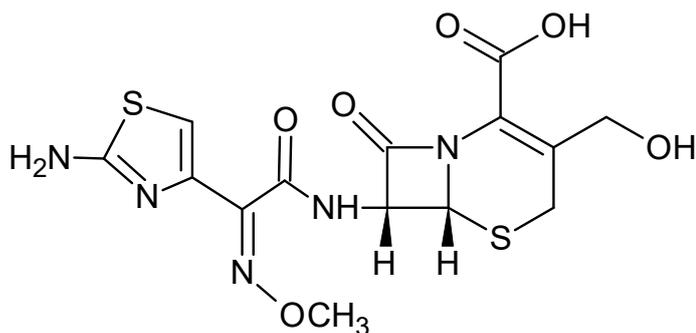


3.2.1 Farmacocinética

A cefotaxima sódica não possui absorção significativa no trato gastrointestinal, por isso tem como via de administração a parenteral, podendo ser intramuscular ou intravenosa (SWEETMAN, 2011). Na literatura estão relatados valores de meia-vida plasmática para o fármaco de aproximadamente 1 hora (VALLEÉ; LEBEL, 1991; PATEL et al., 1995; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012).

Por volta de 25 a 40 % da cefotaxima liga-se às proteínas plasmáticas (PATEL et al., 1995). Cerca de 90% da dose de fármaco administrada é eliminada por via renal, sendo que 50% é eliminada na forma inalterada e 20% na forma de desacetilcefotaxima (Figura 6). A desacetilcefotaxima é formada pela ação das esterases e é o principal metabólito da cefotaxima formado pelo organismo (KEES, 1991; ANVISA, 2016).

Figura 6: Estrutura química da desacetilcefotaxima



A desacetilcefotaxima é menos ativa que a molécula original, mas atua de modo sinérgico com a cefotaxima contra alguns micro-organismos (KO et al., 1991; JONES, 1995). O pico de concentração plasmática da desacetilcefotaxima foi relatado entre 30 e 40 minutos após a administração intravenosa da cefotaxima. A meia-vida da desacetilcefotaxima é aproximadamente 2 horas (KO et al., 1991; VALLEÉ; LEBEL, 1991). Estudos indicam a passagem da cefotaxima pela placenta, sendo sua atividade no líquido amniótico semelhante ou até maior que a relatada para o fármaco no soro materno (MC EVOY, 2010).

3.2.2 Interações medicamentosas

Na literatura foram encontrados relatos de interação da cefotaxima com aminoglicosídeos. A cefotaxima pode ter efeito aditivo e sinérgico contra algumas cepas, mas o sinergismo pode ser imprevisível. O uso combinado da cefotaxima com aminoglicosídeos também apresentou atividade antagonista *in vitro*. A possibilidade de nefrotoxicidade causada pelo uso concomitante de cefotaxima com aminoglicosídeos também deve ser considerada (MC EVOY, 2010).

Quando administrada juntamente com probenecida, a concentração sérica da cefotaxima pode ser aumentada e sua ação prolongada (GRIFFIN; DARCY, 1997; ANVISA, 2016).

3.2.3 Contra-indicações

A administração da cefotaxima não é indicada para pacientes que apresentem hipersensibilidade às cefalosporinas e às penicilinas. Apesar de a cefotaxima não ter apresentado toxicidade para fetos e teratogenicidade em estudos com animais, deve ser evitado seu uso durante a gravidez e durante o período de amamentação (ANVISA, 2016).

3.2.4 Tratamento

A cefotaxima sódica é utilizada principalmente no tratamento de meningites, é de administração parenteral, sendo as vias intramuscular e intravenosa as empregadas. O pó deve ser reconstituído em água para injetáveis e, no caso de infusão, o medicamento pode ser preparado nos seguintes diluentes: água para injetáveis, cloreto de sódio 0,9%, dextrose 5%, solução de Ringer, lactato de sódio e poligelina. Recomenda-se a administração de 1 a 4 g de cefotaxima por dia divididas em duas ou três doses; no caso de infecção grave a quantidade de até 10 a 12 g por dia pode ser utilizada (ANVISA, 2016; KOROLKOVAS, 2010).

3.2.5 Métodos analíticos

O controle de qualidade de fármacos e medicamentos é uma prática que está inserida nas Boas Práticas de Fabricação na indústria farmacêutica (BRASIL, 2010). Assim sendo, o desenvolvimento e a validação de novos métodos analíticos e o aperfeiçoamento dos métodos existentes para a adequada identificação e quantificação de fármacos e medicamentos são de grande importância na indústria e no meio científico, para garantir a segurança e eficácia de tais produtos. Portanto, grupos de pesquisadores têm estudado novos métodos analíticos para quantificação da cefotaxima sódica em medicamentos e diversas matrizes biológicas.

Yilmaz e Biryol (1998) desenvolveram um método de determinação da cefotaxima por voltametria. As condições de análise encontradas foram: eletrodo carbono, fio de platina para doseamento e eletrodo de calomelano como padrão e soluções para análise utilizando ácido fosfórico 0,2 M como diluente. A quantificação por titulação direta foi desenvolvida por Helaleh e colaboradores (1998). No método, uma solução de cefotaxima sódica pó liofilizado na concentração de 1 mg/mL foi titulada com iodeto de potássio e a detecção do ponto final foi realizada com o auxílio do tetracloreto de carbono 0,01 M.

Amostras de cefotaxima sódica matéria-prima e em formulações farmacêuticas foram analisadas por Nassar e colaboradores (1996) com a avaliação da utilidade dos compostos N-bromossuccinimida (NBS) e N-clorossuccinimida (NCS) na determinação da cefotaxima sódica pelas técnicas colorimétrica e titrimétrica. O tempo ótimo de reação foi de 20 minutos e o método teve como limite de quantificação 1,5913 mg de cefotaxima.

Métodos de determinação da cefotaxima sódica e outras cefalosporinas por eletroforese capilar também são relatados na literatura com diferentes condições de análise (PENALVO et al., 1996; MRESTRANI et al., 1997; PENALVO et al., 1997; MRESTRANI et al., 1999; LIN et al., 2000; GÁSPÁR, ÁNDRASI, KARDOS, 2002; GÁSPÁR et al., 2002; SOLANGI et al., 2007; WANG et al., 2009).

Foram encontrados métodos para a determinação de outras cefalosporinas e da cefotaxima por espectrofotometria com absorção no ultravioleta e no visível em diversas matrizes biológicas, em insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e medicamentos. Os métodos encontrados na literatura e as principais condições de análise de cada um estão listadas na Tabela 1.

Sendo a cromatografia líquida de alta eficiência uma das técnicas mais utilizadas para a análise de fármacos e medicamentos, foi encontrada uma maior quantidade de métodos analíticos para a quantificação da cefotaxima sódica, tanto em medicamentos quanto em matrizes biológicas.

A Farmacopeia Americana (USP 37, 2014) traz monografias para o fármaco, para a solução injetável (reconstituída) e para o pó liofilizado para solução injetável. A monografia da matéria-prima apresenta um método de determinação de teor por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna C18 nas dimensões 150 x 3,9 mm, 5 µm mantida em temperatura de 30°C. Foi utilizado modo gradiente com alternância das proporções das fases móveis A (solução tamponante fosfato 0,05 M pH ajustado para 6,25 com ácido fosfórico e metanol 86:14 (V/V)) e B (solução tamponante fosfato 0,05 M pH ajustado para 6,25 com ácido fosfórico e metanol 60:40 (V/V)), com vazão de 1,0 mL/min. O detector utilizado foi o UV em 235 nm. O teor e o teste de impurezas orgânicas para a solução injetável e para o pó liofilizado para solução injetável são realizados nas mesmas condições que o teor para a matéria-prima (USP 37, 2014).

A Farmacopeia Britânica apresenta monografias para a matéria-prima e para solução injetável (reconstituída). A monografia da matéria-prima apresenta testes de teor e substâncias relacionadas por cromatografia líquida de alta eficiência com as seguintes condições de análise: coluna C18 com dimensões de 150 x 3,9 mm, 5 µm, temperatura de 30°C, fase móvel

solução tamponante fosfato pH ajustado para 6,25 com ácido fosfórico e metanol com gradiente de eluição, vazão de 1,0 mL/min e detector de UV em 235 nm. A monografia para a solução injetável traz testes de substâncias relacionadas e teor por cromatografia líquida de alta eficiência com as seguintes condições de análise: coluna C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm, 5 µm, temperatura de 25°C, fase móvel tampão fosfato pH ajustado para 7,0 com ácido fosfórico e metanol 100:37,5 (V/V), vazão de 1,0 mL/min e detector de UV em 235 nm (BP, 2014).

A Farmacopeia Brasileira (2010) e seu primeiro suplemento (2016) não contemplam monografia para a cefotaxima sódica e para o produto acabado.

Os métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência relatados na literatura, em sua maioria, apresentam fases móveis constituídas por soluções tamponantes, o que pode prejudicar o desempenho das colunas cromatográficas e do sistema cromatográfico, além da utilização de solventes que geram resíduos tóxicos. Portanto, é salientada a necessidade de desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos analíticos que apresentem vantagens sobre os existentes. Os métodos analíticos encontrados, assim como as condições de análise, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Condições de análise para os métodos por espectrofotometria no ultravioleta e no visível

Amostra	Preparo da amostra / comprimento de onda	Faixa de concentração	Referência
Pó liofilizado e plasma	Adição de excesso de <i>N</i> -bromossuccinimida ao fármaco em meio ácido e determinação do excesso de <i>N</i> -bromossuccinimida por reação com alaranjado de metila em 508 nm.	1,2-3,2 µg/mL	ASWANI; GURUPADA; NAVYA, 2011
IFA e formas farmacêuticas	Complexação do fármaco com negro de eriocromo T em meio ácido, extração com diclorometano e leitura da fase orgânica em 510 nm.	30-120 µg/mL	SAYED et al., 2012b
IFA e formas farmacêuticas	Hidrólise do anel β-lactâmico das cefalosporinas com NaOH e reação com iodato liberando iodo em meio ácido, o iodo liberado oxida formando uma coloração de azul a violeta com absorção máxima em 556 nm. A absorbância foi medida em faixa de pH de 4,0 a 4,2.	0,5-5,8 µg/mL	PASHA; NARAYANA, 2008
IFA	β-lactâmicos ligados ao 2-aminotiazol-4-il-2-alcóximinoacetamido formam complexo de coloração roxa ou vermelhocereja após reação com nitrito de sódio em meio ácido. A quantificação foi realizada em 500 nm.	12,5-200 µg/mL	URI; JAIN, 1985
IFA e formas farmacêuticas	Reação com cloridrato de 2-nitrofenil-hidrazina na presença de dicicloexilcarbo di-imida e piridina. A coloração violeta resultante da hidrazina foi quantificada em 537 nm.	0,6-3 mmol/10 mL	KORANI et al., 1989
IFA	Água como diluente, análise em 276,8 nm.	5-80 µg/mL	NUEVAS et al., 1998
IFA e forma farmacêutica	Água e metanol como diluente, análise em 260 nm.	10-30 µg/mL	BUSHRA et al., 2014
Pó liofilizado	Hidrólise das cefalosporinas com NaOH com produção de íon sulfeto, que reage com sulfato de <i>N,N</i> -dietil- <i>p</i> -fenilenadiazina e ferro (III) produzindo coloração azul quantificada em 670 nm. No método A, o íon sulfeto reage com o dicloridrato de <i>p</i> -phenilenadiazina e ferro (III), desenvolvendo coloração violeta quantificada em 597 nm.	Método A: 95,48-477,4 µg/mL Método B: 0,5-450 µg/mL	METWALLY; ALWARTHAN; AL-TAMIMI, 2001
IFA e forma farmacêutica	NaOH 0,1 M como diluente, análise em 238 nm.	5-30 µg/mL	MARREDDY; REVATHI; MARREDDY, 2011
Forma farmacêutica	Água e metanol como diluente com 1,2-naftoquinona-4-sulfônico, análise em 493 nm.	0,2-1,2 µg/mL	AHMED; ELBASHIR; ABOUL-ENEIN, 2011
IFA	Hidrólise das cefalosporinas em meio alcalino em temperatura elevada com 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, desenvolvendo coloração amarela, análise em 390 nm.	5-160 µg/mL	RAGEH et al., 2010
IFA e forma farmacêutica	Reagente cromo metálico (VI) é oxidado diretamente por dicromato de potássio na presença do fármaco em meio ácido formando um complexo ternário com absorção em 520 nm.	0,2-28 µg/mL	AMIN; RAGAB, 2004
IFA	Complexo colorido de transferência de carga formado entre os fármacos e 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ) ou ácido <i>p</i> -cloranílico (<i>p</i> -CA), análise em 838 nm para o TCNQ e 529 nm para o <i>p</i> -CA.	TCNQ: 7,6-15,2 µg/mL <i>p</i> -CA: 95,0-427,5 µg/mL	AYAD et al., 1999a

Tabela 1: Condições de análise para os métodos por espectrofotometria no ultravioleta e no visível

(continuação)			
Amostra	Preparo da amostra / comprimento de onda	Faixa de concentração	Referência
IFA	Reação do fármaco com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato sódico em solução de NaOH 0,1 M, análise em 489 nm.	3,8–114,6 mg/mL	FAN et al., 2013
IFA e forma farmacêutica	Oxidação do fármaco com cério (IV) e 1-clorobenzotriazol, análise em 464 nm para o cério (IV) e em 298 nm para o 1-clorobenzotriazol.	CE(IV): 0,5–4,5 µg/mL 1-CTB: 10,0–70,0 µg/mL	AYAD et al., 1999b
Forma farmacêutica	Reação dos fármacos com nitrato de ferro (III) transformando-se na forma ferro (II), que reage com hexacianoferrato (III) de potássio produzindo um complexo de coloração azul, análise em 777 nm.	0,1–8,0 mg/mL	AL-ARFAJ, 2005
Forma farmacêutica	Hidrólise de fármaco em meio alcalino em sob aquecimento e oxidação com ferro (III) em meio com ácido sulfúrico produzindo ferro (II), que complexa-se com <i>o</i> -fenantrolina em solução tamponante citrato pH 4,2 formando complexo vermelho com absorção em 510 nm.	0,20–2,50 mg/mL	AL-MOMANI, 1988
IFA e forma farmacêutica	Oxidação do fármaco com ácido molibdofosfórico resulta em coloração azul, análise em 700 nm.	-	ISSOPOULOS, 1988
IFA e forma farmacêutica	Reação de grupos amino na molécula com a ninidrina produzindo coloração com absorbância máxima em 568 nm	10–90 µg/mL	SAYED, 2013
IFA e forma farmacêutica	O trabalho apresenta os métodos A, B e C. Formação de cromogêneos rosa e roxo obtidos com a diazotização dos fármacos com ácido nitroso e os reagentes N-(1-naftil) etilenodiaminodiclорídrico (mét. A), difenilamina (mét. B) e β-naftol (mét. C) com absorbâncias máximas de 555 nm, 510 nm e 542 nm, respectivamente.	Método A: 5–25 µg/mL Método B: 20–100 µg/mL Método C: 10–50 µg/mL	MRUTHYUNJAY ASWAMY et al., 2006
Forma farmacêutica	Oxidação com permanganato de potássio em meio alcalino, análise em 610 nm.	Tempo inicial: 5–15 µg/mL Tempo fixo: 5–25 µg/mL	OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009
IFA e forma farmacêutica	Fármaco em meio alcalino com ácido 1, 2-naftoquinona-4-sulfônico sódico forma coloração laranja com análise em 495 nm.	20–140 µg/mL	KUMAR et al., 2010
Forma farmacêutica	Foram desenvolvidos 3 métodos: 1. método da equação simultânea; a cefotaxima é determinada em comprimento de onda 233,5 nm. 2. área sob a curva; a cefotaxima é determinada em 238,5–228,5 nm. 3. método do modo multicomponente; a cefotaxima é determinada em 233,5 nm.	1,5–35 µg/mL	NANDA et al., 2010
IFA	Complexação de cefalosporinas com cloreto de paládio (II), análise em 347 nm.	3,99–29,93 µg/mL	BAGHERI et al., 2012
Forma farmacêutica	Foram desenvolvidos 2 métodos: 1. método da equação simultânea; a cefotaxima é determinada no comprimento de onda 231 nm. 2. método da absorção-Q; a cefotaxima é determinada em 234,2 nm.	5–30 µg/mL	RAUNT et al., 2011

Tabela 1: Condições de análise para os métodos por espectrofotometria no ultravioleta e no visível

(continuação)			
Amostra	Preparo da amostra / comprimento de onda	Faixa de concentração	Referência
IFA	Foram desenvolvidos 3 métodos:		
	1. reação com σ -acceptor iodo, análise em 364 nm.	1,6-40 $\mu\text{g/mL}$	SAJEH et al., 2001
	2. reação com π -acceptor 2,3-dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona (DDQ), análise em 460 nm.	2,40-200 $\mu\text{g/mL}$	
3. reação com π -acceptor 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ), análise em 843 nm.	3,6-18 $\mu\text{g/mL}$		
IFA	Hidrólise ácida das cefalosporinas e oxidação com ácido vanadofosfórico, análise em 516 nm.	0,4-45 $\mu\text{g/mL}$	AMIN; SHAMA, 2000
Plasma	Análise em 295 nm.	-	DATTA; MANDAL; CHAKRABORTY, 2003
IFA e forma farmacêutica	Complexação da gelatina com a prata, redução por íons sulfeto gerados da hidrólise alcalina dos fármacos, com a formação de solução amarelo-prateada, análise em 352 nm.	24-76 $\mu\text{g/mL}$	SAYED et al., 2012

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
IFA	Luna C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5µm)	solução tamponante acetato de amônio 20 mM e acetonitrila (60:40 V/V)	1,0	20	UV 254 nm	3,477	SARANYA et al., 2014
IFA	C ₁₈	fosfato de sódio dibásico 0,05 M pH 6,25 e metanol	1,0	-	UV 235 nm, 30°C	Entre 13 e 30	ZHANG et al., 2014
Mel	Acquity UPLC BEH C ₁₈ , (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	ácido fórmico 0,1% e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (gradiente)	0,4	5 (TOF/MS) e 10 (MS/MS)	TOF/MS e MS/MS, 40°C	-	SPORRI et al., 2014
IFA	Fortis C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm)	metanol e água pH ajustado para 4,0 com ácido acético (30:70 V/V)	0,8	20	UV 235 nm, 25°C	4,6	STIRBET; LITESCU; RADU, 2014
Leite bovino	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila 0,1% ácido fórmico (gradiente)	0,25	5	MS/MS, 35°C	1,86	LI et al., 2014
Soluções de nutrição parenteral	Supelcosil LC-18-DB (250 x 4,6 mm, 5 µm)	acetato de amônio 25 mM pH ajustado para 4,0 com ácido acético glacial e acetonitrila 50% em metanol (80:20 V/V)	0,9	3	UV 254 nm, 40°C	6,2	IQBAL et al., 2013
IFA	Hibar C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	metanol e ácido fórmico 0,05% (55:45 V/V)	1,0	20	UV, 260 nm MS	3,740	QURESHI et al., 2013
Águas residuais	Acquity HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila (gradiente)	0,5	5	MS, 30°C	1,18	GROS et al., 2013
Sangue humano	ACE C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm)	água 0,1% ácido fórmico ou acetato de amônio 5 mM e acetonitrila (gradiente)	0,4	15	MS	7,06	SZULTKA et al., 2013
Fluido cerebrospinal	LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm)	solução tamponante acetato pH 4,8 e metanol (85:15 V/V)	1,5	20	UV 254 nm, 23°C	13,8	BAFELTOWS KA et al., 2002
Leite	CN-RP (150 x 2,1 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato 0,01 M pH 5,8 e acetonitrila (60:40 V/V)	1,0	5	UV 220 nm	5,9	ADLNASAB et al., 2012
IFA	C ₁₈ (25 x 4,6 mm)	metanol fosfato de potássio diidrogenado 40 mM pH ajustado para 3,5 com ácido o-fosfórico (30:70 V/V)	0,85	50	UV 254 nm, 30°C	9,593	ALNAHHAS; HASSAN; ALHOSINI, 2012
IFA	Acclaim C ₁₈ PAII (150 x 2,1 mm, 3 µm)	água 0,1 % ácido fórmico e acetonitrila 0,1 % ácido fórmico (gradiente)	0,4	-	MS, 25°C	12,694	GODE et al., 2012
IFA	Click-CD (150 x 2,1 mm, 5 µm, tamanho de poro 10 nm)	formiato de amônio 10 mM pH 6,8 e acetonitrila + formiato de amônio 100 mM 90:10 V/V pH 6,8 (gradiente)	0,2	-	UV 254 nm e MS, 30°C	± 5,0	LIU et al., 2011

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

(continuação)

Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
IFA	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila e água pH ajustado para 3,0 com solução de ácido clorídrico 10%, p/V (15:85 V/V)	0,5	20	UV 254 nm	-	HAN; WANG; JIN; ROW, 2011
Soro	Unison UK-C ₁₈ ODS (50 x 2 mm, 3 µm)	formiato de amônio aquoso 10 mM 0,1% de ácido fórmico e metanol 0,1% de ácido fórmico (gradiente)	0,3	20	MS/MS, 30 e 5°C	5,86	OHMORI et al., 2011
Água	Shimpack VP-ODS (150 x 4,6 mm, 5 µm)	água com ácido fórmico 0,1% e metanol (60:40 V/V)	0,5	10	UV 254 nm e 270 nm, 35°C	7,5	WANG et al., 2011
Plasma humano	Atlantis T3 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	solução de ácido fosfórico 10 mM pH ajustado para 2 com ácido clorídrico e acetonitrila (gradiente)	-	20	UV 230 nm	6,8	VERDIER et al., 2011
IFA	Luna C ₁₈ (4,6 mm x 150 mm, 5,0 µm)	ácido fosfórico 0,007 M e acetonitrila (85:15 V/V)	1,3	20	UV 254 nm	-	MANDA et al., 2011
Leite	1: Inertsil ODS-3 (250 x 4 mm, 5 µm) 2: Orbit 100 C ₁₈ (250 x 4 mm, 5 µm) 3: Chromolith RP-18 (100 x 4,6 mm)	ácido acético 0,1% e metanol + acetonitrila (75:25 V/V) (gradiente)	1,5	20	UV 265 nm	22,142	KARAGEORU; SAMANIDOU, 2010
Pó liofilizado	Symmetry ODS (150 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato e metanol / acetonitrila com pH ajustado para 6,0 com ácido ortofosfórico (80:15:5 V/V/V)	1,3	20	UV 254 nm, 25°C	5,8	TIPPA; SINGH, 2010
Pó liofilizado	SS Wakosil II- C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante acetato de amônio pH 6,8 e acetonitrila (85:15 V/V)	0,8	100	UV 252 nm	5,57	LALITHA; SANJAY, 2010
Urina	OptimaPak C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato 0,005 mol/L e metanol pH 5,0 (79:21 V/V)	0,7	-	UV 254 nm	18,1	ZHU; ROW, 2009
IFA	XTerra C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato 40 mM pH 3,2 e metanol (gradiente)	0,35	100	UV, 32°C	± 16	NEMUTLU et al., 2009
Fluido peritoneal	Atlantis C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ácido ortofosfórico pH 2 e acetonitrila (gradiente)	2,0	-	UV 230 nm	-	SEGUIN et al., 2009
Urina	XTerra C ₁₈ (150 x 3,9 mm, 5 µm)	solução de ácido ortofosfórico 0,007 M e acetonitrila (85:15 V/V)	1,0	20	UV 262 nm, 25°C	3,822	ALEKSIC et al., 2008

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

							(continuação)
Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
Leite	Kromasil 100, C ₁₈ (250 x 4,0 mm, 5 µm)	Solução tamponante acetato pH 4 e metanol (60:40 V/V)	1,0	20	UV 265 nm	2,514	SAMANIDOU; TSOCHATZIS; PAPADOYANNIS, 2008
Solução injetável de glicose	Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm)	metanol e água (gradiente)	1,0	20	UV 238 nm, 30°C	2,254	GUO et al., 2007
Fármaco e pó liofilizado	Zorbax ODS (150 x 4,6 mm) Hypersil ODS (125 x 4,5 mm)	água e acetonitrila (50:50 V/V)	-	-	UV 254 nm e MS	1,732	SOKOLOVA; CHUCHALIN, 2006
Plasma	C ₁₈ Aqua (150 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante diidrogenofosfato de amônio 50 mM, acetonitrila e trietilamina (87,8:12:0,2 V/V/V) pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico 85%	1,0	100	UV 285 nm	13,21	ROSSEEL; VANDEWOUDE, 2004
Plasma humano	Hibar Lichrospher 100 RP8 (250 x 4 mm, 5 µm)	solução tamponante diidrogenofosfato 0,025 mol/L pH ajustado para 2,2 com ácido ortofosfórico e metanol (75:25 V/V)	1,2	100	UV 255 e 280 nm, 25°C	7,5	ZENDELOVSKA; STAFILOV; MILOSEVSKI, 2003
Plasma de rato e plasma humano	Zorbax SB-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	acetato de amônio 0,05 M, acetonitrila e tetraidrofurano (87:1:2, V/V) pH ajustado para 5,5 com ácido acético glacial	1,0	20	UV 254 nm	6,3	LING; YUEN; BARKER, 2003
Intestino de rato	C ₁₈ Shim-Pack (CLC-ODS-M) (250 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato pH 7,0 e metanol (70:30 V/V)	1,0	50	UV 254 nm, 25°C	± 7,5	SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002
Leite	Inertsil ODS-3 (250 x 4 mm, 5 µm)	acetato de amônio 0,05 M e acetonitrila	1,4	20	UV 265 nm	22,5	KARAGEORGOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2012
Sangue e urina	Spherisorb ODS-2 (250 x 34 mm, 5 µm)	solução tamponante acetato pH 4,0 / metanol (78:22 V/V)	1,2	20	UV 265 nm	4,348	SAMANIDOU; HAPESHI; PAPADOYANNIS, 2003

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

(continuação)							
Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
IFA	ODS TSK-gel 80TM (150 x 2,0 mm, 5 µm)	água e acetonitrila (20:80 V/V)	1,0	5	MS	-	HORIMOTO et al., 2002
Plasma	Econosphere C ₁₈ (5 µm)	solução tamponante acetato de sódio pH ajustado para 4,8 com ácido acético glacial e metanol (80:20 V/V)	1,0	20	MS	6,0	METZ; KOHLHEPP; GILBERT, 2002
Plasma humano e fluido cerebrospinal	Spherisorb ODS2 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato 0,007 M e acetonitrila (85:15 V/V)	1,3	20	UV 262 nm	6,8	SCANES et al., 2001
Leite bovino	Nova-Pak fenil (150 x 3,9 mm, 5 µm)	ácido octanossulfonato 0,005 M (pH 2,52)+acetonitrila (90:10 V/V) e acetonitrila+metanol (30:15 V/V) (gradiente)	1,0	100	UV 270 nm, 20-24°C	-	SORENSEN; SNOR, 2000
Sangue	Microbore C ₁₈ (150 x 1 mm, 5 µm)	ácido fosfórico monossódico 10 mM e metanol pH 5,5 (75:25 V/V)	0,05	10	UV 254 nm	7	TSAI et al., 2000
IFA	Supelcosil ODS (150 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante fosfato pH 7 e metanol (4:6 V/V)	1,0	20	UV 254 nm	4,27	SHALABY, 1988
IFA	Nova-Pak C ₁₈ Radial-Pak (100 x 8 mm, 4 µm)	solução tamponante acetato 0,01 M pH 4,7 + metanol + acetonitrila (87:11:2 V/V/V) e solução tamponante acetato 0,01 M pH 4,7 + metanol + acetonitrila (87:2:11 V/V/V) (gradiente)	1,0	50	eletroquímica, 20 ± 2°C	± 15	YUN et al., 1998
IFA	Schimpac GLC-ODS (150 x 6 mm, 5 µm)	acetato de amônio 0,1 M e acetonitrila (90:10 V/V) pH ajustado para 7,5 com amônia	1,5	50	UV 270 nm	5	ABDEL-HAMID, 1998
Humor aquoso e plasma	ODS Hypersil C ₁₈ (300 x 4,6 mm, 5 µm)	fosfato de sódio monoidratado 0,01 M + acetonitrila 15% (V/V) e N,N-dimetilformamida + água 6% (V/V) pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico 85%	1,0	10	UV 285 nm	6,7	KRAEMER et al., 1997

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

(continuação)

Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
IFA	1: Develosil PhA (150 x 0,5 mm, 5 µm) 2: Develosil PhA (30 x 0,5 mm, 10 µm)	1: água deionizada, metanol, ácido acético e glicerol pH 3 (59:40:0,5:0,5 V/V) 2: água deionizada, metanol, ácido acético e dietanolamina pH 3 (57:40:2,5:0,5 V/V)	0,004	500	MS	16,1 e 13,6	KOBAYASHI et al., 1996
Plasma e urina	Zorbax SB-C ₈ (80 x 4,6 mm, 3,5 µm)	ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila (82:12 V/V)	1,0	20	UV 254 nm	1,75	KIRKLAND; McCOMBS; KIRKLAND, 1994
Sangue, fluido ascítico e soro	C ₁₈	solução tamponante acetato de sódio 0,1 M pH 4,1 e brometo de sódio 0,01 M (90:10 V/V)	1,8	100	UV	-	RUNYON et al., 1991
Plasma	Partisil ODS-3 (250 x 4 mm)	solução tamponante acetato 0,02 M pH 4,3 e acetonitrila (15:85 V/V)	1,0	100	UV 254 nm	8,7	LEE; LEE, 1990
Plasma de rato	RP-8 (250 x 4,6 mm, 10 µm)	solução tamponante fosfato de sódio 20 mM pH 4,5) e metanol (77:23 V/V)	1,0	20	UV 254 nm, 25°C	14,6	HAKIM; BOURNE; TRIGGS, 1988
Soro e urina	Hypersil ODS (200 x 4,6 mm, 5 µm)	1: solução tamponante fosfato 0,05 M pH 2,1 e metanol (80:20 V/V) 2: solução tamponante acetato 0,1 M pH 4,1 e metanol (80:20 V/V) 3: solução tamponante fosfato 0,05 M pH 7,65 e metanol (83:17 V/V).	1,6	24	UV 254 nm e amperométrica	± 18	FABRE; BLANCHIN; KOK, 1988
IFA	Hypersil ODS (200 x 4,6 mm, 5 µm)	solução tamponante acetato 0,1 M, pH 4,1 e metanol (83:17 V/V) com 0,01 M de NaBr	1,8	24	eletroquímica, +0,4 V com eletrodo referência Ag/AgCl/KCl e UV 254 nm, 20°C	13,5	FABRE; KOK, 1988
Soro	Resolve (100 x 8 mm, 5 µm)	ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila (10:90 V/V)	1,0	20	UV 254 nm	-	ADAMIVICS, 1987

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

							(continuação)
Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
Soro	Nucleosil CIS (150 x 4,6 mm, 5 µm)	1: diidrogenofosfato sódico 47 mM + dodecil sulfato de sódio 80 mM : ácido fosfórico 2-propanol 3 mM pH 3,3 (92:8 V/V) 2: diidrogenofosfato sódico 45 mM + dodecil sulfato de sódio 80 mM : ácido fosfórico 2-propanol 5 mM pH 3,1 (92:8 V/V) 3: diidrogenofosfato sódico 40 mM + dodecil sulfato de sódio 80 mM : ácido fosfórico 2-propanol 10 mM pH 2,9 (92:8 V/V)	1,0	100	UV 260 nm	23	HAGINAKA et al., 1987
Soro, urina e bile	Ultrasphere ODS (250 mm ou 150 x 4,6 mm, 5 µm)	acetato de amônio 20 mM e acetonitrila pH 5 (92:8 V/V)	1,0	20	UV 254 nm	8,4	JEHL; BIRCKEL; MONTEIL, 1987
IFA	MOS-Hypersil (10 x 0,3 mm, 5 µm)	solução tamponante (ácido cítrico 0,0011 M + fosfato dissódico 0,031 M com força de 0,083) pH 7,65 + água (1:3 V/V) e metanol (93:7 V/V)	0,8	10	UV 254 nm, 25°C	17,5 e 14	FABRE; BLANCHIN; TJADEN, 1986
Sangue hemolisado	µ-Bondapak C ₁₈	Solução tamponante fosfato de sódio 0,1 M pH 6,1 e acetonitrila 8% (92:8 V/V)	2,0	-	UV 299 nm	-	WELCH; BAWDON, 1986
Plasma e urina	SC-02 (125 x 4,6 mm, 10 µm)	acetato de amônio 0,2% e metanol (5:1 V/V)	-	10	UV 254 nm	-	TOGASHI, 1985
Plasma e urina	C ₁₈ µBondapak (300 x 4,5 mm, 10 µm)	ácido fosfórico 0,007 M e acetonitrila (85:15 V/V)	1,3	20	UV, 254 nm	8,7	YOST; DERENDORF, 1985
Urina	Radial-Pak C ₁₈ (100 x 8 mm; µm)	água e acetonitrila (83:17 V/V)	4,0	5-20	UV 270 nm	6,03	DEMOTES-MAINARD et al., 1984
Plasma e urina	LiChrosorb RP-18 (120 x 4,7 mm, 5 µm)	Solução tamponante diidrogenofosfato de potássio 0,2 mol/L e metanol (20:80 V/V)	1,0	20	UV 254 nm	método 3: 10 método 4: 40	LECAILLON et al., 1982

Tabela 2: Condições de análise para os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura

(continuação)

Amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção	Tempo de retenção (minutos)	Referência
Soro e bile	Hibar RT 250-4 LiChrosorb RP 18 (250 x 4 mm, 7 µm)	Diidrogenofosfato sódico 20 mM em água, metanol e acetonitrila (83:7:10 V/V/V)	1,5	-	UV 254 nm	4,8	KEES et al., 1981
Plasma e urina	ODS Spherisorb (100 x 3 mm, 5 µm)	água, metanol e ácido acético glacial (87:12:1 V/V)	1,1	20	UV 262 nm	14 e 18	DELL; CHAMBERLAIN; COPPIN, 1981

3.2.6 Aspectos gerais do fármaco

3.2.6.1 Descrição geral

Nome: cefotaxima sódica

CAS: 64485-93-4 (BP, 2014).

Nome químico: (6R, 7R)-3-[(acetiloxi) metil]-7- [[(2Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoxiimino)acetil]amino]-8-oxo-5tia-1- azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxilato sódico (USP 37, 2014).

Fórmula molecular: C₁₆H₁₆N₅NaO₇S₂ (USP 37, 2014).

Massa molecular: 477,45 g/mol (BP, 2014).

Propriedades físico-químicas: a cefotaxima sódica possui aspecto de um pó cristalino branco ou ligeiramente amarelado (JP, 2011) e higroscópico (Farmacopeia Portuguesa, 2005; BP, 2014) ou pó cristalino quase branco a amarelo claro (USP 37, 2014), é livremente solúvel em água, moderadamente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol (JP, 2011; O'NEIL, 2013; BP, 2014) e praticamente insolúvel em solventes orgânicos (O'NEIL, 2013; USP 37, 2014), apresenta absorção máxima no UV em 235 nm (BP, 2014). Na literatura não há relatos de existência de polimorfismo para este fármaco.

pH: entre 4,5 e 6,5 em solução aquosa na concentração de 10% (JP, 2011; BP, 2014; USP 37, 2014).

pKa: os pKa's da cefotaxima sódica encontrados na literatura, assim como os grupamentos referentes, estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: pKa's para a cefotaxima sódica encontrados na literatura

Referência	pKa 1 (grupamento carboxílico)	pKa 2 (anel aminotiazólico)	pKa 3 (grupamento amida)
Fabre et al., 1984	2,1	3,4	10,9
Aleksic et al., 2005	2,21	3,15	10,87

Categoria: antibacteriano cefalosporínico (BP, 2014) ou antibacteriano (O'NEIL, 2013).

Classe: cefalosporina de terceira geração.

Comercialização no Brasil: A cefotaxima sódica é comercializada no Brasil na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável. Os medicamentos disponíveis são: Claforan[®] (referência), fabricado pela Sanofi, Clafordil[®] (Blau Farmacêutica S.A.), Taxima[®] (Prodotti Laboratório Farmacêutico Ltda), Kefozil[®] (Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica Ltda.), Cefacolin[®] (Itaca Laboratórios Ltda.) e Cetazima[®] (Novafarma Indústria Farmacêutica) (SWEETMAN, 2011). O medicamento genérico é fabricado pelo laboratório Aurobindo Pharma Indústria Farmacêutica Ltda.

3.3 Controle de qualidade

A qualidade desde sempre foi um dos objetivos do ser humano, que busca aperfeiçoamento e desenvolvimento a fim de atender da melhor maneira as necessidades de consumidores, independente do campo de atuação. O termo pode ser definido como as principais características atribuídas a um produto que atendem as necessidades dos clientes, satisfazendo-os com segurança e eficácia adequadas, adequação ao uso do produto (FISHER; ALDEA; BAÑARES-ALCÁNTARA, 2008; RAJA; WEI, 2015).

Na década de 1920, o sistema de gestão da qualidade começa a ser inserido no meio industrial com Druker, Juran, Deming, Ishikawa, Crosby, Feigenbaum e outros, que se aprofundaram no tema para aprimorar o processo de gestão organizacional (RAJA; WEI, 2015).

Anteriormente, a qualidade era avaliada somente em produtos acabados, porém com o passar do tempo notou-se a necessidade de verificação do processo industrial como um todo. O progresso na indústria farmacêutica é iniciado na década de 1960 com o emprego de práticas regulatórias pelo FDA, denominadas Boas Práticas de Fabricação, e a aplicação do Controle de qualidade Total (ISHIKAWA, 1993; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Por volta da década de 1970 surge um novo modo de trabalho baseado no planejamento das atividades e investimento em procedimentos, técnicas, atitudes e postura preventivos, ou seja, a Garantia da Qualidade. Posteriormente, é implantado o sistema *International Standard Organization* (ISO) e suas normas, envolvendo a certificação e a

padronização na organização de estabelecimentos prestadores de serviços, conferindo segurança, confiabilidade e qualidade aos produtos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; ISO, 2016). A aplicação das normas da ISO tem como objetivo aumentar a satisfação do cliente por meio da melhoria contínua do desempenho (HALLEM et al., 2013).

A qualidade é fundamental para atender às necessidades do paciente e garantir as características pertinentes aos produtos; para alcançá-la é necessário investir no Controle da Qualidade Total. O Controle da Qualidade Total é uma filosofia que enfatiza uma perspectiva sistemática, integrada e consistente envolvendo tudo e todos numa organização visando a total satisfação do cliente com a melhoria contínua da eficácia e eficiência da organização e seus processos. Na indústria farmacêutica, a aplicação do Controle da Qualidade Total é o investimento no planejamento e gerenciamento das atividades a partir da aquisição de um princípio ativo, durante todo o processo de produção de medicamentos, e sua chegada ao paciente. As ferramentas que auxiliam na prática do controle da qualidade total são o sistema da garantia da qualidade, as Boas Práticas de Fabricação e o controle de qualidade, juntamente com os Procedimentos Operacionais Padrões (JURAN; GRZYNA, 1991; ISHIKAWA, 1993; BRASIL, 2010; HALEEM et al., 2013).

O controle de qualidade está incluído nas Boas Práticas de Fabricação e apresenta como atividades principais a amostragem, definição de especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentação e liberação. Tais procedimentos asseguram que os processos e as análises necessárias e relevantes sejam executados e que os insumos farmacêuticos, fármacos e medicamentos somente sejam liberados para utilização na indústria e para a comercialização aos pacientes após a confirmação de qualidade satisfatória dos produtos (BRASIL, 2010).

Para o controle de qualidade da indústria farmacêutica também é exigido o monitoramento da estabilidade de produtos acabados. Tais estudos contribuem com a garantia da qualidade pela avaliação das características físico-químicas do medicamento, e com a eficácia e segurança, relacionadas à dosagem dos fármacos nos medicamentos e formação de produtos de degradação. Assim sendo, a qualidade também abrange a necessidade de métodos analíticos indicativos de estabilidade (BRASIL, 2005).

3.4 Química analítica verde

Armenta e colaboradores (2008) definem a química verde como o uso de técnicas e metodologias que visam reduzir ou eliminar o uso de insumos, produtos, solventes e reagentes

e minimizar a geração de resíduos tóxicos ao meio ambiente e ao homem. Nos últimos anos aumentou-se a conscientização em relação à economia relacionada aos processos industriais, redução de resíduos e riscos relacionados ao meio ambiente e ao homem, o que é comprovado pelo crescimento significativo de publicações de trabalhos relacionados à aplicação da química verde em diversas áreas (WELCH et al., 2010; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013). De acordo com Anastas e Warner, a química verde é baseada em 12 princípios (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013):

1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra.
2. Utilização mínima de amostra.
3. Medições *in situ* devem ser executadas.
4. Integração de processos analíticos e operações que economizem energia e reduzam a utilização de reagentes.
5. Métodos automáticos e miniaturizados devem ser utilizados.
6. Derivatização deve ser evitada.
7. A geração de um grande volume de resíduos deve ser evitada e o tratamento adequado dos resíduos analíticos deve ser realizado.
8. Métodos multianalitos e multiparâmetros são preferidos a métodos com utilização de um analito de cada vez.
9. A utilização de energia deve ser minimizada.
10. Reagentes obtidos a partir de fontes renováveis devem ser preferidos.
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos.
12. A segurança do operador deve ser aumentada.

Entre os 12 princípios, muitos deles são aplicáveis a uma ramo da química verde: a química analítica verde. O conceito da química verde começou a ser inserido com mais intensidade para a química analítica nos meios industrial e acadêmico no século 20 nas etapas de amostragem, preparo de amostras e análises (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIESNIK, 2013). Alguns dos trabalhos publicados relatam a aplicação da química verde em diversos métodos analíticos visando os objetivos mencionados em alguns dos princípios da química verde (KOEL; KALJURAND, 2006; YANG et al., 2011; TOBISZEWSKI; NAMIESNIK, 2012; PŁOTKA et al., 2013; LAVILLA et al., 2014; ASSASSI et al, 2015; BOUSSÈS et al., 2015; VOSOUGH et al., 2015; KAPALAVAVI et al., 2016).

Uma das técnicas mais empregadas na indústria farmacêutica na análise de fármacos e medicamentos é a cromatografia líquida de alta eficiência, a qual geralmente gera quantidades

consideráveis de resíduos, além do emprego de solventes tóxicos ao ambiente e aos operadores. Frente às desvantagens da técnica citadas, tem-se buscado cada vez mais o desenvolvimento de novos solventes que possam substituir aqueles compostos orgânicos comumente utilizados hoje, como líquidos iônicos, solventes eutéticos profundos, fluidos supercríticos, gases de líquidos expandidos, polímeros líquidos e solventes derivados de biomassa (ESPINO et al., 2016). O emprego de alguns dos solventes presentes na química analítica como água, etanol, 2-propanol, 1-butanol, acetato de etila, anisol e sulfolano é recomendado, já que são considerados alternativas verdes a solventes orgânicos como metanol, acetona, acetonitrila, tolueno, ácido fórmico e piridina (WELTON, 2016).

3.5 Validação de métodos analíticos

Métodos analíticos são amplamente utilizados na indústria farmacêutica com objetivo de qualificação e quantificação de medicamentos e insumos farmacêuticos para liberação de lotes, estabilidade e estudos de farmacocinética (FDA, 1994). Faz-se necessário assegurar a geração de dados confiáveis e precisos para que seja confirmada a adequação do método à finalidade do mesmo, garantindo a segurança e eficácia de um tratamento para o paciente e evitando possíveis prejuízos para a empresa. Esse objetivo é atingido por meio da validação de métodos analíticos, processo em que são avaliados determinados parâmetros de um método (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP 37, 2014).

No Brasil, o principal órgão regulatório que controla a adequação de validações de métodos analíticos em indústrias farmacêuticas é a ANVISA, a qual publicou a Resolução RE nº 899, contendo os requisitos fundamentais em uma validação. O INMETRO também publicou um guia de orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008, que possui sua última revisão de julho de 2011. Outro guia também utilizado no Brasil como referência para a validação de métodos analíticos é o ICH Q2(R1) - *Validation of Analytical Procedures: text and methodology*, além da farmacopeia americana (USP 37, 2014).

Os métodos descritos em compêndios oficiais são considerados validados, portanto não é necessário realizar uma validação completa, já para métodos analíticos inéditos, devem ser avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo linear, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005), além da adequabilidade do sistema para métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (ICH, 2005; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; USP 37, 2014).

De acordo com o enquadramento do método analítico, faz-se necessária a avaliação de determinados parâmetros para a validação. Para facilitar a verificação da necessidade de emprego de cada parâmetro para os métodos analíticos, foram criadas quatro categorias de acordo com o objetivo de cada método (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014):

- Categoria I: testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas;
- Categoria II: testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas;
- Categoria III: testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo);
- Categoria IV: testes de identificação.

Os ensaios estabelecidos para cada categoria de método estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Ensaios recomendados na validação de métodos analíticos, de acordo com a 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 por repetibilidade	Sim	Sim	Não	Não	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

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

**Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

Os parâmetros essenciais para a validação de um método são os seguintes (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014):

- **Especificidade/seletividade:** a matriz da amostra pode conter degradantes, impurezas, excipientes e adjuvantes que muitas vezes podem influenciar na análise da substância de interesse, portanto a especificidade/seletividade tem como objetivo avaliar a capacidade de um método em qualificar ou quantificar o analito de forma exata na presença dos interferentes da amostra;

- Linearidade: este parâmetro é demonstrado a partir da capacidade de um método analítico em possuir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito de interesse na amostra dentro de um intervalo específico;
- Intervalo: é a faixa linear entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, é estabelecido com a confirmação da exatidão, precisão e linearidade adequados para o método;
- Precisão: geralmente é analisada de acordo com a proximidade dos resultados obtidos em diversas medições de uma amostragem independente de uma mesma amostra, é avaliada em três níveis:
 - Precisão por repetibilidade (intracorrída): é realizada por um mesmo analista, nas mesmas condições de análise, com o mesmo equipamento e num curto intervalo de tempo;
 - Precisão intermediária (intercorrídas): nesta precisão é avaliada a concordância entre os resultados de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;
 - Precisão por reprodutibilidade (interlaboratorial): é avaliada a concordância de resultados obtidos em laboratórios diferentes, geralmente é aplicada à padronização de métodos analítico para inclusão em compêndios oficiais, por exemplo. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.
- Exatidão: neste parâmetro é considerada a proximidade dos valores obtidos com o método em relação ao valor considerado verdadeiro; existem alguns métodos para a determinação da exatidão:
 - Para análise do fármaco: pode ser aplicado um método analítico sugerido na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou os resultados podem ser comparados àqueles já existentes com a utilização de um segundo método bem caracterizado e com exatidão já estabelecida;
 - Para análise da forma farmacêutica: pode ser por enriquecimento, em que uma quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, caso os componentes do medicamento estejam indisponíveis pode-se realizar a análise por meio do método de adição de padrão;

- Para análise de impurezas: pode ser realizada análise pelo método de adição de padrão, ou, no caso de indisponibilidade de determinadas impurezas e/ou produtos de degradação, existe a possibilidade de comparação dos resultados obtidos com um método bem caracterizado (presente em compêndio oficial ou outro procedimento analítico validado); então a exatidão é calculada de acordo com a recuperação, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor considerado verdadeiro, incluindo intervalos de confiança;
- Robustez: é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e determinadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiança do método durante o uso na rotina; a robustez deve ser considerada durante o desenvolvimento do método e a suscetibilidade do método a qualquer variação analítica deve ser devidamente controlada e registrada no procedimento.

A adequabilidade do sistema para métodos por cromatografia líquida é um requisito também exigido pelo ICH (2005) e pela FDA (1994). Os testes realizados para verificação da adequabilidade do sistema visam comprovar a precisão e a resolução do sistema durante as análises, para geração de resultados confiáveis (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A adequabilidade do sistema baseia-se no conceito de equipamento, eletrônica, operações analíticas e amostras como um único sistema. Para o desenvolvimento dos ensaios de adequabilidade do sistema são avaliados número de pratos, resolução, fator de cauda, fator de assimetria, fator de retenção e precisão (repetibilidade) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

4.1 Considerações gerais

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica que se fundamenta na absorção da radiação infravermelha pelas moléculas. Essa absorção faz com que os movimentos vibracionais das ligações existentes nas moléculas sejam ampliados, gerando picos característicos referentes aos grupos funcionais de cada composto no espectro de infravermelho (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; PAVIA et al., 2010).

No final da década de 1950, o surgimento de espectrômetros de feixe duplo com sistemas de captação de dados de fácil operação e baixo custo permitiu a amplificação do uso da espectroscopia na região do infravermelho para a identificação de compostos orgânicos (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Por mais que algumas moléculas tenham estrutura semelhante, cada uma gera um espectro específico, o que permite a identificação de compostos por meio de interpretação dos picos gerados e comparação com uma substância padrão ou referência (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PAVIA et al., 2010).

A literatura descreve também a utilização da espectroscopia na região do infravermelho para a quantificação de fármacos em medicamentos como métodos com baixa geração de resíduos e de simples execução (MORENO; SALGADO, 2012; TÓTOLI; SALGADO, 2012; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012; ALI; SHERAZI; MAHESAR, 2012; KOGAWA; SALGADO, 2013; CORRÊA; SALGADO, 2014; MALLAH et al., 2015; KOGAWA; MELLO; SALGADO, 2016; NATORI; TÓTOLI; SALGADO, 2016).

4.2 Material e método

Como substância química de referência foi utilizada a cefotaxima sódica adquirida comercialmente da empresa Sequoia Research Products, com teor declarado de 98,0% (lote: 1401011887c).

Foi utilizado um medicamento similar como amostra de cefotaxima sódica pó liofilizado, contendo 524 mg de cefotaxima sódica e de nome comercial Cetazima[®] (lote: 0810031, prazo de validade: 05/2016). A amostra foi adquirida comercialmente e não possui adjuvantes.

Para as análises por espectroscopia no infravermelho foram confeccionadas pastilhas contendo brometo de potássio e cefotaxima sódica SQR ou cefotaxima sódica pó liofilizado. Primeiramente o brometo de potássio (Synth[®]) foi pulverizado em gral de ágata e dessecado em estufa (Fanem[®], modelo 315 SE) a 105°C até massa constante. Em seguida, o brometo de potássio e as amostras contendo o fármaco foram pesados em balança analítica (Ohaus[®], modelo DV2015 - Classe I).

Na confecção das pastilhas a amostra (cefotaxima sódica SQR ou cefotaxima sódica pó liofilizado) foi diluída em brometo de potássio na proporção de 1:100 (m/m). Quantidade determinada de diluído foi homogeneizada juntamente com brometo de potássio suficiente para a obtenção de pastilhas de massa final de 200 mg. A mistura de pós foi, então, submetida à pressão de 80 kN por 10 minutos. A leitura das pastilhas foi realizada em espectrômetro (Shimadzu[®] com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21) na região correspondente ao infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹), utilizando-se resolução de 2 cm⁻¹. Os espectros foram digitalizados obtendo-se arquivos eletrônicos.

A identificação do fármaco no pó liofilizado foi realizada utilizando-se a comparação do espectro obtido a partir da amostra com aqueles obtidos com a cefotaxima sódica SQR e na literatura.

A quantificação do fármaco nas pastilhas foi realizada com auxílio do *software IR Solution*, por meio da análise da absorbância referente à altura dos picos na região de 1825 e 1740 cm⁻¹ no espectro, pertencente à banda de estiramento da ligação dupla entre carbono e oxigênio (carbonila) do grupamento lactama encontrada na molécula da cefotaxima sódica (1759 cm⁻¹) (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Espectro na região do infravermelho obtido com a cefotaxima sódica SQR com a banda a ser utilizada na quantificação do fármaco no método por espectroscopia no infravermelho em destaque

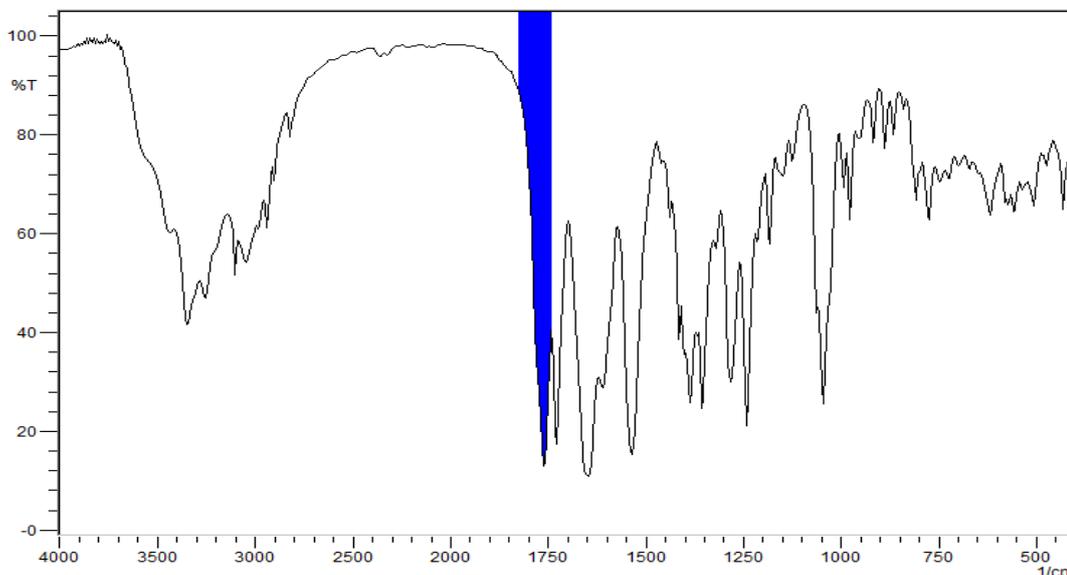
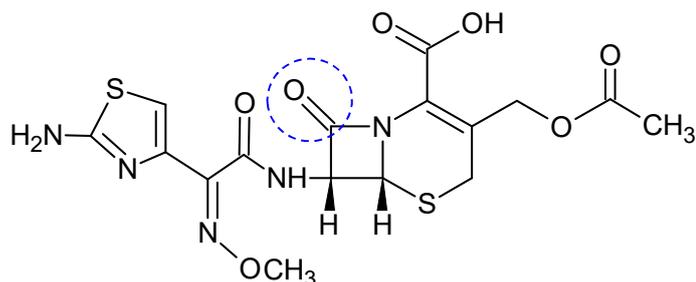


Figura 8: Estrutura química da cefotaxima sódica com a ligação referente à banda no espectro utilizada na quantificação do método por espectroscopia no infravermelho



A curva analítica e as análises estatísticas relativas ao desenvolvimento e validação do método analítico foram obtidas com o *software Microsoft Excel* (2013).

4.2.1 Validação do método

Os parâmetros avaliados na validação do método desenvolvido foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, de acordo com o estabelecido pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

4.2.1.1 Linearidade

O parâmetro de linearidade foi avaliado de acordo com as análises realizadas em três dias diferentes. Uma curva analítica foi construída utilizando-se os resultados obtidos com a

leitura de pastilhas (absorbância) contendo cefotaxima sódica SQR contemplando o intervalo de concentração de 0,4 a 0,9 mg/pastilha. Realizou-se a avaliação estatística dos resultados considerando-se a significância da regressão, o valor do coeficiente de correlação e o gráfico de resíduos padronizados.

4.2.1.2 Precisão

A precisão foi desenvolvida em triplicata e avaliada em duas categorias: repetibilidade e precisão intermediária.

Para a repetibilidade, foram confeccionadas nove pastilhas contendo cefotaxima sódica pó liofilizado, provenientes de preparos independentes e contemplando a faixa linear. As três pastilhas de cada concentração (0,4, 0,7 e 0,9 mg/pastilha) foram preparadas e analisadas pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, nas mesmas condições e no mesmo dia. Posteriormente, foi calculado o DPR% das absorbâncias obtidas para cada concentração.

A precisão intermediária foi desenvolvida da mesma maneira como a repetibilidade, porém a confecção e a análise das pastilhas foram realizadas por analistas diferentes em dias diferentes. Como o critério de aceitação para este parâmetro também foi considerado o DPR% das replicatas do segundo analista e o DPR% das médias das absorbâncias de cada concentração para cada analista.

4.2.1.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada de acordo com o ensaio de recuperação, em que a cefotaxima SQR foi adicionada ao pó liofilizado em quantidades conhecidas em três níveis de concentração (baixa, média e alta) contemplando o intervalo linear do método. O ensaio foi realizado em triplicata conforme Tabela 5 e a recuperação, em porcentagem, foi calculada por meio da equação 1, de acordo com o estabelecido pela AOAC (2002).

Tabela 5: Preparo das pastilhas de brometo de potássio para o teste de recuperação do método por espectroscopia por infravermelho para a cefotaxima sódica

Pastilha	Cefotaxima sódica pó liofilizado diluída ¹ (mg)	Cefotaxima sódica SQR diluída ¹ (mg)	Brometo de potássio ² (mg)	Concentração teórica final (mg/pastilha)
Amostra	40	-	160	0,40
R1	40	16	144	0,56
R2	40	30	130	0,70
R3	40	44	116	0,84
SQR	-	40	160	0,40

¹Diluição 1:100 (m/m) com brometo de potássio.

²Quantidade suficiente para o preparo de pastilhas de massa total de 200 mg.

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

Em que:

R(%): recuperação (em porcentagem);

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

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

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

4.2.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente. Esses parâmetros foram calculados de forma a complementar a validação, uma vez que não são requeridos para a finalidade em que se enquadra o método (categoria I) (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

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

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

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto;

IC = inclinação da curva analítica.

4.2.1.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada de acordo com o planejamento fatorial 2^3 . Neste experimento buscou-se avaliar a influência de pequenas variações de três fatores nas análises em dois níveis. Os fatores determinados e as respectivas variações estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Planejamento fatorial 2^3 para o parâmetro de robustez para o método por espectroscopia na região do infravermelho

Fatores	(-)	(+)
1: Tempo de compressão (minutos)	9	11
2: Força de compressão (kN)	76	84
3: Marca do brometo de potássio	Synth	Dinâmica

A partir do estabelecimento dos parâmetros a serem avaliados, o teste foi desenvolvido de acordo com a Tabela 7. Foram confeccionadas dezesseis pastilhas contendo cefotaxima sódica pó liofilizado na concentração de 0,7 mg/pastilha (concentração de trabalho), sendo duas referentes a cada um dos oito ensaios.

Tabela 7: Matriz de planejamento de ensaios para o parâmetro de robustez no método por espectroscopia na região do infravermelho

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

A interferência de cada fator na análise foi avaliada estatisticamente por meio da aplicação da análise de variância, calculada com o auxílio do *software* Assistat 7.7 beta e por

meio da avaliação da significância dos efeitos (coeficientes de contraste), demonstrada com a construção do gráfico de Pareto. Os efeitos foram calculados de acordo com a Tabela 8. Foi obtida a média das absorvâncias de cada ensaio, então os efeitos foram calculados subtraindo-se a média dos valores médios de absorvância do nível superior (+) dos valores médios de absorvância do nível inferior (-) (MONTGOMERY, 2009; NETO et al., 2010).

Tabela 8: Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^3

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

4.2.2 Determinação do teor de cefotaxima sódica no pó liofilizado

4.2.2.1 Preparo das pastilhas

As pastilhas de cefotaxima sódica SQR foram preparadas na concentração de 0,7 mg/pastilha pesando-se quantidade de diluído equivalente a 0,7 mg de fármaco e 130 mg de brometo de potássio.

Para a confecção das pastilhas contendo cefotaxima sódica pó liofilizado, primeiramente fez-se um *pool* com o conteúdo de vinte frascos-ampola do medicamento, e então foi preparado o diluído. Pesou-se 70 mg de diluído e 130 mg de brometo de potássio.

As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2 Cálculos

O teor de cefotaxima sódica no pó liofilizado foi calculado em mg/pastilha, conforme equação 4, e em porcentagem, de acordo com a equação 5.

$$C_a = C_{SQR} \times \frac{A_a}{A_{SQR}} \quad \text{Equação 4}$$

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

Em que:

C_a : concentração de cefotaxima sódica pó liofilizado na pastilha (mg/pastilha);

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

A_a : absorvância da pastilha de cefotaxima sódica pó liofilizado;

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

$C_a(\%)$: concentração de cefotaxima sódica pó liofilizado (em porcentagem);

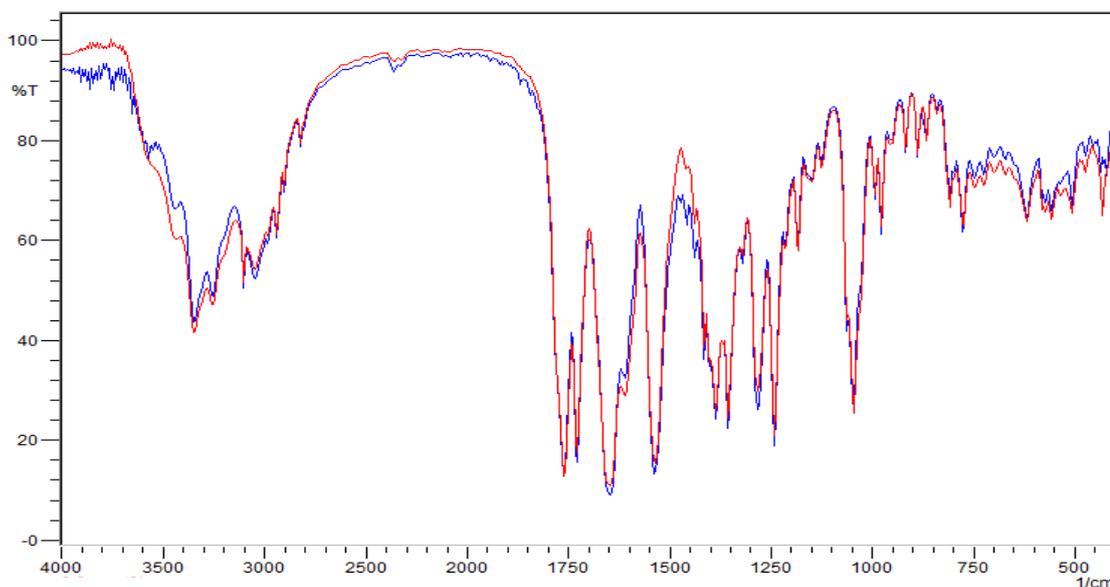
C_t : concentração teórica de cefotaxima sódica no pó liofilizado na pastilha (mg/pastilha).

4.3 Resultados

4.3.1 Desenvolvimento do método

A Figura 9 apresenta o espectro obtido com a cefotaxima sódica SQR sobreposto ao espectro obtido com a cefotaxima sódica pó liofilizado.

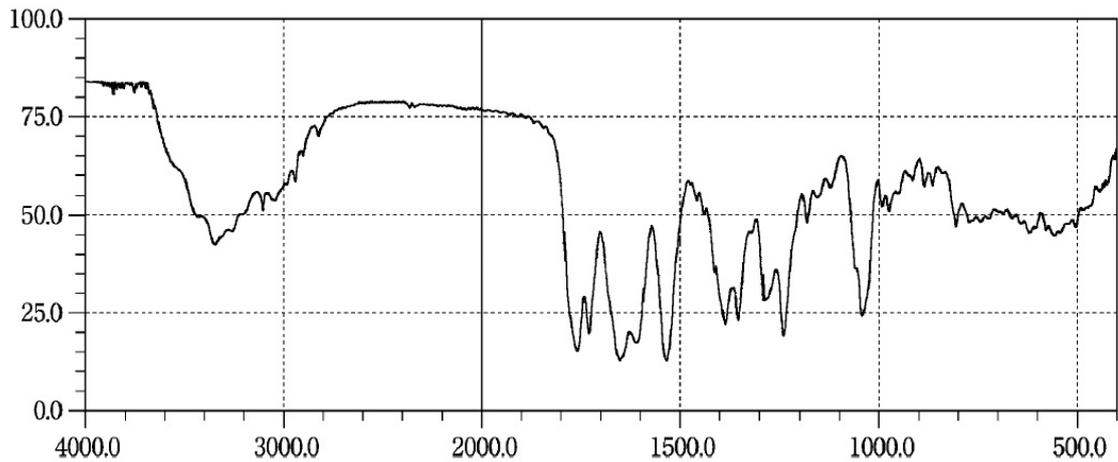
Figura 9: Espectros na região do infravermelho da cefotaxima sódica SQR e cefotaxima sódica pó liofilizado sobrepostos



Azul: cefotaxima sódica pó liofilizado. Vermelho: cefotaxima sódica SQR.

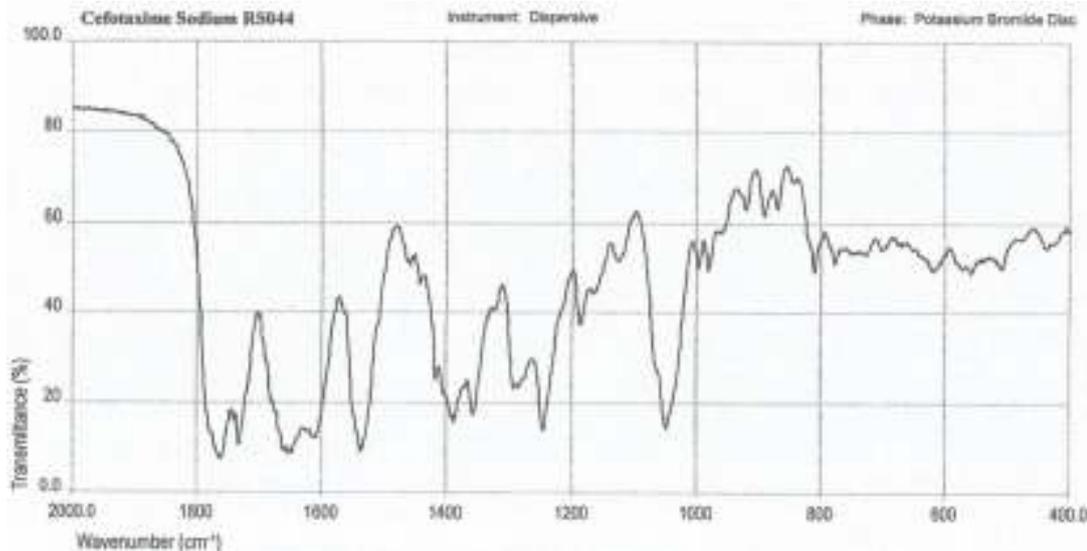
As Figuras 10 e 11 representam os espectros referência para a cefotaxima sódica encontrados em compêndios oficiais, respectivamente Farmacopeia Japonesa e Farmacopeia Britânica.

Figura 10: Espectro na região do infravermelho referência para a cefotaxima sódica encontrado na Farmacopeia Japonesa XVI (2011)



Fonte: JP, 2011.

Figura 11: Espectro na região do infravermelho referência para a cefotaxima sódica encontrado na Farmacopeia Britânica (2014)



Fonte: BP, 2014.

As bandas de absorção características encontradas para a cefotaxima sódica estão assinaladas no espectro da cefotaxima sódica SQR (Figura 12). A Tabela 9 compara as

principais bandas apresentadas no espectro com aquelas descritas na literatura (PAVIA et al., 2010).

Figura 12: Espectro na região do infravermelho obtido com a SQR com as respectivas bandas características

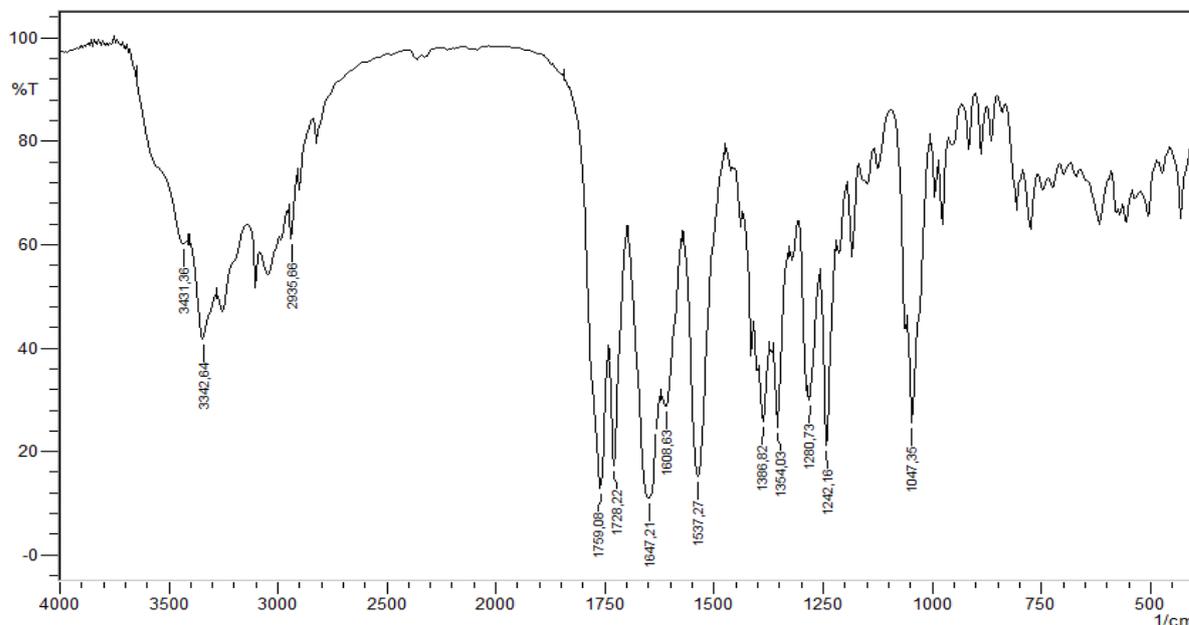


Tabela 9: Comparação das bandas de absorção apresentadas no espectro da cefotaxima sódica SQR com dados da literatura

Frequência visualizada (cm ⁻¹)	Frequência referência (cm ⁻¹)*	Vibrações e grupamentos
3431 e 3342	3430 e 3347	Estiramento da ligação N-H da amina primária
2935	3000-2840	Estiramento da ligação C-H do Csp ³
1759	1745	Estiramento da ligação C=O da lactama
1728	1750-1735	Estiramento da ligação C=O do éster
1647	1680-1630	Estiramento da ligação C=O da amida
1608	Próximo de 1600	Estiramento assimétrico da ligação C=O do grupamento carboxilato
1386 e 1354	Próximo a 1400	Estiramento simétrico da ligação C=O do grupamento carboxilato e dobramento da ligação C-H das metilas
1242	1250-1020	Estiramento da ligação C-N do anel β-lactâmico
1047	1300-1000	Estiramento da ligação C-O do éster

*Pavia et al, 2010.

4.3.2 Validação do método analítico

4.3.2.1 Linearidade

Os valores das absorvâncias encontrados na leitura das pastilhas de cefotaxima sódica SQR para o parâmetro de linearidade do método estão apresentados na Tabela 10.

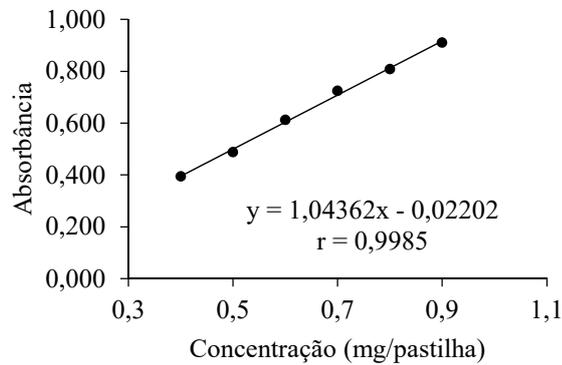
Tabela 10: Valores das absorvâncias referentes à altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} das pastilhas de brometo de potássio contendo cefotaxima sódica SQR para a elaboração da curva analítica por espectroscopia na região do infravermelho

Concentração (mg/pastilha)	Absorvância	Absorvância média \pm DP ¹	DPR ² (%)
0,4	0,388	0,394 \pm 0,0065	1,65
	0,401		
	0,394		
0,5	0,473	0,486 \pm 0,0130	2,66
	0,496		
	0,495		
0,6	0,608	0,613 \pm 0,0090	1,46
	0,623		
	0,607		
0,7	0,738	0,724 \pm 0,0165	2,28
	0,706		
	0,729		
0,8	0,791	0,808 \pm 0,0170	2,10
	0,825		
	0,809		
0,9	0,937	0,910 \pm 0,0244	2,68
	0,889		
	0,905		

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

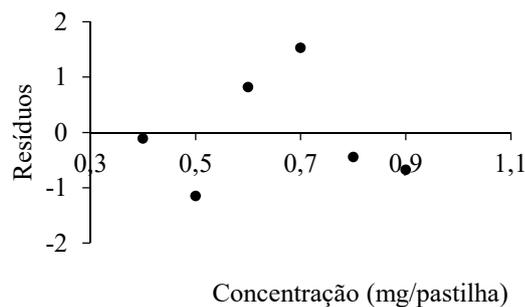
A curva analítica para cefotaxima sódica SQR construída a partir da relação da média dos valores das absorvâncias com as respectivas concentrações está apresentada na Figura 13. A análise da significância da regressão e o gráfico de resíduos padronizados estão representados na Tabela 11 e na Figura 14, respectivamente.

Figura 13: Representação gráfica da curva analítica referente à cefotaxima sódica para o método por espectroscopia na região do infravermelho**Tabela 11:** Análise de variância dos valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica da cefotaxima sódica utilizando método por espectroscopia na região do infravermelho

	gl	SQ	MQ	F	valor-P*
Regressão	1	0,190599625	0,190599625	1435,066616	2,89996x10 ⁻⁶
Resíduo	4	0,000531263	0,000132816		
Total	5	0,191130889			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P*	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,022019048	0,018514628	-1,189278435	0,300101459	-0,073423895	0,0293858
Concentração	1,043619048	0,027549008	37,88227311	2,89996 x 10 ⁻⁶	0,967130739	1,120107356

*Significativo para $p < 0,05$.

Figura 14: Gráfico de resíduos padronizados referente à cefotaxima sódica SQR obtido com a técnica de espectroscopia na região do infravermelho

4.3.2.2 Precisão

Os resultados referentes à precisão por repetibilidade e precisão intermediária são apresentados na Tabelas 12.

Tabela 12: Valores das absorvâncias referentes à altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} para a precisão por repetibilidade (analista 1) e para a precisão intermediária (analistas 1 e 2) pelo método por espectroscopia na região do infravermelho

Concentração (mg/pastilha)	Analista 1			Analista 2			
	Absorbância	Absorbância média \pm DP ¹	DPR ² (%)	Absorbância	Absorbância média \pm DP ¹	DPR ² (%)	DPR ² (%)
0,4	0,423	0,422 \pm 0,0026	0,63	0,390	0,400 \pm 0,0138	3,45	3,73
	0,424			0,395			
	0,419			0,416			
0,7	0,742	0,734 \pm 0,0231	3,14	0,709	0,717 \pm 0,0097	1,35	1,62
	0,752			0,728			
	0,708			0,715			
0,9	0,890	0,897 \pm 0,0130	1,45	0,941	0,935 \pm 0,0053	0,57	2,93
	0,912			0,931			
	0,889			0,933			

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

4.3.2.3 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação para o parâmetro de exatidão estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores das absorvâncias referentes à altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} relativos à exatidão para o método por espectroscopia na região do infravermelho

	Cefotaxima sódica SQR adicionada (mg)	Cefotaxima sódica SQR encontrada (mg)	Recuperação (%)	DPR ¹ (%)	Recuperação média (%)
R1	0,16	0,158	98,48	0,74	100,45
R2	0,30	0,302	100,79	1,19	
R3	0,44	0,449	102,08	1,91	

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

4.3.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores encontrados para o limite de detecção e para o limite de quantificação foram de 0,0450 mg e 0,13643 mg, respectivamente.

4.3.2.5 Robustez

As absorvâncias encontradas nos oito ensaios para o parâmetro de robustez estão apresentadas na Tabela 14, a análise de variância para o parâmetro de robustez está demonstrada na Tabela 15 e foi avaliada no nível de significância de 5%. O gráfico de Pareto está apresentado na Figura 15.

Tabela 14: Valores das absorvâncias encontradas para a altura dos picos na região de 1825 a 1740 cm^{-1} para a cefotaxima sódica pó liofilizado no parâmetro de robustez no método por espectroscopia na região do infravermelho

Ensaio	Absorvância	Absorvância média \pm DP ¹	DPR ² (%)
1	0,748 0,750	0,749 \pm 0,0140	0,19
2	0,744 0,743	0,744 \pm 0,0007	0,10
3	0,739 0,750	0,745 \pm 0,0078	1,04
4	0,744 0,742	0,743 \pm 0,0014	0,19
5	0,755 0,762	0,759 \pm 0,0049	0,65
6	0,733 0,745	0,739 \pm 0,0085	1,15
7	0,786 0,751	0,769 \pm 0,0247	3,22
8	0,753 0,761	0,757 \pm 0,0057	0,75

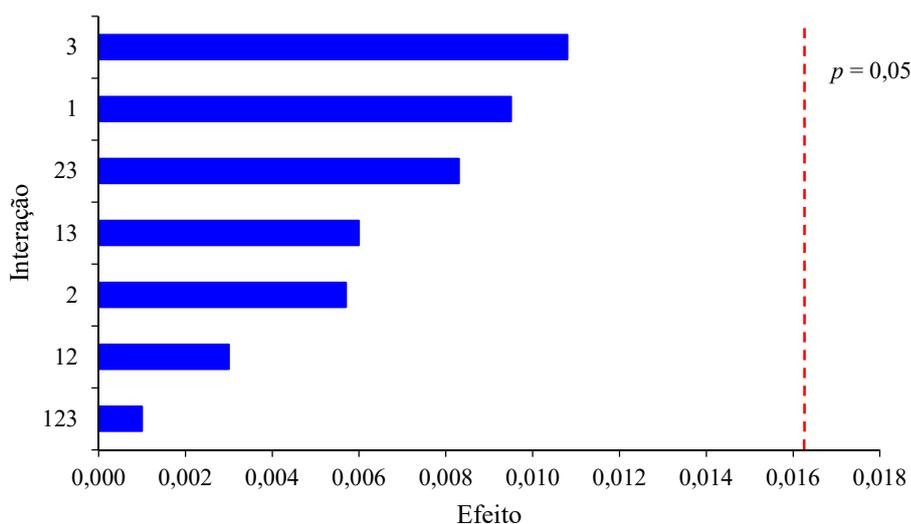
¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

Tabela 15: Análise de variância para a robustez da validação do método por espectroscopia na região do infravermelho

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	F tabelado	valor-P*
Fator 1	1	0,00036	0,00036	3,5831	5,3177	0,0949
Fator 2	1	0,00013	0,00013	1,3127	5,3177	0,2849
Fator 3	1	0,00046	0,00046	4,5881	5,3177	0,5664
Interação fatores 1 e 2	1	0,00004	0,00004	0,3573	5,3177	0,0644
Interação fatores 1 e 3	1	0,00014	0,00014	1,4293	5,3177	0,2660
Interação fatores 2 e 3	1	0,00027	0,00027	2,7022	5,3177	0,1387
Interação fatores 1, 2 e 3	1	0,00000	0,00000	0,0397	5,3177	0,8469
Tratamentos	7	0,00141	0,00020	2,0018	3,5005	0,1757
Resíduo	8	0,00081	0,00010	-	-	-

*Significativo para $p > 0,05$.

Figura 15: Gráfico de Pareto das interações das variáveis para o parâmetro de robustez para o método por espectroscopia na região do infravermelho

4.3.3 Determinação do teor de cefotaxima sódica no pó liofilizado

A Tabela 16 apresenta a determinação do teor de cefotaxima no produto acabado, em porcentagem.

Tabela 16: Determinação do teor de cefotaxima, em porcentagem, pelo método por espectroscopia na região do infravermelho.

	Absorbância da cefotaxima sódica SQR	Absorbância da cefotaxima sódica pó liofilizado	Teor de cefotaxima (%)
	0,750	0,744	99,20
	0,731	0,719	98,36
	0,735	0,737	100,27
Média	0,739	0,733	99,28
DPR(%)*	1,36	1,76	0,97

*Desvio padrão relativo em porcentagem.

4.4 Discussão

Primeiramente, no desenvolvimento do método, os espectros obtidos com a cefotaxima sódica pó liofilizado e cefotaxima sódica SQR foram sobrepostos. A presença de bandas características com valores de frequência e intensidades próximos confirma a identidade da cefotaxima sódica no pó liofilizado, o que pode ser observado também pela comparação com os espectros referência da Farmacopeia Japonesa (2011) e da Farmacopeia Britânica (2014). Os valores de frequência das bandas do espectro da cefotaxima sódica SQR são concordantes com aqueles encontrados na literatura, o que salienta a presença da molécula em estudo no medicamento (PAVIA et al., 2010).

A região do espectro escolhida para a quantificação levou em consideração a banda pertencente ao grupamento seletivo para a classe de antimicrobianos à qual pertence o fármaco, a das cefalosporinas. A carbonila do anel β -lactâmico está presente em todas as cefalosporinas. A seletividade para a cefotaxima sódica é demonstrada por meio da obtenção do espectro característico para a molécula, o que permite a utilização para a quantificação.

No desenvolvimento do método analítico para quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado, inicialmente foram confeccionadas pastilhas de massa total de 150 mg, em concentrações pré estabelecidas no teste de identificação, visando a utilização de menor quantidade possível de reagentes para a mínima geração de resíduos. Os resultados obtidos apresentaram-se insatisfatórios quanto às especificações estabelecidas pela RE nº 899 e pelo guia ICH, utilizados como referência para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003; ICH, 2005), ou seja, os DPR% entre pastilhas de mesma concentração mostraram valores acima do permitido (5%). Foram então preparadas pastilhas de massa total de 200 mg, obtendo-se resultados condizentes com aqueles preconizados pela legislação brasileira e pelo guia ICH.

Após a obtenção de resultados adequados e definição da massa total de 200 mg para as pastilhas, o método foi validado conforme as diretrizes da RE nº 899 e do guia ICH (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

De acordo com as referências para a validação de métodos analíticos, a linearidade de um método deve ser analisada por meio da avaliação do coeficiente de correlação, que deve ser igual ou maior que 0,99, análise da significância da regressão e análise do gráfico de resíduos.

O valor de coeficiente de correlação de 0,9985 demonstra a forte associação entre as duas variáveis, concentração e absorvância. Pela análise de variância foi comprovado que a regressão é existente e estatisticamente significativa, já que o valor-P obtido para a avaliação do coeficiente angular foi inferior a 0,05 ($2,90 \times 10^{-6}$) considerando-se um nível de significância de 5%. A presença da regressão também é confirmada estatisticamente pelo fato de a reta passar pela origem, já que o valor-P obtido para a avaliação da intersecção foi igual a 0,300, num nível de significância de 5%. O gráfico de resíduos apresenta distribuição adequada, o que confirma a linearidade do intervalo de concentrações avaliado.

Portanto, conforme evidenciado pelas análises estatísticas, o método mostrou-se adequado em relação ao preconizado pela RE nº 899 e pelo guia ICH. Os valores de DPR% para as absorvâncias obtidas com as pastilhas de concentrações utilizadas para a construção da curva analítica apresentaram-se inferiores a 5%, o que confirma a linearidade do método na faixa de concentrações escolhida.

A precisão, avaliada em dois níveis (repetibilidade e intermediária), demonstrou a conformidade do método em relação à proximidade das absorvâncias em três concentrações, contemplando a faixa linear por meio da avaliação dos valores de DPR, que foram inferiores ao especificado para a validação de métodos analíticos: 5%. O método apresentou-se exato por apresentar um valor médio de recuperação igual a 100,45%.

Os valores encontrados para o limite de detecção e para o limite de quantificação confirmam a capacidade de quantificação da cefotaxima sódica no medicamento com segurança. Esses parâmetros foram estimados de forma a complementar o trabalho, uma vez que não são necessários à validação do método de acordo com sua finalidade.

A robustez foi avaliada de acordo com as variações de valores de absorvância entre os fatores isolados e de acordo com as interações entre cada fator. Após a aplicação da análise de variância para cada contraste, observou-se que as alterações consideradas para o parâmetro de robustez não interferiram significativamente nos valores de absorvância, já que o valor-P foi maior que 0,05 para todos eles.

Ao se observar os valores dos efeitos dispostos no gráfico de Pareto nota-se que nenhuma das interações teve valores de absorvância estatisticamente significativos para um valor-P igual de 0,05, ou seja, nenhum dos fatores alterados interferiu significativamente no sinal do equipamento. Apesar da demonstração da robustez do método, é importante destacar que a alteração da marca de brometo de potássio apresentou maior variação nos resultados.

A validação do método por espectroscopia de absorção no infravermelho mostrou que o método desenvolvido é adequado e confiável para a quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado. Além disso, o preparo da amostra é simples e rápido, a técnica pode ser utilizada para fármacos insolúveis ou de baixa solubilidade e instáveis em solventes utilizados para o preparo de soluções para análise por outras técnicas, como cromatografia líquida de alta eficiência ou espectrofotometria no ultravioleta (MORENO; SALGADO, 2012).

O método desenvolvido e validado apresenta a grande vantagem de ter uma baixa geração de resíduos, já que utiliza baixa quantidade de brometo de potássio. A quantificação do fármaco pela técnica de espectroscopia no infravermelho não requer a utilização de solventes orgânicos ou reagentes tóxicos, tanto para o analista quando para o meio ambiente, utilizados em métodos por outras técnicas, como a espectrofotometria no ultravioleta, encontrados na literatura (OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009; SAYED et al., 2012; FAN et al., 2013; SAYED, 2013).

Após a validação do método analítico, foi determinado o teor da cefotaxima sódica no pó liofilizado e o resultado médio encontrado foi de 99,28%, ou seja, o medicamento encontra-se de acordo com a especificação estabelecida pela monografia encontrada na USP, entre 90,0 a 115,0% (USP 37, 2014).

5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

5.1 Considerações gerais

A cromatografia é uma técnica de separação de componentes que se baseia na distribuição de uma mistura por duas fases, a estacionária e a móvel, e interação dos componentes com o sistema de forma que migrem de maneira seletiva (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LANÇAS, 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência surgiu na década de 60, e ao longo do tempo, com a evolução das fases estacionárias e do equipamento, houve o aprimoramento da resolução, quantificação e detecção dos analitos, além de redução do tempo de análise (CASS; DEGANI, 2012).

Por ser de alta precisão e de aplicação quase universal, com várias possibilidades de detecção, colunas cromatográficas com diversas estruturas de fase estacionária e solventes, geralmente é a técnica de escolha para a separação de misturas tanto no meio acadêmico quando no meio industrial (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

O desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado por cromatografia líquida de alta eficiência teve como referência trabalhos do laboratório (MORENO, SALGADO, 2008; SALGADO et al., 2009; BONFILIO et al., 2009; VIEIRA; SALGADO, 2011; PASSONI; SALGADO, 2012; BONFILIO et al., 2012; CHIERENTIN; SALGADO, 2013; SILVA; SALGADO, 2013; CAZEDEY; JUODINIS; SALGADO, 2014; FIORENTINO et al., 2014; PEDROSO; SALGADO, 2014a; RUGANI; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2015a; PEDROSO; MEDEIROS; SALGADO, 2016; RODRIGUES; SALGADO, 2016).

A partir das condições analíticas dos métodos relacionados na Tabela 2 (item 3.2.5), buscou-se desenvolver e validar método analítico inédito para a quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado visando o consumo de solventes ecologicamente corretos e redução de emprego de compostos que pudessem danificar colunas cromatográficas e o equipamento.

5.2 Material e método

Como substância química de referência foi utilizada a cefotaxima sódica adquirida comercialmente da empresa Sequoia Research Products, com teor declarado de 98,0% (lote: 1401011887c).

Foi utilizado um medicamento similar como amostra de cefotaxima sódica pó liofilizado, contendo 524 mg de cefotaxima sódica e de nome comercial Cetazima[®] (lote: 0810031, prazo de validade: 05/2016). A amostra foi adquirida comercialmente e não possui adjuvantes.

Todas as soluções e fases móveis constituídas por meio aquoso foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q[®]). Outros dois componentes utilizados no preparo das fases móveis foram o etanol grau HPLC (Panreac[®]) e o ácido acético grau HPLC (J. T. Baker). Todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram filtrados em membrana de *nylon* (0,45 µm) e degaseificados em banho ultrassônico modelo SC2800A (Unique[®]) por 30 minutos. As soluções a serem analisadas foram filtradas com membrana de 0,45 µm (Macherey-Nagel[®]).

As amostras foram analisadas em cromatógrafo a líquido Waters[®], com módulo de separação modelo Alliance 2695, conectado a detector com arranjo de fotodiodos Waters[®] 2998 e injetor automático controlado pelo *software* Empower 3. Procedeu-se a separação na condição isocrática e em fase reversa com coluna Zorbax-SB C₁₈ nas dimensões 4,6 x 150 mm, 5 µm (Agilent[®]). A pureza dos picos da cefotaxima sódica nos cromatogramas da solução de pó liofilizado, SQR e das condições de degradação forçada foi avaliada com auxílio do *software* Empower 3. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do *software* Microsoft Excel (2013).

Durante os estudos de degradação forçada foram utilizadas soluções aquosas de ácido clorídrico (Qhemis[®]) 0,1 M, solução de hidróxido de sódio (Synth[®]) 0,001 M, 0,01 M e 0,1 M e solução de peróxido de hidrogênio (Impex[®]) 3%.

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

5.2.1 Desenvolvimento do método

Durante o desenvolvimento do método foram realizados ensaios prévios visando a obtenção das condições analíticas adequadas para a quantificação do fármaco, ou seja, que o método fosse confiável, rápido, com eficiência e seletividade adequadas, além de uma baixa geração de resíduos e evitar, dentro das possibilidades, a utilização de reagentes que pudessem danificar o equipamento e a coluna cromatográfica ou reduzir sua vida útil. As condições testadas no desenvolvimento do método estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros testados no desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado

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

5.2.1.1 Adequabilidade do sistema

Na avaliação da adequabilidade do sistema, foram preparadas e injetadas seis soluções de cefotaxima sódica SQR na concentração de 100 µg/mL. Para o preparo da solução estoque de concentração 1000 µg/mL, pesou-se quantidade de SQR equivalente a 10 mg de cefotaxima sódica, transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água. Para o preparo da solução de trabalho (100 µg/mL), transferiu-se 1,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água. Foram então calculados e analisados alguns parâmetros cromatográficos, assim como os DPR relativos a cada um deles.

As áreas dos picos relativos ao fármaco no cromatograma e os tempos de retenção relativos, foram obtidos com o *software* Empower 3.

Os parâmetros calculados foram os seguintes (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; CASS; DEGANI, 2012; USP 37, 2014):

- Fator de retenção (k'): referente à medida da retenção do analito na cromatografia líquida, foi calculado de acordo com a Equação 6.

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

Em que:

k' : fator de retenção;

t_R : tempo de retenção do pico (minutos);

t_0 : tempo morto (minutos).

- Assimetria de pico (A_s) e fator de cauda (FC): são parâmetros que estão associados ao formato do pico e são calculados por meio das Equações 7 e 8. A assimetria do pico é relativa às medidas realizadas a 10% da altura do pico e para o fator de cauda as medidas são referentes a 5% da altura do pico (Figura 16).

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

Em que:

A_s : assimetria de pico;

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

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

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

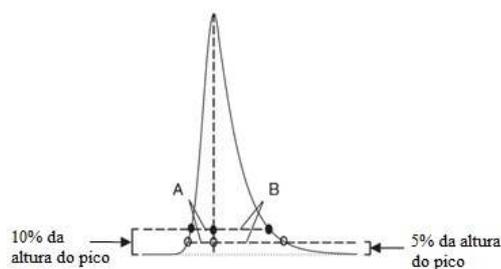
Em que:

FC: fator de cauda;

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

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

Figura 16: Medidas realizadas para o cálculo dos parâmetros de assimetria de pico e fator de cauda para a adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.



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

A farmacopeia americana (USP, 37, 2014) sugere que estes dois parâmetros podem ser considerados o mesmo, já que possuem uma mesma maneira de cálculo.

- Número de pratos (N): é a medida relativa à eficiência das condições cromatográficas, geralmente é aplicada na determinação da eficiência da coluna também. O número de pratos foi calculado pela Equação 9, utilizando a largura do pico à meia altura (Figura 17) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

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

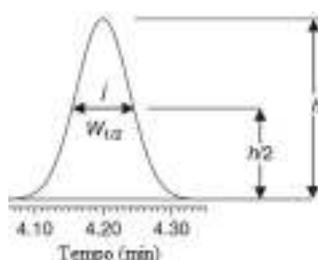
Em que:

N: número de pratos;

t_R : tempo de retenção (minutos);

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

Figura 17: Representação da medida da largura do pico à meia altura para o cálculo do número de pratos da adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.



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

- Resolução (R_s): representa a separação entre dois picos, é calculada pela Equação 10. As medidas relativas à base do pico para o cálculo da resolução estão demonstradas na Figura 18.

$$R_s = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)} \quad \text{Equação 10}$$

Em que:

R_s : resolução;

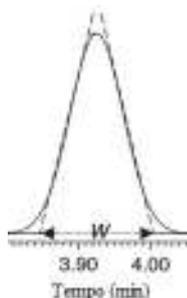
t_{R2} : tempo de retenção do segundo pico (minutos);

t_{R1} : tempo de retenção do primeiro pico (minutos);

W_1 : largura da linha de base do primeiro pico, medida a partir das tangentes (minutos);

W_2 : largura da linha de base do segundo pico, medida a partir das tangentes (minutos).

Figura 18: Representação da medida da base do pico (W) para o cálculo da resolução na adequabilidade do sistema do método por cromatografia líquida de alta eficiência.



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

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

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

5.2.2 Validação do método

Na validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez; conforme estabelecido pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

5.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada com a verificação da interferência dos produtos de degradação forçada nas análises da cefotaxima, já que o produto acabado era constituído somente pelo ingrediente farmacêutico ativo.

Os ensaios de degradação forçada foram desenvolvidos submetendo-se a cefotaxima sódica SQR às seguintes condições de degradação: neutra, alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica. Foram coletadas amostras das soluções em intervalos de tempos pré-determinados e o ensaio foi interrompido quando o pico referente ao fármaco apresentava degradação entre 5 e 20% (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

As soluções utilizadas para os ensaios de degradação forçada continham cefotaxima sódica SQR na concentração de 100 µg/mL. Inicialmente foi preparada a solução estoque da cefotaxima sódica SQR. Foi pesada quantidade de SQR equivalente a 10 mg de cefotaxima e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água. Posteriormente, foram realizadas as diluições para cada condição, resultando nas soluções de trabalho de concentração de 100 µg/mL:

- Neutra: foi transferido 1 mL da solução estoque de cefotaxima sódica SQR para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água. A solução foi então aquecida em temperatura de 60°C por 45 minutos;
- Alcalina: foi transferido 1 mL da solução estoque de cefotaxima sódica SQR para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com solução de hidróxido de sódio 0,001 M. A solução foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos;
- Ácida: foi transferido 1 mL da solução estoque de cefotaxima sódica SQR para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com solução de ácido clorídrico 0,1 M. A solução permaneceu em temperatura ambiente por 12 horas;
- Oxidativa: foi transferido 1 mL da solução estoque de cefotaxima sódica SQR e 1 mL de solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (3%) para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água para a obtenção de solução de peróxido de hidrogênio igual a 0,3%. A solução permaneceu em temperatura ambiente por 2 horas;
- Fotolítica: foi transferido 1 mL da solução estoque de cefotaxima sódica SQR para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água. A solução foi acondicionada em frasco de vidro incolor tampado de volume igual a 30 mL e colocada em câmara com espelhos com lâmpada UV (254 nm) com potência de 20 W por 48 horas.

A pureza do pico do fármaco foi avaliada para as soluções de produto acabado, SQR e para todas as condições de degradação forçada por meio de análise com detector de arranjo de fotodiodo e com auxílio do *software* Empower. O pico foi considerado puro quando o parâmetro de *purity angle* foi menor que o parâmetro de *purity threshold*.

5.2.2.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, inicialmente foi construída uma curva analítica da área dos picos versus concentração. Foi avaliada em triplicata e em três dias diferentes com a cefotaxima SQR. Foi preparada solução estoque de cefotaxima sódica SQR na concentração de 1000 µg/mL (item 5.3.1) e, posteriormente, foram transferidos os volumes de 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2 e 1,3 mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água, obtendo-se as soluções para a construção da curva nas concentrações de, respectivamente, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 130 µg/mL.

A avaliação estatística dos resultados obtidos com a curva analítica foi realizada pela avaliação da significância da regressão, do valor do coeficiente de correlação e da análise do gráfico de resíduos padronizados.

5.2.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada em triplicata e para as categorias de repetibilidade e precisão intermediária, com concentrações abrangendo a faixa linear do método.

Para a repetibilidade, foram preparadas nove soluções de cefotaxima sódica pó liofilizado. Para a solução estoque pesou-se quantidade de pó equivalente a 10 mg de cefotaxima e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água. As soluções estoque foram diluídas transferindo-se 0,7, 1,0 e 1,3 mL para balões volumétricos de 10 mL e completando-se o volume com água para a obtenção de soluções com concentrações em três níveis, respectivamente: baixo (70 µg/mL), médio (100 µg/mL) e alto (130 µg/mL).

As análises da repetibilidade foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, nas mesmas condições analíticas e no mesmo dia. Posteriormente, foi avaliado o DPR das áreas dos picos do fármaco obtidas para cada concentração.

A precisão intermediária foi desenvolvida da mesma maneira como a repetibilidade, porém o preparo e a análise das soluções foram executados por analistas diferentes em dias diferentes. O critério de aceitação considerado para este parâmetro foi a avaliação do DPR das replicatas do segundo analista e o DPR das médias das áreas dos picos do fármaco de cada concentração para cada analista.

5.2.2.4 Exatidão

Para a avaliação da exatidão adotou-se o método de recuperação. A exatidão do método foi determinada em três níveis de concentrações, contemplando o intervalo linear do método e em triplicata. As soluções avaliadas continham as concentrações de 80 µg/mL (80% - R1), 100 µg/mL (100% - R2) e 120 µg/mL (120% - R3) e foram preparadas com o enriquecimento da cefotaxima sódica pó liofilizado com a SQR, conforme Tabela 18. A recuperação foi calculada de acordo com a Equação 1 (item 4.2.1.3).

Tabela 18: Preparo das soluções para a avaliação da exatidão do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Solução	Produto acabado (1000 µg/mL) (mL)	Cefotaxima sódica SQR (1000 µg/mL) (mg)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Produto acabado	0,7	-	70
R1	0,7	0,2	90
R2	0,7	0,4	110
R3	0,7	0,6	130
SQR	-	0,7	70

*Balão volumétrico de 10 mL.

5.2.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados pelas Equações 2 e 3 (item 4.2.1.4), respectivamente, como forma de agregar à validação, já que não são necessários para a finalidade a qual se enquadra o método (categoria I) (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

5.2.2.6 Robustez

O parâmetro de robustez foi desenvolvido por meio do teste de Youden, em que é avaliada a influência da variação de sete parâmetros do método analítico por meio de oito experimentos (YOU DEN; STEINER, 1975; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Para a realização do teste foram preparadas soluções de cefotaxima sódica pó liofilizado e cefotaxima sódica SQR na concentração de trabalho (100 µg/mL), conforme item 5.3.1, e então foi determinado o teor em porcentagem do fármaco para cada ensaio (Equações 11 e 12).

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

$$C_a(\%) = C_a \times \frac{100}{C_t} \quad \text{Equação 12}$$

Em que:

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

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

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

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

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

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

O teste de Youden consiste em estudar as diferentes alterações ocorrendo simultaneamente, o que é codizante com a realidade das rotinas de análise. Para isso, foi utilizada a Tabela 19, em que as letras maiúsculas correspondem às condições nominais e as letras minúsculas correspondem às condições com pequenas alterações (YOUNDEN; STEINER, 1975; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Foram realizados dois testes de Youden, um com variações inferiores e outro com variações superiores às condições nominais. As variações inferiores e superiores estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 19: Parâmetros utilizados no teste de Youden para a determinação de robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetro	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Marca do etanol	A	A	A	A	a	a	a	a
Fonte de água	B	B	b	b	B	B	b	B
Proporção da fase móvel	C	c	C	c	C	c	C	C
% de ácido acético na fase aquosa da fase móvel	D	D	d	d	d	d	D	D
Vazão	E	e	E	e	e	E	e	E
Temperatura	F	f	f	F	F	f	f	F
Comprimento de onda	G	g	g	G	q	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Tabela 20: Variações dos parâmetros utilizadas no teste de Youden

Parâmetro	Condição nominal	Alterações superiores e inferiores
Marca do etanol	A: Panreac	a: J. T. Baker
Fonte de água	B: Laboratório CB	b: Laboratório CFQ
Proporção da fase móvel (água + ácido acético e etanol)	C: 87:13	c: 86:14 e 88:12
% de ácido acético na fase aquosa da fase móvel	D: 0,10%	d: 0,09 e 0,11%
Vazão (mL/min)	E: 1,0	e: 0,9 e 1,1
Temperatura (°C)	F: 25	f: 24 e 26
Comprimento de onda (nm)	G: 235	g: 234 e 236

Após a obtenção dos teores em porcentagem, calculou-se os efeitos para cada variável subtraindo-se a média dos valores de teor da condição nominal das médias dos valores de teor das condições alteradas. Para que o método seja considerado robusto frente às variações dos parâmetros estudados, os valores do efeito para cada parâmetro não podem ser maiores que duas vezes o desvio padrão das médias dos valores de teor de todos os experimentos (YAUDEN; STEINER, 1975; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

5.3 Determinação do teor da cefotaxima sódica no pó liofilizado

5.3.1 Preparo das soluções

As soluções de cefotaxima sódica SQR foram preparadas na concentração de 100 µg/mL, conforme item 5.3.1. Para a solução de cefotaxima sódica pó liofilizado foi utilizado o *pool* com o conteúdo dos frascos-ampola de medicamento, preparado no item 4.2.2.1. As determinações foram realizadas em triplicata.

5.3.2 Estabilidade das soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado

A estabilidade das soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado foi avaliada em temperatura ambiente e a solução foi considerada estável até o tempo em que atingia 2,00% de degradação do ativo.

5.3.3 Cálculos

O teor de cefotaxima sódica no pó liofilizado foi calculado conforme Equação 11 e Equação 12 (item 5.3.6).

5.4 Resultados

5.4.1 Desenvolvimento do método

Para a definição do comprimento de onda a ser utilizado para o detector no UV foi realizada a varredura. A cefotaxima apresentou dois picos máximos de absorção, um em 235 e outro em 258. O comprimento de onda escolhido para as análises foi de 235 nm. O espectro da cefotaxima está apresentado na Figura 19. As condições analíticas definidas para o método de quantificação da cefotaxima estão listadas na Tabela 21. Dois dos cromatogramas obtidos durante o desenvolvimento do método analítico estão apresentados nas Figuras 20 e 21. A Figura 22 mostra o cromatograma obtido com o pó liofilizado sobreposto ao cromatograma da SQR.

Figura 19: Espectro de absorção no UV para a cefotaxima em solução aquosa a 100 µg/mL no desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência

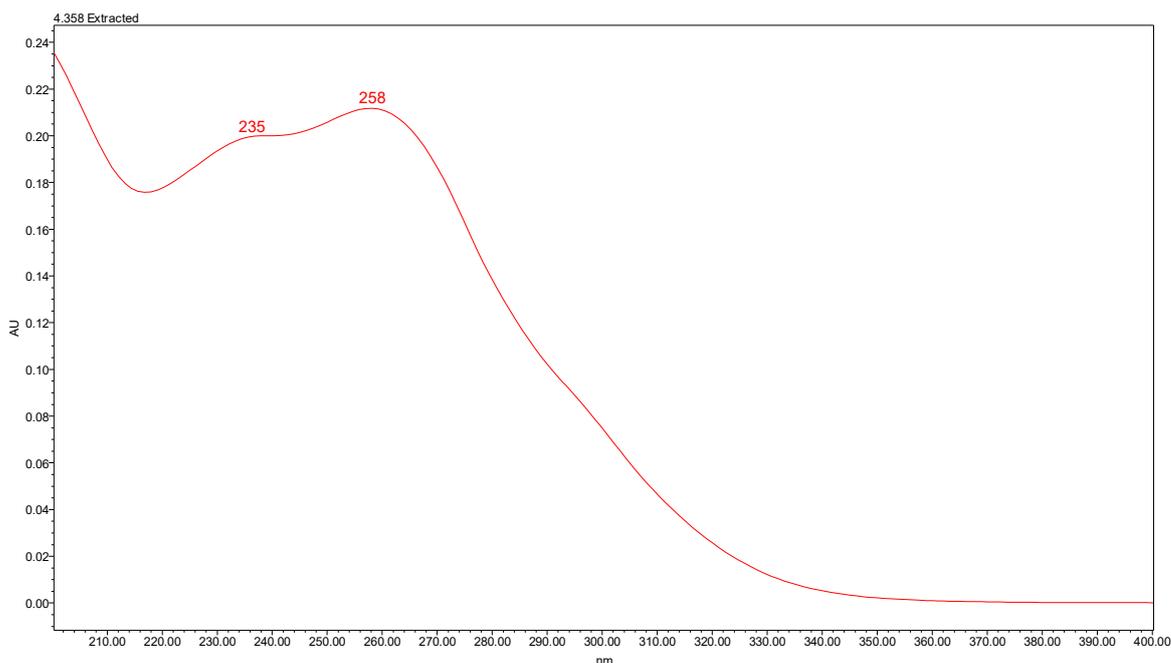


Figura 20: Cromatograma obtido com a solução de cefotaxima sódica SQR 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax Eclipse Plus C_{18} , fase móvel água pH ajustado para 6,0 com ácido acético e etanol (95:05, V/V), vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 μL e comprimento de onda de 235 nm

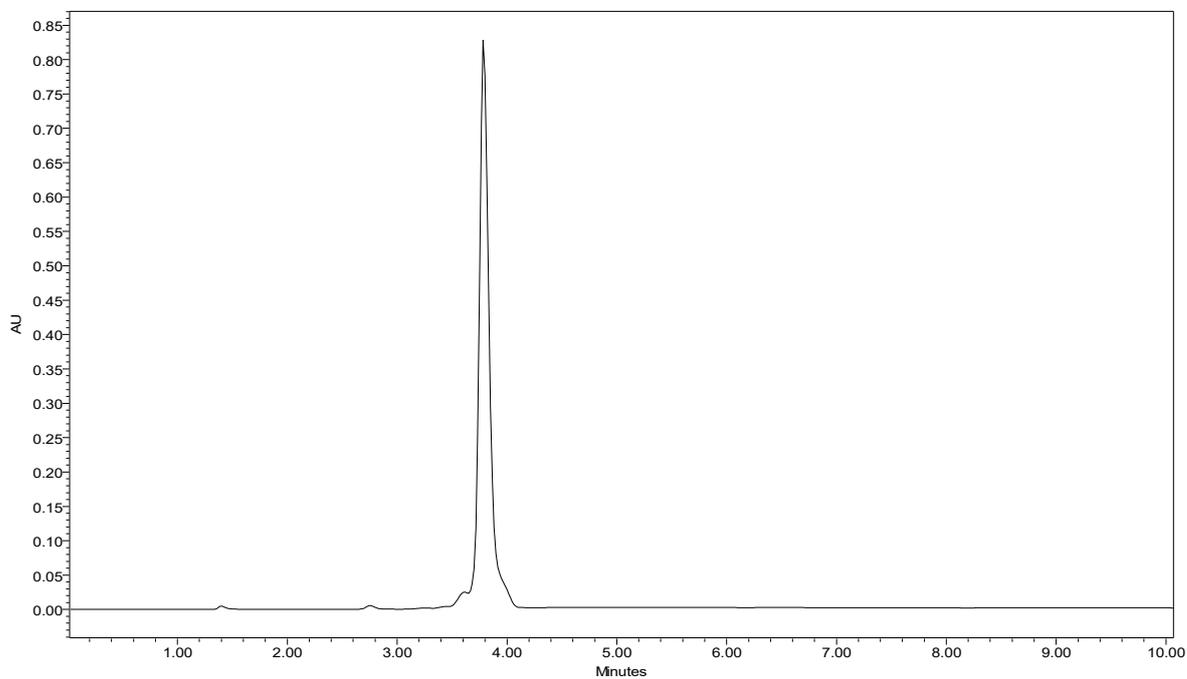


Figura 21: Cromatograma obtido com a solução SQR 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel de água e etanol (95:05, V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μL e comprimento de onda de 235 nm

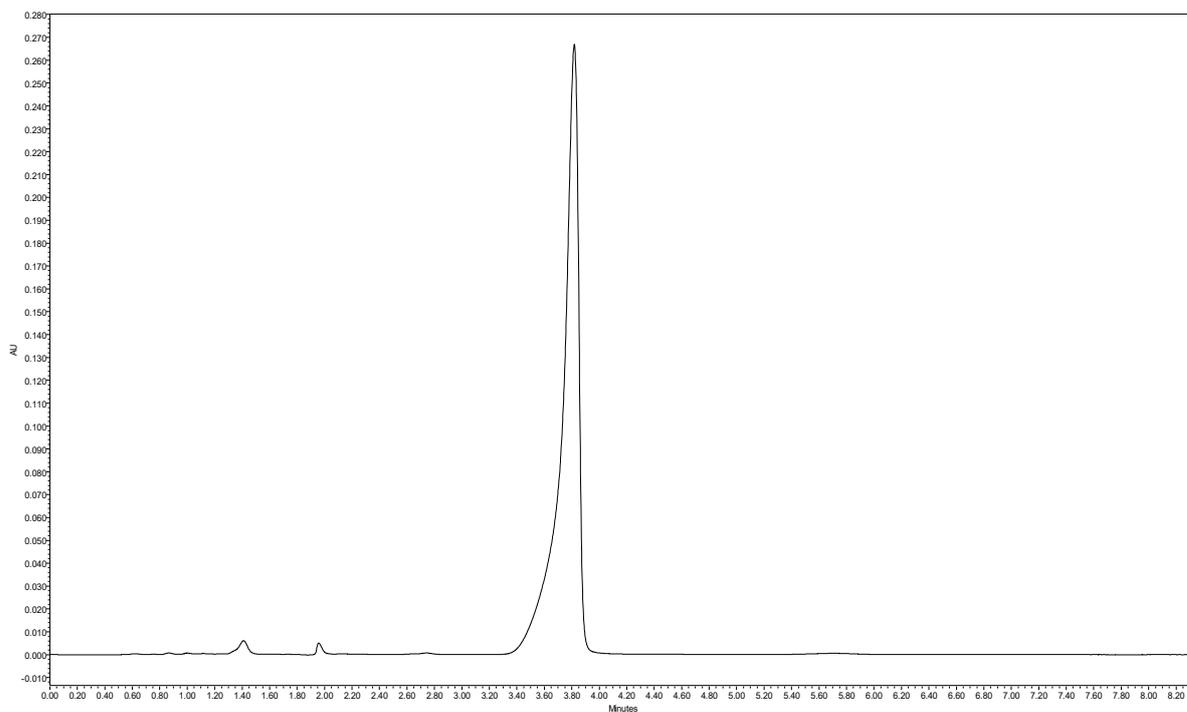
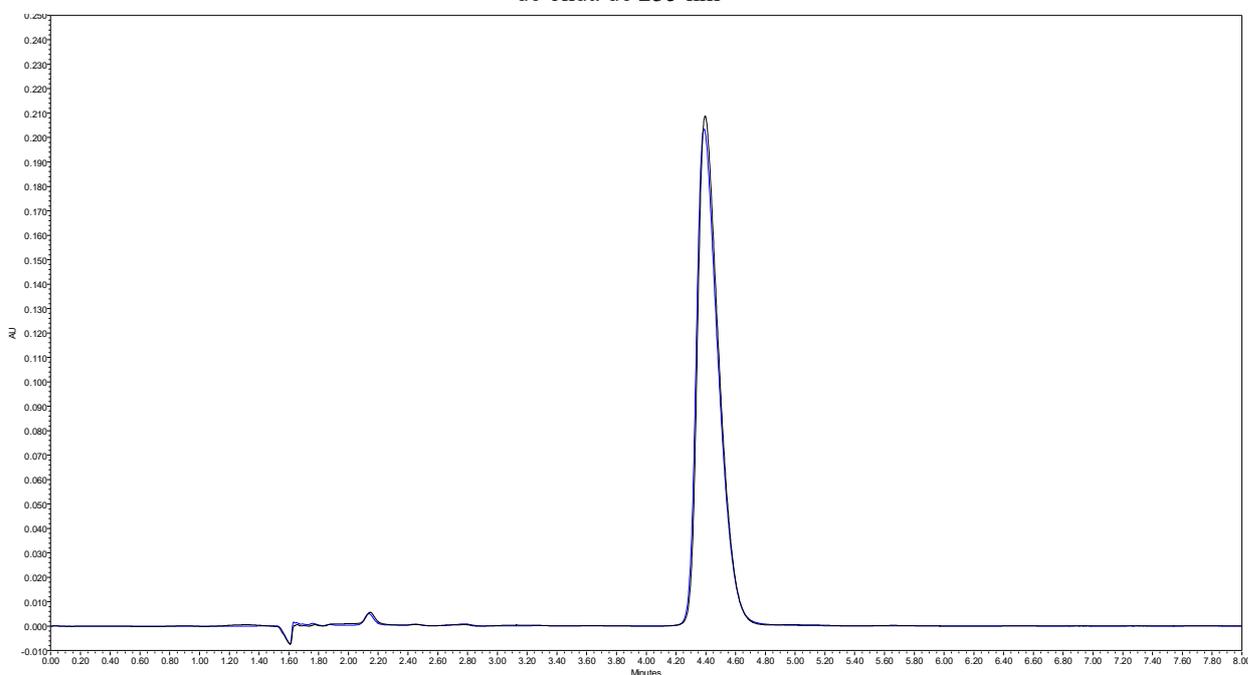


Tabela 21: Condições analíticas estabelecidas para o método de quantificação da cefotaxima por cromatografia líquida de alta eficiência

Condição	Descrição
Coluna	Zorbax SB C ₁₈ (150 x 4,6 mm - 5 µm) - Agilent®
Detector	UV, 235 nm
Fase móvel	Água + ácido acético 0,1% (pH 3,25) e etanol 87:13 (V/V)
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Temperatura	25°C ± 2°C

Figura 22: Cromatogramas das soluções de cefotaxima pó liofilizado e SQR a 100 µg/mL sobrepostos obtidos no desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C₁₈, fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 235 nm

Preto: cefotaxima sódica SQR. Azul: cefotaxima sódica pó liofilizado.

5.4.1.1 Adequabilidade do sistema

Os parâmetros de adequabilidade do sistema calculados após a definição das condições analíticas estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico calculados após a definição das condições analíticas do método

	Tempo de retenção (t _R)	Área	Fator de retenção (k')	Assimetria de pico (As)	Fator de cauda (FC)	Número de pratos (N)	Resolução (Rs)
	4,409	2017443	2,54	1,50	1,27	4223,60	11,19
	4,473	2044351	2,59	1,52	1,28	4321,99	11,28
	4,455	2008803	2,57	1,53	1,28	4329,78	11,40
	4,404	2003095	2,53	1,50	1,28	4233,20	11,20
	4,428	2023126	2,56	1,50	1,28	4269,76	11,28
	4,439	2018520	2,57	1,50	1,28	4291,00	11,32
Média	4,435	2019223	2,56	1,51	1,28	4278,22	11,28
DPR*	0,60	0,71	0,86	0,88	0,32	1,04	0,69

*Desvio padrão relativo.

5.4.2 Validação do método

5.4.2.1 Seletividade

Os resultados do teste de degradação forçada estão apresentados na Tabela 23. Os cromatogramas referentes às condições iniciais e finais para cada condição do teste estão apresentados nas Figuras 23 a 27.

Todos os picos referentes à cefotaxima sódica nos cromatogramas de todas as condições de degradação apresentaram-se puros; a Tabela 24 apresenta os parâmetros do *software* para cada condição de degradação, para as soluções de produto acabado e de SQR.

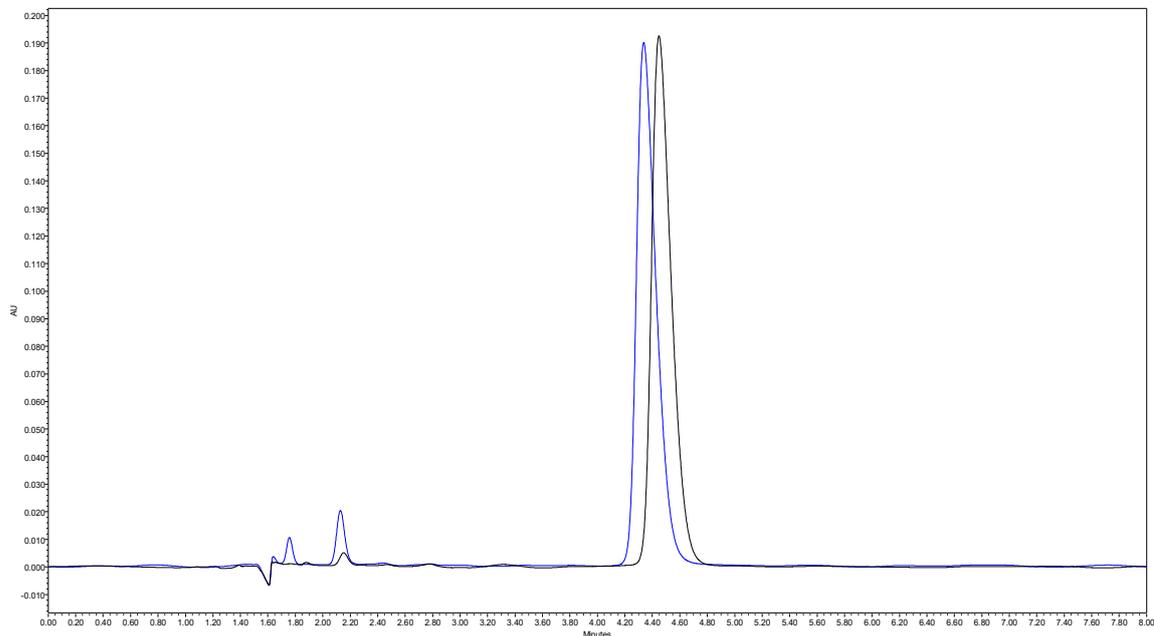
Tabela 23: Teste de degradação forçada para a cefotaxima sódica SQR no desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência

Condição	Tempo	Área	Degradação (%)
Ácida 0,1 M	T ₀	2029670	1,11
	T _{1h}	2026793	1,25
	T _{2h}	1979291	3,57
	T _{4h}	1941718	5,40
	T _{6h}	1865307	9,12
	T _{8h}	1826038	11,04
	T _{12h}	1712472	16,57
Alcalina 0,001 M	T ₀	1981268	3,47
	T _{0,25h}	1745860	14,94
	T _{0,5h}	1584438	22,81
Oxidativa 0,3%	T ₀	2006943	2,22
	T _{0,5h}	1908401	7,02
	T _{1h}	1779654	13,30
	T _{1,5h}	1686963	17,81
	T _{2h}	1498433	27,00
Fotolítica	T ₀	2054825	0
	T _{14h}	1906198	7,13
	T _{16h}	1910522	6,92
	T _{20h}	1883477	8,34
	T _{24h}	1853940	9,68
	T _{36h}	1751850	14,65
	T _{48h}	1648226	19,70
Neutra 60°C	T ₀	2044737	0,38
	T _{0,25h}	1900110	7,43
	T _{0,5h}	1746791	14,90
	T _{0,75h}	1594018	22,34

Tabela 24: Parâmetros para a avaliação da pureza de pico da cefotaxima sódica obtidos com o *software* Empower 3

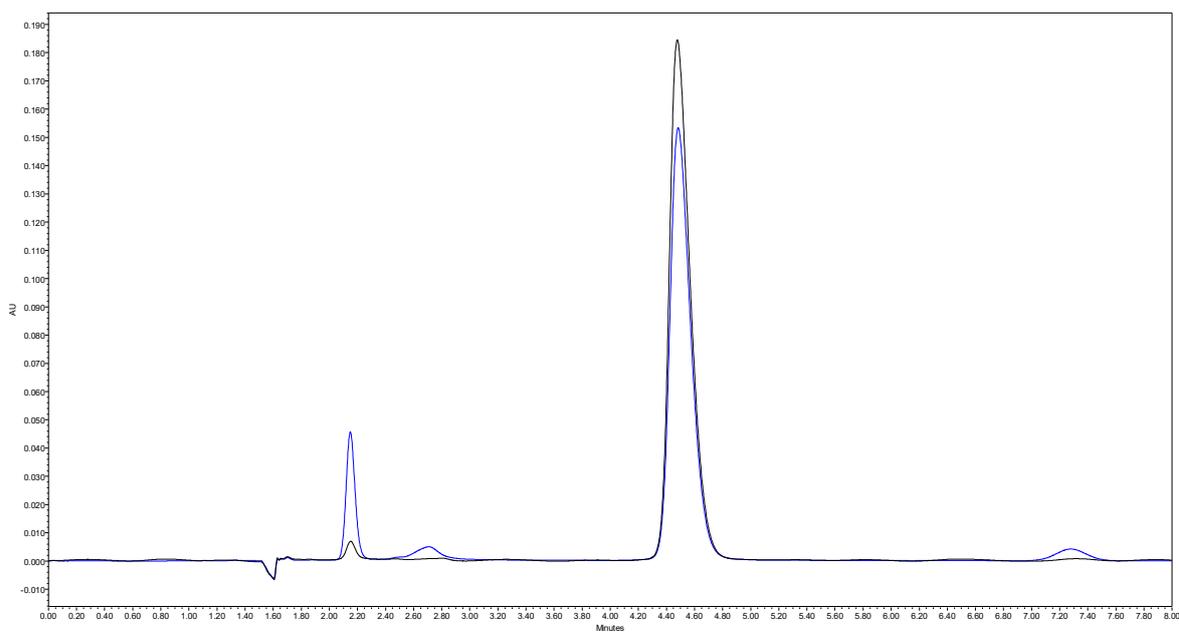
	Parâmetro	
	<i>Purity angle</i>	<i>Purity threshold</i>
Cefotaxima sódica pó liofilizado	0,051	0,231
Cefotaxima sódica SQR	0,040	0,219
Degradação ácida	0,035	0,240
Degradação alcalina	0,033	0,244
Degradação oxidativa	0,063	0,222
Degradação fotolítica	0,032	0,213
Degradação neutra	0,041	0,220

Figura 23: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T_0 e T_{6h} para a degradação ácida para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 235 nm



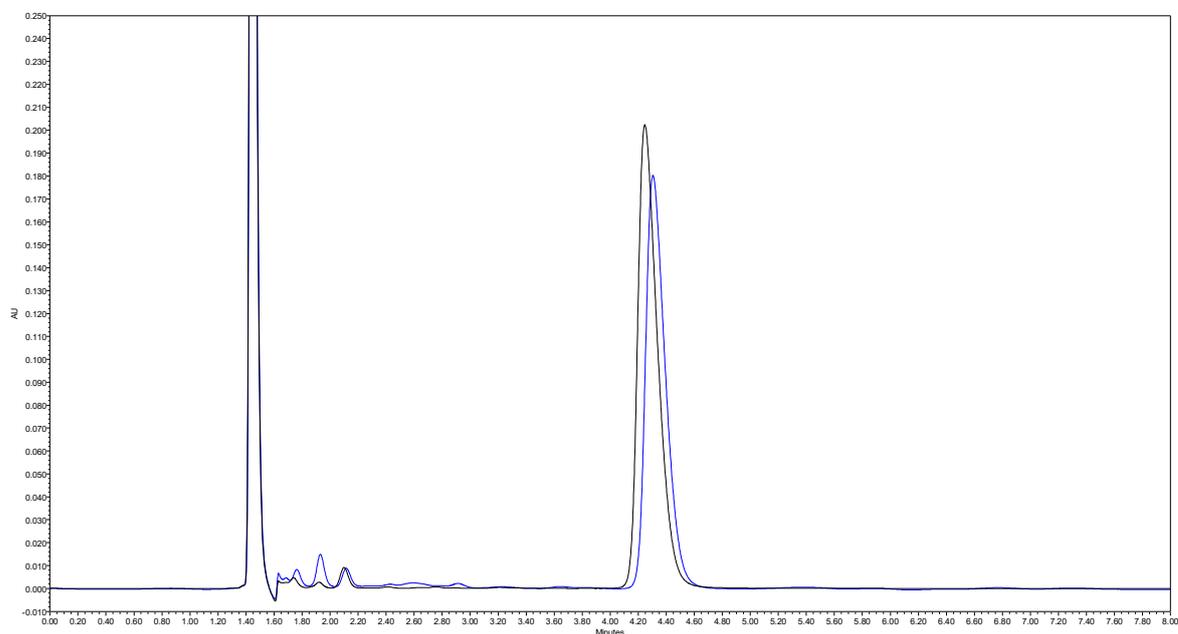
Tempos: 0 (preto) e 6 horas (azul).

Figura 24: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T_0 e $T_{0,25h}$ para a degradação alcalina para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 235 nm



Tempos: 0 (preto) e 0,25 hora (azul).

Figura 25: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T_0 e T_{1h} para a degradação oxidativa para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 235 nm



Tempos: 0 (preto) e 1 hora (azul).

Figura 26: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T_0 e T_{14h} para a degradação fotolítica para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 235 nm

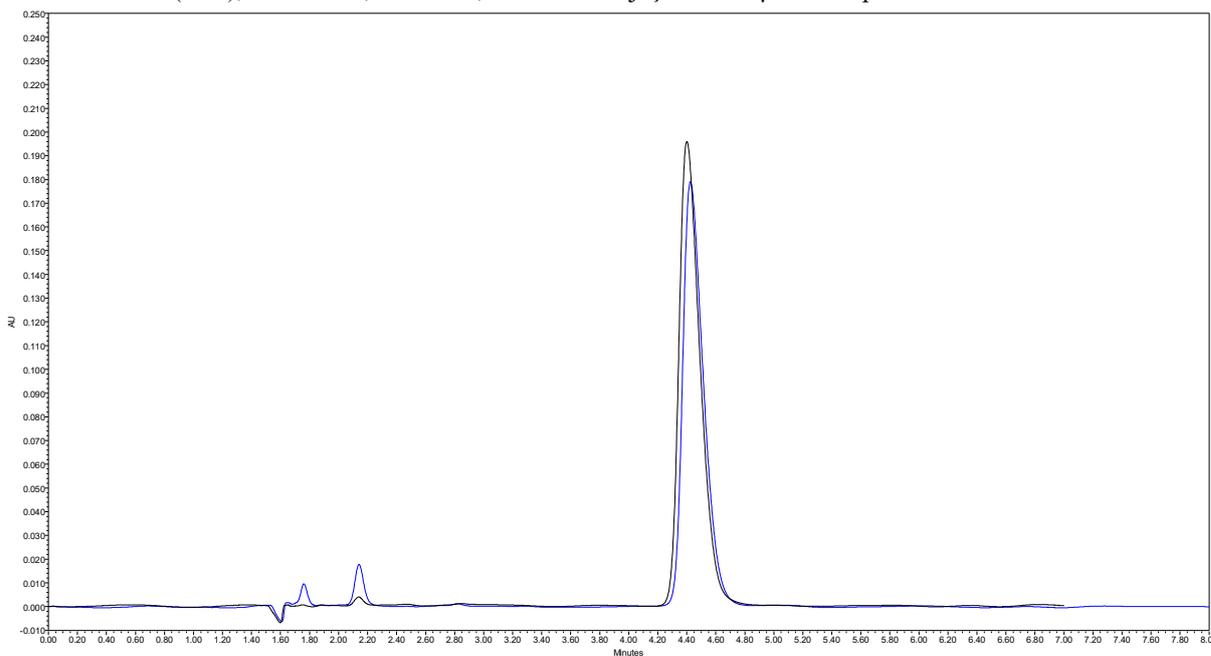
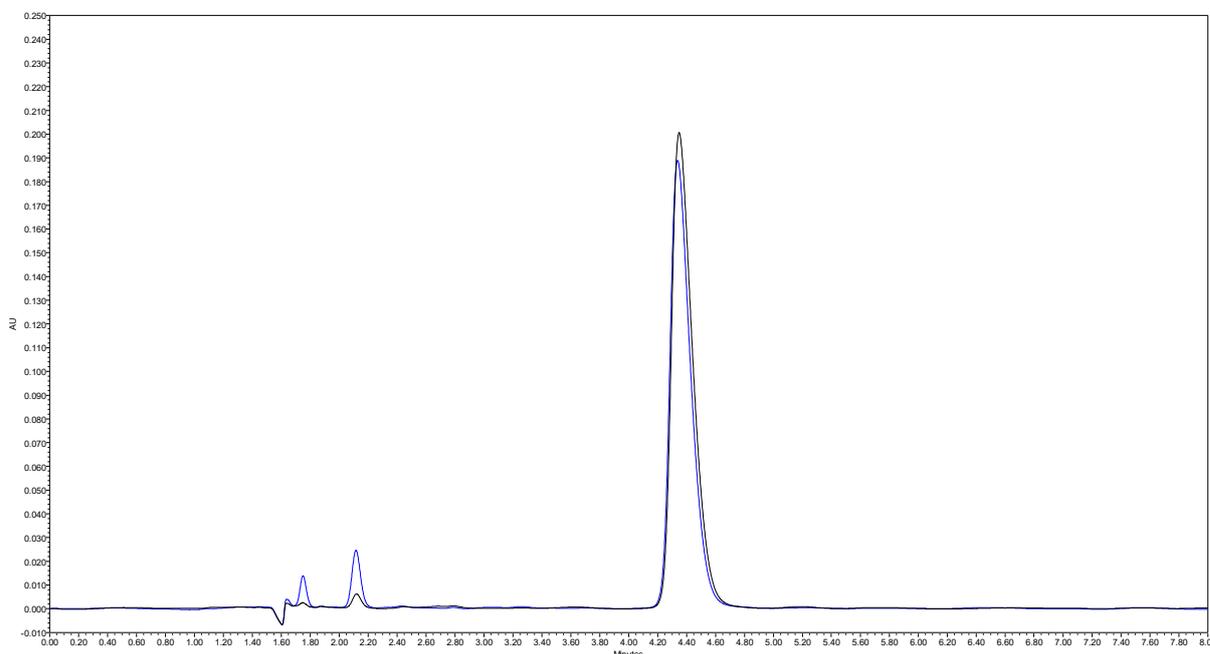


Figura 27: Cromatogramas da cefotaxima sódica SQR nos T_0 e $T_{0,25h}$ para a degradação neutra para o método por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Zorbax SB C_{18} , fase móvel de água + ácido acético 0,1% e etanol 87:13 (V/V), vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e comprimento de onda de 235 nm



Tempos: 0 (preto) e 0,25 hora (azul).

As resoluções calculadas para cada par de picos em cada condição de degradação, após o surgimento de picos de produtos de degradação estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25: Resoluções entre os pares de picos referentes aos cromatogramas de cada condição de degradação forçada

Condição de degradação	Resoluções
Ácida	11,72
	13,11
Alcalina	12,38
	6,64
	8,97
Oxidativa	16,70
	15,28
	12,58
	7,12
Fotolítica	16,70
	13,13
Neutra	15,02
	12,76

5.4.2.2 Linearidade

Os valores das áreas obtidos com as soluções de cefotaxima sódica SQR para o parâmetro de linearidade do método estão apresentados na Tabela 26.

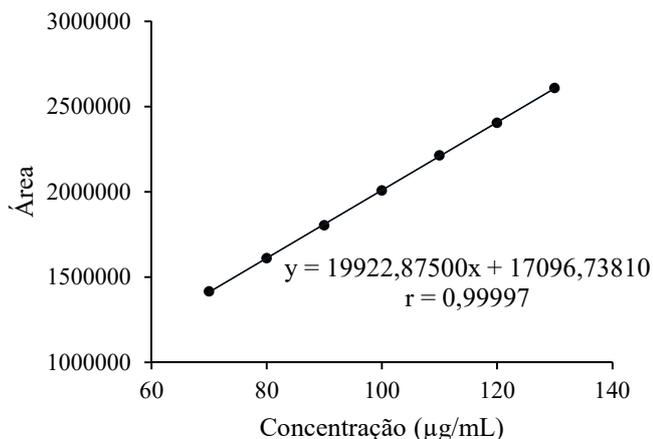
Tabela 26: Valores das áreas referentes às soluções de cefotaxima sódica SQR para a elaboração da curva analítica com o método por cromatografia líquida de alta eficiência

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área média \pm DP ¹	DPR ² (%)
70	1415748	1415082 \pm 11183,40	0,79
	1403580		
	1425917		
80	1606101	1611069 \pm 4302,83	0,27
	1613586		
	1613521		
90	1798614	1803682 \pm 12619,24	0,70
	1794384		
	1818047		
100	1992846	2008511 \pm 17879,85	0,89
	2004696		
	2027990		
110	2223098	2213852 \pm 21056,88	0,95
	2228704		
	2189754		
120	2406932	2404865 \pm 18378,41	0,76
	2422122		
	2385540		
130	2566074	2608630 \pm 38834,17	1,49
	2617666		
	2642149		

¹Desvio padrão.

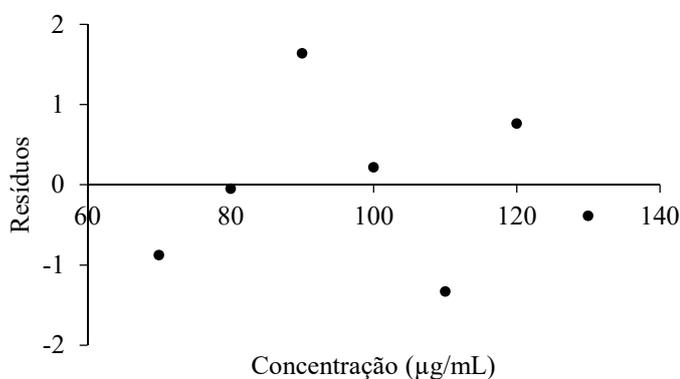
²Desvio padrão relativo.

A curva analítica para cefotaxima sódica SQR foi elaborada com a distribuição dos valores médios das áreas dos picos relacionados às respectivas concentrações e está apresentada na Figura 28. A análise da significância da regressão está representada na Tabela 27 e o gráfico de resíduos padronizados na Figura 29.

Figura 28: Curva analítica referente à cefotaxima sódica para o parâmetro de linearidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência**Tabela 27:** Análise de variância dos valores referentes às áreas utilizados para a construção da curva analítica da cefotaxima sódica SQR para o método por cromatografia líquida de alta eficiência

	gl	SQ	MQ	F	valor-P*
Regressão	1	2799,766007	2799,766	59825,94	$2,16772 \times 10^{-11}$
Resíduo	4	0,23399264	0,046799		
Total	5	2800			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P*	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-0,849717537	0,420344827	-2,02148	0,099183	-1,930248314	0,230813241
Concentração	$5,01894 \times 10^{-5}$	$2,05195 \times 10^{-7}$	244,5934	$2,17 \times 10^{-11}$	$4,96619 \times 10^{-5}$	$5,07168 \times 10^{-5}$

*Significativo para $p < 0,05$.**Figura 29:** Gráfico de resíduos referente à curva analítica da cefotaxima sódica SQR obtida com o método por cromatografia líquida de alta eficiência

5.4.2.3 Precisão

Os resultados referentes à precisão por repetibilidade e precisão intermediária são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Valores encontrados na precisão por repetibilidade (analista 1) e precisão intermediária (analistas 1 e 2) pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência

Concentração (µg/mL)	Analista 1			Analista 2			DPR
	Área	Área média ± DP ¹	DPR ² (%)	Área	Área média ± DP ¹	DPR ² (%)	
70	1341880	1367051 ± 21837,35	1,60	1316220	1346311 ±26646,03	1,98	1,08
	1378333			1355795			
	1380939			1366917			
100	1937835	1941765 ± 3900,84	0,20	1945442	1974387 ±26140,53	1,32	1,18
	1945636			1996274			
	1941824			1981444			
130	2585256	2544438 ± 35390,04	1,39	2562368	2580284 ±48119,49	1,86	0,99
	2522334			2634791			
	2525724			2543692			

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

5.4.2.4 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29: Valores percentuais encontrados para o parâmetro de exatidão para o método por cromatografia líquida de alta eficiência

	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ¹ (%)
R1	20	20,37	101,83	101,25	0,71
R2	40	40,17	100,44		
R3	60	60,88	101,47		

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

5.4.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores encontrados para o limite de detecção e para o limite de quantificação foram de 5,71 µg/mL e 17,30 µg/mL, respectivamente.

5.4.2.6 Robustez

Os teores encontrados nos ensaios 1 e 2 para o parâmetro de robustez estão apresentadas na Tabela 30. Os efeitos calculados para variações superiores e inferiores estão apresentados na Tabela 31 e as figuras 30 e 31 apresentam gráficos para as avaliações dos efeitos em relação ao critério de aceitação.

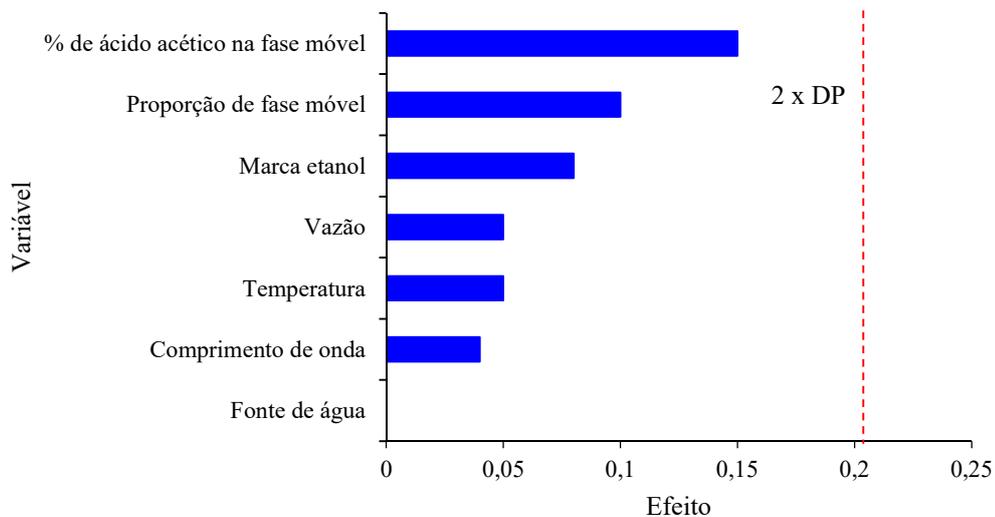
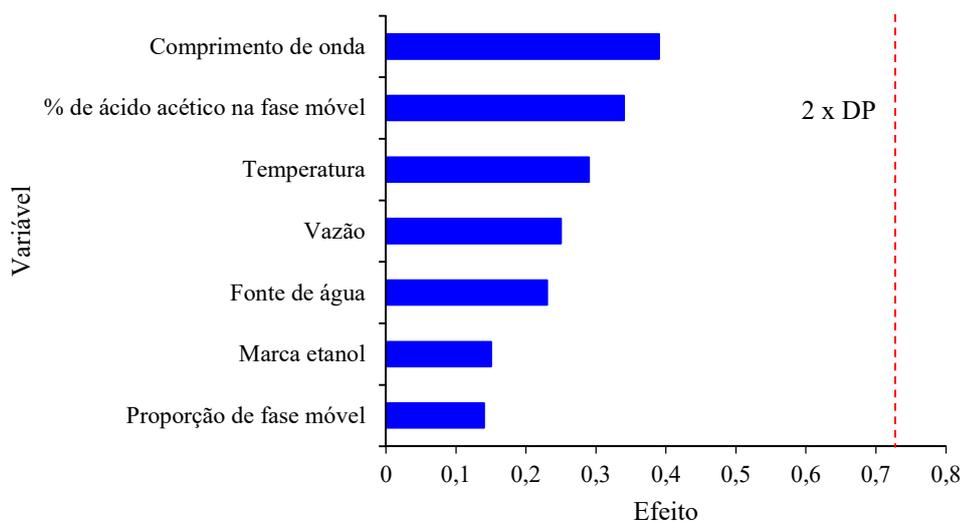
Tabela 30: Teores, em porcentagem, encontrados para o produto acabado nos ensaios 1 e 2 para a robustez no método por cromatografia líquida de alta eficiência

Experimento	Teor da variação inferior	Teor da variação superior
1	97,20	97,49
2	97,24	97,50
3	97,34	97,50
4	97,40	97,71
5	97,26	97,54
6	97,32	97,83
7	97,02	97,65
8	97,26	96,57
Média	97,26	97,47
DP*	0,11	0,38

*Desvio padrão.

Tabela 31: Efeitos calculados para os ensaios com variações inferiores e superiores para a robustez por cromatografia líquida de alta eficiência

Variável	Efeito da variação inferior	Efeito da variação superior
Marca etanol	0,08	0,15
Fonte de água	0,00	0,23
Proporção de fase móvel	-0,10	0,14
Porcentagem de ácido acético na fase aquosa da fase móvel	-0,15	-0,34
Vazão	0,05	-0,25
Temperatura	0,05	-0,29
Comprimento de onda	-0,04	0,39

Figura 30: Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações inferiores**Figura 31:** Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações superiores

5.4.3 Determinação do teor de cefotaxima no pó liofilizado

As áreas referentes aos picos de cefotaxima sódica para a determinação do teor da cefotaxima, assim como o teor em porcentagem estão demonstradas na Tabela 32.

Tabela 32: Áreas encontradas para a determinação do teor de cefotaxima no produto acabado por cromatografia líquida de alta eficiência

	Área cefotaxima SQR	Área cefotaxima pó liofilizado	Concentração (%)
	1963396	2008803	97,74
	1986398	2008717	98,89
	1993781	2002683	99,56
Média	1981192	2006734	98,73
DP*	0,01	0,00	0,92

*Desvio padrão.

5.4.4 Estabilidade das soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado

A Tabela 33 apresenta os resultados referentes ao teste de estabilidade das soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado. A solução de cefotaxima sódica produto acabado mostrou ser estável por 7 horas e a solução de cefotaxima SQR apresentou estabilidade por 8 horas.

Tabela 33: Valores encontrados para a estabilidade das soluções de cefotaxima sódica produto acabado e SQR

Solução de cefotaxima sódica produto acabado			Solução de cefotaxima sódica SQR		
Tempo	Área	Degradação (%)	Tempo	Área	Degradação (%)
T _{1h}	1991632	0,40	T _{1h}	2053349	0
T _{3h}	1982889	0,83	T _{3h}	2036312	0,79
T _{5h}	1970258	1,46	T _{5h}	2030878	1,06
T _{7h}	1966071	1,67	T _{7h}	2021076	1,53
T _{8h}	1959023	2,02	T _{8h}	2012439	1,95
T _{9h}	1958291	2,06	T _{9h}	2006352	2,25

5.5 Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais utilizadas na indústria farmacêutica para a identificação e quantificação de ativos em matérias-primas e produtos acabados por ser precisa, eficiente, exata e possibilitar a separação de amostras das respectivas impurezas, produtos de degradação, excipientes e adjuvantes, o que é essencial para a utilização dos métodos em análises de estabilidade de medicamentos.

Durante o desenvolvimento do método, primeiramente foi definido o comprimento de onda de trabalho. Geralmente é escolhido o comprimento de onda em que a amostra tem uma maior absorção (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; CASS; DEGANI, 2012). Para a

cefotaxima foram observados dois comprimentos de onda com picos de absorção, um maior em 258 nm e outro menor em 235 nm (Figura 19). Optou-se por trabalhar com o comprimento de onda de 235 nm por ser mais específico para a molécula, uma vez que o comprimento de onda de maior absorção (258 nm) mostrou-se muito próximo daquele em que grande parte das moléculas tem absorção (254 nm).

Após a definição do comprimento de onda, foram iniciados os testes para escolha da coluna cromatográfica, da fase móvel e da vazão.

Nos ensaios com a coluna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ e Luna C₁₈ em diversas proporções de fase móvel, constituída por água em diferentes pH's (ajustados com ácido acético e ácido ortofosfórico) e etanol, observou-se um fator de retenção e um fator de cauda inadequados (o pico referente ao fármaco apresentou tempo de retenção próximo ao tempo morto) (Figura 20), o que não é recomendado (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; FDA, 2004).

Provavelmente, a coluna Luna C₁₈ não apresentou resultados satisfatórios, pois o fármaco interagiu significativamente com os silanóis residuais livres da fase estacionária, causando o encaudamento do pico, assimetria de pico inadequada. A coluna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ apresenta a tecnologia de *endcapping*, ou seja, os silanóis residuais são ligados a alguns compostos para que não fiquem livres para interação com a amostra, por isso apresentou melhores resultados, porém ainda não totalmente adequados. Já a coluna Zorbax SB C₁₈ possui grupamentos isobutílicos ligados lateralmente aos átomos de sílica para impedimento estérico dos silanóis residuais livres. Essa estrutura confere melhor estabilidade da fase estacionária em análises realizadas em meios ácidos, assim como a redução da interação da amostra com os silanóis residuais; portanto há uma maior reprodutibilidade das análises e melhor formato de pico em fases móveis de pH ácido (NEUE, 1997; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; AGILENT, 2016a; AGILENT, 2016b; PHENOMENEX, 2016).

As características de cada coluna conferem diferentes valores de seletividade e hidrofobicidade para cada uma, mesmo que o grupamento ligado à sílica da fase estacionária seja semelhante (cadeia contendo 18 átomos de carbono). Tais valores influenciam nas interações da fase estacionária com o fármaco e a fase móvel, gerando comportamentos cromatográficos distintos (WATERS, 2016).

Resultados insatisfatórios em relação ao valor do fator de retenção e ao formato do pico (apresentou frente) foram obtidos com a coluna cromatográfica Zorbax SB C₁₈, vazão de 1 mL/min e fase móvel constituída por água e etanol (Figura 21). Após utilização da fase aquosa da fase móvel composta por água e ácido acético na concentração de 0,1% (pH 3,25),

o pico apresentou-se adequado em relação à assimetria, ao fator de cauda e ao fator de retenção e o cromatograma apresentou resolução satisfatória, sendo então definida a coluna cromatográfica e o método analítico (Figura 22) (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; FDA, 2004).

Os ensaios foram iniciados com vazão de 1,0 mL/min, que foi alterada para 0,8 mL/min e para 1,2 mL/min com a finalidade de melhora dos parâmetros de adequabilidade e aspecto do pico, porém, a vazão em que o sistema apresentou melhor adequabilidade foi de 1,0 mL/min.

Como uma visão geral, o método desenvolvido para a quantificação da cefotaxima no pó liofilizado apresentou vantagens em relação aos métodos encontrados na literatura (Tabela 2). O tempo de análise do fármaco (8 minutos) é reduzido, além de utilizar quantidade muito inferior de solventes orgânicos tóxicos (fase móvel constituída em sua maioria por água e fase orgânica constituída por etanol) e por minimizar danos ao equipamento e à coluna cromatográfica (não utiliza solução tamponante na fase móvel) (ALNAHHAS; HASSAN; ALHOSINI, 2012; ADLNASAB et al., 2012; SZULTKA et al., 2013; IQBAL et al., 2013; QURESHI et al., 2013; SARANYA et al., 2014; STIRBET; LITESCU; RADU, 2014; ZHANG et al., 2014).

Após a definição do método foram realizados os cálculos para a adequabilidade do sistema. Os parâmetros de adequabilidade verificam a conformidade da resolução e da precisão do sistema para a execução das análises, baseiam-se nos conceitos de equipamento, eletrônica, operações analíticas e amostra como um todo. Todos os parâmetros avaliados, ou seja, tempo de retenção (t_R), área do pico, fator de retenção (k), assimetria de pico (A_s), fator de cauda (FC), número de pratos (N) e resolução (R_s), mostraram-se conforme a especificação estabelecida pela FDA (Tabela 22) (FDA, 2004).

O método mostrou-se seletivo para o fármaco em relação aos produtos de degradação obtidos com o teste de degradação forçada nas condições ácida, alcalina, oxidativa, fotolítica e neutra com aquecimento. Os picos de produtos de degradação e do fármaco apresentaram resoluções satisfatórias (FDA, 2004) e o pico do fármaco para todas as condições de degradação mostrou-se puro, ou seja, não houve co-eluição, já que os valores do parâmetro de *peak angle* foram menores que os valores do parâmetro *peak threshold* (Tabela 25) (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Após o estabelecimento das condições analíticas, o método foi validado conforme as diretrizes da RE nº 899, do guia ICH e da USP 37 (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

De acordo com o preconizado para a validação de métodos analíticos, a linearidade de um método deve ser avaliada por meio do valor do coeficiente de correlação, que deve ser igual ou maior que 0,99, análise da significância da regressão e análise do gráfico de resíduos.

O valor de coeficiente de correlação encontrado, igual a 0,99997, demonstra a forte associação entre as duas variáveis, concentração e área do pico do fármaco. Pelo teste de análise de variância foi comprovado que a regressão é existente e estatisticamente significativa, ou seja, o coeficiente angular da equação da reta é diferente de 0, já que o valor-P obtido foi menor que 0,05 ($2,17 \times 10^{-11}$) (nível de significância de 5%). A presença da regressão também é confirmada estatisticamente pelo fato de a reta passar pela origem, ou seja, o coeficiente linear é igual a 0, já que o valor-P obtido para a intersecção foi igual a 0,0993, num nível de significância de 5%. O gráfico de resíduos apresenta distribuição adequada, o que confirma a linearidade do intervalo de concentrações avaliado. Os valores de DPR% para as áreas obtidas com as soluções de SQR nas concentrações da curva analítica apresentaram-se inferiores a 2% (USP 37, 2014), o que demonstra a linearidade na faixa de concentrações escolhida.

O método mostrou-se preciso pela avaliação em dois níveis (precisão por repetibilidade e precisão intermediária). Os valores de DPR das áreas nas três concentrações contemplando a faixa linear foram inferiores ao estabelecido para a validação de métodos analíticos cromatográficos (2%) (USP 37, 2014) (Tabela 28). O método apresentou-se exato pela análise do valor médio de recuperação, igual a 101,00%.

Os valores calculados para o limite de detecção e para o limite de quantificação foram de, respectivamente, 5,71 $\mu\text{g/mL}$ e 17,30 $\mu\text{g/mL}$, o que confirma a capacidade de quantificação da cefotaxima no produto acabado pelo método com segurança na faixa de concentrações utilizada.

A robustez foi avaliada por meio do teste de Youden, que é um dos mais aplicados para este parâmetro em validações de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Após a obtenção dos valores de teor de cefotaxima nas soluções, em porcentagem, os efeitos foram calculados e comparados ao valor igual a 2 vezes o desvio padrão das médias dos valores de teor, ou seja, 0,22 para os ensaios de variações inferiores e 0,76 para os ensaios de variações superiores. Todos os valores referentes aos efeitos calculados foram inferiores aos valores de referência, mostrando que o método é robusto em relação às possíveis variações provenientes do preparo de fase móvel, equipamento e flutuações de temperatura que geralmente acontecem na rotina de análises (YOU DEN; STEINER, 1975; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

A validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que o método desenvolvido é adequado e a quantificação da cefotaxima no pó liofilizado pode ser realizada com confiabilidade, precisão e exatidão. Além disso, o método pode ser aplicado também para as análises de estabilidade por ser seletivo quanto aos produtos de degradação produzidos durante os ensaios de degradação forçada nas condições ácida, alcalina, oxidativa, fotolítica e neutra com aquecimento. O preparo da amostra é simples e rápido, por ter um tempo de corrida igual a 8 minutos.

Após a validação do método analítico, foi determinado o teor da cefotaxima no produto acabado e o resultado médio encontrado foi de 98,73%, ou seja, o medicamento encontra-se de acordo com a especificação estabelecida pela monografia da cefotaxima sódica pó liofilizado encontrada na USP, entre 90,0 a 115,0% de cefotaxima (USP, 2014).

As soluções de cefotaxima sódica SQR e produto acabado apresentaram estabilidade por, respectivamente, 8 horas e 7 horas. O teste de estabilidade para as soluções de trabalho é de considerável importância por avaliar o período de tempo em que as soluções poderão ser utilizadas nas análises assegurando a mesma confiabilidade dos resultados quando soluções preparadas recentemente forem utilizadas.

6. ENSAIO MICROBIOLÓGICO TURBIDIMÉTRICO

6.1 Considerações gerais

O ensaio microbiológico turbidimétrico é uma técnica muito utilizada no doseamento de fatores de crescimento de micro-organismos, como vitaminas, e na avaliação da atividade de fármacos antimicrobianos em medicamentos. O princípio do ensaio é baseado na utilização de meio de cultura líquido, onde é adicionada a suspensão do micro-organismo e a substância a ser testada, e posteriormente, após incubação, é realizada a leitura da turbidez da solução (Farmacopeia brasileira, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A literatura descreve a utilização do ensaio microbiológico turbidimétrico para a determinação da atividade antimicrobiana de fármacos em medicamentos com a vantagem de ser uma técnica com tempo de análise reduzido e facilidade na execução em relação à outra técnica comumente utilizada, a difusão em ágar (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; CAZEDEY; SALGADO, 2013; PEDROSO; SALGADO, 2014b; SILVA; SALGADO, 2015; CURBETE; SALGADO, 2016).

6.2 Material e método

Como substância química de referência foi utilizada a cefotaxima sódica adquirida comercialmente da empresa Sequoia Research Products, com teor declarado de 98,0% (lote: 1401011887c).

Foi utilizado um medicamento similar como amostra de cefotaxima sódica pó liofilizado, contendo 524 mg de cefotaxima sódica e de nome comercial Cetazima[®] (lote: 0810031, prazo de validade: 05/2016). A amostra foi adquirida comercialmente e não possui excipientes.

As cepas de micro-organismos utilizadas durante o desenvolvimento e a validação do método microbiológico turbidimétrico foram repicadas de quinze em quinze dias para ágar caseína soja (Becton Dickinson[®]).

O material necessário ao ensaio era sempre preparado no dia anterior. A água purificada, as ponteiras, tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI (Acumedia[®]) devidamente vedados com tampão de gaze e algodão e béqueres foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Lufenco[®]) por 15 minutos a 121 °C.

O ensaio foi desenvolvido de acordo com os procedimentos estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, 2010. Foi realizado o delineamento 3x3 de retas paralelas, ou seja, foram preparadas três réplicas (tubos de ensaio) para cada uma das três concentrações de soluções do pó liofilizado e da SQR, um tubo para o controle positivo e um tubo para o controle negativo. As concentrações das soluções obedeceram a uma progressão geométrica.

A cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR para o preparo das soluções foram pesadas em balança analítica Ohaus[®] modelo DV215CD-Classe 1. O diluente empregado no preparo das soluções foi a água purificada. Após o preparo das soluções, 200 µL foram adicionados aos tubos de ensaio contendo os 10 mL de meio de cultura previamente esterilizado.

Para o preparo do inóculo, o micro-organismo utilizado no ensaio foi transferido para caldo BHI e incubado em estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás[®]) por 18 a 24 horas em temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Realizou-se então a padronização da transmitância do inóculo para $25 \pm 2\%$ em espectrofotômetro modelo DU530 (Beckman Coulter[®]) em comprimento de onda de 580 nm. O inóculo padronizado foi distribuído nos tubos de ensaio já contendo o meio de cultura e as soluções de cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR.

Os tubos de ensaio foram acondicionados na incubadora *shaker* modelo MA 420 (Marconi[®]) sob agitação por 4 horas (240 minutos) em temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em banho aquecido. O crescimento microbiano foi interrompido com a adição de 500 µL de solução de formaldeído a 12% em cada tubo. A leitura da absorbância de cada tubo foi realizada em espectrofotômetro em 530 nm com cubeta de vidro de caminho óptico de 10 mm. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do *software Microsoft Excel* (2013).

6.2.1 Desenvolvimento do método

As condições analíticas do ensaio foram estabelecidas após o teste de diferentes meios de cultura, cepas de micro-organismos, concentração das soluções de cefotaxima pó liofilizado e SQR e concentração de inóculo. Algumas das condições ensaiadas durante o desenvolvimento do método estão listadas na Tabela 34.

Tabela 34: Condições analíticas testadas durante o desenvolvimento do método microbiológico turbidimétrico para a determinação da potência do fármaco

Parâmetro	Condição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - IAL 1606
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 - IAL 2082
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 - IAL 2150
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 - IAL 1027
	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 - IAL 636
Meios de cultura	Caldo BHI (Brain-Heart Infusion)
	Caldo caseína-soja
	Caldo <i>Müller Hinton</i>
Concentração de inóculo	2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8%
Concentrações das soluções cefotaxima pó liofilizado e SQR	5; 10; 20; 40; 80; 160 µg/mL (razão 2)
	5; 20; 80 µg/mL (razão 4)
	9; 22,5; 56,25 µg/mL (razão 2,5)
	10; 25; 62,5 µg/mL (razão 2,5)
	10; 30; 90 µg/mL (razão 3)
	12; 24; 48 µg/mL (razão 2)
	15; 30; 60; 120 µg/mL (razão 2)
	15; 22,5; 33,75 µg/mL (razão 1,5)
	17; 34; 68; 136 µg/mL (razão 2)
	20; 30; 45 µg/mL (razão 1,5)
	22,5; 45; 90 µg/mL (razão 2)
	25; 37,5; 56,25 µg/mL (razão 1,5)
30; 33; 36,3 µg/mL (razão 1,1)	
30; 36; 43,2 µg/mL (razão 1,2)	
35; 70; 140 µg/mL (razão 2)	

6.2.2 Validação do método

Os parâmetros estudados na validação do método desenvolvido foram: linearidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

6.2.2.1 Linearidade

O parâmetro de linearidade foi avaliado de acordo com as análises realizadas em três dias diferentes. As curvas analíticas para as soluções de cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR foram construídas com os resultados obtidos com a leitura da absorbância da solução de cada tubo após incubação e adição da solução de formaldeído a 12%. A linearidade foi avaliada para as concentrações de 5, 20 e 80 µg/mL de cefotaxima pó liofilizado e SQR utilizando-se o delineamento de retas paralelas 3x3 (item 6.2).

No preparo das soluções contendo cefotaxima sódica, foram pesadas quantidades de cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR equivalentes a 10 mg de cefotaxima e transferidas para balão volumétrico de 10 mL com volume completado com água (concentração teórica de 1000 µg/mL). Posteriormente, foram realizadas as diluições para cada concentração transferindo-se alíquotas de 50, 200 e 800 µL para balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com água.

Foi construído o gráfico da absorbância versus o logaritmo das concentrações das soluções. Realizou-se a avaliação estatística dos resultados considerando-se o valor do coeficiente de correlação, a análise de variância e o paralelismo por meio do *software Microsoft Excel* (2013) (FARMACOPEIA Brasileira, 2010).

6.2.2.2 Precisão

A precisão foi avaliada em triplicata e em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária.

Para a repetibilidade (intradia), foram preparados nove tubos de ensaio contendo solução de cefotaxima sódica pó liofilizado, provenientes de preparos independentes e contemplando a faixa linear. As três replicatas de cada tubo de cada concentração (5, 20 e 80 µg/mL) foram preparadas e analisadas pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, nas mesmas condições e no mesmo dia. Posteriormente, foi realizada a avaliação do DPR% das absorbâncias obtidas para cada concentração.

A precisão intermediária foi desenvolvida da mesma maneira como a repetibilidade, porém os procedimentos pertinentes ao ensaio foram realizados por analistas diferentes em dias diferentes. Como o critério de aceitação para este parâmetro também foi considerado o DPR% das replicatas do segundo analista e o DPR% das médias das absorbâncias de cada concentração para cada analista.

6.2.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do ensaio de recuperação, em que a solução de cefotaxima SQR foi adicionada à solução pó liofilizado em quantidades conhecidas em três níveis de concentração (baixa, média e alta) contemplando o intervalo linear do método. O ensaio foi realizado em triplicata e em três dias diferentes conforme

Tabela 35. A recuperação, em porcentagem, foi calculada por meio da equação 1 (item 4.2.1.3).

Tabela 35: Preparo das replicatas dos tubos para o ensaio de recuperação do método microbiológico por turbidimetria para a determinação da potência da cefotaxima sódica no pó liofilizado

Soluções	Produto acabado (1000 µg/mL) (µL)	Cefotaxima sódica SQR (1000 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	50	-	5
R1	50	50	10
R2	50	350	40
R3	50	650	70
SQR ₁	-	50	5
SQR ₂	-	200	20
SQR ₃	-	800	80

*Balão volumétrico de 10 mL.

6.2.2.4 Robustez

A robustez do método foi avaliada de acordo com o planejamento fatorial 2³. Neste experimento buscou-se avaliar a influência de pequenas variações de três fatores nas análises em dois níveis. Os fatores determinados e as respectivas variações estão descritos na Tabela 36.

Tabela 36: Planejamento fatorial 2³ para o parâmetro de robustez para o método microbiológico por turbidimetria

Fatores	(-)	(+)
1: Tempo de incubação (minutos)	240	245
2: Volume de caldo no tubo (mL)	10	10,1
3: Comprimento de onda da leitura da absorbância dos tubos	530	532

A partir do estabelecimento dos parâmetros a serem avaliados, o teste foi desenvolvido de acordo com a matriz de planejamento, apresentada na Tabela 7 (item 4.2.1.5). Foram preparados dezesseis tubos de ensaio contendo solução de cefotaxima sódica pó liofilizado na concentração de 20 µg/mL, sendo duas referentes a cada um dos oito ensaios.

A interferência de cada fator na análise foi avaliada estatisticamente por meio da aplicação da ANOVA, calculada com o auxílio do *software* Assistat 7.7 beta e por meio da avaliação da significância dos efeitos (coeficientes de contraste), demonstrada com a construção do gráfico de Pareto. Os efeitos foram calculados de acordo com a Tabela 8 (item 4.2.1.5). Foi obtida a média das absorbâncias de cada ensaio, então os efeitos foram

calculados subtraindo-se a média dos valores de absorvância médios do nível superior (+) dos valores de absorvância médios do nível inferior (-) (MONTGOMERY, 2009; NETO et al., 2010).

6.2.3 Determinação da potência de cefotaxima sódica no pó liofilizado

6.2.3.1 Preparo das soluções

As soluções de cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR foram preparadas na concentração de 20 µg/mL, conforme item 6.2.2.1. Para a solução de cefotaxima sódica pó liofilizado foi utilizado o *pool* preparado no item 4.2.2.1. As determinações foram realizadas em triplicata.

6.2.3.2 Cálculos

A potência do produto acabado foi calculada em porcentagem conforme preconizado por Hewitt (2004) (Equação 13).

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

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

Equação 13

Em que:

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

I = logaritmo da razão das doses

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

Na equação são colocadas as médias das absorvâncias obtidas com a leitura dos tubos com as três concentrações de soluções de cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR. As determinações foram realizadas em triplicata

6.3 Resultados

6.3.1 Desenvolvimento do método

Os parâmetros estabelecidos para o método microbiológico por turbidimetria estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37: Parâmetros de análise estabelecidos para o método microbiológico por turbidimetria

Parâmetro	Condição
Micro-organismo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Meio de cultura	Caldo BHI
Diluyente	Água
Concentração de inóculo	5%
Concentração das soluções	5, 20 e 80 µg/mL (razão 4)

6.3.2 Validação do método analítico

6.3.2.1 Linearidade

Os valores das absorbâncias encontrados na leitura das soluções dos tubos para o parâmetro de linearidade do método estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38: Valores das absorbâncias referentes às soluções dos tubos para a elaboração das curvas analíticas para a cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR para o ensaio microbiológico turbidimétrico

Análise	Absorbância (média de três determinações)					
	P1 (5 µg/mL)	P2 (20 µg/mL)	P3 (80 µg/mL)	A1 (5 µg/mL)	A2 (20 µg/mL)	A3 (80 µg/mL)
1	0,515	0,402	0,289	0,507	0,399	0,286
2	0,512	0,408	0,280	0,501	0,402	0,283
3	0,501	0,412	0,301	0,515	0,410	0,296
Média	0,509	0,408	0,290	0,508	0,404	0,288
DPR¹(%)	1,45	1,47	3,63	1,38	1,41	2,36

¹Desvio padrão relativo.

As curvas analíticas para cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR construídas a partir da relação da média dos valores das absorbâncias com as respectivas concentrações está apresentada na Figura 30. Os resultados da análise de variância para verificação do delineamento das retas estão representados na Tabela 39.

Figura 32: Representação gráfica das curvas analíticas referentes à cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR para o ensaio microbiológico turbidimétrico no parâmetro de linearidade

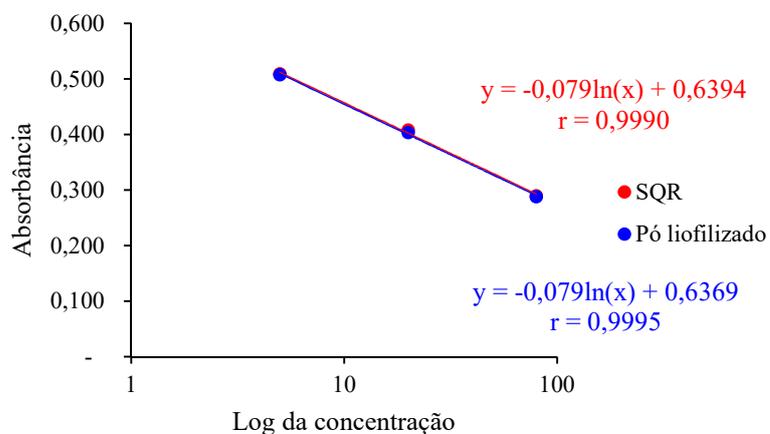


Tabela 39: Análise de variância dos valores de absorbância obtidos na construção das curvas analíticas da cefotaxima sódica pó liofilizado e SQR utilizando método microbiológico turbidimétrico

Fontes de variação	gl	SQ	MQ	F _{calculado} *	F _{tabelado}
Preparação	1	0,0000	0,0000	0,70	4,96
Regressão	1	0,1443	0,1443	34222,64	4,96
Paralelismo	1	0,0000	0,0000	0,00	4,96
Quadrático	1	0,0002	0,0002	4,65	4,96
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,17	4,96
Entre doses	5	0,14	0,03	685,63	3,33
Entre tubos	2	0,00	0,00	2,81	4,10
Dentro (erro)	10	0,00	0,00	-	-
Total	17	0,15	-	-	-

*significativo para $p < 0,05$.

6.3.2.2 Precisão

Os resultados referentes à precisão por repetibilidade e precisão intermediária são apresentados na Tabela 40.

Tabela 40: Valores da precisão intermediária para o método microbiológico turbidimétrico

Concentração (µg/mL)	Analista 1			Analista 2			
	Absorbâncias	Absorbância média±DP ¹	DPR ² (%)	Absorbâncias	Absorbância média±DP ¹	DPR ² (%)	DPR ²
5	0,500	0,507 ± 0,0070	1,38	0,509	0,497 ± 0,0132	2,65	1,36
	0,514			0,500			
	0,507			0,483			
20	0,402	0,410 ± 0,0068	1,66	0,405	0,409 ± 0,0059	1,43	0,06
	0,412			0,416			
	0,415			0,407			
80	0,301	0,292 ± 0,0086	2,96	0,281	0,281 ± 0,0125	4,44	2,55
	0,290			0,294			
	0,284			0,269			

¹Desvio padrão.

²Desvio padrão relativo.

6.3.2.3 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação para o parâmetro de exatidão estão apresentados na Tabela 41.

Tabela 41: Valores relativos à exatidão para o método microbiológico turbidimétrico

	Cefotaxima sódica SQR adicionada (µg/mL)	Cefotaxima sódica SQR encontrada ¹ (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR ² (%)	Recuperação média (%)
R1	5	5,03	100,60	4,34	
R2	35	33,28	95,09	2,32	98,98
R3	65	65,82	101,26	1,71	

¹Média de três determinações.

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

6.3.2.4 Robustez

As absorbâncias encontradas nos 8 ensaios para o parâmetro de robustez estão apresentadas na Tabela 42. A análise de variância para o parâmetro de robustez está demonstrada na Tabela 43 e foi avaliada no nível de significância de 5%. O gráfico de Pareto está apresentado na Figura 31.

Tabela 42: Absorbâncias encontradas para a cefotaxima sódica pó liofilizado no parâmetro de robustez para o método microbiológico por turbidimetria

Ensaio	Absorbância	Absorbância média±DP ¹	DPR ² (%)
1	0,403 0,407	0,405 ± 0,0028	0,70
2	0,402 0,406	0,404 ± 0,0028	0,70
3	0,410 0,404	0,407 ± 0,0042	1,04
4	0,405 0,381	0,393 ± 0,0170	4,32
5	0,406 0,398	0,402 ± 0,0057	1,41
6	0,415 0,407	0,411 ± 0,0057	1,38
7	0,410 0,395	0,403 ± 0,0106	2,64
8	0,408 0,412	0,410 ± 0,0028	0,69

¹Desvio padrão.

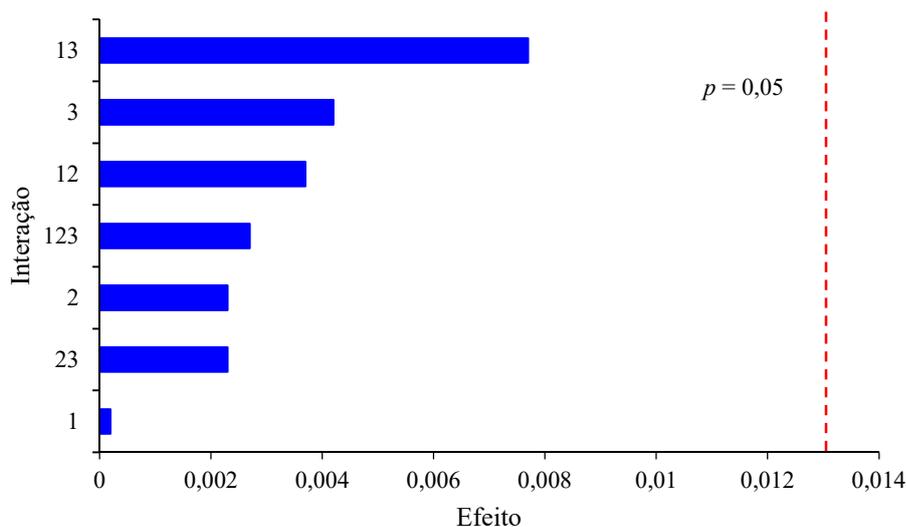
²Desvio padrão relativo.

Tabela 43: Análise de variância para a robustez da validação método microbiológico por turbidimetria

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	F tabelado	valor-P*
Fator 1	1	0,00007	0,00007	1,0750	5,3177	0,3300
Fator 2	1	0,00002	0,00002	0,3564	5,3177	0,5669
Fator 3	1	0,00000	0,00000	0,0089	5,3177	0,6076
Interação fator 1 e 2	1	0,00002	0,00002	0,2853	5,3177	0,9271
Interação fator 1 e 3	1	0,00025	0,00025	3,9181	5,3177	0,0830
Interação fator 2 e 3	1	0,00005	0,00005	0,8302	5,3177	0,3887
Interação fator 1, 2 e 3	1	0,00003	0,00003	0,5222	5,3177	0,4903
Tratamentos	7	0,00044	0,00006	0,9994	3,5005	0,4937
Resíduo	8	0,00051	0,00006	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$.

Figura 33: Gráfico de Pareto das interações das variáveis para o parâmetro de robustez para o método microbiológico por turbidimetria



6.3.3 Determinação da potência do pó liofilizado

A Tabela 44 apresenta a determinação da potência do pó liofilizado, em porcentagem.

Tabela 44: Determinação da potência do pó liofilizado, em porcentagem, pelo método microbiológico por turbidimetria

Potência (%)	
	103,34
	103,35
	97,87
Média	101,52
DPR(%)*	3,12

*Desvio padrão relativo.

6.4 Discussão

No controle de qualidade de antimicrobianos, além da utilização de técnicas físico-químicas para a quantificação de fármacos é requerida a avaliação da atividade antimicrobiana dos ativos. Muitas vezes, as técnicas físico-químicas empregadas no doseamento de fármacos e medicamentos não são capazes de avaliar a integridade da molécula do insumo farmacêutico, que é necessária à atividade antimicrobiana. O controle de qualidade de um antimicrobiano deve ser composto por técnicas físico-químicas e

microbiológicas para comprovar a adequação das características dos medicamentos (USP 37, 2014).

A avaliação da atividade antimicrobiana de um medicamento geralmente pode ser avaliada por duas técnicas: a difusão em ágar e o ensaio microbiológico turbidimétrico. Optou-se pela utilização do ensaio microbiológico turbidimétrico para a quantificação do medicamento em estudo pelas vantagens apresentadas pela técnica em relação à difusão em ágar: menor tempo de análise, facilidade e simplicidade de execução do ensaio, fornecimento de uma medida objetiva da resposta (absorbância) e ausência da matriz constituída pelo ágar, que poderia dificultar a difusão do fármaco pela placa (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Na literatura não foi encontrado ensaio microbiológico turbidimétrico para a determinação da potência da cefotaxima.

Primeiramente, no desenvolvimento do método, o crescimento de todos os micro-organismos testados para o método foi avaliado em cada um dos três meios de cultura. Todos os micro-organismos apresentaram melhor crescimento em caldo BHI (Brain-Heart Infusion), portanto foi o meio de cultura escolhido. Pela alta solubilidade em água do fármaco e do produto acabado, assim como pela simplicidade de preparo, optou-se por utilizar a água como diluente nas soluções de cefotaxima sódica SQR e pó liofilizado.

Os ensaios de desenvolvimento do método foram iniciados com o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*, porém os resultados obtidos não foram reprodutíveis e precisos. Duas cepas de *Staphylococcus aureus* também foram ensaiadas; os resultados para as análises com as duas cepas foram semelhantes. As concentrações encontradas para o intervalo linear constituíam um intervalo muito restrito (30-36,3 µg/mL), exigindo maior rigor e experiência na execução das análises para possibilitar menores erros experimentais e permitir a reprodução e validação do método. Outro micro-organismo, *Bacillus atropheus*, também foi testado e apresentou crescimento heterogêneo, ou seja, a formação de grumos na solução de meio de cultura, a leitura das soluções em espectrofotômetro foi inviável por não existir uma solução de turbidez homogênea. Quanto ao micro-organismo testado *Kocuria rhizophila*, apresentou crescimento insuficiente para a leitura adequada da turbidez das soluções em espectrofotômetro, mesmo com a utilização de concentrações elevadas de inóculo padronizado, apresentando controle positivo na faixa de absorbância de 0,200 a 0,300 para uma concentração de inóculo de 8%. Por fim, a *Escherichia coli* ATCC 25922 foi o micro-organismo de escolha para a validação do método, já que as análises apresentaram resultados reprodutíveis e precisos.

Após estabelecidas as condições analíticas, foi realizada a validação do método de acordo com o preconizado pela RE nº 899 (BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi comprovada estatisticamente. De acordo com a Tabela 39 desvios da linearidade estão ausentes para as curvas da cefotaxima SQR e pó liofilizado, já que os parâmetros “quadrático” e “diferença de quadrático” apresentaram valores de F calculado, igual a 4,65 e 0,17 respectivamente, inferiores ao valor de F tabelado (4,96). A comparação da inclinação das curvas de cefotaxima sódica SQR e pó liofilizado foi realizada pelo parâmetro de “paralelismo”. Os coeficientes angulares das retas foram considerados estatisticamente iguais, já que o F calculado para o parâmetro foi de 0,00, valor inferior ao F tabelado (4,96). Os coeficientes de correlação (r) para a curva de cefotaxima SQR e pó liofilizado foram calculados e os valores obtidos, de 0,9990 e 0,9995 respectivamente, comprovaram a linearidade do método por demonstrarem a presença de forte correlação entre as variáveis (log da concentração e absorbância). Todas as análises foram realizadas a um nível de significância de 5%.

A precisão, avaliada em dois níveis (repetibilidade e intermediária), demonstrou a conformidade do método em relação à proximidade das absorbâncias em três concentrações contemplando a faixa linear por meio da avaliação dos valores DPR, que foram inferiores ao especificado para a validação de métodos analíticos microbiológicos: 15%. O método apresentou-se exato por apresentar valor médio de recuperação igual a 98,98%.

A robustez foi avaliada de acordo com as variações de valores de absorbância entre os fatores isolados e de acordo com as interações entre cada fator. Após a aplicação da análise de variância para cada contraste, observou-se que as alterações consideradas para o parâmetro de robustez não interferiram significativamente nos valores de absorbância, já valor-P foi maior que 0,05 para todos eles.

Ao se observar os valores dos efeitos dispostos no gráfico de Pareto nota-se que nenhuma das interações teve valores de absorbância estatisticamente significativos para um valor-P igual de 0,05, ou seja, nenhum dos fatores alterados interferiu significativamente na quantificação do fármaco. Apesar da demonstração da robustez do método, é importante destacar que a variação do tempo de incubação e do volume de caldo simultaneamente apresentou maior desvio nos resultados.

A validação do método microbiológico por turbidimetria comprovou a sua adequação na quantificação da atividade do fármaco, o que reafirma a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises. Algumas vantagens, como o tempo reduzido de análise, a facilidade e simplicidade de execução dos procedimentos, assim como a ausência da matriz de ágar, que

poderia influenciar na difusão do fármaco para interação com o micro-organismo, são destacadas quando o ensaio é comparado com a técnica de difusão em ágar, uma das mais utilizadas para a quantificação microbiológica de fármacos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; KOGAWA; SALGADO, 2012; CAZEDEY; SALGADO, 2013; TÓTOLI; SALGADO, 2013; PEDROSO; SALGADO, 2014b; VIEIRA; FIUZA; SALGADO, 2014; CHIERENTIN; SALGADO, 2015; SILVA; SALGADO, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2015b; CURBETE; SALGADO, 2016).

Após a validação do método analítico, foi determinada a atividade do fármaco no medicamento em estudo e o resultado médio encontrado foi de 101,52%, ou seja, o medicamento encontra-se em concordância com a especificação estabelecida pela monografia para o medicamento encontrada na USP, entre 90,0 a 115,0% (USP 37, 2014).

7. ANÁLISE COMPARATIVA

A comparação entre métodos analíticos é necessária para a avaliação da equivalência analítica entre as técnicas utilizadas. Visando confrontar os métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado, os resultados dos teores em porcentagem passaram por avaliação estatística por meio da aplicação da análise de variância (ANOVA), considerando um nível de significância de 5%.

7.1 Resultados

Os resultados obtidos na determinação do teor em porcentagem da cefotaxima sódica pelos métodos propostos encontram-se na Tabela 45. A análise estatística está apresentada na Tabela 46.

Tabela 45: Valores obtidos na quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado pelos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia no infravermelho e ensaio microbiológico por turbidimetria

	Métodos		
	Cromatografia líquida de alta eficiência	Espectroscopia no infravermelho	Ensaio microbiológico turbidimétrico
	97,74	99,20	103,34
	98,89	98,36	103,35
	99,56	100,27	97,87
Média (%)	98,73	99,28	101,52
DPR* (%)	0,92	0,97	3,12

*DPR: Desvio Padrão Relativo.

Tabela 46: Análise de variância dos resultados para a quantificação da cefotaxima sódica pelos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia no infravermelho e ensaio microbiológico por turbidimetria

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	13,11549	2	6,55774	1,673515	0,2645042	5,14325
Dentro dos grupos	23,51127	6	3,91854			
Total	36,62675	8				

7.2 Discussão

Pela análise estatística de comparação dos resultados obtidos para a quantificação do fármaco pelos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, por espectroscopia no infravermelho e por ensaio microbiológico turbidimétrico, observou-se que os métodos

propostos não apresentaram diferença estatisticamente significativa para p de 0,05, uma vez que o valor do F calculado (1,67) mostrou-se inferior ao F tabelado (5,14). Apesar da comprovação de que a determinação do teor do fármaco é estatisticamente igual para os três métodos, deve-se considerar algumas características referentes a cada técnica.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais utilizadas na indústria farmacêutica para a quantificação de fármacos e medicamentos por ter a vantagem de separar o fármaco de seus produtos de degradação e possíveis impurezas, ou seja, pode ser utilizado para análises de estabilidade.

O método por cromatografia líquida apresentou ser mais sensível, já que os limites de quantificação e detecção foram inferiores àqueles estimados para o método por espectroscopia no infravermelho. O custo de um cromatógrafo a líquido é mais elevado que o custo de um espectrômetro no infravermelho, assim como o custo de consumíveis para o método por cromatografia é mais elevado (requer colunas cromatográficas, filtros e solventes de alta pureza) que o custo dos consumíveis utilizados para o método por espectroscopia no infravermelho (brometo de potássio e acetona PA). No entanto, a quantidade de solvente orgânico utilizado nas análises por cromatografia líquida neste trabalho é muito inferior quando comparada a outros métodos cromatográficos descritos na literatura. A geração de resíduos tóxicos para ambos os métodos é muito reduzida, assim como o tempo de análise.

Apesar das vantagens apontadas em relação aos métodos físico-químicos, é necessário que, num controle de qualidade de um antibiótico sejam realizadas análises conjuntas com métodos microbiológicos. Pequenas alterações na molécula do fármaco podem somente ser evidenciadas com a realização de testes microbiológicos, que verificam a atividade antimicrobiana da molécula. Ensaio físico-químico e microbiológico se complementam por avaliarem diferentes aspectos da molécula de um antimicrobiano.

Assim sendo, todos os métodos poderiam ser utilizados com confiança para a quantificação do fármaco no controle de qualidade do medicamento estudado, porém sempre recomenda-se que sejam realizadas análises físico-químicas e microbiológicas para garantir as características pertinentes ao medicamento antimicrobiano.

8. CONCLUSÕES

- Foram desenvolvidos e validados novos métodos para a quantificação da cefotaxima sódica na forma farmacêutica pó liofilizado.
- Desenvolveu-se e validou-se método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a identificação e quantificação da cefotaxima sódica no pó liofilizado com baixa geração de resíduos.
- Desenvolveu-se e validou-se método analítico rápido, de baixo custo, baixa geração de resíduos, com sensibilidade e precisão adequadas para a quantificação da cefotaxima sódica por espectroscopia no infravermelho.
- Desenvolveu-se e validou-se método analítico microbiológico turbidimétrico simples, de fácil execução e com tempo de análise reduzido para a quantificação da atividade do fármaco no pó liofilizado.
- Comprovou-se, estatisticamente, que os métodos analíticos desenvolvidos e validados fornecem resultados semelhantes, o que possibilita a utilização de qualquer um dos métodos físico-químicos em conjunto com o método microbiológico no controle de qualidade do medicamento.

REFERÊNCIAS

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

ADAMIVICS, J. A. Determination of antibiotics and antimicrobial agents in human serum by direct injection onto silica liquid chromatographic columns. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 5, n. 3, p. 267-274, 1987.

ADLNASAB, L.; EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI Y. A three phase dispersive liquid-liquid microextraction technique for the extraction of antibiotics in milk. **Microchimdvances Acta**, v. 179, p. 179-184, 2012.

Agilent. ZORBAX StableBond. Disponível em: <https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-stablebond>. Acesso em: 03 de agosto de 2016a.

Agilent. ZORBAX Eclipse Plus. Disponível em: <https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-eclipse-plus>. Acesso em: 03 de agosto de 2016b.

AHMED, S. M. A.; ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. New spectrophotometric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 2-7, 2011.

AL-ARFAJ, N. A. Spectrophotometric determination of some cephalosporins in pharmaceutical formulations. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 225-236, 2005.

ALEKSIC, M. M.; KAPETANOVIC, V., ATANACKOVIC, J.; JOCIC, B.; ZECEVIC, M. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in real urine sample using voltammetric and high-performance liquid chromatographic methods. **Talanta**, v. 77, p. 131-137, 2008.

ALEKSIC, M.; SAVIC, V.; POPOVIC, G.; BURIC, N.; KAPETANOVIC, V. Acidity constants of cefetamet, cefotaxime and ceftriaxone; the effect of the substituent at C3 position. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 752-756, 2005.

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

AL-MOMANI, I. F. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 751-757, 2001.

ALNAHHAS, B.; HASSAN, A.; ALHOSINI, H. New rapid and validated isocratic HPLC method for separation and assay of three 3rd generation's cephalosporins (ceftazidime,

ceftriaxone, cefotaxime). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 14, n. 11, p. 50-56, 2012.

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

AMIN, A. S.; SHAMA, S. A. Vanadophosphoric acid as a modified reagent for the spectrophotometric determination of certain cephalosporins and their dosage forms. **Monatshefte fur Chemie**, v. 131, p. 313-319, 2000.

ANVISA. Bulário eletrônico. CETAZIMA[®] Novafarma Industria Farmacêutica. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=11286092015&pIdAnexo=3025838. Acesso em: 02 de agosto de 2016.

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

ARMENTA, S.; GARRIGUES, M.; GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 1380, v. 27, p. 497-511, 2008.

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

ASSASSI, A. L.; ROY, C.; PEROVITCH, P.; AUZERIE, J.; HAMON, T.; GAUDIN, K. ARMENTA, S.; GARRIGUES, M.; GUARDIA, M. Green analytical method development for statin analysis. **Journal of Chromatography A**, n. 1380, p. 104-111, 2015.

ASWANI, K. C. H.; GURUPADAYYA, B. M.; NAVYA, S. S Determination and validation of cefadroxil, ceftriaxone and cefotaxime by using n-bromosuccinamide in human plasma and pharmaceutical dosage form. **International Journal of Research in Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 2, 206-212, 2011.

AYAD, M. M.; SHALABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E., ELSAID, H. M. Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of certain cephalosporins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 975–983, 1999a.

AYAD, M. M.; SHALABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E., ELSAID, H. M. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins through oxidation with cerium(IV) and 1-chlorobenzotriazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 557–564, 1999b.

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

BAGHERI GH. A.; YOSEF RAD, A.; REZVANI, M.; ROSHANZAMIR, S. Spectrophotometric complexation of cephalosporins with palladium (II) chloride in aqueous

and non-aqueous solvents. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 89, p. 317-321, 2012.

BAFELTOWSKA, J. J.; BUSZMANA, E.; MANDTB, K.; HAWRANEKB, J. Determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 976, p. 249-254, 2002.

BONFILIO, R.; TARLEY, C.R.T.; PEREIRA, G.R.; SALGADO, H.R.N.; ARAÚJO, M.B. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, v.80, p.236-241, 2009.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 87-100, 2012.

BOUSSÈS, C.; FERREY, L.; VEDRINES, E.; GAUDIN, K. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

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

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

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

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2014.

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

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

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

BUSHRA, M. U.; AKTER N., HASSAN M. R., ISLAM A., HOSSAIN M. R. Development and validation of a simple UV spectrophotometric method for the determination of cefotaxime sodium in bulk and pharmaceutical formulation. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 1, p. 74-77, 2014.

CASS, Q. B.; DEGANI, L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégia e validação**. São Carlos: EDUFScar, 2002.

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

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

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

CHIERENTIN, L.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of norfloxacin in tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 629-635, 2015.

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

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

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

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

DAHYOT-FIZELIER, C.; FRASCA, D.; GRÉGOIRE, N.; ADIER, C.; MIMOZ, O.; DEBAENE, B.; COUET, W.; MARHAND, S. Microdialysis study of cefotaxime cerebral distribution in patients with acute brain injury. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2738-274, 2013.

DATTA, B.; MANDAL, T. K.; CHAKRABORTY, A. K. Pharmacokinetics of Cefotaxime in Goats with Experimentally Induced Kidney Damage. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 35, p. 173-176, 2003.

DELL, D.; CHAMBERLAIN, J.; COPPIN, F. Determination of cefotaxime and desacetilcefotaxime in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 226, p. 431-440, 1981.

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

DEMOTES-MAINARD, F. M.; VINCON, G. A.; JARRY, C. H.; ALBIN, H. C. Micromethod for the determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 336, p. 438-445, 1984.

DERAYEA, S. M.; AHMED, H. M.; ABDELMAGEED, O. H.; HAREDY, A. M. New valid spectrofluorimetric method for determination of selected cephalosporins in different pharmaceutical formulations using safranin as fluorophore. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 655-660, 2016.

EL-SHABOURY, S. R.; SALEH, G. A.; MOHAMED, F. A.; RAGEH, A. H. Analysis of cephalosporin antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 1-19, 2007.

ESPINO, M.; FERNÁNDEZ, M. A.; GOMEZ, F. J. V.; SILVA, M. F. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 126-136, 2016.

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

FABRE, H.; BLANCHIN, M. D.; TJADEN, U. High-performance liquid chromatography with anodic amperometric detection for the determination of cefotaxime and its metabolites. **Journal of Chromatography**, v. 111, p. 1281-1284, 1986.

FABRE, H.; BLANCHIN, M.; KOK, W. T. Liquid chromatography with amperometric detection for the determination of cephalosporins in biological fluids. **Analyst**, v. 113, p. 651-655, 1988.

FABRE, H.; EDDINE, N. H.; BERGE, G.; BLANCHIN, M. D. Overlapping ionization constants for cefotaxime. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 1, p. 85-86, 1985.

FABRE, H.; KOK, W. T. Determination of cephalosporins and decomposition products by liquid chromatography with indirect electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 136-141, 1988.

FAN, B.; GENGB, M., WANGB, Y., LIA, Q. Spectrophotometric determination of cefotaxime by Using Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonate. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 965-968, 2013.

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

FARMACOPEIA BRASILEIRA - Primeiro Suplemento. Brasília: Anvisa, 2016.

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

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

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

FISHER, J.; ALDEA, A.; BAÑARES-ALCÁNTARA, R. A compliance management system for the pharmaceutical industry. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 25, p. 949-954, 2008.

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

GÁSPÁR, A. T.; ANDRÁSI, M.; KARDOS, S. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. **Journal of Chromatography B**, v. 775, p. 239-246, 2002.

GÁSPÁR, A.; KARDOZ, S.; ANDRÁSI, M.; KLEKNER, Á. Capillary electrophoresis for the direct determination of cephalosporins in clinical samples. **Chromatographia Supplement**, v. 56, p. 109-114, 2002.

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

GODE, D.; MARTIN, M. M.; STEINER, F.; Huber, C. G.; VOLMER, D. A. Rapid narrow band elution for on-line SPE using a novel solvent plug injection technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 433-445, 2012.

GRIFFIN, J. P.; D'ARCY, P. F. **A manual of adverse drug interaction**. 5th. ed. Amsterdam: Elsevier, 1997.

GROS, M.; RODRÍGEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 173-188, 2013.

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

GUO, P.; LI, X.; WANG, J.; YOU, A. Study on the compatibility of cefotaxime with tinidazole in glucose injection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1849-1853, 2007.

HAGINAKA, J.; WAKAI, J.; YASUDA, H.; NAKAGAWA, T. Direct serum injection with micellar liquid chromatography: chromatographic behavior and recovery of cephalosporins. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2732-2734, 1987.

HAKIM, L.; BOURNE, D. W. A.; TRIGGS, E. J. High-performance liquid chromatographic assay of cefotaxime, desacetylcefotaxime and ceftriaxone in rat plasma. **Journal of Chromatography**, v. 424, p. 111-117, 1988.

HALEEM, R. M.; SALEM, M. Y.; FATAHALLAH, F. A.; ABDELFATTAH, L. E. Quality in the pharmaceutical industry - A literature review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 463-469, 2013.

HAN, D.; WANG, Y.; JIN Y.; ROW, K. H. Analysis of some β -lactam antibiotics using ionic liquids as mobile phase additives by RP-HPLC. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 63-66, 2011.

HELALEH, M. I. H.; ABU-NAMEHE. S. M.; JAMHOUR R. M. A. Q. Direct titration and indirect spectrophotometric determination of selected cephalosporins. **Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research**, v. 55, n. 2, p. 93-97, 1998.

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

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

HORIMOTO, M. S.; MAYUMI, T.; AOE, K.; NISHIMURA, N.; SATO, T. Analysis of β -lactam antibiotics by high performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using bromoform. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1093-1102, 2002.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. Geneva, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, DOQ-CGCRE-008, 2011.

IQBAL, M. S.; BAHARI, M. B.; DARWIS, Y.; IQBAL, M. Z.; HAYAT, A. An RP-HPLC-UV Method with SPE for cefotaxime in all-in-one total parenteral nutritional admixtures: application to stability studies. **Journal of AOAC International**, v. 2, n. 96, p. 290-294, 2013.

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

ISO. International Standard Organization. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/home/about.htm>. Acesso em: 30 de agosto de 2016.

ISSOPOULOS, P. B. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins using molybdophosphoric acid. **Analyst**, v. 113, p. 1083-1086, 1988.

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

JEHL, F.; BIRCKEL, P.; MONTEIL, H. Hospital routine analysis of penicillins, thirdgeneration cephalosporins and aztreonam by conventional and high-speed high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 413, p. 109-119, 1987.

JONES, R. N. Cefotaxime and desacetylcefotaxime antimicrobial interactions. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 22, p. 19-33, 1995.

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

KAPALAVAVI, B.; YANG, Y.; MARPLE, R.; GAMSKY, C. Separation and analysis of pharmaceuticals in cold drugs using green chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 308-312, 2016.

KARAGEORGOU, E. G.; SAMANIDOU, V. F. Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 2862-2871, 2010.

KARAGEORGOU, E. G.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of β -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 2599-2607, 2012.

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

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

KEES, F.; STREHL, E.; SEEGER, K.; SEIDEL, G.; DOMINIAK, P.; GROBECKER, H. Comparative determination of cefotaxime and desacetyl cefotaxime in serum and bile by bioassay and high-performance liquid chromatography. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**, v. 31, n. 2, p. 362-365, 1981.

KIRKLAND, K. M.; McCOMBS, D. A., KIRKLAND, J. J. Rapid, high-resolution high-performance liquid chromatographic analysis of antibiotics. **Journal of Chromatography A**, v. 660, p. 327-337, 1994.

KO, R. J.; SATTLER, F. R. NICHOLS, S.; AKRIVIADIS, E.; RUNYON, B.; APPLEMAN, M.; COHEN, J. L.; KODA, R. T. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in patients with liver disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1376-1380, 1991.

KOBAYASHI, K.; SATO, K.; MIZUNO, Y.; KATSUMATA, Y. Capillary high-performance liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry of 24 cephem antibiotics. **Journal of Chromatography B**, v. 677, p. 275-290, 1996.

KOEL, M.; KALJURAND, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 1993-2002, 2006.

KOGAWA, A. C.; MELLO, N. P.; SALGADO, H. R. N. Quantification of doxycycline in raw material by an eco-friendly method of infrared spectroscopy. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 07, p. 463-466, 2016.

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

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

KORANI, M. A.; ABDEL-HAY, M, H.; BEDAIR, M. M.; GAZY A. A. Colorimetric determination of some penicillins and cephalosporins with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride. **Talanta**, v. 36, n. 12, p. 1253-1257, 1989.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 17 ed. 2010/2011. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KRAEMER, H.; GEHRKE, R.; BREITHAUP, A.; BREITHAUP, H. Simultaneous quantification of cefotaxime, desacetylcefotaxime, ofloxacin and ciprofloxacin in ocular aqueous humor and in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 700, p. 147-153, 1997.

KUMAR, C. H. A.; KUMAR, T. A.; GURUPADAYYA, B. M., SLOKA; S. N.; REDDY, M. B. R. Novel spectrophotometric determination of valacyclovir and cefotaxime using 1, 2-naphthaquinone-4-sulfonic acid sodium in bulk and pharmaceutical dosage form. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, n. 4, p. 278-287, 2010.

LALITHA, N.; SANJAY, P. P. N. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of cefotaxime sodium in marketed formulations. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 1, p. 26-28, 2010.

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

LAVILLA, I.; ROMERO, V.; COSTAS, I.; BENDICHO, C. Greener derivatization in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 61, p. 1-10, 2014.

LECAILLON, J. B.; ROUAN M. C.; SOUPPART C.; FEBVRE, N.; JUGE, F. Determination of cefsulodin, cefotian, cephalixin, cefotaxime, desacetyl-cefotaxime, cefuroxime and cefroxadin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 228, p. 257-267, 1982.

LEE, Y. J.; LEE, H. S. Simultaneous determination of ceftiofur, cefuroxime, cephalixin and cephaloridine in plasma using HPLC and a column-switching technique. **Chromatographia**, v. 30, n. 1, p. 80-841, 1990.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

LI, N.; FENG, F.; YANG, B.; JIANG, P.; CHU, X. Simultaneous determination of β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors in bovine milk by ultra performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 945-946, p. 110-114, 2014.

LIN, C.; CHEN, H.; LIN, E. C.; LIN, K.; HUANG, H. Optimization of separation and migration behavior of cephalosporins in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 879, p. 197-210, 2000.

LING, S. S. N.; YUEN, K. H.; BARKER, S. A. Simple liquid chromatographic method for the determination of cefotaxime in human and rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 297-301, 2003.

LIO, R.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Multivariate development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of glimepiride in tablets. **Journal of AOAC International**, v. 96, p. 960-976, 2013.

LIU, Q.; XU, L.; KE, Y.; JIN, Y.; ZHANG, F.; LIANG, X. Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 623-628, 2011.

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

MANDA, P.; HARGETT, J. K.; VAKA, S. R. K.; REPKA M. A.; MURTHYL, S. N. Delivery of cefotaxime to the brain via intranasal administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 11, p. 1306-1310, 2011.

MARREDDY, J. L.; REVATHI, R.; MARREDDY, S. N. R. Effective quantitation of cefotaxime sodium in bulk and pharmaceutical dosage forms using spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 9, n. 1, p. 104-106, 2011.

MARTÍNEZ, L. G.; FALCÓ, P. C.; CABEZA, A. S. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 405-423, 2002.

MC EVOY, G. K. (Ed.) **AHFS Drug information 2010**. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2010.

METWALLY, F. H.; ALWARTHAN A. A.; AL-TAMIMI, S. A. Flow-injection spectrophotometric determination of certain cephalosporins based on the formation of dyes. **II Farmaco**, v. 56, p. 601-607, 2001.

METZ, P.; KOHLHEPP, S. J.; GILBERT, D. N. Study of different off-line sample processing procedures and the measurement of antibiotic and antiviral levels in human serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 159-166, 2002.

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

MORENO A.H.; SALGADO H.R.N. Development of a new high-performance liquid chromatographic method for determination of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v.91, n.4, p.739-743, 2008.

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

MRESTRANI, Y.; NEUBERT, R.; HARTL, A.; WOHLRAB, J. Determination of cephalosporins in urine and bile by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, n. 349, p. 207-213, 1999.

MRESTRANI, Y.; NEUBERT, R.; SCHIEWE, J.; HARTL, A. Application of capillary zone electrophoresis in cephalosporin analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 690, p. 321-326, 1997.

MRUTHYUNJAYASWAMY, B. H. M.; HIREMATH, B.; MALIPATIL, S. M.; RAJU, S. A. Simple and sensitive spectrophotometric methods for the determination of cefotaxime sodium. **Journal Indian Council Chemist**, v. 23, n. 2, p. 120-123, 2006.

NANDA, R. K.; BHAGWAT, V. V.; POTAWALE, S. E.; VIDYASAGAR, N. C.; MISHRA, R. Simultaneous spectrophotometric estimation of cefotaxime sodium and sulbactam sodium in pharmaceutical dosage form. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1612-1617, 2010.

NASSAR, M. W. I.; ABD EL-SATTAR, O. I.; BARAKAT, S. E. M. Colorimetric and titrimetric determination of cefotaxime sodium in bulk powder and pharmaceutical formulations. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1-6, p. 175-187, 1996.

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

NEMUTLU, E.; KIRA, S.; KATLANB, D.; BEKSAC, M. S. Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone. **Talanta**, v. 80, p. 117-126, 2009.

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

NEUE, U. D. **HPLC Columns: Theory, Technology and Practice**. New York: Wiley-VCH, 1997.

NUEVAS, L.; GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, J. C.; HOOGMARTENS, J. Derivative spectrophotometric determination of the triethylammonium salt of cefotaxime in presence of related compounds from the synthesis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 579–583, 1998.

OHMORI, T.; SUZUKI, A.; NIWA, T.; USHIKOSHI, H.; SHIRAI, K.; YOSHIDA, S.; OGURA, S.; ITOH, S. Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1038-1042, 2011.

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

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

OMAR, A. M.; ABDELMAGEED, O. H.; ATTIA, T. Z. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins in pharmaceutical formulations. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1-12, 2009.

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

PASHA, C.; NARAYANA, B. A simple method for the spectrophotometric determination of cephalosporins in pharmaceuticals using variamine blue. **Eclética Química**, v. 33, n. 2, p. 41-46, 2008.

PATEL, K. B.; NICOLAU, D. P.; NIGHTINGALE, C. H.; QUINTILIANI, R.; Pharmacokinetics of cefotaxime in healthy volunteers and patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 22, p. 49-55, 1995.

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

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

PŁOTKA, J.; TOBISZEWSKI, M.; SULEJ, A. M.; KUPSKA, M.; GORECKI, T.; NAMIESNIK, J. Green chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1307, p. 1-20, 2013.

QURESHI, T.; MEMON, N.; MEMON, S. Q.; ABRO, K.; SHAH, S. W. LC/UV determination of cefradine, cefuroxime, and cefotaxime in dairy milk, human serum and wastewater samples. **Springer Plus**, v. 2, n. 575, p. 1-8, 2013.

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

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

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium by liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p.213-223, 2014a.

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological assay by turbidimetry to determine the potency of cefazolin sodium in lyophilized powder. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1391-1396, 2014b.

PENALVO, G. C.; JULIEN, E.; FABRE, H. Cross validation of capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for cefotaxime and related impurities. **Chromatographia**, v. 42, n. 3/4, p. 159-164, 1996.

PENALVO, G. C.; KELLY, M.; MAILLOLS, H.; FABRE, H. Evaluation of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography with direct injection of plasma for the determination of cefotaxime and its metabolite. **Analytical Chemistry**, v. 69, p.1364-1369, 1997.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Editora Manole, 2015.

Phenomenex. Luna C18. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/C18>. Acesso em: 03 de agosto de 2016.

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

RAJA, M. W.; WEI, S. Evaluating innovation performance and quality practices relationship: a review from different industries. **Tékhné**, v. 13, p. 25-33, 2015.

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

RAUT, M. D.; GHODE, S. P.; KALE, R. S.; PURI, M. V.; PATIL, H. S. Spectrophotometric method for the simultaneous estimation of cefotaxime sodium and sulbactam in parenteral dosage forms. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 3, p. 1506-1510, 2011.

RODRIGUES, D. F.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a green analytical method of RP-HPLC for quantification cefepime hydrochloride in pharmaceutical dosage forms: simple, sensitive and economic. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 12, 2016. (in press)

ROSSEEL, M. T.; VANDEWOUDE, K. H. Liquid chromatographic determination of the plasma concentrations of cefotaxime and desacetylcefotaxime in plasma of critically ill patients. **Journal of Chromatography B**, v. 811, p. 159-163, 2004.

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

RUNYON, B. A.; AKRIVIADIS E. A.; SATTler, F. R.; COHEN, J. Ascitic fluid and serum cefotaxime and desacetyl cefotaxime levels in patients treated for bacterial peritonitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 36, p. 1782-1786, 1991.

SAJEH, G. A.; ASKAL, H. F., RADWAN, M. F., OMAR, M. A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins. **Talanta**, v. 54, p. 1205-1215, 2001.

SALGADO, H.R.N.; MORENO, A.H.; GARG, S. LC-DAD Determination of fleroxacin in bulk and pharmaceutical dosage forms. **Chromatographia**, v.69, p. S237-S250, 2009.

SAMANIDOU, V. F.; HAPESHI, E.A.; PAPADOYANNIS, I. N. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 147-158, 2003.

SAMANIDOU, V. F.; TSOCHATZIS, E. D.; PAPADOYANNIS, I. N. HPLC determination of cefotaxime and cephalexine residues in milk and cephalexine in veterinary formulation. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 471-475, 2008.

SARANYA, C. H. L.; THEJASWINI, J. C.; GURUPADAYYA, B. M.; SRUTHI, B. Y. K. Simultaneous determination of cefotaxime sodium and paracetamol by LC-MS. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2014.

SAYED, R. A. Spectrophotometric method for the determination of cefotaxime sodium and cefoperazone sodium in pure and pharmaceutical dosage forms. **American Chemical Science Journal**, n. 3, v. 4, p. 514-525, 2013.

SAYED, R. A.; HASSAN, W. S.; EL-MAMMLI, M. Y.; SHALABY, A. Use of silver – gelatin complex for the determination of cefoperazone sodium, ceftazidime pentahydrate and cefotaxime sodium in pure and pharmaceutical dosage forms. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, n. 1, p. 10-17, 2013.

SAYED, R. A., HASSAN, W. S., EL-MAMMLI, M. Y.; SHALABYA, A. A. new extractive spectrophotometric method for the determination of gatifloxacin and cefotaxime sodium in pure and pharmaceutical dosage forms. **Oriental Journal of Chemistry**, n. 28, v. 2, p. 639-650, 2012.

SCANES, T.; HUNDT, A. F.; SWART, K. J.; HUNDT, H. K. L. Simultaneous determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 750, p. 171-176, 2001.

SEGUIN, P.; VERDIER, M. C.; CHANAVAZ, C.; ENGRAND, C.; LAVIOLLE, B.; DONNIO, P.; MALLÉDANT, Y. Plasma and peritoneal concentration following continuous infusion of cefotaxime in patients with secondary peritonitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 564-567, 2009.

SHALABY, A. Simple HPLC method for the analysis of some pharmaceuticals. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 20, p. 3161-3171, 1988.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in *in vitro* rat intestinal sac absorption model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 39-50, 2002.

SILVA, L. M. ; SALGADO, H. R. N. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, p. 192-199, 2013.

SILVA, L. M.; SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay to potency evaluation of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Microbiological Methods**, v. 110, p.49-53, 2015.

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

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

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. New York: JohnWiley & Sons, 1997.

SOKOLOVA, L. I.; CHUCHALINA, I. V. Preconcentration of the antibiotics cephalosin, cefotaxime, and levomycetin on modified silicas. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 1140–1143, 2006.

SOLANGI, A. R.; MEMON, S. Q.; KHUHAWAR, M. Y.; NHANGER, M. I. Quantitative analysis of eight cephalosporin antibiotics in pharmaceutical products and urine by capillary zone electrophoresis. **Acta Chromatographica**, v. 19, p. 81-96, 2007.

SORENSEN, L. K.; SNOR, L. K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 145-151, 2000.

SPORRI, A. S.; JANA, P.; COGNARD, E.; ORTELLI, D.; EDDER, P. Comprehensive screening of veterinary drugs in honey by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 5, p. 806-816, 2014.

STIRBET, D.; LITESCU, S.; RADU, G. Chromatographic analysis of immobilized cefotaxime. **Journal of Serbian Chemical Society**, v. 79, n. 5, p. 579-586, 2014.

SZULTKA, M.; KRZEMINSKI, R.; JACKOWSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography–tandem massspectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 66-76, 2013.

SWEETMAN, S. C. (Ed.) **Martindale: the complete drug reference**. 37th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011.

TIPPA, D. M. R.; SINGH, N. Cefotaxime sodium for injection reconstitution stability study in intravenous and intramuscular diluents. **Der Pharmacia Sinica**, v. 1, n. 2, p. 113-121, 2010.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIESNIK, J. Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 68-73, 2012.

TOGASHI, O. Pharmacokinetic study of cefotaxime (CTX) in dogs. **Pharmaceutical Research**, p. 124-130, 1985.

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

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 103-108, 2012.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for solution for injection. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5923-5928, 2013.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of an economic, environmental friendly and stability-indicating analytical method for determination of ampicillin sodium for injection by RP-HPLC. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 1928-1943, 2014.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development, optimization and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomicin in lyophilized powder. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1276-1285, 2015a.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Rapid Turbidimetric Assay to Determine the Potency of Daptomycin in Lyophilized Powder. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 106-121, 2015b.

TSAI, T. H.; CHEN, Y. F.; CHEN, K. C.; SHUM, A. Y. C.; CHEN, C. F. Concurrent quantification and pharmacokinetic analysis of cefotaxime in rat blood and brain by microdialysis and microbore liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 738, p. 75–81, 2000.

URI, J. V.; JAIN, T. C. Colorimetric detection and spectrophotometric determination of the aminothiazolyl-alkoxyimino β -lactams. **The Journal of Antibiotics**, v. 39, n. 5, p. 669-675, 1985.

USP 37 - The United States Pharmacopeia. The Nacional Formulary (NF 32). 37th. ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2014.

VALLEÉ, F.; LEBEL, M. Comparative study of pharmacokinetics and serum bactericidal activity of ceftizoxime and cefotaxime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 10, p. 2057-2064, 1991.

VERDIER, M.; TRIBUT, O.; TATTEVIN, P.; TULZO, T. L.; MICHELET, C.; BENTUÉ-FERRER, D. Simultaneous determination of 12 β -Lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4873-4879, 2011.

VIEIRA, D. C. M.; FIUZA, T. F. M.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of cefuroxime sodium in powder for dissolution for injection. **Pathogens**, v. 3, p. 656-666, 2014.

VIEIRA, D. C. M.; RICARTE, P. C.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of the quantitative analysis of cefuroxime sodium in powder for injection by infrared spectroscopy. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 80-87, 2012.

VIEIRA, D. C. M.; SALGADO, H. R. N. Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical products. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 508-511, 2011.

VOSOUGH, M.; RASHVAND, M.; ESFAHANI, H. M.; KARGOSHA, K.; SALEMI, A. Direct analysis of six antibiotics in wastewater samples using rapid high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector: A chemometric study towards green analytical chemistry. **Talanta**, n. 135, p. 7-17, 2015.

WANG, P.; TAO YUAN, T.; HU, J.; TAN, Y. Determination of cephalosporin antibiotics in water samples by optimised solid phase extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detector. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 91, n. 13, p. 1267-1281, 2011.

WANG, R.; JIA, Z.; FAN, J.; JUN, M.; HUA, X.; ZHANG, Q.; WANG, J. Separation and determination of cefotaxime enantiomers in injections by capillary zone electrophoresis. **Pharmazie**, v. 64, n. 3, p. 156-160, 2009.

Waters. Waters Reversed-Phase Column Selectivity Chart. Disponível em: Agilent. ZORBAX Eclipse Plus. Disponível em: http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475&alias=Alias_selectivitychart_CHEMISTRY&locale=pt_BR. Acesso em: 05 de agosto de 2016.

WELCH, C. J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z.; ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 667-680, 2010.

WELCH, W. D.; BAWDON, R. E. Cefotaxime metabolism by hemolyzed blood: quantitation and inhibition of the deacetylation reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 4, p. 119-124, 1986.

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

YANG, Y.; STRICKLAND, Z.; KAPALAVAVI, B.; MARPLE, R.; GAMSKY, C. Industrial application of green chromatography–I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase. **Talanta**, v. 84, p. 169-174, 2011.

YILMAZ, N.; BIRYOL, I. Anodic voltammetry of cefotaxime. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 1335–1344, 1998.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical Manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1975. 88p.

YOST, R. L.; DERENDORF, H. Rapid chromatography determination of cefotaxime and its metabolite in biological fluids, **Journal of Chromatography**, v. 341, p. 131-138, 1985.

YUN, E. K.; PRINCE, A. J.; MCMILLIN, J. E.; WELCH, L. E. High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins. **Journal of Chromatography B**, v. 712, p. 145-152, 1998.

ZENDELOVSKA, D.; STAFILOV, T.; MILOSEVSKI, P. High-performance liquid chromatographic method for determination of cefixime and cefotaxime in human plasma. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2003.

ZHANG, W.; HU, Q.; ZHANG, X.; LI, Y.; WANG, M.; HU, C. The selection of suitable columns for a reversed-phase liquid chromatographic separation of beta-lactam antibiotics and related substances via chromatographic column parameters. **Journal of Chromatography A**, v. 1323, p. 87– 96, 2014.

ZHU, T.; ROW, K. H. Extraction and determination of cefazolin sodium and cefotaxime sodium in human urine with a weak ion exchange monolithic column. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, p. 1423-1433, 2009.