



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE
CEFUROXIMA SÓDICA INJETÁVEL**

DANIELA CRISTINA DE MACEDO VIEIRA

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MAGALI BENJAMIM DE ARAÚJO

ARARAQUARA - SP

2010

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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE
CEFUROXIMA SÓDICA INJETÁVEL**

DANIELA CRISTINA DE MACEDO VIEIRA

Tese 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MAGALI BENJAMIM DE ARAÚJO

ARARAQUARA - SP

2010

Ficha Catalográfica

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

Vieira, Daniela Cristina de Macedo

V658a Análise químico farmacêutica e estudo de estabilidade de cefuroxima
forma farmacêutica injetável. / Daniela Cristina de Macedo Vieira. –
Araraquara, 2010.
228 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita
Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado
Co-orientador: Magali Benjamin de Araujo

. 1. Validação. 2. Estabilidade. 3. Cefalosporinas. 4. Cefuroxima. 5.
Controle de qualidade. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Araujo,
Magali Benjamin, co-orient. III. Título.

CAPES: 40300005

DANIELA CRISTINA DE MACEDO VIEIRA

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE
DE CEFUROXIMA SÓDICA INJETÁVEL**

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Hérica Regina Nunes Salgado
Orientador e Presidente

Prof^ª Dr^ª Maria Virgínia Costa Scarpa

Prof^ª Dr^ª Tais Maria Bauab

Prof^ª Dr^ª Pierina Sueli Bonato

Prof^ª Dr^ª Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em

16/08/2010

"A possibilidade de realizarmos um
sonho é o que torna a vida
interessante."

Paulo Coelho

À minha filha, Anna Carolina

"... Eu tenho tanto pra te falar, mas com palavras não sei dizer como é grande o meu
amor por você ..."

Você é quem fez valer a pena!

Perdoe-me pelos momentos de ausência.

Aos meus pais, José Luiz e Neide

E, às vezes, quando os procuro, noto que eles não têm
noção de como me são necessários, de como são
indispensáveis ao meu equilíbrio vital, porque eles fazem
parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se
tornaram alicerces do meu encanto pela vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Junior, Gustavo, Danilo e Ana Beatriz, obrigada pela compreensão, pela paciência e carinho com a Anna Ca. Amo vocês!

Aos meus cunhados e sobrinhos, obrigada pelo carinho e apoio.

Ao Adam, por estar presente nos momentos em que o chão parecia não existir..... O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem!

À Prof^a Dr^a Hérica Regina Nunes Salgado, obrigada pela orientação e pela paciência. "Todos buscam um mestre perfeito; acontece que os mestres são humanos, embora seus ensinamentos possam ser divinos."

À Prof^a Dr^a Taís Bauab, obrigada pelas palavras de carinho e incentivo nos momentos de certeza e incerteza. A você meu carinho e gratidão, que além de transmitir seus conhecimentos e suas experiências, soube me apoiar nos momentos de dificuldade!

À Prof^a Dr^a Virgínia Scarpa, pela contribuição na minha formação profissional. Minha gratidão àquela que faz do magistério um ideal, mesclando a arte de ensinar com o dom da convivência, tornando-se minha amiga e transmitindo suas experiências que grandemente ajudaram na minha formação.

À Maria de Fátima Rodrigues não só pelas orientações a respeito do laboratório e das aulas, mas pela amizade e apoio em minhas decisões. "Amigos são anjos que nos deixam de pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar".

Às minhas amigas de Alfenas, Adriana e Evanusa, pelas palavras de incentivo e carinho sempre. "Um verdadeiro amigo é alguém capaz de tocar teu coração mesmo do outro lado do mundo".

Aos amigos e colegas do Laboratório de Controle de Qualidade: Cris Lopes, Marcelo Hiene, Andréia, Ketylin, Rudy, Lucélia, Josilene, Cris Laignier, Flávia Fiorentino, Flávia Ribeiro e Paula, pela convivência e companheirismo.

Aos meus amigos Fernanda, Hilris, Leiliane, Olívia, Marcelo e Fabiano, pelos momentos de diversão, gargalhadas, almoços, passeios e grande amizade. "A amizade é como as estrelas, não as vemos toda hora, mais sabemos que existem".

Aos demais professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, amigos e funcionários com os quais no decorrer do curso pude conviver e aprender.

Às minhas estagiárias Patrícia Ricarte e Thalita Fiúza, pela contribuição no desenvolvimento do meu projeto! Vocês foram essenciais!

À Prof^a Dr^a Magali Benjamim de Araújo, pela disponibilização do Laboratório Núcleo Controle de Qualidade da Unifal-MG, em Alfenas.

À Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza e à Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani pelas excelentes colaborações prestadas no exame de qualificação.

A Irani, Rita, Ana, Max e a todos os demais funcionários do serviço técnico da Biblioteca desta Faculdade pelo apoio e amizade.

À secretaria de pós-graduação, em especial a Cláudia, Laura e Sônia.

À CAPES, por seis meses de bolsa.

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

RESUMO

A cefuroxima sódica (CAS 56238-63-2) é uma cefalosporina de segunda geração, indicada nas infecções provocadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Apesar deste fármaco ser altamente estudado e pesquisado no que concerne à atividade antimicrobiana, farmacocinética e farmacodinâmica, há poucos estudos na literatura em relação ao desenvolvimento de metodologia analítica para esta cefalosporina. Desta forma, pesquisas envolvendo métodos analíticos são de fundamental importância e altamente relevantes para otimizar sua análise na indústria farmacêutica e garantir a qualidade do produto já comercializado. Neste trabalho foram desenvolvidas e validadas técnicas de análise para cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável: (i) espectrofotometria na região do UV a 280,0 nm com faixa de concentração 5,0 a 14,0 µg/mL, utilizando água como solvente, com exatidão de 100,82% e teor de 99,49%; (ii) doseamento microbiológico, método de difusão em ágar na faixa de concentração de 30,0 a 120,0 µg/mL, utilizando *Micrococcus luteus* ATCC 9341, com exatidão de 100,77% e teor de 99,96%; (iii) doseamento microbiológico, método turbidimétrico na faixa de concentração de 30,0 a 120,0 µg/mL, utilizando *Micrococcus luteus* ATCC 9341, com exatidão 100,21% e teor de 99,97%; (iv) espectrofotometria na região do visível a 510,0 nm, com concentração de 100,0 a 300,0 µg/mL utilizando *o*-fenantrolina como ligante, com exatidão de 99,98% e teor de 99,82%; (v) espectrofotometria na região do IV, com exatidão de 99,83% e teor de 100,25%; (vi) acidimetria, com exatidão de 100,32% e teor de 100,51%; (vii) volumetria em meio não-aquoso, com exatidão de 100,40% e teor de 100,86%; (viii) iodometria, com exatidão de 99,97% e teor de 100,27%; (ix) cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV a 280,0 nm, utilizando metanol:água (70:30) como fase móvel, faixa de concentração de 10,0 a 15,0 µg/mL, vazão de 0,8 mL/min, com exatidão de 100,10% e teor de 99,84% e tempo médio de retenção de 1,8 minutos. Estudo preliminar da estabilidade de cefuroxima sódica frente à degradação alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica mostraram que o fármco é instável a estes importantes fatores de degradação. O fármaco também se mostrou instável a radiação UV-C.

Palavras chave: cefuroxima sódica, espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, CLAE, ensaio microbiológico, controle de qualidade, validação e estabilidade.

ABSTRACT

Cefuroxime sodium (CAS 56238-63-2) is a second generation cephalosporin indicated in the infections caused by Gram-positive and Gram-negative microorganisms. Although this drug highly to be studied and to be searched with respect to the antimicrobial pharmacokinetics and pharmacodynamics activity, there are few studies in relation to the development of analytical methodology for this cephalosporin in literature. In such a way, research involving highly excellent analytical methods is very important to optimize its analysis in the pharmaceutical industry and to guarantee the commercialized product quality. In this work, analytical methods for determination of cefuroxime injectable were validated: (i) UV spectrophotometry at 280 nm with concentration range of 5.0 a 14.0 µg/mL using water as solvent, with accuracy of 100.8% and quantitation of 99.49%; (ii) microbiological assay, agar diffusion method and (iii) turbidimetric method at concentration range 30.0 to 120.0 µg/mL, using *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as indicator microorganism, accuracy 100.77%, quantitation of 99.96% and accuracy of 100.21% and quantitation 99.97%, respectively; (iv) visible spectrophotometric method at 510.0 nm with concentration range of 100.0 at 300.0 µg/mL, using *o*-phenantrolin as reagent, with accuracy of 99.98% and quantitation of 99.82%; (v) IR spectrophotometry, accuracy of 99.83% and quantitation of 100.25%; (vi) acidimetry, accuracy of 100.32% and quantitation of 100.51%; (vii) volumetry in a non aqueous, accuracy of 100.40% and quantitation of 100.86%; (viii) iodometry accuracy of 99.97% and quantitation of 100.27%; (ix) HPLC method with UV detector at 280.0 nm using methanol and water (70:30), v/v) as mobile phase and concentration range of 10.0 a 15.0 µg/mL, flow of 0.8 ml/min, accuracy of 100.10% and quantitation of 99.84% and mean retention time of 1.8 minutes. Preliminary study of sodium cefuroxime through alkaline, acid, oxidative and fotolitic degradation shows sensibility showed that fármco is unstable to these important factors of degradation. The drug also proved to be unstable to UV-C radiation.

Key words: cefuroxime, UV and visible spectrophotometry, HPLC, microbiological assay, quality control, validation and satbility.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	29
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	31
3.1	AGENTES BACTERIANOS CAUSADORES DE INFECÇÕES E SEUS TRATAMENTOS.....	32
3.2	CEFALOSPORINAS.....	34
3.3	CEFUROXIMA SÓDICA.....	39
3.4	CONTROLE DE QUALIDADE.....	41
3.4.1	<i>Estudos de estabilidade.....</i>	<i>44</i>
3.4.2	<i>Validação.....</i>	<i>49</i>
4	DESCRIÇÃO.....	53
5	ANÁLISE QUALITATIVA.....	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE CEFALOSPORINAS.....	56
5.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....	58
5.2.1	<i>Material e métodos.....</i>	<i>58</i>
5.2.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>58</i>
5.3	PESO MÉDIO.....	58
5.3.1	<i>Material e método.....</i>	<i>58</i>
5.3.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>59</i>
5.4	SOLUBILIDADE.....	60
5.4.1	<i>Material e métodos.....</i>	<i>60</i>
5.4.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>60</i>
5.5	DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO.....	61
5.5.1	<i>Material e métodos.....</i>	<i>61</i>
5.5.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>62</i>
5.6	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	62
5.6.1	<i>Material e método.....</i>	<i>62</i>
5.6.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>63</i>
5.7	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA.....	63
5.7.1	<i>Material e método.....</i>	<i>63</i>
5.7.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>64</i>
5.8	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	65
5.8.1	<i>Material e método.....</i>	<i>65</i>
5.8.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>65</i>
5.9	ANÁLISE TÉRMICA.....	67
5.9.1	<i>Material e método.....</i>	<i>67</i>
5.9.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	<i>68</i>

5.10	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	71
5.10.1	<i>Material e método.....</i>	71
5.10.2	<i>Resultados e discussão.....</i>	72
6	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	74
6.1	Espectrofotometria na região de ultravioleta.....	75
6.1.1	<i>Considerações gerais.....</i>	75
6.1.2	<i>Material e método.....</i>	75
6.1.3	<i>Construção da curva de Ringbom.....</i>	76
6.1.4	<i>Obtenção da curva analítica.....</i>	78
6.1.5	<i>Validação do método.....</i>	81
6.1.6	<i>Determinação de cefuroxima sódica na forma farmacêutica.....</i>	83
6.1.6.1	Preparo da solução de cefuroxima sódica SQR.....	83
6.1.6.2	Preparo da amostra.....	84
6.1.6.3	Cálculos.....	84
6.1.7	<i>Teste de recuperação.....</i>	85
6.1.7.1	Preparo das soluções.....	85
6.1.7.2	Cálculo do teste de recuperação.....	86
6.1.8	<i>Discussão.....</i>	87
6.2	Espectrofotometria na região do visível.....	89
6.2.1	<i>Considerações gerais.....</i>	89
6.2.2	<i>Material e método.....</i>	89
6.2.2.1	Metodologia empregando Fe(III) e <i>o</i> -fenantrolina.....	89
6.2.3	<i>Construção da curva de Ringbom.....</i>	90
6.2.4	<i>Obtenção da curva analítica.....</i>	92
6.2.5	<i>Validação do método.....</i>	93
6.2.6	<i>Determinação de cefuroxima sódica.....</i>	95
6.2.6.1	Preparo da solução de cefuroxima sódica SQR.....	95
6.2.6.2	Preparo da solução de cefuroxima sódica amostra.....	95
6.2.6.3	Cálculos.....	96
6.2.7	<i>Teste de recuperação.....</i>	97
6.2.7.1	Preparo das soluções.....	97
6.2.7.2	Cálculo do teste de recuperação.....	98
6.2.8	<i>Discussão.....</i>	99
6.3	Espectrofotometria na região do infravermelho.....	101
6.3.1	<i>Considerações gerais.....</i>	101
6.3.2	<i>Material e método.....</i>	102
6.3.2.1	Obtenção da curva analítica.....	102
6.3.2.2	Determinação de cefuroxima sódica.....	103

6.3.2.2.1	Preparo das pastilhas de cefuroxima sódica SQR.....	103
6.3.2.2.1	Preparo das pastilhas de cefuroxima sódica amostra.....	103
6.3.2.3	Cálculos.....	104
6.3.3	<i>Teste de recuperação</i>	105
6.3.3.1	Cálculo do teste de recuperação.....	105
6.3.4	<i>Discussão</i>	106
6.4	Método de Análise Microbiológica	108
6.4.1	Método de Difusão em Ágar	108
6.4.1.1	<i>Considerações gerais</i>	108
6.4.1.2	<i>Material e método</i>	108
6.4.1.2.1	Preparo do inóculo.....	110
6.4.1.2.2	Preparo das soluções de cefuroxima sódica SQR.....	110
6.4.1.2.3	Preparo das soluções de cefuroxima sódica amostra.....	110
6.4.1.3	<i>Curva analítica</i>	111
6.4.1.4	<i>Validação do método</i>	113
6.4.1.5	<i>Determinação da potência do medicamento</i>	114
6.4.1.6	<i>Teste de recuperação</i>	117
6.4.1.6.1	Preparo das soluções.....	117
6.4.1.6.2	Cálculos.....	118
6.4.1.7	<i>Discussão</i>	118
6.4.2	Método Turbidimétrico	121
6.4.2.1	<i>Considerações gerais</i>	121
6.4.2.2	<i>Material e método</i>	121
6.4.2.2.1	Preparo do inóculo.....	123
6.4.2.2.2	Preparo das soluções de cefuroxima sódica SQR.....	123
6.4.2.2.3	Preparo das soluções de cefuroxima sódica amostra.....	123
6.4.2.3	<i>Curva analítica</i>	123
6.4.2.4	<i>Validação do método</i>	126
6.4.2.5	<i>Determinação da potência do medicamento</i>	127
6.4.2.6	<i>Teste de recuperação</i>	128
6.4.2.7	<i>Discussão</i>	130
6.5	Acidimetria	132
6.5.1	<i>Considerações gerais</i>	132
6.5.2	<i>Material e método</i>	132
6.5.2.1	Preparo das soluções.....	132
6.5.2.2	<i>Determinação de cefuroxima sódica no medicamento</i>	133
6.5.2.2.1	Cálculos.....	133
6.5.3	<i>Teste de recuperação</i>	134

6.5.3.1	Preparo das soluções.....	134
6.5.3.2	Cálculo do teste de recuperação.....	135
6.5.4	<i>Discussão</i>	136
6.6	Volumetria em meio não-aquoso	138
6.6.1	<i>Considerações gerais</i>	138
6.6.2	<i>Material e método</i>	139
6.6.2.1	Preparo das soluções.....	139
6.6.3	<i>Determinação de cefuroxima sódica no medicamento</i>	139
6.6.3.1	Cálculos.....	139
6.6.4	<i>Teste de recuperação</i>	140
6.6.4.1	Preparo das soluções.....	140
6.6.4.2	Cálculo do teste de recuperação.....	141
6.6.5	<i>Discussão</i>	142
6.7	Iodometria	144
6.7.1	<i>Considerações gerais</i>	144
6.7.2	<i>Material e método</i>	146
6.7.2.1	Preparo das soluções.....	146
6.7.3	<i>Determinação de cefuroxima sódica no medicamento</i>	148
6.7.3.1	Cálculos.....	148
6.7.4	<i>Teste de recuperação</i>	149
6.7.4.1	Preparo das soluções.....	150
6.7.4.2	Cálculo do teste de recuperação.....	151
6.7.5	<i>Discussão</i>	151
6.8	Cromatografia líquida de alta eficiência	153
6.8.1	<i>Considerações gerais</i>	153
6.8.2	<i>Material e método</i>	153
6.8.3	<i>Obtenção da curva analítica</i>	154
6.8.4	<i>Validação do método</i>	157
6.8.5	<i>Determinação de cefuroxima sódica no medicamento</i>	160
6.8.5.1	Preparo da solução de cefuroxima sódica SQR.....	160
6.8.5.2	Preparo da solução de cefuroxima sódica amostra.....	160
6.8.5.3	Cálculos.....	160
6.8.6	<i>Teste de recuperação</i>	161
6.8.6.1	Preparo das soluções.....	161
6.8.7	<i>Discussão</i>	162
7	ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PROPOSTOS	165
8	ESTABILIDADE	171
8.1	<i>Considerações gerais</i>	172

8.2	<i>Parte experimental</i>	178
8.2.1	Estudo preliminar da estabilidade da cefuroxima.....	178
8.2.1.1	<i>Método</i>	180
8.2.1.2	<i>Resultados</i>	181
8.2.1.2.1	Degradação ácida.....	181
8.2.1.2.2	Degradação básica.....	185
8.2.1.2.3	Degradação oxidativa.....	185
8.2.1.2.4	Degradação térmica.....	186
8.2.1.2.5	Degradação fotoquímica.....	186
8.2.1.3	<i>Discussão</i>	187
8.2.2	Estudo da degradação térmica da cefuroxima sódica.....	189
8.2.2.1	Análise em CLAE.....	190
8.2.2.1.1	<i>Resultados</i>	190
8.2.2.2	Análise microbiológica.....	192
8.2.2.2.1	Resultados.....	193
8.2.2.3	Discussão.....	194
8.2.3	Estudo da fotodegradação da cefuroxima sódica.....	195
8.2.3.1	Análise em CLAE.....	196
8.2.3.1.1	<i>Resultados</i>	196
8.2.3.2	Análise microbiológica.....	198
8.2.3.2.1	<i>Resultados</i>	199
8.2.3.3	Discussão.....	202
8.2.3.4	Discussão geral.....	203
9	CONCLUSÕES	205
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	209

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural da cefalosporina.....	35
Figura 2:	Estrutura química da cefuroxima sódica.....	39
Figura 3:	Espectro na região do ultravioleta de cefuroxima sódica SQR a 10 µg/mL em água (preto), tampão fosfato pH 6,0 (verde), metanol (azul), ácido clorídrico 0,1 M (vermelho) e hidróxido de sódio 0,1 M (rosa).....	64
Figura 4:	Espectro na região de infravermelho de cefuroxima sódica SQR em pastilhas de KBr.....	65
Figura 5:	Espectro na região de infravermelho de cefuroxima sódica amostra em pastilhas de KBr.....	66
Figura 6:	Espectro na região de infravermelho de cefuroxima sódica SQR (Farmacopeia Britânica, 2005).....	67
Figura 7:	Curva DSC de cefuroxima sódica SQR e da amostra sob atmosfera de ar sintético, em razões de aquecimento de 10°C.....	69
Figura 8:	Curva de termogravimetria (TG) de cefuroxima sódica SQR e amostra sob atmosfera de oxigênio.....	70
Figura 9:	Curva de termogravimetria (TG) de cefuroxima sódica SQR e amostra sob atmosfera de nitrogênio.....	70
Figura 10:	Determinação de cefuroxima sódica 10 mg/mL por cromatografia em camada delgada, P: SQR e A: amostra. Sistema solvente: clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:2:1).....	72
Figura 11:	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta para solução de cefuroxima sódica SQR de 0,5 a 30,0 µg/mL.....	78
Figura 12:	Representação gráfica da curva de calibração de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm.....	81
Figura 13:	Reação de complexação do Fe ³⁺ com a <i>o</i> -fenantrolina.....	90
Figura 14:	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível, $\lambda = 510$ nm, para solução de cefuroxima sódica substância de referência de 10,0 a 400,0 µg/mL.....	92
Figura 15:	Representação gráfica da curva analítica da solução de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm.....	93
Figura 16:	Representação gráfica da curva analítica de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	103
Figura 17:	Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções SQR (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P1 (30 µg/mL); P2 (60 µg/mL); P3 (120,0 µg/mL); A1 (30 µg/mL); A2 (60 µg/mL) e A3 (120,0 µg/mL).....	111
Figura 18:	Representação gráfica da curva analítica de cefuroxima sódica pelo ensaio	

	microbiológico – método de difusão em ágar.....	113
Figura 19:	Determinação da potência de cefuroxima sódica amostra pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.....	115
Figura 20:	Esquema da determinação da potência da cefuroxima sódica pelo método turbidimétrico.....	124
Figura 21:	Curvas analíticas de soluções de cefuroxima sódica SQR e amostra, em concentrações de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.....	126
Figura 22:	Cromatograma obtido por CLAE para soluções de cefuroxima sódica SQR: 10 µg/mL a 15 µg/mL.....	155
Figura 23:	Representação gráfica da curva analítica da solução de cefuroxima sódica em concentrações de 10 a 15 µg/mL por CLAE.....	157
Figura 24:	Cromatograma de cefuroxima sódica amostra, na concentração de 12 µg/mL, representando a degradação ácida em HCl 0,1 M. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters.....	181
Figura 25:	Cromatograma de cefuroxima sódica amostra, na concentração de 12 µg/mL, representando a degradação básica em NaOH 0,1 M. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters.....	182
Figura 26:	Cromatograma de cefuroxima sódica amostra, na concentração de 12 µg/mL, representando a degradação oxidativa em H ₂ O ₂ 3%. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters.....	182
Figura 27:	Cromatograma de cefuroxima sódica amostra, na concentração de 12 µg/mL, expostos durante 90 dias, em câmara climática (40°C/75%), representando a degradação térmica. Fase móvel metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters.....	183
Figura 28:	Cromatograma de cefuroxima sódica amostral, na concentração de 12 µg/mL, exposto durante 30 dias, em lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C. Fase móvel: metanol: água (70:30).....	183
Figura 29:	Cromatograma de cefuroxima sódica amostra em sua embalagem original, na concentração de 12 µg/mL, exposto durante 30 dias, em lâmpada UVC-	

	254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C. Fase móvel: metanol: água (70:30).....	184
Figura 30:	Cefuroxima axetil (1) e seus produtos de degradação: anti-cefuroxima axetil (2) e Δ -3-cefuroxima axetil (3).....	186
Figura 31:	Representação gráfica dos teores de cefuroxima sódica amostra obtidos após exposição em câmara climática $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\%$ UR por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.....	193
Figura 32:	Representação gráfica dos teores de cefuroxima sódica amostra obtidos após exposição em câmara climática $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\%$ UR por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.....	193
Figura 33:	Representação gráfica dos teores de cefuroxima sódica amostra obtidos após exposição à radiação UV por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.....	202
Figura 34:	Representação gráfica dos teores de cefuroxima sódica amostra obtidos após exposição à radiação UV por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.....	202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de algumas cefalosporinas....	38
Tabela 2:	Parâmetros para estudo de estabilidade de longa duração.....	47
Tabela 3:	Peso médio da cefuroxima sódica na forma farmacêutica injetável.....	59
Tabela 4:	Solubilidade da cefuroxima sódica SQR em diferentes solventes a 25,0 °C.....	61
Tabela 5:	Umidade da cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável determinada pelo método gravimétrico.....	63
Tabela 6:	Absorção de cefuroxima sódica no infravermelho em dispersão de KBr.....	66
Tabela 7:	Obtenção da curva de Ringbom de cefuroxima sódica por espectrofotometria no ultravioleta a 280,0 nm.....	77
Tabela 8:	Preparo da curva analítica de cefuroxima sódica por espectrofotometria no ultravioleta a 280,0 nm.....	79
Tabela 9:	Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta em 280,0 nm.....	80
Tabela 10:	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	82
Tabela 11:	Precisão do método de UV representado pelo desvio padrão relativo para cefuroxima sódica.....	82
Tabela 12:	Robustez do método de UV representado pela alteração no valor do pH de 7,23 para 6,8.....	83
Tabela 13:	Robustez do método de UV representado alteração do comprimento de onda de 280 nm para 283 nm.....	83
Tabela 14:	Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra (750,0 mg) pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm.....	85
Tabela 15:	Preparo das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm.....	86
Tabela 16:	Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta em 280,0 nm.....	87
Tabela 17:	Obtenção da curva de Ringbom de cefuroxima sódica + $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ por espectrofotometria na região do visível em 510,0 nm.....	91
Tabela 18:	Preparo da curva analítica de cefuroxima sódica por espectrofotometria na região do visível a 510,0 nm.....	93

Tabela 19:	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do visível.....	94
Tabela 20:	Robustez do método espectrofotométrico na região do visível representado pela mudança do equipamento.....	94
Tabela 21:	Robustez do método espectrofotométrico na região do visível representado pelo aumento do comprimento de onda (515,0 nm).....	95
Tabela 22:	Quantidades determinadas para o doseamento cefuroxima sódica amostra (750,0 mg) pelo método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm.....	97
Tabela 23:	Preparo das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm.....	98
Tabela 24:	Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico.....	99
Tabela 25:	Preparo da curva analítica de cefuroxima sódica por espectrofotometria no infravermelho.....	102
Tabela 26:	Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	105
Tabela 27:	Preparação das pastilhas para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	106
Tabela 28:	Teste de recuperação de cefuroxima sódica SQR adicionada à cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.	106
Tabela 29:	Parâmetros testados para a avaliação de cefuroxima sódica por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.....	109
Tabela 30:	Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de cefuroxima sódica pelo ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.....	112
Tabela 31:	Robustez do método microbiológico por difusão em ágar, considerando a mudança do meio de cultura.....	114
Tabela 32:	Robustez do método microbiológico por difusão em ágar, considerando o solvente utilizado para diluição da amostra e da SQR.....	114
Tabela 33:	Valores experimentais obtidos para o doseamento de cefuroxima sódica amostra (750 mg) pelo ensaio microbiológico difusão em ágar.....	116
Tabela 34:	Análise da variância dos dados obtidos do doseamento de cefuroxima sódica pelo ensaio microbiológico difusão em ágar.....	116
Tabela 35:	Representação do esquema de preparação das amostras no teste de	

	recuperação de cefuroxima sódica no doseamento microbiológico método de difusão em ágar.....	117
Tabela 36:	Valores experimentais do teste de recuperação obtidos em amostras de cefuroxima sódica amostra, pelo ensaio microbiológico, método de difusão em ágar.....	118
Tabela 37:	Parâmetros testados para a avaliação de cefuroxima sódica por ensaio microbiológico-método turbidimétrico.....	122
Tabela 38:	Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de cefuroxima sódica, pelo método turbidimétrico.....	125
Tabela 39:	Robustez do método microbiológico pela técnica turbidimétrica, considerando o tempo de incubação.....	127
Tabela 40:	Robustez do método microbiológico pela técnica turbidimétrica, considerando o volume do meio de cultura.....	127
Tabela 41:	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de cefuroxima sódica, utilizando o método turbidimétrico.....	128
Tabela 42:	Valores determinados para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método turbidimétrico.....	128
Tabela 43:	Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de cefuroxima sódica amostra no doseamento microbiológico método turbidimétrico.....	129
Tabela 44:	Valores do teste de recuperação obtidos em amostras de cefuroxima sódica, pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico.....	130
Tabela 45:	Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método acidimétrico.....	134
Tabela 46:	Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método acidimétrico.....	135
Tabela 47:	Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método acidimétrico.....	136
Tabela 48:	Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método volumétrico em meio não-aquoso.....	140
Tabela 49:	Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método volumétrico em meio não-aquoso.....	141
Tabela 50:	Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método volumétrico em meio não-aquoso.....	142
Tabela 51:	Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra por iodometria.....	149

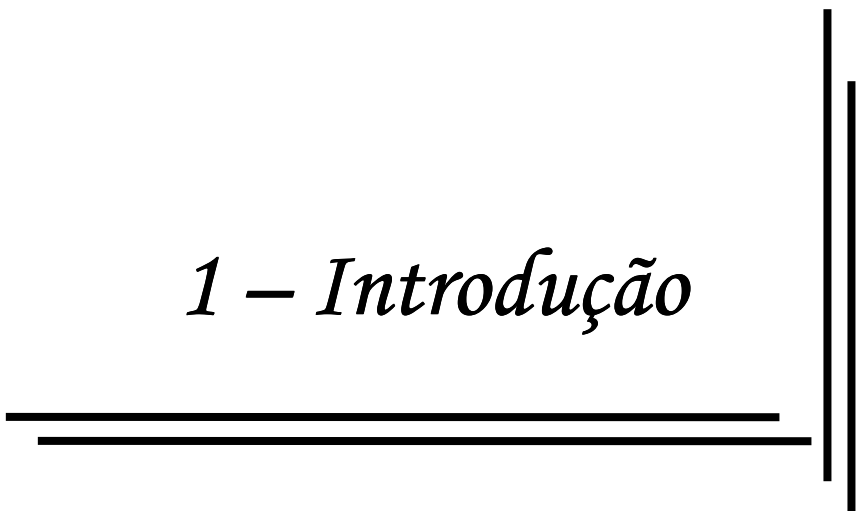
Tabela 52:	Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para determinação iodométrica.....	150
Tabela 53:	Teste de recuperação de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra por iodometria.....	151
Tabela 54:	Parâmetros utilizados para a avaliação de cefuroxima sódica por cromatografia líquida de alta eficiência.....	154
Tabela 55:	Condições cromatográficas utilizadas na adequação de método para quantificação da cefuroxima sódica por CLAE.....	154
Tabela 56:	Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica por CLAE.....	156
Tabela 57:	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica, utilizando o método CLAE.....	158
Tabela 58:	Precisão do método de CLAE representado pelo desvio padrão relativo para cefuroxima sódica.....	158
Tabela 59:	Robustez do método para CLAE de cefuroxima sódica pela variação do analista.....	159
Tabela 60:	Robustez do método para CLAE de cefuroxima sódica pela variação da vazão da fase móvel.....	159
Tabela 61:	Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra por CLAE.....	161
Tabela 62:	Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método CLAE.....	162
Tabela 63:	Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra por CLAE.....	162
Tabela 64:	Aplicabilidade, exatidão e precisão das técnicas propostas para quantificação de cefuroxima sódica.....	167
Tabela 65:	Valores médios experimentais obtidos para a determinação quantitativa de cefuroxima sódica amostra, pelas técnicas avaliadas.....	168
Tabela 66:	Análise da variância dos resultados obtidos para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelas técnicas propostas.....	168
Tabela 67:	Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original mantidas em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, analisados por CLAE.....	188
Tabela 68:	Quantificação de cefuroxima sódica solução mantida em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, analisados por CLAE.....	189
Tabela 69:	Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original mantidas em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar	191

Tabela 70:	Quantificação de cefuroxima sódica solução mantida em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, por ensaio microbiológico-método de difusão em agar.....	192
Tabela 71:	Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original exposta à radiação UV, pelo método de CLAE.....	197
Tabela 72:	Quantificação de cefuroxima sódica solução exposta à radiação UV, pelo método de CLAE.....	198
Tabela 73:	Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original exposta à radiação UV, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.....	200
Tabela 74:	Quantificação de cefuroxima sódica solução sódica exposta à radiação UV, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.....	201

Lista de Abreviaturas

ATCC - *American Type Culture Collection*
ANOVA - análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS - *Chemical Abstracts Service*
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
BHI - *Brain-heart Infusion Agar*
BV – Balão Volumétrico
DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA - Análise Térmica Diferencial
e.p.m. - erro padrão da média
F cal - valor de F calculado
FM - fase móvel
F tab - valor de F tabelado
GL - graus de liberdade
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
QM – Quadrados Médios
R - Reagente
SA – Solução Amostra
SI - Solução Indicadora
SQR – Substância Química de Referência
SQ: Soma dos Quadrados
SR - Solução Reagente
TG - Termogravimetria
TSA - *Tryptic Soy Agar*
UV - Ultravioleta
v/v - volume em volume
Vis - Visível

1 – Introdução



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

As terapias medicamentosas são uma parte indispensável da vida diária da população e a promoção do uso racional dos medicamentos tem sido uma das principais diretrizes preconizadas pela Organização Mundial da Saúde no sentido de orientar as políticas nacionais de medicamentos (HARTIGAN-GO, 2002). Para alcançar este objetivo, é fundamental a participação ativa e consciente dos profissionais responsáveis pela prescrição e dispensação dos medicamentos (médicos, odontólogos, veterinários e farmacêuticos), além da ampla disseminação junto à população de informações corretas para a qual tem importância estratégica à participação de todos os profissionais da saúde.

Considerando todos os aspectos sociais e econômicos do ramo farmacêutico, foram implantadas novas tecnologias, surgiram distribuidoras que passaram a oferecer matérias-primas em quantidades acessíveis, proporcionando, assim, oportunidade aos profissionais da saúde prescreverem o medicamento de forma genérica, e ao paciente, a oportunidade de comprar seus medicamentos a um custo inferior.

O mercado nacional está repleto de especialidades farmacêuticas contendo o mesmo fármaco, oriundas de diferentes laboratórios, que possivelmente adotam critérios diversos de fabricação. Sabe-se que a disponibilidade dos medicamentos pode ser alterada por fatores ligados ao fármaco, à formulação ou aos processos de fabricação. Associado a este contexto no segmento da indústria de medicamentos, a Resolução RDC nº 16, de 02 de março de 2007 aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos e, estabelece, entre outros, procedimentos que visam comprovar a equivalência terapêutica de medicamentos aparentemente similares disponíveis à população brasileira (BRASIL, 2007).

É reconhecido que o controle de qualidade é fundamental para manter o cliente satisfeito com o produto adquirido, bem como o estabelecimento com boa reputação. A avaliação da qualidade dos medicamentos, disponíveis no mercado, é iniciativa importante, principalmente para as ações dos órgãos de Vigilância Sanitária na ocorrência de suspeita ou denúncia de medicamentos adulterados, falsificados, com falha terapêutica e com alteração no aspecto e nas propriedades físico-químicas.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2007), a responsabilidade pela qualidade dos produtos farmacêuticos é do fabricante, que deverá assegurar a confiabilidade dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos, não colocando os

pacientes em risco, em função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade e eficácia.

Inúmeros são os relatos de falhas no controle de qualidade de medicamentos, quer nos aspectos físico-químicos, quer no controle biológico, com prejuízos incalculáveis à população, portanto o Controle de Qualidade é aspecto fundamental na Indústria Farmacêutica. Busca-se com a sua aplicação garantir que as características essenciais de qualidade, esperadas pelo consumidor, tais como eficácia terapêutica, funcional, cosmética, além da segurança, estejam presentes em todos os produtos.

Assim sendo, os critérios de identidade, pureza, teor e estabilidade tradicionalmente utilizados no controle de qualidade, são parâmetros indicativos de qualidade, mas não são suficientes para assegurar a eficácia clínica dos medicamentos (STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995; DOKOUMETZIDIS, MACHERAS, 2006).

Dentro da visão de qualidade biofarmacêutica é atribuição do controle assegurar a qualidade e segurança dos medicamentos por meio da realização de estudos de equivalência farmacêutica, bioequivalência e biodisponibilidade que visam garantir que a dose contida na forma farmacêutica atingirá os locais de ação no organismo e apresentará o efeito terapêutico desejado (STORPIRTIS et al., 2004).

A maioria da população que não conhece o assunto considera a quantidade elevada de medicamentos como símbolo de qualidade sanitária, deixando de lado a qualidade do produto, a sua eficácia e segurança (STROM, 2000).

Dentre os medicamentos licenciados no Brasil pelo Ministério da Saúde, as cefalosporinas representam o maior número de inovações no tratamento antimicrobiano (PICHICHERO; CASEY, 2007; JONES et al., 2007). Representam, sem dúvida, um importante e crescente grupo de antibióticos na medicina atual.

Esta classe tem recebido muita atenção clínica em virtude de sua eficácia no tratamento de diversas infecções, tais como otites, pneumonias, faringites, infecções urinárias, de pele, ossos, oportunistas e septicemia, além do uso profilático e pós-operatório (HENRY; HOECKER; RHODES, 2000; PONG; BRADLEY, 2005; MAZZEI et al., 2006; JONES, 2007).

Das cefalosporinas de segunda geração, a cefuroxima sódica (CAS 56238-63-2) é uma cefalosporina de amplo espectro, que tem farmacocinética bem definida após administração intravenosa (I.V.) e intramuscular (I.M.), indicada nas infecções provocadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Porém, não tem atividade sobre enterococos, estafilococos resistentes à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa*. A cefuroxima

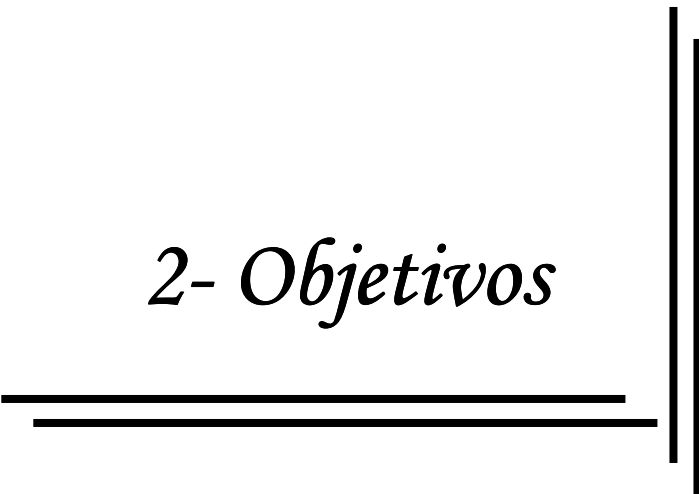
sódica é bastante ativa contra o *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae meningitis* (WOZNIAK; HICKS, 1991; MCEVOY, 2003).

Esta substância é comercializada no Brasil com o nome comercial de Cefuromax[®] (Itafarma), Cefuroxima sódica[®] (Eurofarma), Zencef[®] (Cellofarm), Medcef[®] (Bergamo), Cefuroxima sódica[®] (Novartis) e Zinacef[®] (Glaxo Smithkline), sendo este último o medicamento de referência. As amostras desta pesquisa são ampolas contendo 750 mg de cefuroxima sódica.

A 32^a edição da Farmacopeia Americana (USP, 2009a) preconiza a cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da qualidade da cefuroxima sódica matéria-prima e na forma injetável, utilizando tampão acetato e acetonitrila como fase móvel.

Portanto, apesar deste fármaco ser altamente estudado e pesquisado no que concerne à atividade antimicrobiana, farmacocinética e farmacodinâmica, há poucos estudos na literatura em relação ao desenvolvimento de metodologia analítica para esta cefalosporina. Desta forma, pesquisas envolvendo métodos analíticos são de fundamental importância e altamente relevantes para aperfeiçoar sua análise na indústria farmacêutica e garantir a qualidade do produto comercializado.

2- Objetivos



O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos de análise físico-químicos e microbiológicos, para a cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável, comercializada no mercado brasileiro, baseado em métodos gerais de análise para cefalosporinas, utilizando reações para o fármaco de acordo com suas características estruturais e determinar o(s) fator(es) capaz(es) de alterar a estabilidade química de cefuroxima sódica na forma sólida (pó para solução injetável) e em solução, conforme descrito a seguir:

- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por espectrofotometria na região do ultravioleta;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por espectrofotometria na região do infravermelho;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por espectrofotometria na região do visível;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por volumetria em meio não-aquoso;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por iodometria;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por cromatografia líquida de alta eficiência;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise microbiológica de cefuroxima sódica por difusão em ágar e por turbidimetria;
- desenvolvimento e validação de métodos de análise de cefuroxima sódica por acidimetria;
- desenvolvimento de método de análise de cefuroxima sódica por análise térmica (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*);
- análise comparativa das técnicas propostas;
- realização de testes de estabilidade de cefuroxima sódica na forma sólida (pó para solução injetável) e em solução (solução aquosa), a fim de verificar possíveis degradações desta cefalosporina frente a condições e fatores especiais, tais como luz e temperatura.

3- Revisão da Literatura

3. AGENTES BACTERIANOS CAUSADORES DE INFECÇÕES E SEUS TRATAMENTOS

Na última década, uma série de estudos informam mudanças evidentes nos agentes causadores de septicemia em pacientes neonatais, com um número alto de fracassos terapêuticos dos esquemas de tratamento (BIZZARRO et al., 2008).

Haemophilus influenzae é um cocobacilo aeróbico, Gram-negativo e um importante causador de mortalidade em crianças, especialmente menores de 5 anos de idade. Sua ação inclui o trato respiratório, artrite, meningite, celulite bem como bacteremia e septicemia (WENGER; WARD, 2004). A literatura também revela vários casos de infecção pulmonar crônica causada por *H. influenzae* em ambiente hospitalar (GOUGH et al., 1990; GOETZ et al., 1994; NAZIR et al., 2004). Em seus estudos, Dort e colaboradores (2007) relataram sobre os problemas causados por *H. influenzae*, tais como doença pulmonar em pessoas idosas, fácil transmissão da doença de pessoa a pessoa e o envolvimento de organismos resistentes a β -lactamases.

Outras infecções comuns causadas por *H. influenzae* são a otite aguda (BLOCK et al., 2007) e a peritonite em crianças e adultos com cirrose e síndrome nefrótica (GHOSH; ERAS, 2007).

Do uso descontrolado de agentes antimicrobianos para tratar infecções comuns, os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais (WANNMACHER, 2004), gerando uma questão de saúde pública (GUPTA et al., 2004). Esta quantidade de prescrição vem contribuir para o grande avanço da resistência de micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos (PICHICHERO et al., 2000; BRONZWAER et al., 2002; DOERN; BROWN, 2004; FELMINGHAM et al., 2005; JOHNSON et al., 2006).

No Brasil, durante o período de vacinação, de 1990 a 1999, a incidência de meningite tipo *b* causada por *H. influenzae* em crianças entre 1 e 4 anos e acima de 4 anos foi de 22,3 e 8,8 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (FUNASA, 2008). A letalidade de casos nestas idades foi de 19,9% e 17,1%, respectivamente. Até a introdução do controle vacinal, em 1998, *H. influenzae* do sorogrupo b (HI-b) foi um importante agente bacteriano causador de processos infecciosos como as osteomielites, pneumonias e meningites (FREITAS; HAMANN, 2004).

Complicações no tratamento de otite aguda têm sido frequentes em países em desenvolvimento por causa da resistência dos micro-organismos a fármacos (BROOK, 2004). O grande índice de resistência entre os agentes causadores de otite aguda (HOBAN; FELMINGHAM, 2002; JACOBS et al., 2003; DOERN; BROWN, 2004; JOHNSON et al., 2006) tem resultado na necessidade da utilização de agentes antimicrobianos de amplo espectro

mais eficientes (APPELBAUM, 2005). Este assunto tem não somente complicado as decisões sobre o tratamento, mas também tem aumentado o interesse sobre a origem da resistência antimicrobiana e o aumento do custo da terapia antimicrobiana (BLOCK et al., 2007).

Por muitos anos, ampicilina e cloranfenicol foram recomendados para o tratamento de meningite em crianças. Entre 1972 e 1974, o primeiro isolado de *H. influenzae* resistente a ampicilina foi encontrado na Europa e nos Estados Unidos e depois sua prevalência e sua propagação foram rápidas pelo mundo (JORDANS; SLACK, 1995).

H. influenzae é a maior causa de infecção respiratória adquirida e o aumento de antimicrobianos resistentes à *H. influenzae* tem sido largamente relatado (VERHOEF; GILLISSEN, 2003; KOETH et al., 2004).

Em seus estudos, Doern e colaboradores (2001) demonstraram que 55,7% de isolados de *Streptococcus pneumoniae* exibem alto nível de resistência à penicilina. Aproximadamente 31% de isolados de *H. influenzae* e 92% de isolados de *Moraxella catarrhalis* são resistentes, devido à produção de β -lactamase (THABAUT et al., 1994; HOBAN et al., 2001).

Em seu trabalho, Lee (2002) utilizou cefuroxima sódica no tratamento de pacientes com bronquite crônica devido à sua eficácia clínica e bacteriológica, segurança e tolerabilidade do medicamento, bem como a fácil administração, custo e a disponibilidade do paciente em continuar o tratamento.

Neisseria gonorrhoeae causa uma doença sexualmente transmissível que afeta primeiramente o tecido da mucosa epitelial do trato urogenital (WANG, 2008), causando, quando não tratada, uretrite e inflamação pélvica (ISON et al., 1998; LLANES et al., 2003).

Devido ao recente aumento da resistência de fluoroquinolonas sobre outros agentes usados no tratamento de doença gonocócica, faz-se necessário a avaliação de outros modelos de agentes antimicrobianos (KAM et al., 2003; VENERANDA et al., 2003; DAIKOS, 2007; LOPES, 2007). A frequência de infecção gonocócica é alta e a prevalência de resistência antimicrobiana, especialmente a penicilina, tetraciclina e levofloxacino são grandes (MORENCY et al., 2001; VAN DYCK et al., 2001a; 2001b; LOPES, 2007).

Considerando que a infecção é assintomática, a falta de prevenção, a imunodeficiência adquirida e a mudança do comportamento sexual são os principais fatores que contribuem para a disseminação de *N. gonorrhoeae* e o desenvolvimento de sua resistência (JONES et al., 2005a).

Também, o surgimento e o aumento da resistência de *N. gonorrhoeae* a certas cefalosporinas têm sido reportados por Ison e colaboradores (1998); Forsyth e colaboradores (2000), Tanaka e colaboradores (2004) e Furuya, Tanaka (2009).

Em relação a outros agentes, Hoeger (2004) demonstrou grande atividade de cefuroxima sódica em dermatites causadas por *Staphylococcus aureus*, sendo que anteriormente foram utilizados eritromicina, roxitromicina, ácido fusídico, amoxicilina e clindamicina sem sucesso.

Também, a alta resistência ao clotrimazol e à ampicilina foi detectada no tratamento contra *Escherichia coli*, sendo que o uso de cefuroxima sódica foi completamente eficiente (KARLOWSKY et al., 2002; RAFALSKIĀ et al., 2004).

3.2 CEFALOSPORINAS

A descoberta das cefalosporinas não foi uma questão de sorte. As exigências durante a segunda guerra mundial estimularam a busca para os antibióticos produzidos por micro-organismos (EL-SHABOURY et al., 2007).

Cefalosporinas consistem na fusão de dois anéis, o β -lactâmico e o diidrotiazina, conhecido com ácido 7-aminocefalosporânico e uma variedade de cadeias substituintes em C3 (R2) e C7 (R1) (OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009).

A estrutura química da cefalosporinas está apresentada na Figura 1.

Os compostos que contêm 7-ACA são relativamente estáveis em ácido diluído e altamente resistente à penicilinase, independentemente da natureza de suas cadeias laterais e da sua afinidade com a enzima (HARDMAN; LIMBIRD, 2006). Subsequentemente, este composto foi modificado pelo acréscimo de diferentes cadeias laterais para formar toda uma família de antibióticos a qual pertence as cefalosporinas (NEMUTLUA et al., 2009).

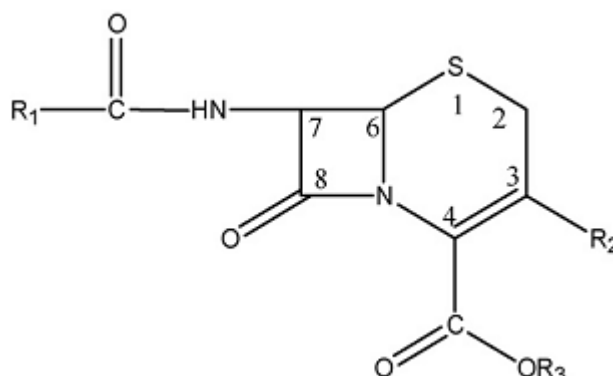


Figura 1: Fórmula estrutural das cefalosporinas.

A tensão gerada pelo éster localizado na posição quatro do anel β -lactâmico e a distorção da geometria planar no sistema bicíclico, pode ser um dos fatores essenciais para a reatividade química elevada destes os compostos, mas Van Krimpen e colaboradores (1987) demonstraram em uma análise crítica que os fatores mencionados são menos importantes para a reatividade e atividade biológica do que suposto previamente. Segundo El-Shaboury e colaboradores (2007), outros fatores importantes são essenciais para a atividade biológica, como o transporte no sistema biológico, a ligação do antibiótico ao local do receptor e a inibição dos sistemas relevantes da enzima. Além do anel β -lactâmico, os substituintes no C3, C4 e C7 são igualmente importantes para sua atividade biológica (VAN KRIMPEN et al., 1987; NEMUTLUA et al., 2009).

São utilizadas particularmente no tratamento de infecções bacterianas de diversos tipos e também para o tratamento de infecções cujos agentes antimicrobianos apresentam grande resistência (MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; PICHICHERO, 2007). Elas são largamente usadas em infecções do trato respiratório, prostatites, infecções do trato urinário e pele (HENRY; HOECKER; RHODES, 2000; PONG; BRADLEY, 2005; MAZZEI et al., 2006; JONES, 2007). Também são utilizadas na terapia clínica devido a suas propriedades farmacocinéticas e antibacterianas (JAMASBI et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009) atuando em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A primeira fonte das cefalosporinas, o *Cephalosporium acremonium*, foi isolado em 1948 por Brotzu, do mar próximo a uma saída de esgoto na costa da Sardenha. Constatou-se que os filtrados não-purificados de culturas deste fungo inibiam o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* e curavam as infecções estafilocócicas e a febre tifóide nos

seres humanos (AL-MOMANI, 2001; MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; HARDMAN; LIMBIRD, 2006; SAMANIDOU et al., 2003). Verificou-se que os líquidos das culturas nos quais os fungos da Sardenha foram cultivados, continham três antibióticos específicos, que foram denominados cefalosporina P, N e C. Com o isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C, o ácido 7-aminocefalosporânico, e com o acréscimo de cadeias laterais, tornou-se possível produzir compostos semi-sintéticos com atividade antibacteriana muito maior que a da substância original (HARDMAN; LIMBIRD, 2006; HADLEY; FRITSCHÉ, 2007; EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009).

A cefalosporina C foi a primeira a ser isolada e uma modificação química na sua estrutura permitiu a produção de vários antibióticos assemelhados às penicilinas, mas com a característica de serem resistentes à β -lactamase, além de serem ativos contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (THOGPOON et al., 2005).

Parece que as modificações efetuadas na posição sete do anel β -lactâmico estão associadas à alteração da atividade antibacteriana, enquanto as substituições na posição três do anel diidrotiazina estão associadas a alterações no metabolismo e nas propriedades farmacocinéticas dos fármacos (BROOKS et al., 2001; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

O crescimento explosivo das cefalosporinas durante a última década desafiou os eventos mais lembrados do passado e estabeleceu um sistema de classificação muito apropriado (HARDMAN; LIMBIRD, 2006; HADLEY; FRITSCHÉ, 2007; EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009). Em geral, a progressão da primeira para a quarta geração está associada ao aumento do espectro de atividade contra Gram-negativos, alguma redução no espectro contra Gram-positivos e aumento da resistência a β -lactamases (EL-SHABOURY et al., 2007).

A classificação por gerações (SCHOLZ; NABER, 1999) baseia-se nas características gerais da atividade antimicrobiana. As cefalosporinas de primeira geração, representadas pela cefalotina e cefazolina, têm boa atividade contra bactérias Gram-positivas e atividade relativamente moderada contra micro-organismos Gram-negativos. A maioria dos cocos Gram-positivos é sensível, exceto enterococos, *S. aureus* resistentes à metilina e *Streptococcus epidermidis*. Os anaeróbios da cavidade oral são, em sua maioria, sensíveis, porém o grupo do *Bacteroides fragilis* é resistente. A atividade contra *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* é satisfatória (RODENAS et al., 1997; MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SAMANIDOU et al., 2003; AMIN; RAGAB, 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

As cefalosporinas de segunda geração exibem uma atividade ligeiramente aumentada contra os micro-organismos Gram-negativos, mas são menos ativas do que os

agentes de terceira geração. Um subgrupo de agentes de segunda geração (cefoxitina, cefotetano e cefmetazol) também é ativo contra o grupo do *B. fragilis* (RODENAS et al., 1997; MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SAMANIDOU et al., 2003; AMIN; RAGAB, 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

As cefalosporinas de terceira geração são, em geral, menos ativas que as de primeira geração contra cocos Gram-positivos, mas são muito mais ativas contra as enterobactérias, incluindo as cepas produtoras de β -lactamase. Um subgrupo de agentes de terceira geração (ceftazidima e cefoperazona) também exibe atividade contra *P. aeruginosa*, porém é menos ativo do que outros agentes de terceira geração contra cocos Gram-positivos (RODENAS et al., 1997; MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SAMANIDOU et al., 2003; AMIN; RAGAB, 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

As cefalosporinas de quarta geração, como a cefepima, têm espectro ampliado de atividade em comparação com as de terceira geração e exibem maior estabilidade à hidrólise por β -lactamases mediadas por plasmídeos e cromossomos. Os agentes de quarta geração podem ter utilidade terapêutica particular no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos aeróbios resistentes as cefalosporinas de terceira geração (RODENAS et al., 1997; SAMANIDOU et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2002; AMIN; RAGAB, 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

A resistência das cefalosporinas pode estar relacionada à incapacidade do antibiótico de atingir seu local de ação; a alterações nas proteínas de ligação (PBP) ou a enzimas bacterianas (β -lactamases) capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico e inativar a cefalosporina (TENOVER, 2006). Entretanto, as cefalosporinas têm sensibilidade variável às β -lactamases: entre os agentes de primeira geração, a cefazolina é mais sensível à hidrólise pela β -lactamase do *S. aureus* do que a cefalotina. A cefoxitina, a cefuroxima sódica e as cefalosporinas de segunda geração são mais resistentes à hidrólise pelas β -lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas do que as de primeira geração. As cefalosporinas de terceira geração, entre elas a ceftazidima e cefoperazona, são sensíveis à hidrólise por β -lactamases induzíveis e codificadas por cromossomos (tipo I). As cefalosporinas de quarta geração, como a cefepima, são indutoras fracas das β -lactamases do tipo I e são menos sensíveis à hidrólise por β -lactamases do tipo I do que os agentes de terceira geração (JONES; VARNAM, 2002; SAMANIDOU et al., 2003; KIMURA et al., 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2006; KIRATISIN et al., 2007).

As propriedades farmacocinéticas das cefalosporinas são bastante idênticas (DOLLERY, 1999; MARTINDALE, 2007). A Tabela 1 resume as propriedades de alguns membros da classe. Estes antibióticos têm grande volume de distribuição e são eliminados

principalmente por excreção renal. Dentre esta generalização, há algumas que têm bastante diferença. Quanto à ação, os antibióticos β -lactâmicos têm a capacidade de inibir o crescimento ou mesmo matar as bactérias sensíveis (HARDMAN; LIMBIRD, 2006; HADLEY; FRITSCH, 2007; EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009).

Os níveis séricos obtidos após administração parenteral são elevados e prolongados. Concentrações terapeuticamente ativas são detectadas no soro, mesmo 8 a 12 horas após a administração intramuscular ou endovenosa (EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de algumas cefalosporinas

FÁRMACO	pKa	SAL	MEIA - VIDA (h)	LIGAÇÃO A PROTEÍNAS (%)	EXCREÇÃO URINÁRIA (%)
cefaclor	8,03	mono-hidratado	0,5-1	24,7	85, inalterada
cefadroxil	2,6; 7,3	anidro	1,5	20	90, inalterada
cefalexina	5,3; 7,3	mono-hidratado cloridrato	1	6-15	80, inalterada
cefalotina	2,2	sódico	0,25-0,89	65	70, inalterada e como metabólito
cefazolina	2,1	sódico	1,8	74-86	80, inalterada
cefoxitina	3,5	sódico	1	65-80	85, inalterada
cefpiroma	-	sulfato	1,4-2,3	8,2-11,7	80-90, inalterada
ceftazidima	1,8; 2,7; 4,1	penta-hidratado	1,8-2,2	10	80-90, inalterada
ceftriaxona	2,95	di-hidratado	6-9	95	40-65, inalterada
cefuroxima sódica	2,5	sódico e axetil	1,25	30	35, inalterada

*Fonte: EL-SHABOURY; SALEH; MOHAMED; RAGEH, 2007

3.3 CEFUROXIMA SÓDICA

A cefuroxima sódica é um antibiótico β -lactâmico semi-sintético de amplo espectro para administração parenteral. É o (6R,7R) – 3 - [[(aminocarbonil)oxi]metil] - 7- [[2 - (2 - furil) -2 - (metoxiimino)acetil]amino] – 8 –oxo – 5 – tia – 1 – azabícclo [4.2.0] oct – 2 – ene – 2 – carboxilato de sódio.

Sua fórmula empírica é $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$, com peso molecular de 446,36 g/mol (USP, 2009a; BP, 2010).

A estrutura química da cefuroxima sódica está representada na Figura 2.

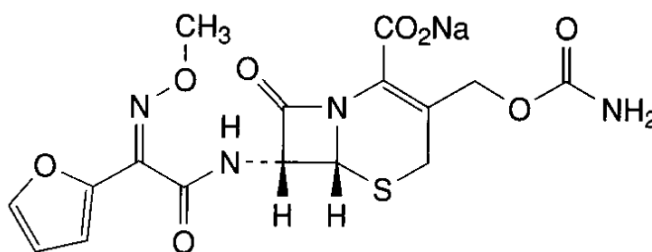


Figura 2. Estrutura química da cefuroxima sódica.
(CAS 56238-63-2)

A diferença estrutural entre a cefuroxima sódica e outras cefalosporinas é o grupo metoxiamino na posição 7 que apresenta estabilidade contra hidrólise de beta-lactamases e o grupo carbamato na posição 3 que confere estabilidade metabólica (GREENWOOD et al., 1976; O'CALLAGHAN et al., 1976; RYAN et al., 1976).

É um antibiótico bactericida, apresentando atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em relação a enterobactérias seu espectro é maior do que as cefalosporinas mais antigas (SCOTT et al., 2001; JONES et al., 2005b).

A cefuroxima sódica é resistente a β -lactamases e exibe efeito por inibir a síntese da parede bacteriana e excitar enzimas autolíticas (AKIO et al., 1999).

A ligação a proteínas é moderada, aproximadamente 33%. Penetra as meninges inflamadas e atinge concentrações no líquido adequadas ao tratamento de meningite bacteriana.

Sua meia-vida plasmática é de cerca de 1,3 h (MARTINDALE, 2007). Quando administrada por via intramuscular, atinge concentração sérica máxima de 27 μ g/mL, em 45 minutos, após dose de 750 mg; a concentração máxima na urina, após dose de 750 mg, é de 1300 μ g/mL (IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006).

Administrada por via intravenosa, atinge a concentração sérica máxima, ao término da infusão, de 50 µg/mL após dose de 750 mg e 100 µg/mL após dose de 1,5 g; a concentração máxima na urina é de 1150 µg/mL após dose de 750 mg e 25000 µg/mL após dose de 1,5 g (IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006; EL - SHABOURY et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009).

É excretada principalmente pela urina, por filtração glomerular e secreção tubular; 48 a 52% são eliminados dentro de 12 horas e o total excretado em 24 horas chega a 90-95% (BRUNTON et al., 2006).

É a única cefalosporina de segunda geração que penetra adequadamente o líquido; por isso, dentre as parenterais, parece ser a mais útil clinicamente, sobretudo na meningite causada por patógenos comuns. É mais eficaz que outras cefalosporinas no tratamento de infecções do trato urinário (KOROLKOVAS, 2006; IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006).

As reações adversas são pouco frequentes e incluem reações por hipersensibilidade, inclusive exantema cutâneo, urticária, prurido, febre, doença do soro e anafilaxia, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson e necrose epidérmica tóxica (necrose exantemática) (KATZUNG, 2005). Também foram observados diarreias, náuseas e vômitos, colite pseudomembranosa, cefaleia, eosinofilia, incremento transitório dos níveis das enzimas hepáticas ALT (SGPT), AST (SGOT) e LDH. Raramente foi informada icterícia. Em algumas ocasiões, observou-se tromboflebite após a injeção intravenosa de cefuroxima sódica (BRUNTON et al., 2006).

A cefuroxima sódica injetável em doses elevadas deve ser administrada com precaução em pacientes que recebem diuréticos potentes e aminoglicosídeos concomitantemente; foi informada perda leve ou moderada da capacidade auditiva em alguns pacientes pediátricos; observou-se a persistência de cultivos positivos a *H. influenzae* em líquido cefalorraquidiano, por um período de 18 a 36 horas (EL-SHABOURY et al., 2007; OMAR; ABDELMAGEED; ATTIA, 2009).

A solução injetável de cefuroxima sódica não deve ser misturada na mesma seringa com antibióticos aminoglicosídeos. A solução de bicarbonato de sódio injetável não é recomendável para a diluição de cefuroxima sódica. As variações na intensidade da cor amarela das soluções injetáveis recém-preparadas não indicam nenhuma mudança, tanto na eficácia quanto na segurança do fármaco (BRUNTON et al., 2006).

Cefuroxima sódica é ativa contra cepas resistentes à ampicilina e à amoxicilina, em geral contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*,

Streptococcus pyogenes, *S. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*. Não são suscetíveis à cefuroxima sódica *Pseudomonas*, *Helicobacter* (*Campylobacter*), *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* resistentes à metilina e enterococos (BRUNTON et al., 2006).

Portanto, os antibióticos representam uma porcentagem significativa de medicamentos no que diz respeito aos cuidados com a saúde (NUNES, 2006). Se for tida em consideração a vertente microbiológica do uso indiscriminado de antibióticos, com o aumento do risco de aparecimento de cepas resistentes e o seu impacto na saúde pública e nos serviços de saúde, o desenvolvimento de novas metodologias para melhorar o controle de qualidade destes medicamentos é de fundamental importância para aperfeiçoar a utilização de novos antibióticos.

3.4 CONTROLE DE QUALIDADE

O alvo da análise de medicamentos (com ênfase na análise industrial) é a investigação analítica de:

- matérias-primas;
- produtos intermediários;
- produtos de pesquisa;
- formulação do medicamento;
- impurezas e produtos de degradação;
- amostras biológicas que contêm o fármaco e seus metabólitos;
- validação de processos de limpeza;

com o objetivo de obter dados para contribuir com:

- a alta qualidade;
- o máximo de segurança e eficácia e
- o máximo de economia para a fabricação do fármaco (GÖRÖG, 2008).

A definição de qualidade de fármacos segundo a ICH (International Conference on Harmonization, 2005) é a seguinte: "A conformidade de uma substância ou produto deve estar de acordo com seu uso pretendido". Este termo inclui atributos como identidade, pureza e caracterização (FDA, 1999).

O Controle de Qualidade consiste um conjunto de operações cujos objetivos incluem a obtenção de medicamentos cada vez melhores, mais eficazes, seguros e menos tóxicos. Antigamente, as soluções para estes problemas eram feitos intuitivamente e com base em observações e referências populares, isto é, empiricamente. Nas décadas

posteriores, isto é feito racionalmente fixando-se hipóteses prévias que podem ou não ser comprovadas experimentalmente (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Outro objetivo do controle de qualidade é verificar se o produto está em conformidade com as especificações farmacopeicas. A não-conformidade representa um somatório de atribuições para a empresa que podem resultar, além dos prejuízos decorrentes do retrabalho, a perda de credibilidade e até a cassação da licença de funcionamento e do registro do produto. Para o paciente, a falta de qualidade do medicamento ocasiona sérios transtornos com o comprometimento da sua saúde (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

A produção de medicamentos de alta qualidade e a conservação desta qualidade, durante todo o processo de comercialização, interessa tanto aos fabricantes, quanto aos consumidores. Vários modelos de sistemas têm sido implementados visando assegurar a qualidade dos medicamentos (GÖRÖG, 2008).

Na década de 60 surgiram sistemas importantes de controle de qualidade dentre eles o PDCA, a estratégia *benchmarking*, a metodologia dos seis sigma, o *Just in Time* (JIT), o *Material Requirements Planning* (MPR), o *Optimized Production Technology* (OPT), o *brainstorming*, o diagrama de Ishikawa, o plano de ação 5W2H, as folhas de verificação, incluindo as Boas Práticas de Fabricação, o Controle de Qualidade Total e a ferramenta 5S: *seiri* (utilização), *seisô* (limpeza), *seiton* (organização), *seiketsu* (asseio) e *shitsuke* (disciplina) (RIBEIRO, 2006).

Na década de 70 surge a Garantia da Qualidade, que assegura apoio, com procedimentos, equipamentos adequados, pessoal qualificado e treinado para desenvolver em conjunto com os diversos setores envolvidos nos processos produtivos, as atividades necessárias para garantir a homogeneidade e qualidade dos produtos fabricados (JURAN, 1990).

Sem invalidar os conceitos anteriores, em 1987 surgem sistemas envolvendo certificação, respaldados em normas internacionais ISO (*International Standard Organization*), particularmente a série 9000. Tão grande foi sua influência, que a *Food Drug Administration* (FDA) realizou trabalho de compatibilização entre seu já tradicional sistema de *Good Manufacturing Practices* (GMP) e a ISO 9000. As necessárias atualizações se fazem imprescindíveis, assim é usual a sigla cGMP (*current Good Manufacturing Practices*), cujo indicativo de atual (*current*), expressa a constante revisão do sistema (MARANHÃO, 2006).

O controle de medicamentos, não é, sem dúvida alguma, um processo estacionário; evolui sempre, de acordo com os problemas que vão surgindo (SANTORO, 1988). A qualidade de um produto pode ser considerada como um conjunto de características e propriedades que o tornam satisfatório para o atendimento às necessidades

dos consumidores. Em vista disso, a avaliação da qualidade dos medicamentos na indústria farmacêutica representa uma etapa indispensável para a sua comercialização em condições adequadas (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

Para o paciente, a administração de medicamentos com qualidade, segurança e eficácia é imprescindível, considerando-se que o doente necessita do fármaco para obter uma melhoria ou cura dos processos patológicos, garantindo seu bem estar físico, social e mental e a melhoria na sua qualidade de vida (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

Independentemente do modelo do sistema de controle de qualidade adotado, no caso de medicamentos, há a necessidade de serem estabelecidos padrões ou níveis de qualidade idealizados para cada produto, cujo modelo deve ser atingido em cada lote produzido, de forma que o profissional, ao prescrever uma medicação e, sobretudo o próprio paciente tenha segurança quanto ao seu efeito (SANTORO, 1988).

Uma variedade de técnicas, apresentando ótima linearidade, tem sido descrita para determinação de antimicrobianos na forma pura, em preparações farmacêuticas e fluidos biológicos. Estas técnicas incluem espectrofotometria (CHAUDHARI et al., 2006; PATEL et al., 2006; EL-SHABOURY et al., 2007; MORENO; SALGADO, 2008); espectrofotometria de absorção atômica (SALEM; ASKAL, 2002), fluorimetria (NAVARRO et al., 1999; MA et al., 2000; KAI et al., 2003; BEBAWY et al., 2003; EL-SHABOURY et al., 2007), polarografia (IVASKA; NORDSTROM, 1983), cromatografia líquida de alta eficiência (MARONA; SCHAPOVAL, 1999; KAKUMANU et al., 2006; CAN; ALTIOKKA; ABOUL-ENEIN, 2006; TOZO; SALGADO, 2006; MORENO; SALGADO, 2008), eletroforese capilar (GASPAR et al., 2002; STEPPE et al., 2003), quimioluminescência (LI; LU, 2006; THONGPOON et al., 2006; ALARFAJ; EL-RAZEQ, 2006), CLAE com detecção por quimioluminescência (MIYAWA et al., 1998; KAI et al., 2003; LENEHAN et al., 2004), cromatografia em camada delgada (KRZEK; DABROWSKA-TYLKA, 2003) e microbiológico (EV; SCHAPOVAL, 2002; SOUZA; BITTENCOURT; SOUZA-FILHO, 2004). Nos últimos anos, o método microbiológico provou ser um grande procedimento analítico para medida destes fármacos, por causa de sua especificidade, rapidez e sensibilidade (GOMES; SALGADO, 2006; SALGADO; LOPES; LUCCHESI, 2006; TOZO; SALGADO, 2007; MORENO; SALGADO, 2008).

O método oficial de análise para cefuroxima sódica pó para solução injetável descrito na literatura é a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando tampão acetato pH 3,4 e acetonitrila como fase móvel (USP 32, 2009). Entretanto existem outros métodos descritos na literatura para determinação em fluidos biológicos (EL-GINDY et al., 2000; CAN; ALTIOKKA; ABOUL-ENEIN, 2006; DENOOZ; CHARLIER, 2008; PARTANI et al. 2010) e em medicamentos (IVANA, LJILJANA, MIRA, 2006; ZAJAC et al., 2003; CAN; ALTIOKKA; ABOUL-

ENEIN, 2006; CHAUDHARI et al., 2006; JELÍŇSKA et al., 2006; RANJANE et al., 2008) para a forma acetilada da cefuroxima.

3.4.1 Estudos de Estabilidade

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005), a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem.

A maioria dos fármacos está sujeita a alguma forma de decomposição química ou física. Algumas classes químicas são mais vulneráveis e tendem a se decompor mesmo em condições brandas.

As condições externas envolvidas na deterioração de fármacos e medicamentos são tidas como fatores extrínsecos ou ambientais; entre os principais fatores estão a luz, a temperatura, o ar e a umidade. Estes fatores podem afetar a estabilidade física de medicamentos e acelerar processos de decomposição química do fármaco (MARTINÈZ; FALCO; CABEZA, 2002; ZAJAC et al., 2003; JELINSKA et al., 2006).

Além disso, elas podem também exibir manifestações físicas de decomposição como descoloração que frequentemente segue a fotodegradação ou, mais seriamente, porém não muito frequente, podem conter produtos de decomposição prejudiciais (TØNNESEN, 2001).

Métodos para acelerar a decomposição de fármacos, usando temperaturas elevadas, são examinados para se prever sua estabilidade nas condições requeridas de estocagem, a partir das medidas desses estudos. Embora esses experimentos não substituam os procedimentos rigorosos, envolvendo testes de estabilidade do produto na forma em que será comercializado, eles proporcionam um ganho de tempo considerável durante o processo de desenvolvimento do produto, em que é necessário identificar com rapidez uma formulação que possua estabilidade aceitável (WATERMAN; ADAMI, 2005). Desta forma, é comum expor o material a condições de temperatura, umidade e intensidade de luz que se conhece, da experiência, que provavelmente causam a sua decomposição.

A estabilidade é definida como a capacidade de determinada formulação, em um recipiente específico manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas (VADAS, 2004).

É conhecido, que ao longo do tempo decorrido entre a fabricação, passando pelo transporte, estocagem, o ponto de venda e finalmente durante o armazenamento na “farmácia de casa”, a substância ativa pode sofrer alterações.

A umidade, a luz, o oxigênio e a temperatura podem influenciar durante o período de estocagem das formas farmacêuticas, podendo reduzir o tempo de estabilidade. Foi na década de 50, concomitantemente com os acidentes que incentivaram a farmacovigilância, que se estabeleceram as primeiras alternativas para previsão do prazo de validade de medicamentos.

Vale lembrar que até 1984, as metodologias de avaliação de estabilidade de fármacos e medicamentos seguiam princípios técnicos e científicos, sem interferência de atos regulatórios emitidos por agências ou órgãos de vigilância sanitária. As empresas utilizavam metodologias próprias, juntando seus dados e informações na documentação de registro. O incremento do comércio internacional, o processo de especialização de unidades produtivas, a racionalização da produção de medicamentos e reconhecimento de zonas climáticas dos países importadores para atender aos princípios de produção em escala econômica, todos incluídos no contexto caracterizado como globalização, contribuíram para que fosse considerado indispensável o conhecimento do comportamento das formas farmacêuticas nas diferentes áreas (MORETTO, 1999).

Na década de 90, vários países reuniram esforços para harmonização da legislação, realizando a ICH (*Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*, 2009). No Brasil, os princípios da Farmacovigilância e de estabilidade, foram mencionados na Lei nº 6360, de 23/09/1976 (BRASIL, 1976). No entanto, não há regulação específica para farmacovigilância e, apenas em abril de 2002, foi publicado o guia Realização de Estudos de Estabilidade; revogado pela RE nº 398, de 12 de novembro de 2004, que teve como referência os guias de qualidade editados pela ICH relativo a requerimentos técnicos para registro de medicamentos para uso humano (BRASIL, 2004).

Em 2005, a resolução RE nº 01, instituiu novo guia, definindo três tipos de estudos de estabilidade:

1. Estudo de estabilidade acelerado, que visa acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

2. Estudo de estabilidade de acompanhamento, que verifica se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

3. Estudo de estabilidade de longa duração, que é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.

Na RE nº 01, o prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração e de acordo com os parâmetros definidos e por ocasião do registro poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses. Existem parâmetros empregados pela ANVISA que devem ser seguidos para o estudo de estabilidade de longa duração. A Tabela 2 define estes parâmetros, mas para registro provisório do medicamento, também pode ser feito o estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses, acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração.

Tabela 2: Parâmetros para estudo de estabilidade de longa duração

Forma Farmacêutica	Condição de Armazenamento (°C)*	Embalagem	Temperatura e Umidade Relativa		Temperatura e Umidade Relativa (UR)	Longa Duração (°C)***
			(UR)			
Sólido	15-30	Semi-permeável	40 ± 2/75% ± 5%		30 ± 2/75% ± 5%	
Sólido	15-30	Impermeável	40 ± 2		30 ± 2	
Semi-sólido	15-30	Semi-permeável	40 ± 2/75% ± 5%		30 ± 2/75% ± 5%	
Semi-sólido	15-30	Impermeável	40 ± 2		30 ± 2	
Líquido***	15-30	Semi-permeável	40 ± 2/75% ± 5%		30 ± 2/75% ± 5%	
Líquido	15-30	Impermeável	40 ± 2		30 ± 2	
Gás	15-30	Impermeável	40 ± 2		30 ± 2	
Todas as formas farmacêuticas	2-8	Impermeável	25 ± 2		5 ± 3	
Todas as formas farmacêuticas	2-8	Semi-permeável	25 ± 2/60% ± 5%		5 ± 3	
Todas as formas farmacêuticas	-20	Todas	-20 ± 5		-20 ± 5	

Fonte: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Observações:

(*) Qualquer recomendação de armazenamento em temperatura dentro destas faixas deve constar nas bulas e rótulos. A temperatura recomendada não exige que os testes de estabilidade sejam realizados com temperaturas definidas nas duas últimas colunas da tabela.

(**) Os valores de temperatura e umidade são fixos e as variações são inerentes às oscilações esperadas pela câmara climática e por eventuais aberturas para retirada ou colocação de material.

(***) Líquidos e semi-sólidos de base aquosa devem realizar o estudo com umidade a 25%UR ou 75%UR. Caso se opte por 75%UR, o valor da perda de peso deverá ser multiplicado por 3,0.

A monitoração da estabilidade de medicamentos é eficaz para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante seu tempo de validade. Também a segurança e a eficácia podem ser avaliadas por estudos de estabilidade, pelo monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica ou toxicidade.

As possibilidades de degradação ficam evidentes ao se constatar a variedade climática no mundo e a já inevitável globalização, pois a importação e exportação de insumos e medicamentos entre regiões com diferentes climas se tornam comuns. Com a finalidade de prever o prazo de validade do medicamento nos diferentes climas, o mundo foi subdividido em zonas climáticas, com diferentes especificações de temperatura e umidade. Essas especificações devem ser utilizadas pelas empresas para proceder aos estudos de estabilidade quando houver interesse em exportar para determinadas zonas (VADAS, 2000).

Classicamente, a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é dividida em estudos de estabilidade física ou farmacêutica, química (incluindo-se a bioquímica) e físico-química.

Reconhecer a estabilidade física de uma formulação é importante para o profissional e o usuário. Em primeiro lugar, o produto farmacêutico deve manter boa aparência. Alterações como descoloração ou escurecimento devem ser motivos para desconfiança; a uniformidade de dose do ingrediente ativo deve ser assegurada com o tempo, pois alguns produtos são dispensados em embalagens de dosagem múltipla e o fármaco ativo deve ter eficiência durante o tempo de validade esperado da preparação (LEMKE, 2003; RISHA et al., 2003).

As reações químicas mais comuns são as de oxidação e hidrólise, devido à presença de oxigênio e umidade na própria atmosfera.

Outras formas de degradação ocorrem por reações fotoquímicas (isomerização, ciclização, fragmentação), racemização, incompatibilidade com outros componentes da fórmula ou embalagem, entre outras. Algumas vezes, mais de uma reação ocorre ao mesmo tempo, outras vezes ocorrem consecutivamente (VADAS, 2000).

A estabilidade química é importante para selecionar as condições de armazenagem (temperatura, luz, umidade), escolha do recipiente adequado (vidro, plástico claro, âmbar ou opaco), tipo de tampa e para prever as interações ao misturar fármacos e excipientes (ANSEL et al., 2000). A degradação química de excipientes pode acarretar problemas de estabilidade física ou microbiológica (IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006).

Considerando que os produtos de degradação podem resultar em atividade reduzida ou tóxica e que as notificações classificadas como possíveis desvios da qualidade com envolvimento de pacientes poderiam estar relacionadas a problemas de estabilidade dos medicamentos, verifica-se a relevância dos estudos de estabilidade para a farmacovigilância.

3.4.2 Validação

Validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição. Em outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente, pré-estabelecidos (MORETTO, SHIB, 2000; NICOLÓSI, 2003).

A validação de um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores como: a estrutura química do fármaco; o nível das doses terapêuticas, e as diferenças nas fórmulas de um laboratório para outro. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação (NICOLÓSI, 2003).

Os métodos podem ser otimizados pela modificação daqueles existentes na literatura. Uma busca consistente deve ser realizada a fim de reunir o maior número de dados dos métodos anteriormente publicados. Desta forma, é possível sugerir modificações e otimizações.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). É um fator primordial nos sistemas de qualidade laboratorial, como é proposto nas Boas Práticas de Laboratório (BPL) e nos guias ISO (*International Standardization Organization*).

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados. Nenhum dos objetivos dos ensaios será devidamente alcançado se o teste não for confiável e apresentar, no mínimo, precisão,

exatidão e repetitividade dos resultados. O conhecimento dos fatores que afetam os ensaios e seu controle favorece a obtenção de resultados reprodutíveis (MARCOLONGO, 2003).

De acordo com Moretto (1999), a indústria farmacêutica deve se responsabilizar pela qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando a adequabilidade dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos, e cumprir com as exigências relativas ao registro, não colocando os pacientes em risco, em função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia.

Os elementos exigidos para a validação são precisão e exatidão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade também podem ser exigidos, dependendo das características do teste (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

A ICH (*International Conference on Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) tem publicado guias que padronizam as exigências de análise. Estes métodos definem e resumem os parâmetros exigidos para os diferentes tipos de procedimentos e incluem exigências dos dados experimentais e cálculos estatísticos. Estas normas servem de base para autoridades e para a indústria farmacêutica de diferentes países na busca pelo desenvolvimento correto de processos de validação.

De acordo com Moretto e Shib (2000), o primeiro registro que se tem do uso oficial do termo validação, encontra-se nas *Good Manufacturing Practices* - GMPs, as quais foram publicadas na *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978, porém somente em 1980 recebeu a seguinte definição: "Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado". Em 1983, a FDA define validação de processos como "um programa documentado que proporciona um alto grau de segurança de que um processo específico produzirá uma forma farmacêutica que satisfaz as especificações e atributos de qualidade pré-determinados". Em 1992, a validação de métodos e processos foi adotada nas GMPs da Organização Mundial da Saúde (OMS).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtido comparado ao valor verdadeiro (ICH, 2005; USP, 2009b).

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra. A partir dos valores obtidos, são calculados a média e o desvio padrão (DP), determinando-se o coeficiente de variação (CV), expresso em termos de percentagem de uma série de medidas, nas quais duas delas podem ser a reprodutibilidade e a repetibilidade do método analítico sob condições normais de operação.

Neste contexto, a reprodutibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos em diferentes laboratórios, diferentes analistas e em diferentes dias, enquanto que a repetibilidade refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos. Para inúmeros propósitos, a repetibilidade é o critério que interessa em um método analítico oficial (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; USP, 2009b).

Segundo Pasteelnick (1993), a exatidão e a precisão são importantes atributos da validação de metodologia analítica. O primeiro deles pressupõe que não existem erros sistemáticos inerentes ao processo, enquanto que o segundo reflete a dispersão dos vários resultados individuais do doseamento em relação ao valor médio estando ou não próximo do valor verdadeiro. Porém, existem inúmeros fatores que podem comprometê-los causando erros ocasionais, por exemplo, a calibração de equipamentos, habilidade e capacitação do analista, temperatura irregular do laboratório, umidade, componentes da amostra.

Outra característica da validação da metodologia analítica é a especificidade ou seletividade. Este atributo é definido como sendo a capacidade de medir exata e especificamente o fármaco na presença de outros constituintes da amostra (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; USP, 2009b). Pode ser demonstrada comparando os resultados dos testes de amostras contendo impurezas ou produtos de degradação, ou ainda através do placebo, com valores encontrados após análise da amostra sem os interferentes.

Os limites de detecção e de quantificação são outros dois atributos da validação analítica. O primeiro refere-se à menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que possa ser detectado, porém sem quantificá-lo. É expresso em percentual ou partes por bilhão. O segundo está relacionado à menor quantidade de um composto presente em uma amostra que possa ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais declaradas (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; USP, 2009b).

A linearidade é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente, ou por transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada. A variação refere-se ao intervalo entre o maior e o menor nível de quantidade da substância presente na amostra. Deriva geralmente dos estudos da linearidade e depende da aplicação do procedimento. Confirma que o procedimento analítico fornece um aceitável grau de exatidão, precisão e linearidade quando aplicados em amostras que contém quantidades variáveis do analito, dentro ou nos extremos da variação especificada (ICH, 2005; USP, 2009b).

A robustez do método é a medida da capacidade que o método apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas modificações em seus parâmetros, e fornecer indicações de segurança durante o uso normal (USP, 2009b).

A validação é um dos principais instrumentos da garantia de qualidade, tornando-se ultrapassado o conceito de apenas controlá-la. Com este intuito, este trabalho proporcionou condições para se ter uma visão mais ampla da validação, em particular da validação de metodologia analítica, bem como sua importância para outros setores da empresa.

4 - Descrição

Nome genérico: cefuroxima sódica (CAS 56238-63-2).

Nome químico: (6R, 7R) – 3 - [[(aminocarbonil)oxi]metil] - 7- [[2 - (2 - furil) -2 - (metoxiimino)acetil]amino] – 8 –oxo – 5 – tia – 1 – azabíciclo [4.2.0] oct – 2 – ene – 2 – carboxilato de sódio.

Fórmula química: C₁₆H₁₅N₄NaO₈S.

Massa molecular: 446,36 g/mol.

Propriedades físico-químicas: Fisicamente, cefuroxima sódica é um pó branco ou levemente amarelado, cristalino, facilmente solúvel em água, solúvel em metanol e muito pouco solúvel em etanol, éter, acetato de etila e clorofórmio (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005; MERCK, 2006; USP, 2009a; BP, 2010).

Categoria: antimicrobiano.

Classe: cefalosporina.

pH: 5,5 to 8,5 (ARSÈNE et al., 2002).

Substância química de referência: adquirida da *Glaxosmithkline*, com pureza especificada de 97,4% - Lote: G060123.

Amostras: frascos-ampola contendo pó para solução injetável adquiridas da Cellofarm Farmacêutica, sob o nome comercial de Zencef®. Cada frasco ampola contém cefuroxima sódica correspondente a 750 mg de cefuroxima sódica – Lote: 7400444.

Nomes comerciais no Brasil: Cefuromax® (Itafarma), Cefuroxima sódica® (Eurofarma), Zencef® (Cellofarm), Medcef® (Bergamo), Cefuroxima sódica® (Novartis) e Zinacef® (Glaxo Smithkline).

5 - Análise Qualitativa

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CEFALOSPORINAS

Considerando a estrutura química da cefuroxima sódica, representada na Figura 2, foram realizadas reações para caracterização estrutural do fármaco, principalmente para identificação do anel β -lactâmico. Porém, uma das etapas preliminares para os procedimentos analíticos é a degradação hidrolítica do antimicrobiano (MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002).

O ensaio de degradação consiste na hidrólise ácida ou alcalina do fármaco quando uma solução aquosa do mesmo é aquecida até ebulição durante cerca de 20 minutos, em meio ácido ou alcalino. Para tanto, foram pesados 20 mg do fármaco e dissolvidos com 10 mL de solução de ácido sulfúrico 4,5 *M*. A solução foi aquecida até a ebulição em banho-maria durante 20 minutos. Após, arrefeceu-se e neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio 6,0 *M* e o volume foi completado com água purificada em balão volumétrico de 100 mL (MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002).

A literatura destaca várias técnicas para determinação de cefalosporinas e outros compostos β -lactâmicos baseados na complexação do reagente com o fármaco, originando compostos coloridos que podem ser determinados espectrofotometricamente, como as reações com cloridrato de hidroxilamina, ninidrina, vanadato de amônio, molibdato de amônio, ácido fosfomolibdico, 2-nitrofenilhidrazina, imidazol, acetilacetonaformaldeído, nitrato de cobalto, sulfato de cério e amônio, íons ferro (III), íons cobre (II), ácido pícrico, 2-dinitrofenol, *p*-nitrofenol, fenilhidrazina e outros (ZUHRI et al., 1994; NAVARRO et al., 1999; MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002).

Foram selecionadas três reações de caracterização de cefalosporinas: ensaios com íons ferro (III), com íons cobre (II) e com molibdato de amônio. Para isso, foram preparadas várias soluções como podem ser resumidamente descritas a seguir. As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico.

Solução de H_2SO_4 0,8 *M*: foram adicionados 48 mL de H_2SO_4 R em 1,0 L de água purificada.

Solução de H_2SO_4 25 % (v/v): juntou-se 1 parte de ácido sulfúrico R em 3 partes de água purificada, sob resfriamento e com as devidas proteções individuais.

Solução de cloreto de cobre 0,005 *M*: foram dissolvidos 212 mg de cloreto de cobre em 250 mL de água purificada.

Solução de ferro (III) 0,01 *M*: foram pesados 4,040 g de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ em 1,0 L de H_2SO_4 0,8 *M*.

Solução de molibdato de amônio 2%: foram dissolvidos 20,0 g de molibdato de amônio em 1,0 L de água purificada.

Solução de neocuproína 0,01 M: foram dissolvidos 520 mg de neocuproína em 250 mL de etanol.

Solução de *o*-fenantrolina 0,06 M: foram dissolvidos 3,965 g de *o*-fenantrolina em 1,0 L de solução tampão citrato pH 4,2.

Solução tampão citrato pH 4,2: foram dissolvidos 1,910 g de ácido cítrico em 900 mL de água purificada. O pH da solução foi ajustado a 4,2 com solução de NaOH 0,5 M e o volume completado com água purificada para 1,0 L.

Na execução do ensaio, os testes foram realizados em tubos e a identificação baseada na observação visual (aparecimento de coloração ou precipitado).

Na reação com íons ferro (III), em 1,0 mL das soluções da substância de referência e da amostra degradadas, conforme procedimento discutido anteriormente, foram adicionados 1,0 mL de solução de ferro (III) 0,001 M e 0,5 mL da solução de *o*-fenantrolina 0,02 M. Após, verificou-se o desenvolvimento da coloração alaranjada característica da reação.

Na reação com molibdato de amônio, em 10 mL das soluções da substância de referência e da amostra degradadas, conforme discutido anteriormente, foram adicionados 1 mL da solução de H₂SO₄ 25 % (v/v) e 5 mL da solução de molibdato de amônio 2 %. Procedeu-se ao aquecimento em banho de água aquecido a 40°C durante 30 minutos. Após, arrefeceu-se e verificou-se o desenvolvimento da coloração amarelada produzida.

Na reação com íons cobre (II), foram adicionados 1 mL de solução de cloreto de cobre 0,005 M e 1 mL de solução de neocuproína 0,01 M a soluções de cefuroxima sódica a 30 mg/mL preparadas em tampão citrato pH 4,2. Procedeu-se ao aquecimento em banho-maria durante 10 minutos e arrefeceu-se. Foi verificado o aparecimento de coloração amarelada característica da reação.

Estes ensaios de identificação foram realizados também utilizando outras amostras de compostos β -lactâmicos, como amoxicilina, ampicilina, cefalexina e ceftazidima, a fim de comprovar a presença do referido anel β -lactâmico.

5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

5.2.1 Material e métodos

A amostra de cefuroxima sódica injetável, descrita no item 4, foi avaliada em relação ao aspecto, cor e odor.

5.2.2 Resultados e discussão

A cefuroxima sódica apresenta-se sob a forma de grânulos, com odor leve e cor branca. A descrição é condizente com a citada pelo fabricante e órgãos oficiais (MERCK, 2006; MARTINDALE, 2007; USP, 2009, BP, 2010).

5.3 PESO MÉDIO

5.3.1 Material e método

Foi utilizada balança analítica Bel Mark. Segundo a Farmacopeia Brasileira (1988) os recipientes que contêm sólidos destinados a soluções ou suspensões injetáveis devem ser examinados quanto ao peso de sólidos dispensados a satisfazer as exigências especificadas na monografia. Os sólidos, cujos pesos médios são maiores que 40 mg, devem satisfazer às exigências do teste descrito, que é realizado sobre 20 unidades.

Para realizar o peso médio, o rótulo do recipiente foi removido. O recipiente foi lavado e secado externamente, e então foi aberto e pesado com o conteúdo imediatamente depois de aberto. Após a pesagem, o recipiente foi esvaziado o mais completamente possível por meio de leves batidas e enxaguado com água, se necessário, e a seguir com álcool etílico. Os recipientes foram secos a 105°C por uma hora até peso constante. Depois de peso constante, os recipientes foram esfriados em dessecador e pesados.

A diferença entre o peso do recipiente com o conteúdo e o peso do recipiente vazio representa o peso do conteúdo. Este procedimento foi repetido com os dezenove recipientes.

No máximo, o peso individual de dois recipientes podem desviar mais que 10% do peso médio determinado sobre os vinte recipientes e nenhum deve desviar mais que 20% (F. BRAS. IV, 1988).

5.3.2 Resultados e discussão

O resultado do peso médio está apresentado na Tabela 3.

A média do peso médio do injetável de cefuroxima sódica foi de 0,76585 mg, que está dentro dos parâmetros preconizados pela Farmacopeia Brasileira (1988), pois apenas duas unidades desviaram 10% do valor do peso médio encontrado.

Tabela 3: Peso médio da cefuroxima sódica na forma farmacêutica injetável

Peso do frasco cheio (g)	Peso do frasco vazio (g)	Diferença de peso (g)
21,3167	20,5166	0,8001
21,9036	21,1266	0,7770
21,5291	20,7998	0,7293
21,5885	20,7995	0,7890
21,2213	20,4347	0,7866
21,6350	20,8436	0,7914
21,4568	20,6630	0,7938
21,2972	20,5452	0,7520
21,7914	21,1070	0,6844
21,8835	21,0870	0,7965
21,5651	20,7901	0,7750
21,2904	20,6154	0,6750
21,4271	20,7354	0,6917
22, 8450	22,1430	0,7020
20,9902	20,1947	0,7955
21,7243	20,9241	0,8002
21,6552	20,8292	0,8260
21,1382	20,3922	0,7460
21,6464	20,8382	0,8082
21,7576	20,9603	0,7973

Peso médio = 0,7658 ± 0,0102

5.4 SOLUBILIDADE

5.4.1 Material e método

Transferiram-se 100,0 mg de cefuroxima sódica SQR e amostra para tubos de ensaio acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, sob agitação, até completa solubilização. O ensaio foi realizado a 25,0 °C e a solubilidade indicada de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (F. BRAS. IV, 1988).

Os solventes utilizados foram: acetato de etila, acetona, ácido clorídrico 0,1 *M*, água, clorofórmio, etanol, hidróxido de sódio 0,1 *M*, isopropanol, metanol, 1-propanol e toluol. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.4.2 Resultados e discussão

Foram utilizados diversos solventes na determinação das solubilidades cuja finalidade foi de realizar a caracterização da substância qualitativamente, testando sua polaridade.

A expressão *partes* refere-se à dissolução de 1,0 g de um sólido ou 1,0 mL de um líquido no número de mililitros do solvente estabelecido no número de *partes* (F. BRAS. IV, 1988).

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no teste de solubilidade para a amostra de cefuroxima sódica, bem como o significado para os termos descritivos.

Tabela 4: Solubilidade da cefuroxima sódica SQR em diferentes solventes a 25,0 °C

Solventes	Termo descritivo	Significado
acetato de etila	pouco solúvel	de 100 à 1000 partes
acetona	muito pouco solúvel	de 1000 à 10000 partes
ácido clorídrico 0,1 <i>M</i>	muito solúvel	menos de 1 parte
água	muito solúvel	menos de 1 parte
clorofórmio	muito pouco solúvel	de 1000 à 10000 partes
etanol	muito pouco solúvel	de 1000 à 10000 partes
hidróxido de sódio 0,1 <i>M</i>	muito solúvel	menos de 1 parte
isopropanol	pouco solúvel	de 100 à 1000 partes
1-propanol	muito pouco solúvel	de 1000 à 10000 partes
metanol	pouco solúvel	de 100 à 1000 partes
toluol	pouco solúvel	de 100 à 1000 partes

De acordo com os parâmetros avaliados, a SQR e a substância amostra estão dentro das especificações farmacopeicas (USP, 2009; BP, 2010), pois estes parâmetros são úteis na identificação de fármacos, fornecendo informações do grau de pureza e são utilizados para pesquisar a presença de possíveis contaminantes na amostra.

5.5 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO

5.5.1 Material e método

A faixa de fusão foi determinada na substância de referência e na amostra, descritas no item 4, utilizando equipamento automático Stuart Scientific SMP3. A amostra previamente dessecada em estufa a 60,0 °C durante 2 horas foi colocada em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram introduzidos horizontalmente no equipamento.

Foi possível realizar a determinação simultânea utilizando-se três capilares.

5.5.2 Resultados e discussão

A taxa de aquecimento utilizada foi de 1,0°C por minuto a partir de 10,0 °C antes do valor esperado para a faixa de fusão, prosseguindo até 10,0 °C após este valor.

A partir de 170,0 °C a substância começou a adquirir coloração amarelada, passando à cor preta em 234,0 °C. Em 300,0 °C, que é a capacidade total do aparelho, a substância continuava a apresentar cor preta não apresentando fusão.

Nas literaturas consultadas (MERCK, 2006; MARTINDALE, 2007; USP, 2009a), o ponto de fusão da cefuroxima sódica não é apresentado.

A faixa de fusão pode ser empregada na caracterização de um composto, sendo ainda um importante indicativo de pureza, quando comparado com padrões de referência, pois uma pequena quantidade de impureza pode causar abaixamento do ponto de fusão e/ou alargar a faixa de fusão de um determinado composto (SHIRNER et al., 1998).

Assim, o mesmo teste foi realizado com a amostra, mostrando que o fármaco estudado apresentava características semelhantes às da substância de referência.

5.6 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

5.6.1 Material e método

A cefuroxima sódica foi exatamente pesada em pesa-filtros previamente tarados e dessecados em estufa Fanem modelo 315E durante 3 horas a 60 °C, a vácuo, com pressão não excedendo 5 mm de mercúrio. Antes da pesagem, os pesa-filtros foram dispostos em dessecador até atingirem temperatura ambiente.

O processo foi repetido até peso constante e a perda de peso foi calculada em porcentagem.

As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se cerca de 500 mg de amostra em cada determinação.

O teor de água foi estudado pelo método gravimétrico (F. BRAS. IV, 1988) que consiste em secar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada de 105,0 a 150,0 °C, durante várias horas, para fármacos termoestáveis.

Segundo a Farmacopeia Brasileira, a expressão “dessecação até peso constante” significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em

mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após uma hora de secagem adicional nas condições específicas.

5.6.2 Resultados e discussão

As determinações foram conduzidas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988) e os resultados, apresentados na Tabela 5, mostram que a cefuroxima sódica injetável está dentro dos padrões farmacopeicos, pois as últimas duas medidas não diferiram entre si com intervalo de pesagem de uma hora.

Tabela 5: Umidade da cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável determinada pelo método gravimétrico

Ensaio	Umidade (%) $\pm$ DPR*
1	1,45 $\pm$ 0,22
2	1,63 $\pm$ 0,58
3	1,63 $\pm$ 0,24
média	1,57 $\pm$ 0,35

DPR: desvio padrão relativo.

* Cada valor é a média de três determinações em dias diferentes.

5.7 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

5.7.1 Material e método

Foram pesados analiticamente 50,0 mg de cefuroxima sódica substância de referência, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água purificada. Alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL para obtenção de uma solução de concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada, tampão fosfato pH 6,0, metanol, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M.

Os espectros de absorção na região de ultravioleta foram obtidos entre 200 a 400 nm em espectrofotômetro Kayk XA modelo HP 8453 empregando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

5.7.2 Resultados e discussão

Os espectros obtidos com diferentes solventes utilizando cefuroxima sódica substância de referência estão apresentados na Figura 3.

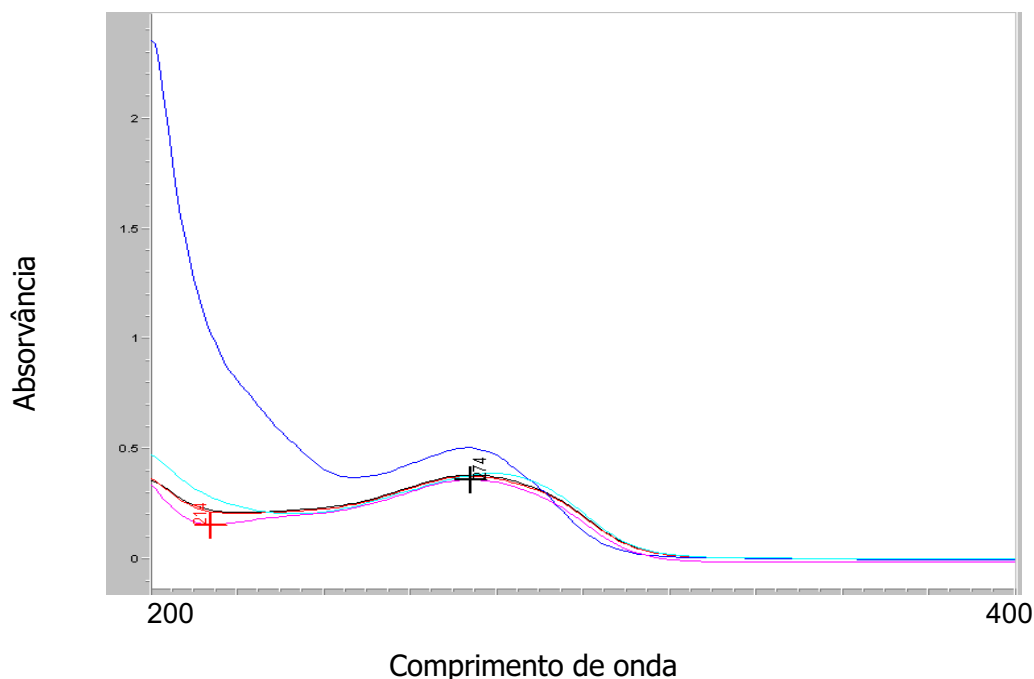


Figura 3: Espectro na região do ultravioleta de cefuroxima sódica SQR a 10 $\mu\text{g/mL}$ em água (preto), tampão fosfato pH 6,0 (verde), metanol (azul), ácido clorídrico 0,1 M (vermelho) e hidróxido de sódio 0,1 M (rosa).

A espectrofotometria na região do ultravioleta apresenta uma série de aplicações farmacêuticas, destacando-se a identificação e quantificação de fármacos, a determinação de pK_a , a determinação dos coeficientes de partição e solubilidade dentre outras (WATSON, 1999). O SQR mostrou-se solúvel nos solventes testados e os espectros de absorção da substância de referência e do fármaco demonstraram perfis semelhantes em água, apresentando máxima em 274 nm. As absorções em tampão fosfato pH 6,0, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M apresentaram o mesmo pico de absorção máxima de cefuroxima sódica em água.

Após a obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta, optou-se por trabalhar com soluções preparadas em água purificada, por ser um solvente de fácil acesso e não tóxico.

5.8 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

5.8.1 Material e método

Os espectros foram obtidos com auxílio de espectrofotômetro SHIMADZU FTIR, modelo 3000 (Columbia, USA), pesando 10 mg de cefuroxima sódica SQR e quantidade equivalente de cefuroxima sódica amostra (pó para solução injetável), descrita no item 4, em pastilhas de 250 mg de brometo de potássio dessecado.

5.8.2 Resultados e discussão

Os espectros obtidos com cefuroxima sódica SQR e cefuroxima sódica amostral, utilizando-se pastilhas de 250 mg de brometo de potássio, estão representados pelas Figuras 4 e 5.

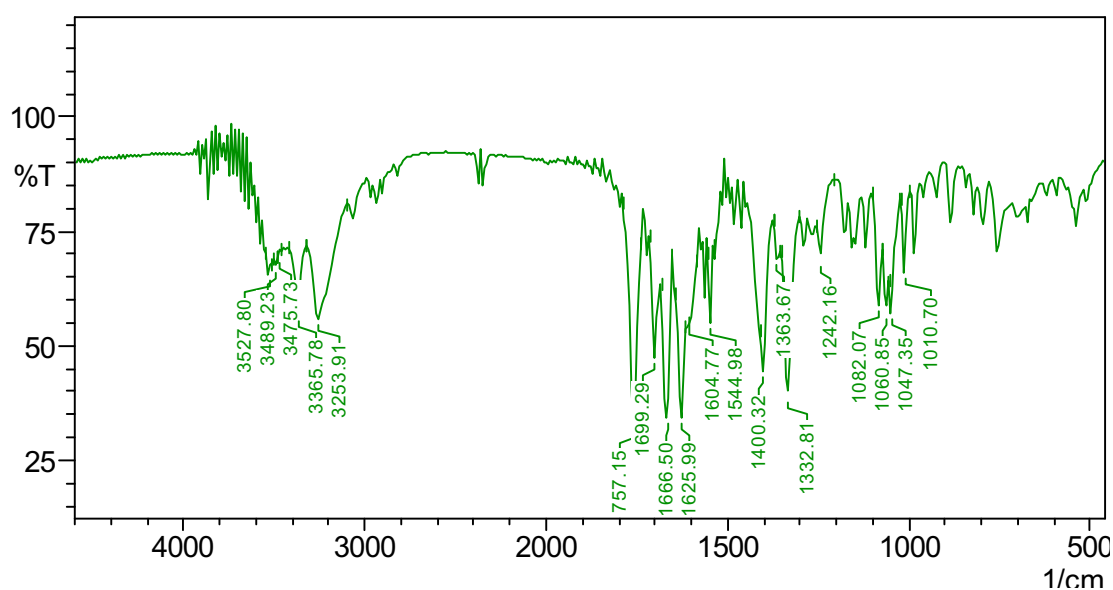


Figura 4: Espectro na região de infravermelho de cefuroxima sódica SQR em pastilhas de KBr.

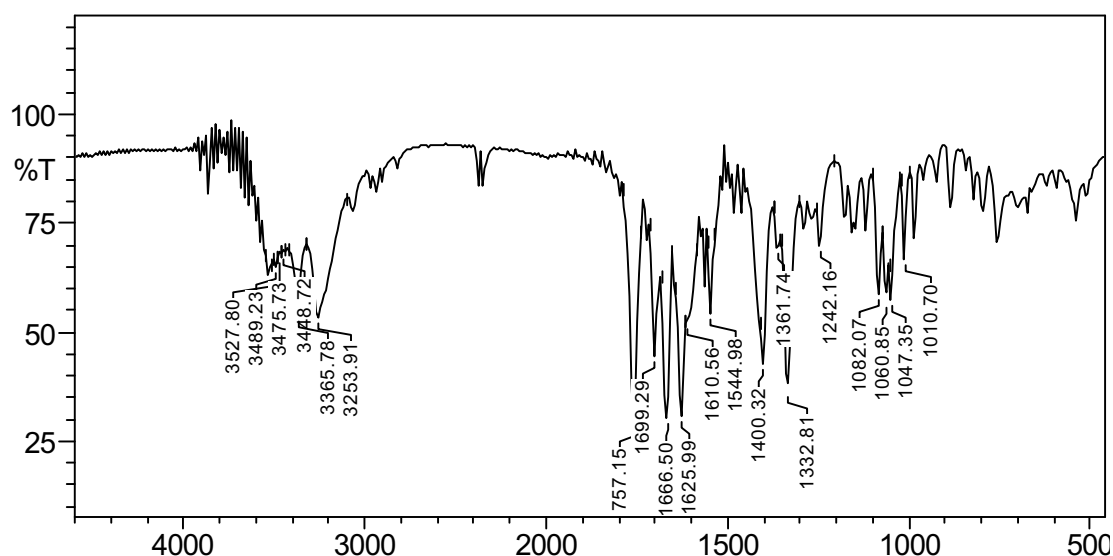
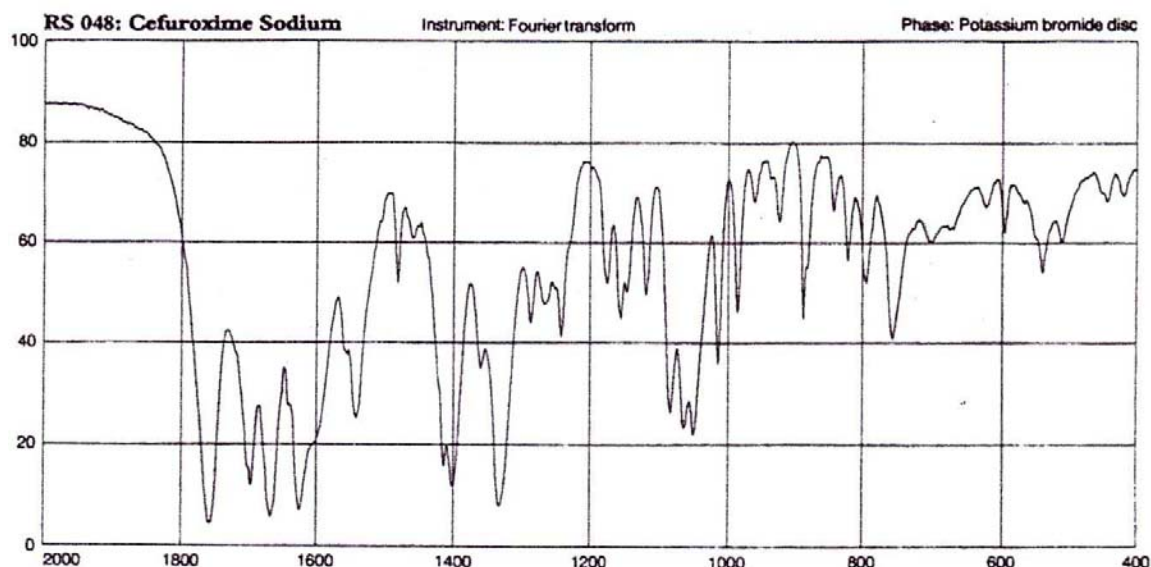


Figura 5. Espectro na região de infravermelho de cefuroxima sódica amostra em pastilhas de KBr.

Através das análises efetuadas em cefuroxima sódica SQR e amostra (Figuras 4 e 5) foram obtidos os espectros, que apresentam as mesmas bandas de absorção e foram comparados e analisados com dados apresentados na literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; BP, 2010). O espectro de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentou bandas de absorção características de compostos cefalosporínicos apresentados na Tabela 6, dados que estão de acordo com o espectro apresentado na Figura 6.

Tabela 6: Absorção de cefuroxima sódica espectro de infravermelho em dispersão de KBr

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



Fonte: BP (2005).

Figura 6: Espectro na região de infravermelho de cefuroxima sódica padrão apresentado na literatura.

O espectro de absorção de um composto no infravermelho pode ser encarado como uma espécie de “impressão digital” do composto. A fim de detectar uma impureza numa substância, pode-se fazer uma comparação entre o espectro da substância e o espectro do composto puro; as impurezas provocam o aparecimento de bandas de absorção extras no espectro (HARRIS, 2001).

Para o teste quantitativo foi utilizado o pico referente ao estiramento do grupo carbonila C=O da carboxila (1757,15).

5.9 ANÁLISE TÉRMICA

5.9.1 Material e método

Foram utilizadas cefuroxima sódica substância de referência e amostras descritas no item 4. Todos os reagentes utilizados foram grau analítico.

As medidas de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) foram realizadas em cadinhos de alumínio, taxa de aquecimento 10°C/min e fluxo de N₂.

O equipamento utilizado foi DSC/DTA, modelo 2910 (Maryland, DC). As curvas TG (*Thermogravimetry*) e DTA (*Differential Thermal Analysis*) foram obtidas através de análise térmica simultânea (SDT Q600), da TA Instruments (Maryland, DC), no Instituto de

Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, sob a coordenação do Professor Doutor Younes Messaddeq.

A faixa de temperatura utilizada foi de 0 a 800 °C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90 mL/min), de oxigênio (vazão de 90 mL/min) e de nitrogênio (vazão de 90 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min e massa de amostra (cefuroxima sódica) de aproximadamente 5 mg. A amostra foi acondicionada em cadinho de alumínio hermeticamente fechado, e como substância de referência foi utilizada Al_2O_3 .

5.9.2 Resultados e discussão

Análise térmica é utilizada para determinar as propriedades físicas e químicas de uma amostra em função da temperatura ou tempo. Esta técnica, juntamente com outras técnicas analíticas complementares, tais como a espectroscopia e métodos cromatográficos, está se tornando cada vez mais importante para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (ROY et al., 2002). Dentre as técnicas termoanalíticas utilizadas, a DSC é a mais popular, devido à sua ampla aplicabilidade em comparação com outros métodos. Nesta técnica, a diferença no fluxo de calor para a amostra e o padrão é monitorada contra o tempo/temperatura quando exposto a um programa de temperatura (RIGA; COLLINS, 2000). Técnicas de DSC fornecem informações sobre o ponto de fusão/intervalo de fusão, calor fusão, grau de pureza, polimorfismo, pseudopolimorfismo, transição vítrea, interação/compatibilidade, estabilidade térmica, cinética de decomposição entre outros (FOREMAN, 2000).

O objetivo deste estudo foi determinar a estabilidade de cefuroxima sódica frente à temperatura bem como sua pureza e ponto ou faixa de fusão. A análise termogravimétrica (TG) determina a variação da massa de uma substância em função da temperatura ou tempo, sob o controle de temperatura programada.

Na análise térmica diferencial (DTA) mede-se a diferença de temperatura entre a substância analisada e o material de referência, quando ambos são submetidos a controle de temperatura programado (HATAKEYAMA; QUINN, 1994; CLASS et al., 1999). Na calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede-se, ao invés da diferença de temperatura, a diferença de energia que é fornecida à substância em análise em comparação a um padrão inerte.

A Figura 7 apresenta a curva de DSC de cefuroxima sódica substância de referência e forma farmacêutica injetável.

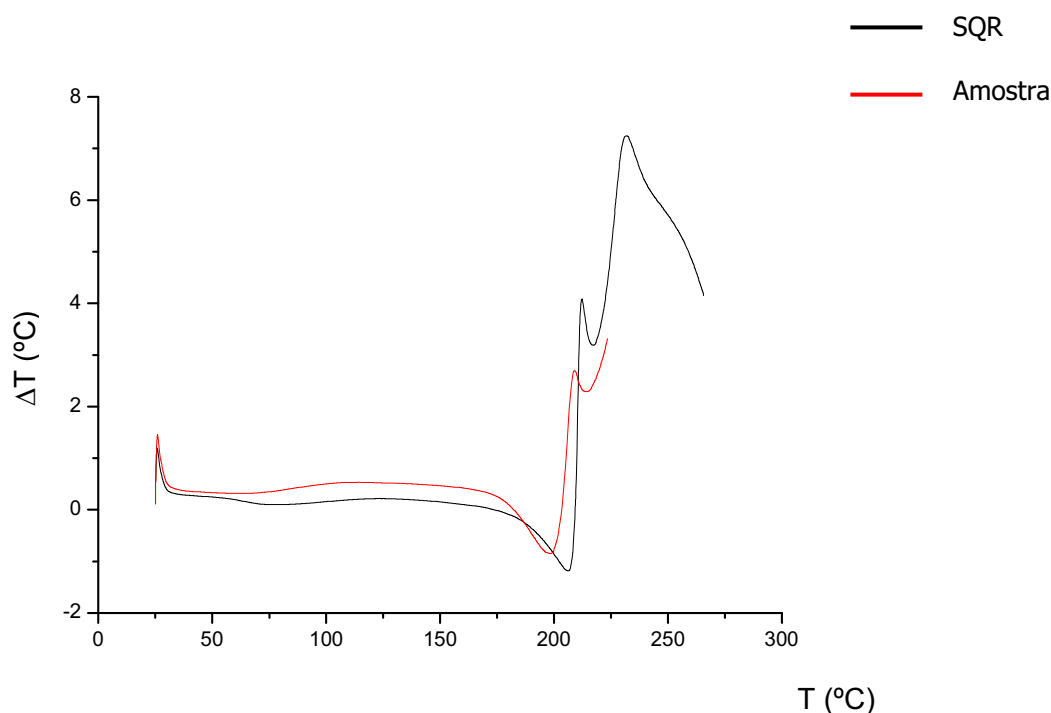


Figura 7: Curva DSC de cefuroxima sódica SQR e da amostra sob atmosfera de ar sintético, em razões de aquecimento de 10°C .

Em relação às curvas de DSC para cefuroxima sódica substância de referência, o pico endotérmico que caracteriza a cefuroxima sódica encontra-se a $200\text{--}210^{\circ}\text{C}$. As curvas também demonstraram o aparecimento de dois picos exotérmicos entre $215\text{--}220^{\circ}\text{C}$ e $230\text{--}240^{\circ}\text{C}$. Não houve diferença em relação ao pico endotérmico na forma farmacêutica, que ficou na mesma faixa de fusão.

Desta forma a DSC pode ser utilizada nas monografias de fármacos em determinação da faixa de fusão de substâncias permitindo a caracterização quanto a aspectos como pureza e polimorfismo (GIRON-FOREST et al., 1989).

Foi também realizada a análise termogravimétrica de cefuroxima sódica substância de referência e forma farmacêutica injetável sob atmosfera de O_2 (Figura 8) e sob atmosfera de N_2 (Figura 9).

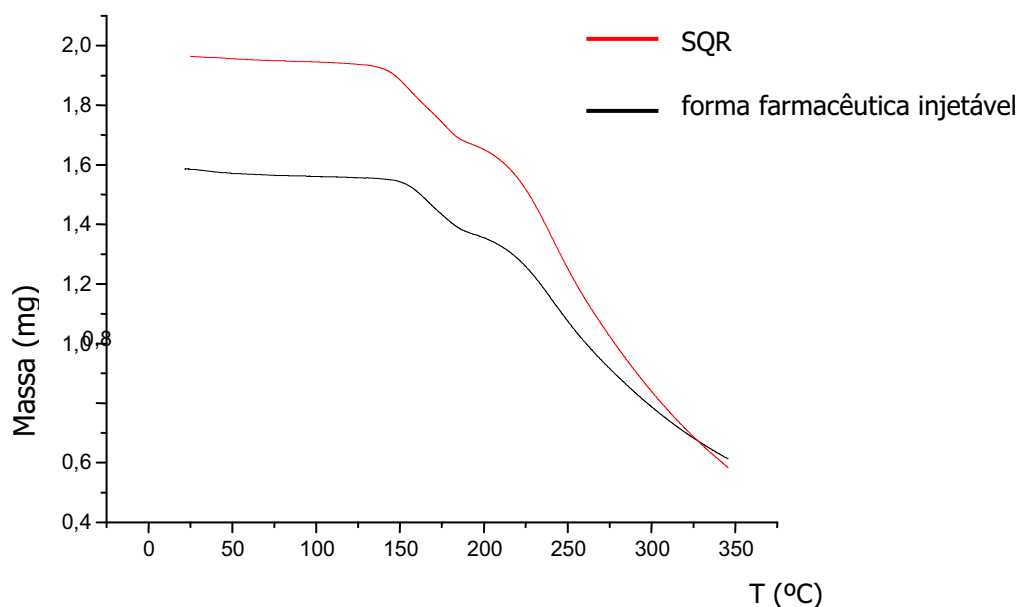


Figura 8: Curva de termogravimetria (TG) de cefuroxima sódica SQR e da forma farmacêutica injetável sob atmosfera de oxigênio.

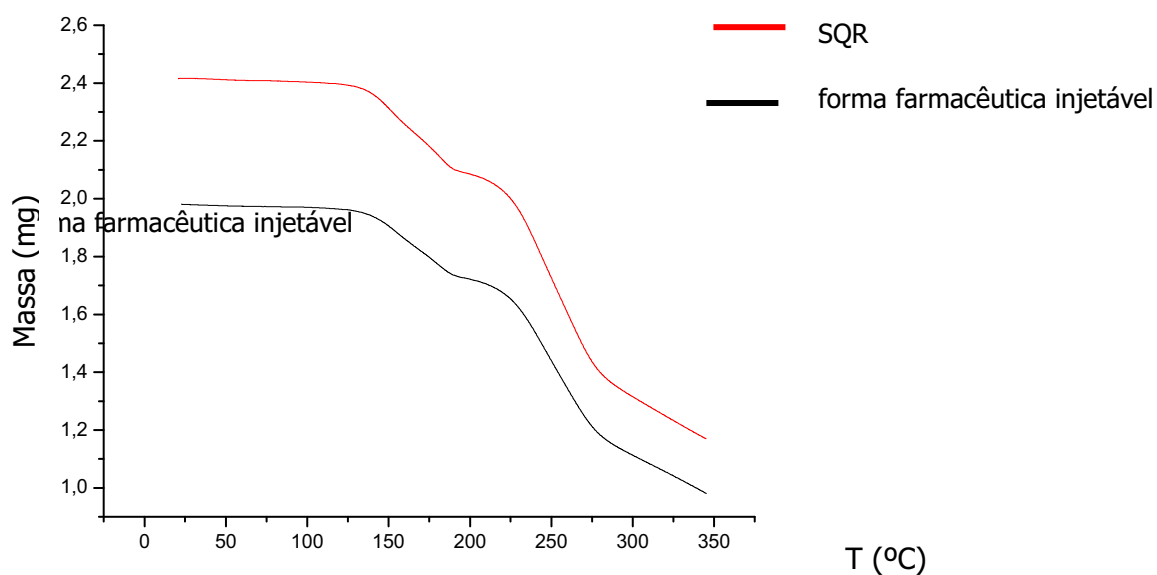


Figura 9: Curva de termogravimetria (TG) de cefuroxima sódica SQR e amostra sob atmosfera de nitrogênio.

As curvas de TG não apresentaram diferenças de comportamento nas condições utilizadas de atmosfera de oxigênio ou nitrogênio. Através destas curvas verifica-se perda de massa total em duas etapas, entre as temperaturas de 195°C e 275°C, sendo mais intensa e progressiva a partir de 275°C.

Os métodos calorimétricos apresentam grande interesse para a análise farmacêutica, fornecendo informações sobre a pureza da substância em questão, grau de hidratação, compatibilidades, termoestabilidade e identidade (GIRON, 1998; KANDARAPU et al., 2001).

Assim, a análise térmica é, atualmente, uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento e análise de formulações farmacêuticas. Geralmente, a instabilidade de um produto ou incompatibilidade entre os componentes de uma formulação é caracterizada por processos exotérmicos (KANDARAPU et al., 2001).

5.10 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

5.10.1 Material e método

Foram utilizadas placas de sílica-gel F₂₅₄ (12 x 5 cm) com espessura de 0,25 mm de camada adsorvente e amostras de cefuroxima sódica substância de referência e forma farmacêutica injetável.

Para o preparo das soluções da substância de referência e da amostra, foram pesadas massas equivalentes a 50 mg da substância de referência e da amostra previamente dessecadas em estufa a 105°C, durante uma hora e transferidas para balão volumétrico de 5 mL e dissolvidos em dimetilformamida R, para obtenção de solução com concentração final de 10 mg/mL.

Foram testadas oito fases móveis:

- 1) diclorometano: metanol: acetonitrila: ácido acético 5% (6:4:2:2) v:v:v;
- 2) clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:7:1) v:v:v;
- 3) *n*-butanol: ácido acético: água (4:1:5) v:v:v;
- 4) diclorometano: metanol: hidróxido de amônio: acetonitrila (6:4:2:2) v:v:v:v;
- 5) clorofórmio: metanol: ácido fórmico (33:7:3) v:v:v;
- 6) clorofórmio: metanol: ácido fórmico (7:18:1) v:v:v;
- 7) clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:2:1) v:v:v;
- 8) acetona: metanol: ácido fórmico (18:2:1) v:v:v.

Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

Na execução do ensaio, primeiramente o sistema eluente foi colocado para a saturação da cuba. As soluções, preparadas no dia da análise, foram aplicadas com auxílio

de seringa na quantidade de 10 μ L a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa, e então a placa foi colocada na cuba para eluição dos compostos até estes atingirem 10 cm do ponto de aplicação. Após a migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, para secagem com corrente de ar quente e observação à luz ultravioleta, para comparação das manchas quanto à forma, posição e tamanho.

Foram determinados os fatores de retenção (R_f) da solução amostra e da solução padrão.

5.10.2 Resultados e discussão

A maioria dos sistemas solventes testados não foi adequada para identificar a cefuroxima sódica, pois nenhum eles foi capaz de separar a amostra, com exceção da fase móvel (7), que foi constituída de clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:2:1). Os valores de R_f obtidos após a migração cromatográfica foram de 0,34 para a substância de referência e para a amostra da forma farmacêutica injetável, ambas apresentando cor cinza.

O perfil cromatográfico após revelação na luz ultravioleta (254 nm) pode ser visualizado na Figura 10.



Figura 10: Determinação de cefuroxima sódica 10 mg/mL por cromatografia em camada delgada, P: SQR e A: amostra. Sistema solvente: clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:2:1)

A cefuroxima sódica apresenta, no UV longo, uma mancha bem característica, de intensidade forte, facilmente identificável. As manchas detectadas com a SQR e a substância amostra foram compatíveis entre si quanto ao tamanho, local e cor, estando em concor-

-dância com o especificado nas monografias.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica flexível, pois permite a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores, os quais são determinados de acordo com as características da amostra em teste (WATSON, 1999).

Esta técnica ocupa um lugar de destaque entre os métodos de análise devido à sua facilidade em efetuar separações, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas. Além disso, possibilita a escolha de fases estacionárias diferentes e adequadas para cada tipo de molécula, apresenta tempo de desenvolvimento relativamente curto, promove a fácil recuperação dos componentes separados e possui sensibilidade satisfatória, com separações extremamente nítidas e capazes de detectar quantidades muito menores que as manchas muito mais difusas obtidas na cromatografia em papel (BARNARD; CHAYEN, 1970).

A literatura não descreve metodologia para identificação de cefalosporinas por cromatografia em camada delgada, apenas o ensaio de substâncias aparentadas (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002; USP, 2009a; BP, 2010) que utiliza como fase móvel uma mistura de 6 volumes de butanol, 26 volumes de solução tampão de acetato de sódio pH 4,5, 32 volumes de acetato de butila e 32 volumes de ácido acético glacial, sendo as placas examinadas à luz ultravioleta de 254 nm. Por ser uma técnica de fácil execução, sem utilização de materiais e reagentes complexos, a metodologia desenvolvida neste trabalho é de grande importância para o controle de qualidade desta forma farmacêutica.

6 - Análise Quantitativa

6.1 Espectrofotometria na região de ultravioleta

6.1.1 Considerações gerais

A espectrofotometria na região do ultravioleta é um importante recurso utilizado na quantificação de substâncias, uma vez que está relacionada com a estrutura eletrônica da molécula (KOROLKOVAS, 1988). A aplicação desta técnica oferece algumas vantagens específicas: 1- simplicidade, pois elimina alguns passos do experimento, como filtração e extração; 2 – alta especificidade devido à medida do aumento ou diminuição da absorvância como função da concentração da amostra; 3 – evita a interferência de cor e/ou turbidez das amostras (SALEH et al., 2009).

A partir de dados encontrados na literatura para outras cefalosporinas (MARTINÉZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SALEM; ASKAL, 2002; SALEM; SALEH, 2002; EL-MAMMLI, 2003; AMIN; RAGAB, 2004; KOROLKOVAS, 2006; MORENO; SALGADO, 2008) alguns parâmetros foram testados para a determinação da cefuroxima sódica, principalmente visando obter seletividade quando comparado com os existentes na literatura.

6.1.2 Material e método

O espectro na região de ultravioleta foi obtido utilizando-se equipamento espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-mini 1240 e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi feita entre 200 e 400 nm. Foram preparadas soluções de cefuroxima sódica em diferentes solventes, tais como: água purificada, metanol e NaOH 0,1 M, para a determinação dos máximos de absorção e posterior comparação de seus espectros de absorção (Figura 3).

O solvente escolhido foi a água purificada e as soluções foram preparadas com a substância de referência de cefuroxima sódica, previamente dessecada e pesada, em concentração de 10 µg/mL.

6.1.3 Construção da curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região de ultravioleta obedece à linearidade. Foram preparadas soluções de cefuroxima sódica substância de referência de concentrações crescentes, para obtenção de curva analítica de 18 pontos.

Foram pesados em balança analítica 100 mg de cefuroxima sódica substância de referência, previamente dessecada em estufa a 105°C por 2 horas e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água purificada. Uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL para obtenção de solução de concentração de 50 µg/mL em água purificada. A partir desta solução foram transferidas alíquotas para obtenção de uma curva de Ringbom com 18 pontos de concentrações crescentes. Os volumes foram completados com água purificada em balão volumétrico de 10 mL obtendo-se soluções com concentrações de 0,5 a 30 µg/mL de cefuroxima sódica SQR, sendo o pH final de cada solução 7,23 (Tabela 7).

A curva de Ringbom (Figura 11) foi obtida utilizando-se o valor das concentrações (µg/mL) *versus* absorvância.

Tabela 7: Obtenção da curva de Ringbom de cefuroxima sódica por espectrofotometria no ultravioleta a 280,0 nm

Pontos	Cefuroxima sódica 50 µg/mL (µL)	Quantidade de cefuroxima sódica (mg)	Concentração final (µg/mL)	Abs.
1	100	5,0	0,5	0,027
2	200	10,0	1,0	0,054
3	400	20,0	2,0	0,095
4	800	40,0	4,0	0,141
5	1000	50,0	5,0	0,216
6	1200	60,0	6,0	0,248
7	1600	80,0	8,0	0,333
8	2000	100,0	10,0	0,441
9	2400	120,0	12,0	0,520
10	2800	140,0	14,0	0,613
11	3200	160,0	16,0	0,679
12	3600	180,0	18,0	0,779
13	4000	200,0	20,0	0,840
14	4400	220,0	22,0	0,942
15	4800	240,0	24,0	0,991
16	5200	260,0	26,0	1,006
17	5600	280,0	28,0	1,030
18	6000	300,0	30,0	1,100

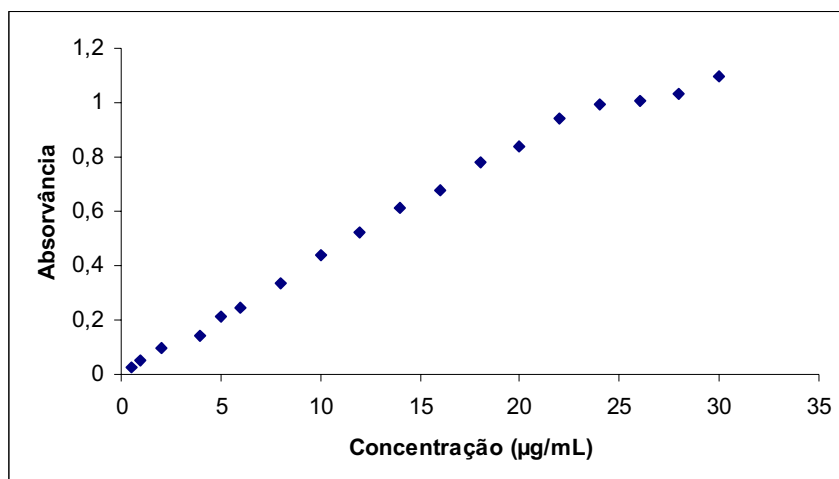


Figura 11: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta para solução de cefuroxima sódica SQR de 0,5 a 30,0 µg/mL.

6.1.4 Obtenção da curva analítica

Após a obtenção da curva de Ringbom, foi determinada a faixa de concentração que obedece a lei de Lambert-Beer. Foram preparadas soluções de cefuroxima sódica substância de referência previamente dessecada em estufa e analiticamente pesada, em concentrações que obedeçam à linearidade para a determinação da curva analítica com 6 pontos.

Alíquotas da solução de cefuroxima sódica substância de referência preparada a 50 µg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL para obtenção de soluções com concentrações de 5 a 14 µg/mL de cefuroxima sódica substância de referência, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Preparo da curva analítica de cefuroxima sódica por espectrofotometria no ultravioleta a 280,0 nm

Pontos	Vol. de cefuroxima sódica 50,0 µg/mL (µL)	Vol. de água qsp BV 10 mL (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	1000	9,0	5,0
2	1200	8,8	6,0
3	1600	8,4	8,0
4	2000	8,0	10,0
5	2400	7,6	12,0
6	2800	7,2	14,0

Os resultados das leituras de absorvância obtidos para a curva analítica estão apresentados na Tabela 9. Cada determinação corresponde ao preparo de três soluções para leitura a 280,0 nm.

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de cefuroxima sódica em concentrações de 5 a 14 µg/mL pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm estão representados na Figura 12.

Tabela 9: Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta em 280,0 nm

Concentração (µg/mL)	Abs*	Abs média	DPR %
5,0	0,195 0,199 0,207	0,200	0,61
6,0	0,247 0,248 0,253	0,249	0,32
8,0	0,324 0,331 0,322	0,325	0,47
10,0	0,391 0,428 0,417	0,412	1,32
12,0	0,508 0,502 0,506	0,492	0,30
14,0	0,576 0,585 0,578	0,579	0,30

DPR: desvio padrão relativo.

*valor correspondente a 3 leituras.

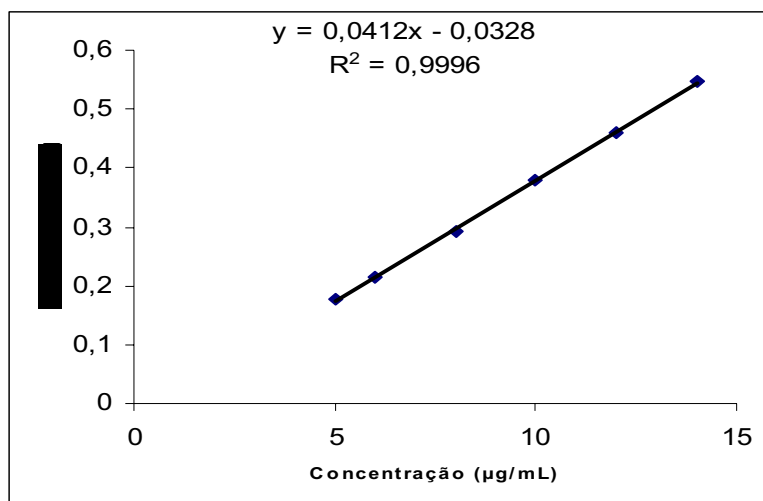


Figura 12: Representação gráfica da curva analítica da solução de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm.

6.1.5 Validação do método

O método foi validado para determinação da linearidade, precisão, robustez e exatidão (ICH, 2005; USP, 2009b).

- **Linearidade:** para validação do método, cinco concentrações (5,0 – 14,0 µg/mL) da SQR e 5 concentrações (5,0 – 14,0 µg/mL) da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA (Tabela 10).
- **Precisão:** repetibilidade (intramétodo) e precisão (intermétodo) foram determinadas na concentração de 10 µg/mL (100% da concentração do fármaco). A repetibilidade do método foi estudada pelas análises das amostras em concentrações diferentes no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada por comparação do método em diferentes dias (Tabela 11).
- **Exatidão:** foi determinada pelo teste de recuperação.
- **Robustez:** a robustez do método foi determinada pela análise de algumas amostras sob várias condições. Os fatores considerados foram a variação de pH (Tabela 12) e a variação do comprimento de onda (Tabela 13). O valor inicial do pH nas soluções era de 7,23 e para o teste de robustez esse valor foi alterado para 6,8. Já o comprimento de onda variou de 280 nm para 283 nm.

Tabela 10: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F cal	F tab
Entre	5	0,3163	0,06326	361,5*	3,11
Regressão linear	1	0,3160	0,3160	320,5*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,002244	0,000561	0,05	3,26
Resíduo	12	0,0021	0,000175		
Total	17	0,3184			

*Significativo para $p < 5\%$

Tabela 11: Precisão do método de UV representado pelo desvio padrão relativo para cefuroxima sódica

Ensaio	Abs*	Quantidade encontrada (mg)	Teor %	Média $\pm$ e.p.m.	DPR(%)
I	0,391	731,47	97,53		
II	0,382	765,30	102,04		
III	0,383	738,07	98,41		
IV	0,391	755,25	100,70	99,49 $\pm$ 0,63	1,40
V	0,390	737,45	98,32		
VI	0,383	749,65	99,95		

e.p.m.: erro padrão médio

DPR%: desvio padrão relativo percentual

Tabela 12: Robustez do método de UV representado pela alteração no valor do pH de 7,23 para 6,8

Ensaio	Abs*	Quantidade encontrada (mg)	Teor %	Média ± e.p.m.	DPR(%)
I	0,389	732,05	97,60	98,56 ± 0,4589	1,11
II	0,390	737,25	98,30		
III	0,383	738,45	99,79		

e.p.m.: erro padrão médio

DPR%: desvio padrão relativo percentual

Tabela 13: Robustez do método de UV representado alteração do comprimento de onda de 280 nm para 283 nm

Ensaio	Abs*	Quantidade encontrada (mg)	Teor %	Média ± e.p.m.	DPR(%)
I	0,395	732,15	97,62	100,07 ± 0,60	0,85
II	0,388	765,21	102,02		
III	0,392	754,45	100,59		

e.p.m.: erro padrão médio

DPR%: desvio padrão relativo percentual

6.1.6 Determinação de cefuroxima sódica na forma farmacêutica

6.1.6.1 Preparo da solução de cefuroxima sódica SQR

A cefuroxima sódica substância de referência foi dessecada e analiticamente pesada para o preparo de solução com concentração requerida. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Foram pesados analiticamente 50,0 mg de cefuroxima sódica substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com água purificada, para obtenção de uma solução com concentração de 1 mg/mL.

A partir desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água purificada, obtendo-se solução de concentração final de cefuroxima sódica de 50 µg/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata.

6.1.6.2 Preparo da amostra

Uma quantidade de pó referente ao peso médio foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL para obtenção de solução com concentração de 0,77 mg/mL. Uma alíquota de 6,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL completando-se o volume com água purificada para obtenção de solução de 50,05 µg/mL. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas de 2,0 mL para balão de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, obtendo solução de concentração final de 10,01 µg/mL. As leituras das soluções foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As soluções foram preparadas em triplicata.

6.1.6.3 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 1:

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

Equação 1

Em que:

C_A : concentração da amostra (µg/mL)

A_A : concentração da substância de referência (µg/mL)

A_A : absorvância da amostra

A_{SR} : absorvância da substância de referência

O teor percentual de cefuroxima sódica nas amostras foi calculado pela Equação 2:

$$C_A \% = C_A \cdot 100 / C_t$$

Equação 2

Em que:

C_A : concentração de cefuroxima sódica encontrada na amostra (mg)

C_t : concentração de cefuroxima sódica teórica na amostra (mg)

Os valores experimentais da determinação de cefuroxima sódica nas amostras pelo método proposto encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14: Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra (750,0 mg) pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm

Ensaio	Abs*	Quantidade	Teor %	Média ± e.p.m.	DPR(%)
		encontrada (mg)			
I	0,391	731,47	97,53	99,49 ± 0,62	1,40
II	0,382	765,30	102,04		
III	0,383	738,07	98,41		
IV	0,391	755,25	100,70		
V	0,390	737,45	98,32		
VI	0,383	749,65	99,95		

*cada valor é a média de três determinações distintas

e.p.m.: erro padrão médio

DPR%: desvio padrão relativo percentual

6.1.7 Teste de recuperação

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 2002; USP, 2009b). Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência são adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica injetável para a quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos, aos quais são adicionadas quantidades definidas de solução de cefuroxima sódica substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

6.1.7.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 50,0 mg de cefuroxima sódica substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 50 mL para o preparo de solução de cefuroxima sódica SR com concentração de 1000 µg/mL. Desta solução foi tomada alíquota de 5,0 mL e transferida para balão de 100 mL e completado o volume, obtendo-se concentração de 50 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração de 100 µg/mL, a partir de uma solução a 1000 µg/mL preparada pela dissolução de 49,65 mg de pó em 50 mL de água purificada.

Para o ensaio de recuperação, foram transferidas alíquotas de 2,0 mL da solução amostra para balões de 25 mL denominados A, R1, R2 e R3. Foram adicionados 1,0, 2,0 e 3,0 mL da solução de cefuroxima sódica SR em concentração de 50 µg/mL, nos balões R1, R2 e R3, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão, foram transferidos 6,0 mL de solução de cefuroxima sódica SR a 50 µg/mL para um balão de 25 mL, completando o volume com água purificada e obtendo solução de concentração de 12 µg/mL.

Os volumes dos balões foram completados com água purificada, obtendo-se concentração de 10, 12 e 14 µg/mL para os balões A, R1, R2 e R3, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15: Preparo das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método espectrofotométrico na região de ultravioleta em 280,0 nm

	Volume solução-amostra (mL) (100 µg/mL)	Volume cefuroxima sódica SR (mL) (50 µg/mL)	Concentração final em 25 mL (µg/mL)
A	2,0	-	8,0
R1	2,0	1,0	10,0
R2	2,0	2,0	12,0
R3	2,0	3,0	14,0
P	-	4,0	8,0

6.1.7.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) pode ser calculada através da expressão descrita pela AOAC (2002), apresentado na Equação 3:

$$R\% = [(C_f - C_u) / C_a] \cdot 100$$

Equação 3

Em que:

C_f = Concentração da substância de referência + amostra

C_u = Concentração da amostra

C_a = Concentração da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para amostra de cefuroxima sódica estão na Tabela 16.

Tabela 16: Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo de método espectrofotométrico na região do ultravioleta em 280,0 nm

	Concentração teórica adicionada (µg/mL)	Abs*	Concentração encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)	Média
R1	2,0	0,417	10,35	102,57	100,82
R2	4,0	0,484	12,19	99,80	
R3	6,0	0,559	14,29	100,11	

* cada valor é a média de três determinações

6.1.8 Discussão

Os espectros de absorção no ultravioleta são instrumentos úteis na identificação de compostos orgânicos e na elucidação de suas estruturas, no entanto a relação detalhada da estrutura molecular com bandas de absorção é muito extensa, mas uma informação relativa a um composto de estrutura desconhecida pode, algumas vezes, ser obtida pela comparação direta do seu espectro de absorção com os compostos-modelo de estrutura conhecida (EWING, 2001).

A curva analítica foi feita plotando-se os valores de absorvância *versus* a concentração da substância de referência e a Lei de Beer foi válida no intervalo de 5,0 a 14,0 µg/mL (Tabela 9). O coeficiente de correlação (0,9996) e a equação da reta inclinação da reta, $y = 0,0412x - 0,0328$, foram calculados usando o método dos mínimos quadrados. O valor da absorvidade molar foi de $1,15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A repetibilidade do método foi determinada por análise de seis replicatas da amostra, cada uma na concentração de 10 µg/mL. Nesta concentração, o desvio padrão relativo foi de 1,40 (Tabela 14).

A eficácia do método (Tabela 10) proposto foi avaliada pelo cálculo do valor do teste-*F* e comparado com o método oficial (USP, 2009a; BP, 2010). Medidas dos valores do teste-*F* foram obtidos com 95% de confiança. Os resultados mostram que o *F* calculado (2,81) não excedeu o valor teórico que é de 3,11 e não difere significativamente do método oficial (RODRIGUES, 1986).

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação. Desta forma, quantidade conhecida da substância de referência foi adicionada nas soluções de cefuroxima sódica injetável para quantificação da substância. Obteve-se neste teste recuperação de 100,83%, que é satisfatório e é um requisito obrigatório para a validação de métodos analíticos.

A precisão do método proposto (Tabela 11) foi obtida utilizando-se seis determinações de cefuroxima sódica injetável, sendo cada preparação realizada em triplicata e as medidas realizadas de preparações distintas.

A robustez avaliou a confiabilidade do método proposto pela alteração do valor do pH, que passou de 7,2 para 6,8 e através da alteração do valor do comprimento de onda que era de 280,0 nm e foi alterado para 283,0 nm. Pode ser observado que mesmo com a alteração desses parâmetros os valores encontrados em três determinações da cefuroxima sódica no medicamento estão dentro do valor preconizado que é de 99-102 % do teor.

O teor médio de cefuroxima sódica nos frascos-ampola foi de 749,19 mg (99,89%) determinados durante seis dias consecutivos e em triplicata, sendo cada medição originada de soluções distintas.

O método espectrofotométrico tem baixa especificidade para compostos contendo anel β -lactâmico que absorvem em uma faixa de 250-270 nm (MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002). No entanto, o método proposto e dados da literatura (CHAUDHARI et al., 2006) mostram que este método tem boa especificidade e seletividade para determinação de cefuroxima sódica sob a forma farmacêutica injetável.

6.2 Espectrofotometria na região do visível

6.2.1 Considerações gerais

A espectrofotometria na região do visível é uma das técnicas mais utilizadas no mundo em laboratórios químicos e clínicos. Em análise farmacêutica, é amplamente usada para identificação e doseamento de fármacos e medicamentos. Todas as técnicas espectrofotométricas são baseadas na interação de uma substância química com energia radiante e, na maioria dos casos, o efeito desta interação é a absorção de energia pela substância que está sendo analisada (WATSON, 1999; OHANNESIAN; 2002). Diferentes reagentes têm sido utilizados para aumentar a seletividade do método, baseado na capacidade de absorção da cefalosporina ou de seus produtos derivados da degradação ácida/básica (MARTINÉZ; FALCÓ; CABEZA, 2002).

A partir de dados encontrados na literatura para outros fármacos (AL-MOMANI, 2001; SALEM; ASKAL, 2002; AMIN; RAGAB, 2004) alguns parâmetros serão testados para a determinação da cefuroxima sódica, principalmente visando obter seletividade quando comparado com os existentes na literatura.

6.2.2 Material e Método

6.2.2.1 Metodologia empregando Fe(III) e *o*-fenantrolina

O espectro na região do visível foi obtido utilizando-se equipamento espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-mini 1240 e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi feita entre 400 e 700 nm. Foi preparada uma solução de cefuroxima sódica a 50 µg/mL em tampão citrato pH 4,2. Resumidamente, 10,0 mg de cefuroxima sódica transferidos para balão volumétrico de 50 mL foram dissolvidos em solução tampão citrato pH 4,2 para obtenção de solução a 200 µg/mL. Uma alíquota de 12,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL o qual foi completado com solução tampão citrato pH 4,2 para obtenção de solução de cefuroxima sódica 50 µg/mL. A reação entre o Fe³⁺ e a *o*-fenantrolina está expressada na Figura 13.

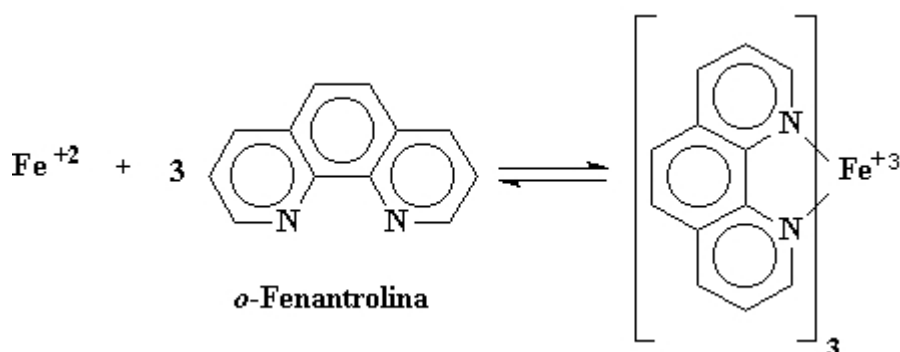


Figura 13: Reação de complexação do Fe^{3+} com a *o*-fenantrolina

A cefuroxima sódica reage com o complexo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ dando uma solução de cor alaranjada

6.2.3 Construção da curva de Ringbom

Foram pesados analiticamente 50,0 mg de cefuroxima sódica substância de referência, previamente dessecados em estufa a vácuo durante 2 horas, e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água purificada. O pH foi ajustado em 4,2 com tampão citrato. Uma alíquota de 25,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL para obtenção de solução de concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas para obtenção de curva de Ringbom com 18 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de micropipeta. Foram adicionados em cada balão, 1,0 mL de solução de Fe(III) 0,01 *M* e 500 μL de solução de *o*-fenantrolina 0,02 *M*, seguido de aquecimento em banho de água a 40°C por 30 minutos. Os volumes foram completados com água purificada em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0 a 400,0 $\mu\text{g/mL}$ de cefuroxima sódica (Tabela 17).

Tabela 17: Obtenção da curva de Ringbom de cefuroxima sódica + $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ por espectrofotometria na região do visível em 510,0 nm

Pontos	Vol. (mL) cefuroxima sódica SR (500 µg/mL) adicionado	Concentração final (µg/mL)	Abs.
1	0,2	10,0	0,016
2	0,4	20,0	0,037
3	0,6	30,0	0,055
4	0,8	40,0	0,078
5	0,9	45,0	0,089
6	1,0	50,0	0,104
7	1,2	60,0	0,126
8	1,4	70,0	0,144
9	1,6	80,0	0,181
10	1,8	90,0	0,207
11	2,0	100,0	0,226
12	2,4	120,0	0,284
13	2,8	140,0	0,342
14	3,2	160,0	0,365
15	3,6	180,0	0,466
16	4,0	200,0	0,524
17	6,0	300,0	0,832
18	8,0	400,0	1,091

A curva de Ringbom (Figura 14) foi obtida utilizando-se logaritmo das concentrações (µg/mL) *versus* absorvância.

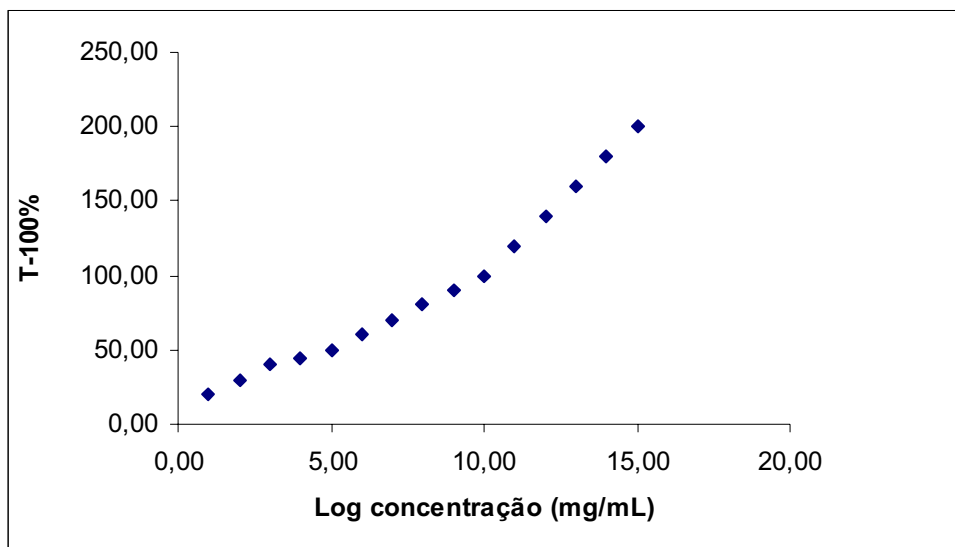


Figura 14: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível, $\lambda = 510$ nm, para solução de cefuroxima sódica substância de referência de 10,0 a 400,0 $\mu\text{g/mL}$.

6.2.4 Obtenção da curva analítica

Após a obtenção da curva de Ringbom, foi determinada a faixa de concentração que obedece a lei de Lambert-Beer.

Para obtenção da curva analítica foi preparada uma solução de cefuroxima sódica substância de referência a 500,0 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas com auxílio de micropipetador para obtenção de soluções com concentrações de 100,0 a 300,0 $\mu\text{g/mL}$ de cefuroxima sódica substância de referência (Tabela 18).

Foram adicionados em cada balão volumétrico, 1 mL de solução de Fe(III) 0,01 M e 500 μL de solução de *o*-fenantrolina 0,02 M sendo o volume completado para 10 mL com água purificada.

Tabela 18: Preparo da curva analítica de cefuroxima sódica por espectrofotometria na região do visível a 510,0 nm

Pontos	Vol. de cefuroxima sódica 500,0 µg/mL (mL)	Vol. (mL) de Fe(III) 0,01 M	Vol. (µL) de o- fen 0,02 M	Vol. de água qsp BV 10 mL (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	2,0	1	500	6,5	100,0
2	2,8	1	500	5,7	120,0
3	3,2	1	500	5,3	160,0
4	3,6	1	500	4,9	180,0
5	4,0	1	500	4,5	200,0
6	6,0	1	500	2,5	300,0

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de cefuroxima sódica em concentrações de 100,0 a 300,0 µg/mL pelo método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm estão representados na Figura 15.

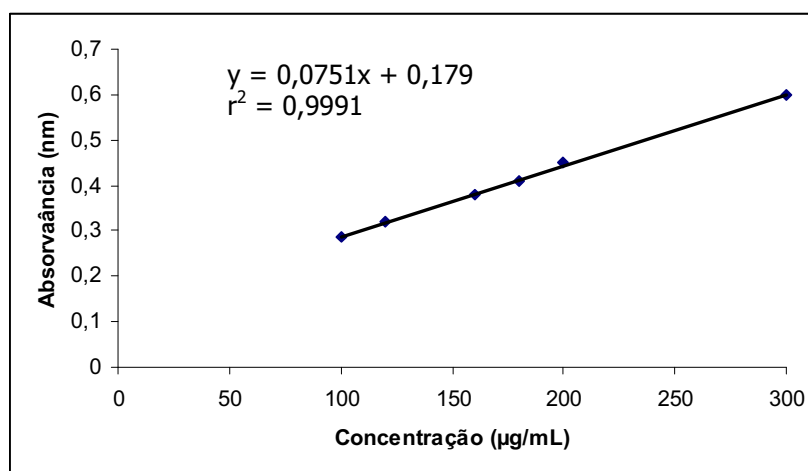


Figura 15: Representação gráfica da curva analítica da solução de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm.

6.2.5 Validação do método

O método foi validado para determinação da linearidade, precisão, robustez e exatidão (ICH, 2005; USP, 2009b).

- **Linearidade:** para validação do método, cinco concentrações (100,0 a 300,0 µg/mL) da SQR e cinco concentrações (100,0 a 300,0 µg/mL) da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi efetuado (Tabela 19).
- **Precisão:** repetibilidade (intramétodo) e precisão (intermétodo) determinadas na concentração de 120 µg/mL (100% da concentração do fármaco). A repetibilidade do método foi estudada pela análise das amostras em concentrações diferentes no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada por comparação do método em diferentes dias.
- **Exatidão:** foi determinada pelo teste de recuperação (Tabela 24).
- **Robustez:** a robustez do método foi determinada pela análise de algumas amostras sob várias condições. Os fatores considerados foram a variação do aparelho (Tabela 20) e a variação do comprimento de onda (Tabela 21).

Tabela 19: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do visível

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F cal	F tab
Entre	5	0,4274	0,07437	472,6*	3,11
Regressão linear	1	0,4271	0,4271	431,6*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,003355	0,000672	0,05	3,26
Resíduo	12	0,0032	0,000286		
Total	17	0,4295			

*Significativo para $p < 5\%$

Tabela 20: Robustez do método espectrofotométrico na região do visível representado pela mudança do equipamento

Ensaio	Abs*	Quant. encontrada (mg)	Teor %	Média ± e.p.m.	DPR(%)
I	0,233	768,15	102,42		
II	0,229	745,28	99,37	100,92 ± 1,11	1,57
III	0,254	757,33	100,97		

*cada valor é a média de três determinações distintas

e.p.m.: erro padrão médio

DPR: desvio padrão relativo

Tabela 21: Robustez do método espectrofotométrico na região do visível representado pelo aumento do comprimento de onda (515,0 nm)

Ensaio	Abs*	Quant. encontrada (mg)	Teor %	Média ± e.p.m.	DPR(%)
I	0,250	735,45	98,06	99,13 ± 0,15	0,22
II	0,261	749,30	99,90		
III	0,249	745,74	99,43		

*cada valor é a média de três determinações distintas

e.p.m.: erro padrão médio

DPR: desvio padrão relativo

6.2.6 Determinação de cefuroxima sódica

6.2.6.1 Preparo da solução de cefuroxima sódica SQR

Foram transferidos volumes de 50 mL de solução de cefuroxima sódica SQR com concentração de 1000,0 µg/mL para balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 1,0 µL de solução de Fe(III) e 500 µL de solução de *o*-fenantrolina. O pH foi ajustado em 4,2 com solução de ácido cítrico e o volume foi completado com água purificada para obtenção de uma solução com concentração 500 µg/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata.

6.2.6.2 Preparo da solução de cefuroxima sódica amostra

Foram pesados 20 frascos de cefuroxima sódica amostra para a determinação do peso médio, que foi de 0,770 g. Uma quantidade de pó equivalente a três pesos médios foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O pH foi ajustado em 4,2 com solução de ácido cítrico e o volume foi completado com água purificada para obtenção de uma solução com concentração 2,31 mg/mL. Uma alíquota de 21,64 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL onde também foram adicionados 1,0 mL de solução de Fe (III) e 500 µL de solução de *o*-fenantrolina. O volume foi completado com água purificada, para obter uma solução de concentração de 500 µg/mL.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 510 nm, utilizando-se cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico e água purificada adicionada dos reagentes solução de Fe(III) e solução de *o*-fenantrolina como branco.

6.2.6.3 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 4:

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

Equação 4

Em que:

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

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

A_A = Absorvância da amostra

A_{SR} = Absorvância da substância de referência

O teor percentual de cefuroxima sódica na amostra foi calculado pela Equação 5:

$$C_A\% = C_A \cdot 100 / C_t$$

Equação 5

Em que:

C_A = concentração de cefuroxima sódica encontrada na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_t = concentração de cefuroxima sódica teórica na amostra (mg)

Os valores experimentais da determinação de cefuroxima sódica nos frascos-ampola pelo método proposto encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22: Quantidades determinadas para o doseamento cefuroxima sódica amostra (750,0 mg) pelo método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm

Ensaio	Abs*	Quantidade	Teor %	Média ± e.p.m.	DPR(%)
		encontrada (mg)			
I	0,295	764,39	101,92	99,82 ± 0,66	1,48
II	0,299	755,07	100,68		
III	0,299	735,23	98,03		
IV	0,299	736,66	98,22		
V	0,297	749,51	99,93		
VI	0,296	751,06	100,14		

*cada valor é a média de três determinações distintas

e.p.m.: erro padrão médio

DPR%: desvio padrão relativo percentual

6.2.7. Teste de recuperação

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 2002; USP, 2009b). Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência são adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica injetável para a quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos, aos quais são adicionadas quantidades definidas de solução de cefuroxima sódica substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

6.2.7.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 25,0 mg de cefuroxima sódica substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 25 mL para o preparo de solução de cefuroxima sódica SQR com concentração de 1000 µg/mL. O pH foi ajustado em 4,2 com ácido cítrico. Desta solução, uma alíquota de 25,0 mL é transferida para balão de 50 mL e completado o volume com água purificada, obtendo-se concentração de 500 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração de 500 µg/mL, a partir de uma solução a 1000 µg/mL preparada pela dissolução de 100,05 mg de cefuroxima sódica pó em 100 mL de água purificada.

Para o ensaio de recuperação, foram transferidas alíquotas de 2,0 mL da solução amostra para balões de 10 mL denominados A, R1, R2 e R3. Foram adicionados 0,4, 1,2 e 1,6 mL de solução de cefuroxima sódica SR em concentração de 500 µg/mL, nos balões R1, R2 e R3, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão, foram transferidos 2,0 mL de solução de cefuroxima sódica SR a 500 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo solução de concentração de 100 µg/mL.

Os volumes nos balões foram completados com água purificada após a adição de 1 mL de solução de Fe(III) e 500 µL de solução de *o*-fenantrolina obtendo-se concentrações de 100,0; 120,0; 160,0 e 180,0 µg/mL para os balões A, R1, R2 e R3 (Tabela 23).

Tabela 23: Preparo das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm

	Volume solução-amostra (mL) (500 µg/mL)	Volume cefuroxima sódica SR (mL) (500 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	2,0	-	100,0
R1	2,0	0,4	120,0
R2	2,0	1,2	160,0
R3	2,0	1,6	180,0
P	-	2,0	100,0

6.2.7.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 9 descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

$$R\% = [C_f - C_u] / C_a \cdot 100$$

Equação 6:

Em que:

C_f = concentração da substância de referência + concentração da amostra

C_u = concentração da amostra

C_a = concentração da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para frasco-ampola de cefuroxima sódica estão na Tabela 24.

Tabela 24: Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico na região do visível em 510,0 nm

	Conc. teórica adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Abs*	Conc. encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
R1	20,0	0,248	122,19	101,83
R2	60,0	0,299	158,80	99,25
R3	80,0	0,347	178,00	98,88

* cada valor é a média de três determinações

6.2.8 Discussão

A espectrofotometria na região do visível em análise farmacêutica é amplamente usada para identificação e doseamento de fármacos e medicamentos. Todas as técnicas espectrofotométricas são baseadas na interação de uma substância química com energia radiante e, na maioria dos casos, o efeito desta interação é a absorção de energia pela substância que está sendo analisada (WATSON, 1999; OHANNESIAN; 2002).

Os métodos espectrofotométricos utilizados na determinação de cefalosporinas incluem níquel (II)-hidroxilamina (AGBABA et al., 1997), oxidação com Ce (IV) (AYAD et al., 1999a), formação de precipitado com excesso de Pb (II) (AYAD et al., 1999b), degradação alcalina com sulfeto de hidrogênio e formação de azul de metileno (ALWARTHAN et al., 1993) e neocuproína-cobre (II) (MORENO; SALGADO, 2008).

Diferentes parâmetros afetam a reação de oxidação e por isso a determinação da cefuroxima sódica foi otimizada. Isto inclui a acidificação do meio, a concentração das soluções de Fe (III) e de *o*-fenantrolina e a temperatura da reação.

A constante de equilíbrio do complexo $\text{Fe}(\text{o-fen})^{2+}_3$ é $2,5 \times 10^6$ a 25°C. A formação quantitativa do complexo pode ser concluída na faixa de pH entre 2 e 9 (AL-MOMANI, 2001). Diferentes valores de pH, na faixa de 3 e 5 foram testados. Em valores de pH > 5,0, a solubilidade da *o*-fenantrolina foi incompleta. O máximo sinal analítico foi observado em pH = 4,2, então a solução de *o*-fenantrolina foi mantida neste valor de pH.

O efeito da acidificação da solução de Fe (III) sobre a absorvância foi verificado. Os efeitos da mudança da concentração de H_2SO_4 (0,3-1,4 M) na absorvância do complexo formado mostram um aumento da absorção até um valor de 0,8 M. A influência da concentração de Fe (III) no sinal analítico também foi investigada e observou-se um máximo de absorvância obtido com solução de Fe (III) 0,01 M, que foi utilizado em todas as análises.

Diferentes concentrações de *o*-fenantrolina na faixa de 0,01-0,08 M em tampão citrato foram testadas. Em baixas concentrações, uma separação do pico foi observada devido à reação incompleta. Com o aumento da concentração da *o*-fenantrolina, a absorvância também aumentou mostrando um máximo na concentração de 0,06 M que foi utilizada durante o experimento.

O espectro de absorção mostrou pico de absorção máxima em 510,0 nm, utilizando solução aquosa de cefuroxima sódica a 500,0 µg/mL. A linearidade da curva analítica e a conformidade com a Lei de Beer foram comprovadas pelos valores dos coeficientes de correlação linear, 0,9991 no intervalo de concentração de 100,0 a 300,0 µg/mL. A equação da reta foi $y = 0,0751x + 0,179$.

A precisão intradia foi avaliada pela análise de cinco concentrações diferentes e a precisão interdia foi similarmente avaliada em três dias diferentes.

Os resultados em ambos os testes apresentaram alta precisão, sendo que o desvio padrão relativo não excedeu 2% (Tabela 22).

A performance do método foi determinada pelo cálculo do valor t e do valor F . Os resultados mostraram que os valores calculados de t e F não excederam o valor teórico com 95% de confiança (RODRIGUES, 1986). Estes resultados indicam que o método proposto não difere significativamente do método oficial.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas às soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. A recuperação média foi de 99,98%. Com este resultado comprovou-se a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos.

A robustez avaliou a confiabilidade do método proposto pela mudança do equipamento e por pequenas alterações do valor do comprimento de onda que era de 510,0 nm e foi alterado para 515,0 nm. Pode ser observado que mesmo com a alteração destes parâmetros, os valores encontrados em três determinações da cefuroxima sódica no medicamento estão dentro do valor preconizado que é de 99-102 % do teor.

6.3 Espectrofotometria na região do infravermelho

6.3.1 Considerações gerais

Processos de síntese de novos fármacos necessitam do desenvolvimento de procedimentos de análise confiáveis que permitam a identificação da espécie química, bem como sua determinação quantitativa (SADLEJ-SOSNOWSKA et al., 2006).

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica popular utilizada para a identificação de vários grupos funcionais. Entre os métodos de identificação recomendado pela British Pharmacopoeia (2005), espectroscopia no IV parece emergir como o melhor método aplicável a cerca de 60% das substâncias.

Os espectros de infravermelho são provocados pelos diferentes modos de vibração e de rotação de uma molécula. Nos comprimentos de onda abaixo de 25 nm a radiação possui energia suficiente para provocar modificações dos níveis da energia vibracional da molécula, e estas modificações são acompanhadas por alterações nos níveis de energia rotacional; portanto, essa energia é bastante grande para originar as transições vibratórias no estado fundamental da molécula, juntamente com as rotações associadas. Isto significa que as curvas de absorção de infravermelho são muito mais específicas que as da região ultravioleta e visível, ainda que alguns picos possam, todavia perder a nitidez (BARNARD; CHAYEN, 1970).

A maioria das aplicações da espectroscopia no infravermelho se refere à compostos orgânicos, principalmente em virtude da água, o principal solvente dos compostos inorgânicos, absorver fortemente além de 1,5 μm . Além disso, os compostos inorgânicos possuem bandas de absorção largas, enquanto as substâncias orgânicas podem proporcionar numerosas bandas mais estreitas (JEFFREY et al., 1992).

O espectro de absorção de um composto no infravermelho pode ser encarado como uma espécie de "impressão digital" do composto. A fim de detectar uma impureza numa substância, pode-se fazer uma comparação entre o espectro da substância e o espectro do composto puro; as impurezas provocam o aparecimento de bandas de absorção extras no espectro (HARRIS, 2001).

Bugay e colaboradores (1996) demonstraram que a técnica é eficaz para identificação de formas polimórficas da cefepima.

Apesar de a espectrofotometria no infravermelho ser aceita oficialmente para a identificação de diversos compostos, a literatura registra algumas publicações que utilizam

esta técnica para a análise quantitativa (KOROLKOVAS, 1988; AL-ZOUBI et al., 2002, MATKOVIC et al., 2004; USP, 2009). Assim, procedeu-se à determinação dos parâmetros para a determinação quantitativa de cefuroxima sódica por espectrofotometria no infravermelho.

6.3.2 Material e método

6.3.2.1 Obtenção da curva analítica

Foi utilizado espectrofotômetro convencional SHIMADZU (Columbia, USA) com digitalização de espectros que permite obter arquivos eletrônicos das análises.

Foram tomadas massas equivalentes a 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 e 2,0 mg de cefuroxima sódica SQR (previamente diluída em brometo de potássio a 1:10) e diluídas em brometo de potássio (Merck PA) previamente dessecado até peso constante e foram preparadas as pastilhas para leitura com massa total de 250 mg por pastilha (Tabela 25). As leituras foram realizadas em absorvância, a fim de avaliar a intensidade dos picos, apresentados na Tabela 7.

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão de cefuroxima sódica em concentrações de 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/pastilha pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho estão representados na Figura 16.

Tabela 25: Preparo da curva analítica de cefuroxima sódica por espectrofotometria no infravermelho

Pontos	Quantidade cefuroxima sódica (mg)*	Quantidade KBr (mg)	Concentração final (mg/250 mg)
1	5,0	245,0	0,5
2	7,0	243,0	0,7
3	10,0	240,0	1,0
4	15,0	235,0	1,5
5	20,0	230,0	2,0

* Cefuroxima sódica na diluição de 1:10 em KBr.

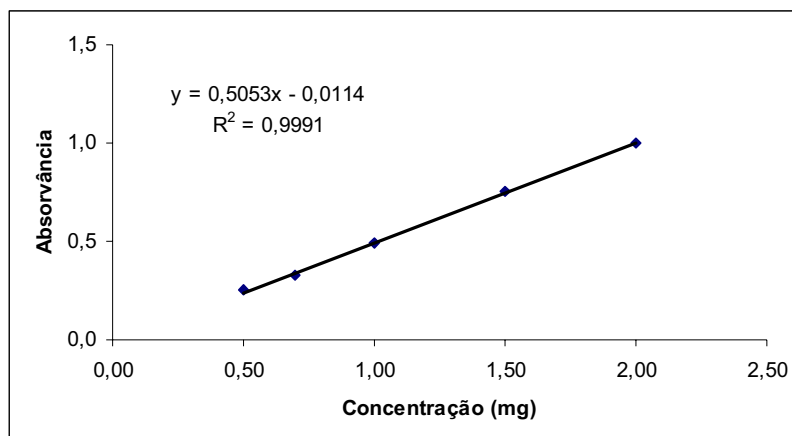


Figura 16: Representação gráfica da curva analítica de cefuroxima sódica pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.

6.3.2.2 Determinação de cefuroxima sódica

6.3.2.2.1. Preparo das pastilhas de cefuroxima sódica SQR

Foram tomadas massas de pó equivalentes a 1,5 mg de cefuroxima sódica SQR (15,0 mg da diluição 1:10) e devidamente homogeneizadas com 235 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 250 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.3.2.2.1.2 Preparo das pastilhas de cefuroxima sódica amostra

Foram tomadas massas de pó equivalentes a 1,5 mg de cefuroxima sódica substância amostra (15,0 mg da diluição 1:10) em relação ao peso médio e devidamente homogeneizadas com 235 mg de brometo de potássio, perfazendo uma massa total da pastilha de 250 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.3.2.3 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 7:

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

Equação 7

Na qual:

C_A = concentração da amostra (mg)

C_{SR} = Concentração da substância de referência (mg)

A_A = Absorvância da amostra

A_{SR} = Absorvância da substância de referência

O teor percentual de cefuroxima sódica na amostra foi calculado pela Equação 8:

$$C_A \% = C_A \cdot 100 / C_t$$

Equação 8

Na qual:

C_A = concentração de cefuroxima sódica encontrada na amostra (mg)

C_t = concentração de cefuroxima sódica teórica na amostra (mg)

A concentração da amostra (em mg) foi calculada a partir da curva analítica desenvolvida, utilizando a equação da reta ($y = 0,5053x - 0,0114$), sendo x a concentração e y a absorvância.

A Tabela 26 representa as quantidades de cefuroxima sódica encontradas nas pastilhas analisadas.

Tabela 26: Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho

Ensaio	Absorvância*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	0,7512	1,5202	101,35		
II	0,7439	1,4857	99,05		
III	0,7521	1,5147	100,98		
IV	0,7505	1,4803	98,69	100,25 ± 0,44	1,00
V	0,7495	1,5084	100,56		
VI	0,7498	1,5130	100,87		

*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

6.3.3 Teste de recuperação

Foi analiticamente pesado o equivalente a 1,0 mg de cefuroxima sódica em relação ao peso médio (diluição 1:10 em KBr) e 100,0; 200,0 e 400,0 µg de cefuroxima sódica SQR (diluição 1:10 em KBr) e homogeneizados com quantidade suficiente de KBr para o preparo das pastilhas com massa de 250 mg. Assim, foram adicionados 100,0; 200,0 e 400,0 µg de cefuroxima sódica SQR às pastilhas, obtendo-se concentrações de 1,1; 1,2 e 1,4 mg de cefuroxima sódica em R1, R2 e R3, respectivamente. Em seguida, as leituras foram realizadas, e a intensidade dos picos determinada em absorvância.

6.3.3.1 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 9, descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002):

$$R\% = [C_f - C_u] / C_a \cdot 100$$

Equação 9

Na qual:

C_f = concentração da substância de referência + concentração da amostra

C_u = concentração da amostra

C_a = concentração da substância de referência adicionada

A Tabela 27 representa a preparação das pastilhas de cefuroxima sódica SQR e amostra utilizadas na realização do teste de recuperação.

Tabela 27: Preparação das pastilhas para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método espectrofotométrico na região do infravermelho

	Quantidade amostra (mg)	Substância referência (mg)	Total por pastilha (mg)
A	1,0	-	1,0
R1	1,0	0,100	1,1
R2	1,0	0,200	1,2
R3	1,0	0,400	1,4

* Diluição sólida 1:100 em KBr.

Os valores encontrados no teste de recuperação para cefuroxima sódica amostra estão representados na Tabela 28.

Tabela 28: Teste de recuperação de cefuroxima sódica SQR adicionada à cefuroxima sódica amostra pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.

	Adicionado (mg)	Encontrado (mg)	Recuperação (%)	Média (%)	DPR(%)
R1	0,1	0,10058	100,58	99,83	0,82
R2	0,2	0,19738	98,69		
R3	0,4	0,40009	100,23		

*Cada valor é a média de três determinações.

6.3.4 Discussão

Na primeira etapa do trabalho de desenvolvimento de método analítico foi estudado o espectro infravermelho de cefuroxima sódica SQR para identificar as bandas do espectro, o que demonstrou que a cefuroxima sódica apresenta uma banda intensa em $3365,78\text{ cm}^{-1}$ que se atribui ao grupamento amina primário da molécula. Os resultados evidenciaram relação linear entre as concentrações de cefuroxima sódica substância de referência utilizada na preparação das pastilhas *versus* absorvância, sendo possível a construção da curva analítica, a qual apresentou equação da reta $y = 0,5053x - 0,0114$ e

coeficiente de regressão linear de 0,9991, indicando a linearidade do método e, portanto, a possibilidade de o mesmo ser utilizado para quantificação de cefuroxima sódica.

Os resultados encontrados para o medicamento foram de 100,25%, revelando boa exatidão e precisão, com desvio padrão relativo de 1,00.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas às soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 99,83%. Com este resultado foi comprovada a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de cefuroxima sódica amostra para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,82.

Atualmente, a combinação de espectrofotometria no infravermelho próximo e calibração multivariada vêm sendo amplamente utilizada na determinação de diversas substâncias, dentre elas, fármacos e produtos alimentícios e vem apontando como métodos emergentes de análise quantitativa (MORGANO et al., 2005).

Assim, podemos concluir que a presente investigação demonstrou que a espectrofotometria no infravermelho, até então empregada para a identificação de substâncias, pode estender-se à quantificação dos fármacos, tornando possível sua aplicação em análises rotineiras de controle de qualidade.

6.4 Método de Análise Microbiológica

6.4.1 Método da Difusão em Ágar

6.4.1.1 Considerações gerais

O doseamento microbiológico é um método físico, no qual um micro-organismo é usado como revelador. Dentre as metodologias utilizadas para o doseamento, o método da difusão em ágar, cilindros em placas, que emprega meio de cultura sólido inoculado e distribuído em placas, em sistema de bicamada, através do qual a substância se difunde. É essencial que se trabalhe com réplicas, de forma a compensar os desvios inerentes ao ensaio ou acidental (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

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

A partir de dados obtidos de outros fármacos (GOMES; SALGADO, 2006, TOZO; SALGADO, 2007; MORENO; SALGADO, 2007) foi realizado o desenvolvimento e a validação de ensaio de quantificação de cefuroxima sódica SQR e amostra, utilizando método microbiológico de difusão em ágar, que relaciona o tamanho da zona de inibição com a concentração da substância ensaiada.

6.4.1.2 Material e Método

Para realização dos testes preliminares foram utilizados cefuroxima sódica SQR e cefuroxima sódica injetável descritas no item 4. Os testes preliminares foram realizados para o desenvolvimento da metodologia de análise para cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável, alternando-se alguns parâmetros apresentados na Tabela 29.

Tabela 29: Parâmetros testados para a avaliação de cefuroxima sódica por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
Meio de cultura	Ágar BHI
	Meio nº 1 de Grove-Randall
	Meio nº 2 de Grove-Randall
	Tryptic Soy Ágar
Solução diluente	Água purificada
	Solução tampão pH 6,0
	Solução tampão pH 8,0
Concentração do inóculo	0,5%; 1,0% e 2,0%
Concentração das soluções	25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL
	30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL

Os meios de cultura utilizados, assim como a água purificada, foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Foram empregadas placas de Petri com 20,0 mm de altura e 100,0 mm de diâmetro e *templates* de aço inoxidável. Estes materiais foram esterilizados em estufa a 200°C por 1 hora.

A partir dos resultados obtidos com os diferentes micro-organismos e meios de cultura, foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico. Assim foram escolhidos *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) como micro-organismo padrão na concentração de 2,0%, meios nº 1 e nº 2 de Grove-Randall para camada base e de superfície respectivamente e água como solução diluente do fármaco nas concentrações 30,0, 60,0 e 120 µg/mL. A padronização do ensaio foi realizada utilizando-se técnica 3 x 3 descrita para outros agentes antimicrobianos (F. BRAS. IV, 1988).

6.4.1.2.1 Preparo do inóculo

O micro-organismo teste foi mantido em ágar Casoy inclinado para manutenção e repicado para caldo BHI, que após 18 horas de crescimento em estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás®) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ foi utilizado para a padronização do inóculo, que foi realizada em espectrofotômetro a 580 nm com transmitância de $25 \pm 2\%$. Após a padronização, o inóculo (2%) foi utilizado em meio nº 2 de Grove-Randall (F. BRAS. IV, 1988). Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.4.1.2.2 Preparo das soluções de cefuroxima sódica SQR

Foram transferidos 50,0 mg de cefuroxima sódica substância de referência, exatamente pesados para balão volumétrico de 100,0 mL e dissolvidos em água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 500 µg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, respectivamente.

6.4.1.2.3 Preparo das soluções de cefuroxima sódica amostra

A partir do peso médio dos frascos-ampola, foram exatamente pesados o equivalente a 50,0 mg de cefuroxima sódica, transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL e dissolvidos em água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 500 µg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, respectivamente.

6.4.1.3 Curva analítica

Foram utilizadas 18 placas de Petri e o teste foi realizado em câmara de fluxo laminar com a transferência de 20 mL do meio de cultura nº 1 de Grove-Randall para o preparo da camada base. Com auxílio de pipetador automático e, após a solidificação da camada base, foram adicionados 5 mL de meio de cultura nº 2 de Grove-Randall com inóculo a 2%. Em seguida foram adicionados *templates* de aço inoxidável estéreis, um em cada placa e com auxílio de pipetador automático, 200 µL das soluções padrão e amostra foram adicionados em delineamento 3 x 3 (Figura 17). As placas foram colocadas em estufa incubadora à $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 18 horas, foram realizadas medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de um paquímetro digital.

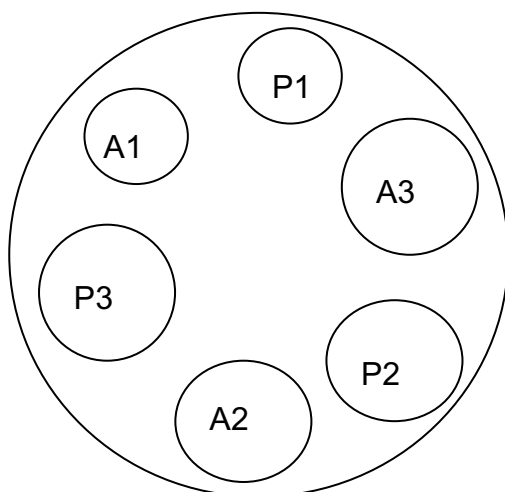


Figura 17: Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções SQR (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P1 (30 µg/mL); P2 (60 µg/mL); P3 (120,0 µg/mL); A1 (30 µg/mL); A2 (60 µg/mL) e A3 (120,0 µg/mL).

A curva analítica foi construída em gráfico logarítmico da concentração *versus* diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da SQR. Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos para soluções em diferentes concentrações de padrão e amostra de cefuroxima sódica encontram-se na Tabela 30.

Tabela 30: Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de cefuroxima sódica pelo ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar

	Concentração das soluções (µg/mL)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) ± e.p.m.	DPR (%)
P1	30,0	18,04	18,05 ± 0,75	1,07
		18,05		
		18,05		
P2	60,0	20,01	20,01 ± 0,88	1,25
		20,02		
		20,01		
P3	120,0	22,05	22,05 ± 0,95	1,34
		22,05		
		22,04		
A1	30,0	18,06	18,05 ± 0,76	1,08
		18,05		
		18,04		
A2	60,0	20,00	20,02 ± 0,85	1,20
		20,01		
		20,02		
A3	120,0	22,05	22,05 ± 0,93	1,32
		22,05		
		22,05		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

A equação da reta para representação gráfica da curva analítica foi determinada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva foram utilizados os valores da média de três determinações, do diâmetro das concentrações 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL. A curva foi construída usando o programa Excel 98 (Figura 18).

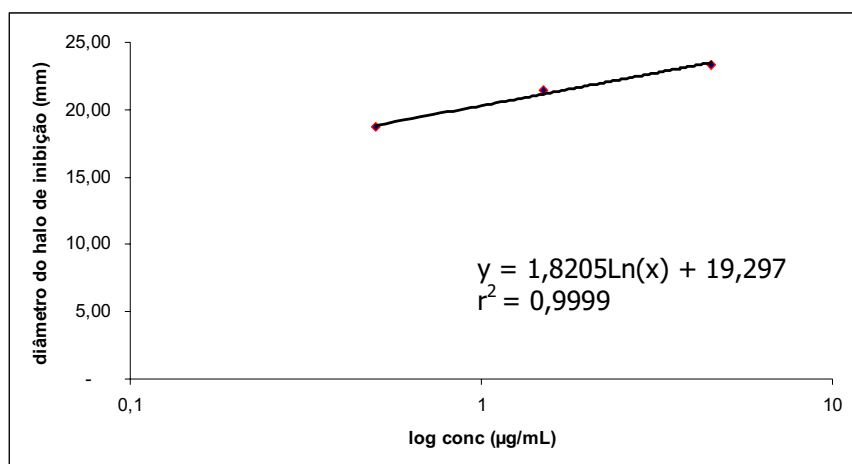


Figura 18: Representação gráfica da curva analítica de cefuroxima sódica pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.

6.4.1.4 Validação do método

O método foi validado para determinação da linearidade, precisão, robustez e exatidão (ICH, 2005; USP, 2009b).

- **Linearidade:** para validação do método, três concentrações (30,0, 60,0 e 120,0 µg/mL) da SQR e 3 concentrações (30,0, 60,0 e 120,0 µg/mL) da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA (Tabela 34).
- **Precisão:** repetibilidade (intramétodo) e precisão (intermétodo) foram determinadas. A repetibilidade do método foi estudada pelas análises das amostras em concentrações diferentes no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada por comparação do método em diferentes dias.
- **Exatidão:** foi determinada pelo teste de recuperação.
- **Robustez:** a robustez do método foi determinada pela análise de algumas amostras sob várias condições. Os fatores considerados foram meio de cultura (Tabela 31) e solvente utilizado para diluição da amostra e do padrão (Tabela 32).

Tabela 31: Robustez do método microbiológico por difusão em ágar, considerando a mudança do meio de cultura

Ensaio	Teor (%) encontrado com meio de Grove-Randall	Teor (%) encontrado com ágar BHI
I	99,76	100,35
II	100,31	99,85
III	99,94	99,89
IV	100,13	101,25
V	99,38	98,99
VI	99,64	101,05
Média ± e.p.m.	99,96 ± 0,15	100,23 ± 0,18

Tabela 32: Robustez do método microbiológico por difusão em ágar, considerando o solvente utilizado para diluição da amostra e da SQR

Ensaio	Teor (%) encontrado com água como solvente	Teor (%) encontrado com solução tampão pH 6,0
I	99,76	99,85
II	100,31	101,56
III	99,94	101,85
IV	100,13	98,65
V	99,38	99,87
VI	99,64	100,56
Média ± e.p.m.	99,96 ± 0,15	100,39 ± 0,22

6.4.1.5 Determinação da potência do medicamento

Foram utilizadas 18 placas de Petri para o doseamento de cefuroxima sódica em frascos-ampola. Em cada ensaio foram utilizadas 6 placas de Petri e os resultados foram analisados estatisticamente pela ANOVA.

O teste foi realizado em capela de fluxo laminar com a transferência do meio de cultura nº 1 de Grove-Randall para o preparo da camada base. Com auxílio de pipetador automático e, após a solidificação da camada base, foi adicionado meio de cultura nº 2 de Grove-Randall com inóculo a 2%. Em seguida, foram adicionados *templates* de aço inoxidável estéreis, um em cada placa e com auxílio de pipetador automático, 200 µL das

soluções padrão e amostra foram adicionadas em delineamento 3 x 3 (Figura 17). As placas foram colocadas em estufa incubadora à $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 18 horas, foram realizadas medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de um paquímetro digital.

Em cada ensaio os resultados foram analisados estatisticamente e a potência de cada doseamento calculada pela equação de Hewitt (1977).

Os resultados obtidos na determinação de cefuroxima sódica amostral, no delineamento 3 x 3 estão apresentados na Figura 19.

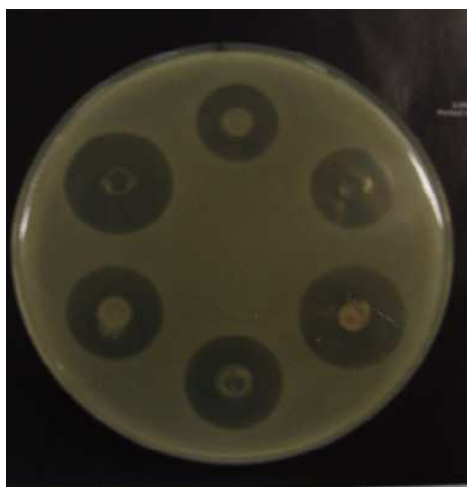


Figura 19: Determinação da potência de cefuroxima sódica amostra pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.

A potência da cefuroxima sódica amostra, calculados pela fórmula de HEWITT (1977) (Equação 10) está apresentado na Tabela 33.

$$T/R (\%) = \text{Antilog } M \times 100$$

Equação 10

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

Em que:

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

I = logaritmo da razão das doses

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

Tabela 33: Valores experimentais obtidos para o doseamento de cefuroxima sódica amostra (750 mg) pelo ensaio microbiológico difusão em ágar

Ensaio	Valor encontrado* (mg/ampola)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	748,23	99,76		
II	750,32	100,31		
III	749,58	99,94	99,96 ± 0,15	0,33
IV	750,98	100,13		
V	749,54	99,38		
VI	749,34	99,64		

$P < 0,05$

e.p.m. = erro padrão da média

DPR (%) = desvio padrão relativo percentual

*Cada valor é a média de seis determinações.

A validação do método foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopeia Brasileira (1988) para ensaio 3 x 3 utilizando *templates* e está representada na Tabela 34.

Tabela 34: Análise da variância dos dados obtidos do doseamento de cefuroxima sódica pelo ensaio microbiológico difusão em ágar

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F cal	F tab
Preparação	1	2,523	2,523	5,019*	4,24
Regressão	1	217,08	217,08	173,688*	4,24
Desvio de paralelismo	1	4,084	4,084	3,267	4,24
Quadrático	1	0,005	0,005	0,004	4,24
Diferença de Quadrático	1	0,350	0,350	0,280	4,24
Entre doses	5	224,043	44,809	35,851*	2,6
Entre placas	5	1,067	2,613	1,093	2,6
Dentro (erro)	25	31,246	1,250		
Total	35	388,36			

* significativo $p < 0,05$

6.4.1.6 Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado com a finalidade de verificar a exatidão do método proposto da mesma forma que para o doseamento das soluções amostra, com a diferença que, a solução amostra estará adicionada de padrão.

No desenvolvimento do teste de recuperação do doseamento microbiológico foram padronizados valores de 5, 10 e 20% de SQR adicionada, acima dos 100% preconizados.

6.4.1.6.1 Preparo das soluções

Neste ensaio, preparou-se uma solução de SQR com concentração de 1000 µg/mL pesando-se 50,0 mg de SQR em 50 mL de água purificada. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 25,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água para uma concentração final de 500 µg/mL. A solução amostra foi preparada pesando-se o equivalente a 100,0 mg de cefuroxima sódica e dissolvidos em água num balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se concentração final de 1000 µg/mL.

As soluções para o teste de recuperação foram preparadas de acordo com a Tabela 35.

Tabela 35: Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de cefuroxima sódica no doseamento microbiológico método de difusão em ágar.

	Vol. (µL) amostra adicionada (1000 µg/mL)	Vol. (µL) solução padrão adicionada (0,5 mg/mL)	Concentração de amostra + padrão em 10 mL (µg/mL)
R1	300	30	31,5
	600	60	63,0
	1200	120	126,0
R2	300	60	33,0
	600	120	66,0
	1200	240	132,0
R3	300	120	36,0
	600	240	72,0
	1200	480	144,0

Após a execução do ensaio, as placas foram colocadas em estufa incubadora a 35,0° C ± 2,0° C por 18 horas. Foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de paquímetro.

6.4.1.6.2 Cálculos

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela expressão descrita pela AOAC (AOAC, 2002).

$$R\% = [(P_F - P_A)/P_P] \cdot 100$$

Equação 11

Em que:

P_F = potência da substância de referência + amostra

P_A = potência da amostra

P_P = potência da substância de referência adicionada

Os resultados encontram-se representados na Tabela 36.

Tabela 36: Valores experimentais do teste de recuperação obtidos em amostras de cefuroxima sódica amostra, pelo ensaio microbiológico, método de difusão em ágar

	Adicionado (%)	Encontrado (%)	Recuperação	Média
R 1	5,0	5,06	101,14	100,77
R 2	10,0	10,06	100,63	
R 3	20,0	20,11	100,55	

6.4.1.7 Discussão

A quantificação de agentes antimicrobianos por métodos químicos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria mostram-se precisos, porém não fornecem verdadeira indicação sobre a atividade biológica (ADAMS et al., 1998).

O ensaio microbiológico de difusão em ágar tem por finalidade a avaliação da potência de antimicrobianos por meio das dimensões dos halos de inibição formados pela difusão da solução do fármaco no meio adequado inoculado com o micro-organismo teste.

Uma vantagem deste tipo de determinação é não requerer equipamentos especializados e dispendiosos, além de não utilizar solventes potencialmente tóxicos para o analista e para o meio ambiente.

Embora os métodos microbiológicos demonstrem um desempenho relativamente simples, muitos aspectos devem ser considerados no seu desenvolvimento, para assegurar que eles sejam suficientemente seguros e exatos, tais como: temperatura de incubação, espessura do ágar, micro-organismo utilizado, pH da solução diluente entre outras características.

Além disso, os ensaios biológicos podem sofrer adequações para determinações específicas, como em preparações farmacêuticas, em que frequentemente se recorre ao uso de soluções diluentes tamponadas, e são capazes de indicar a atividade biológica de produtos de degradação possivelmente originados (THOMPSON, 2000). Desta forma, os ensaios biológicos continuam sendo essenciais para o desenvolvimento e controle de qualidade de substâncias antimicrobianas.

Alguns artigos relatam o doseamento de antibióticos e antimicrobianos pelo método de difusão em ágar cilindros em placas (SOUZA; BITTENCOURT; SOUZA-FILHO, 2004; SALGADO; LOPES; LUCCHESI, 2006; TOZO; SALGADO, 2007; SALGADO; RONCARI, 2006; MORENO; SALGADO, 2007).

Na determinação dos parâmetros para a padronização do ensaio microbiológico método de difusão em ágar cilindros em placa para cefuroxima sódica (Tabela 29), optou-se por trabalhar com *Micrococcus luteus* ATCC 9341, pois o crescimento do micro-organismo foi bastante homogêneo e os halos de inibição formados apresentaram-se bem definidos, além da menor patogenicidade em relação aos outros micro-organismos.

A velocidade de crescimento do micro-organismo não foi afetada diretamente pela composição do meio, pois, nos três meios testados, observou-se crescimento homogêneo. Foi selecionado o meio nº 1 de Grove-Randall para a camada de superfície e o meio nº 2 de Grove-Randall para a camada base devido ao melhor crescimento do micro-organismo e a fácil visualização do halo de inibição.

A concentração do inóculo empregada deve ser suficiente para apresentar crescimento homogêneo do micro-organismo, propiciando um contraste com a zona de inibição de crescimento, sem apresentar colônias isoladas. Os melhores resultados e o crescimento mais uniforme foram obtidos com o inóculo com concentração de 2,0 %.

Em soluções diluentes diferentes, observou-se que na água, os halos de inibição formados foram maiores e mais uniformes, sendo este solvente compatível com o

crescimento bacteriano e com a atividade do fármaco.

Para assegurar a validade do ensaio microbiológico de difusão em ágar, na determinação da potência de cefuroxima sódica, foram utilizados três concentrações diferentes para amostra, idênticas às da SQR, em delineamento 3 x 3 (F. BRAS. IV, 1988). Estas doses estão em progressão geométrica, já que o sistema utilizado possui relação linear entre logaritmo da concentração da substância testada e os diâmetros dos halos de inibição. As diluições foram definidas de acordo com o tamanho dos halos produzidos, de forma a não se sobreporem e ficarem bem espaçados.

Através dos resultados obtidos foi construída a curva analítica com solução de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL. As soluções foram feitas em triplicata, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9999. A equação da reta foi $y = 1,8205\ln(x) + 19,297$.

O doseamento do método difusão em ágar cilindros em placas desenvolvido e validado para cefuroxima sódica demonstrou ser preciso, exato e linear.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas da SQR foram adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Obteve-se neste teste recuperação média de 100,77%.

A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de cefuroxima sódica amostra. O desvio padrão relativo foi 0,3376 %, sendo pode chegar até 15% de acordo com as literaturas oficiais (F. BRAS. IV, 1988; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002; USP, 2009b; BP, 2010), e o teor de cefuroxima sódica determinado na amostra foi calculado pela equação de Hewitt (1977) obtendo teor médio de 99,96 %, comprovando a proximidade dos resultados obtidos pelo método proposto com os valores aceitos como referência, que para produto acabado deve variar no máximo, 10% em relação ao valor nominal, segundo referências farmacopeicas (F. BRAS. IV, 1988; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002; USP, 2009b; BP, 2010).

A análise estatística dos resultados de diâmetro dos halos obtidos foi matematicamente verificada pela análise da variância (ANOVA) e os resultados obtidos, com *F* significativo validam o método microbiológico para cefuroxima sódica (Tabela 34).

De acordo com as farmacopeias britânica, europeia e brasileira, se o modelo de retas paralelas é utilizado, as duas linhas dose - resposta da amostra e da SQR devem ser paralelas e lineares nas concentrações utilizadas no cálculo. Estas condições são verificadas por meio de análise estatística, descrita nestes códigos. Dentre as variáveis avaliadas no ensaio, aquelas que necessitam ser cumpridas para validar o método proposto estão a

regressão linear e a variação entre doses, que devem ser significativas. A variação entre preparações, o desvio de paralelismo, desvio de linearidade e variação entre placas devem ser não-significativos (Tabela 34). Em todos os ensaios estas condições foram cumpridas.

O método proposto consiste de uma técnica que permite indicar a potência do produto uma vez que apresenta sensibilidade, linearidade, exatidão e precisão adequadas, segundo conceitos sobre validação apresentados na Farmacopeia Brasileira (1988) e por Riley e Rosanske (1997).

6.4.2 Método Turbidimétrico

6.4.2.1 Considerações gerais

Existem vários trabalhos que descrevem a quantificação de antimicrobianos, utilizando o ensaio microbiológico, método de difusão em ágar – cilindros em placas (FROEHLICH, 1991; FRATINI, 1993; MARONA; SCHAPOVAL, 1998; EV; SCHAPOVAL, 2002; BONILLA, 2004; GOMES; SALGADO, 2006; SALGADO; LOPES, 2006; TOZO; SALGADO, 2007; MORENO; SALGADO, 2007), entretanto, nenhum artigo utilizando o método turbidimétrico foi encontrado.

O método turbidimétrico está descrito na Farmacopeia Brasileira (F. BRAS. IV, 1988) e uma de suas principais vantagens é o menor tempo de análise.

Este método baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido pela turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados/sensíveis ao agente antimicrobiano contido em um meio. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa.

6.4.2.2 Material e método

Para realização dos testes preliminares foram utilizados cefuroxima sódica SQR e cefuroxima sódica injetável descritas no item 4. Os testes preliminares foram realizados para o desenvolvimento da metodologia de análise para cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável, alternando-se alguns parâmetros apresentados na Tabela 37.

Para a incubação dos micro-organismos utilizou-se aparelho incubador Shaker Marconi® modelo MA420 e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás®). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro Beckman modelo DU® 530.

Dez mililitros dos meios de cultura utilizados foram colocados em tubos de ensaio com 20,0 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro e foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos, assim como a água purificada.

A partir dos resultados obtidos com os diferentes micro-organismos e meios de cultura foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico. A padronização do ensaio foi realizada utilizando-se técnica 3 x 3 descrita para outros agentes antimicrobianos (F. BRAS. IV, 1988).

Tabela 37: Parâmetros testados para a avaliação de cefuroxima sódica por ensaio microbiológico-método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
Meio de cultura	Caldo BHI
	Caldo Muller Hinton
	Caldo Casoy
Soluções diluentes	Água purificada
	Solução tampão pH 6,0
	Solução tampão pH 8,0
Concentração do inóculo	0,5%; 1,0% e 2,0%
Concentração das soluções	25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL
	30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL

A partir dos resultados obtidos com os diferentes micro-organismos e meios de cultura, foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico. Assim foram escolhidos *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) como micro-organismo padrão na concentração de 2,0%, caldo BHI e água como solução diluente do fármaco nas concentrações 30,0, 60,0 e 120 µg/mL.

6.4.2.2.1 Preparo do inóculo

As culturas de *Micrococcus luteus* foram repicadas com alça de platina para caldo BHI e mantidas, para seu desenvolvimento, em estufa microbiológica à temperatura de $35,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo à 530 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de $25,0\% \pm 2,0\%$. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (F. BRAS. IV, 1988).

6.4.2.2.2 Preparo das soluções de cefuroxima sódica SQR

Foram transferidos 50,0 mg de cefuroxima sódica SQR, exatamente pesados para balão volumétrico de 100,0 mL e dissolvidos em água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.4.2.2.3 Preparo das soluções de cefuroxima sódica amostra

A partir do peso médio dos frascos-ampola, foram exatamente pesados o equivalente a 50,0 mg de cefuroxima sódica, transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL e dissolvidos em água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.4.2.3 Curva analítica

Inicialmente procedeu-se o preparo do inóculo como descrito no item 6.4.2.2.1, em seguida, distribuiu-se em tubos idênticos contendo 10,0 mL de caldo BHI estéril, 200 μL de cada uma das soluções do padrão e da amostra descritas nos itens 6.4.2.2.2 e 6.4.2.2.3,

respectivamente. Adicionou-se em cada tubo 1,0 mL de caldo BHI inoculado. Foram usados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas 3 X 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de cefuroxima sódica) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas 3 réplicas.

Incubou-se, em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de $35,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

Determinou-se a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm. O aparelho foi padronizado em absorvância zero através de branco contendo 10,0 mL de caldo e 0,5 mL de formaldeído 12% (controle negativo).

Foram feitas três curvas em três dias diferentes.

A Figura 20 representa o esquema da determinação da potência da cefuroxima sódica pelo método turbidimétrico.

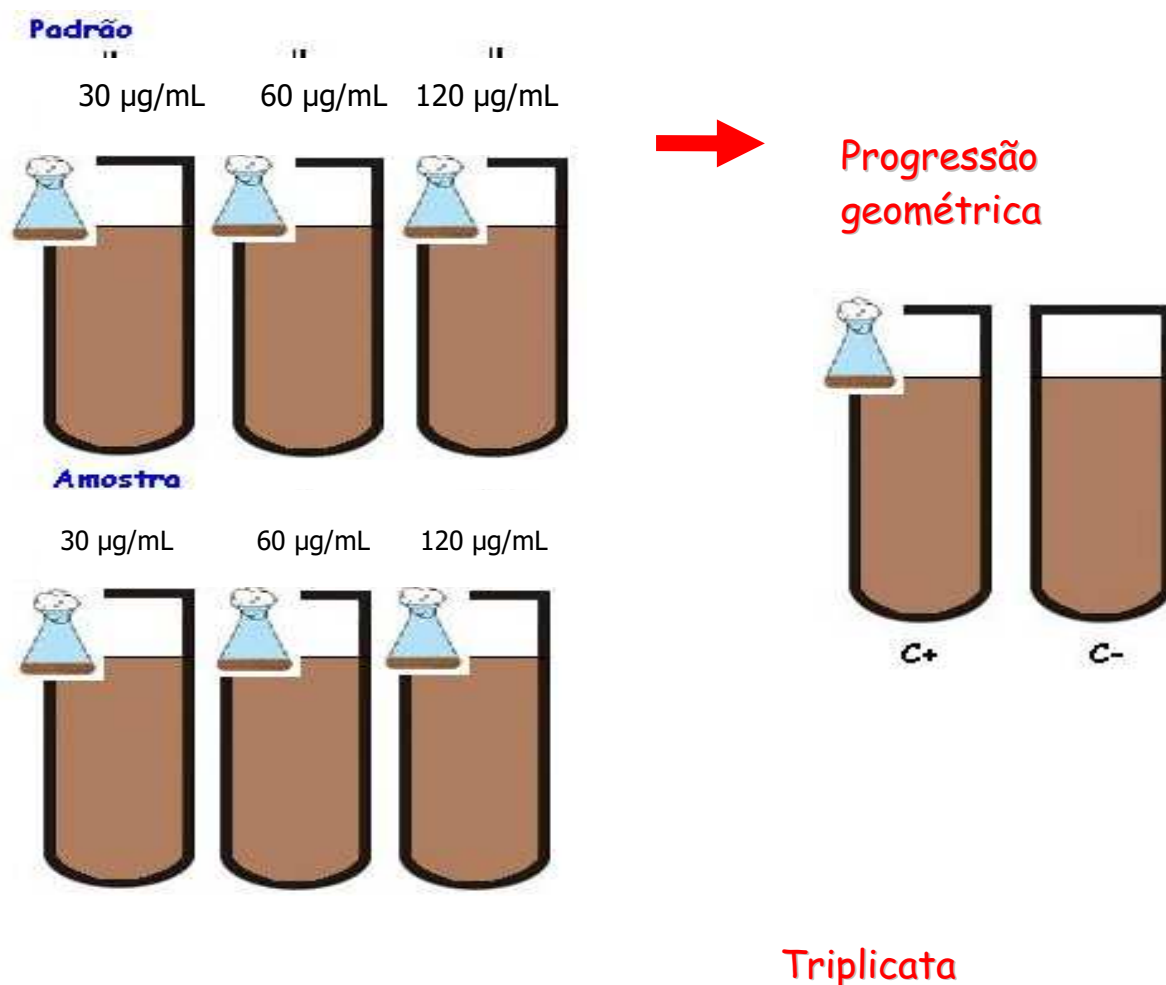


Figura 20: Esquema da determinação da potência da cefuroxima sódica pelo método turbidimétrico.

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de cefuroxima sódica SQR e amostra são mostrados na Tabela 38.

Tabela 38: Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de cefuroxima sódica, pelo método turbidimétrico

Concentração das soluções (µg/mL)	Absorvância		Absorvância média ± e.p.m.		DPR(%)	
	P	A	P	A	P	A
30,0	0,586	0,573				
	0,583	0,572	0,585 ±	0,574 ±	0,12	0,21
	0,585	0,576	0,04	0,07		
60,0	0,545	0,551				
	0,544	0,550	0,546 ±	0,550 ±	0,32	0,10
	0,550	0,549	0,11	0,03		
120,0	0,475	0,479	0,479 ±	0,474 ±		
	0,480	0,478	0,12	0,07	0,36	0,21
	0,482	0,475				
DPR =					0,26	0,17

*Cada valor corresponde a média de três determinações.

P = padrão; A = amostra

As equações das retas para representação gráfica das curvas analíticas foram determinadas por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva foram utilizados os valores da média de três determinações, das concentrações 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL. As curvas foram construídas usando o programa Excel 98 (Figura 21).

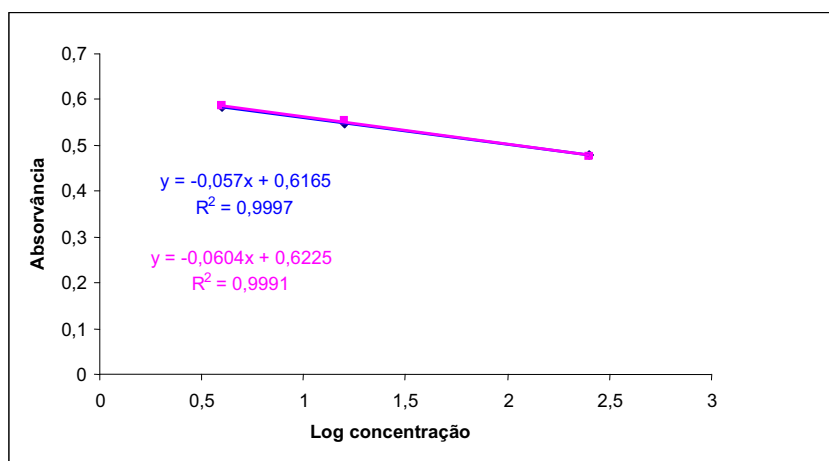


Figura 21: Curvas analíticas de soluções de cefuroxima sódica SQR (azul) e amostra (rosa), em concentrações de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.

6.4.2.4 Validação do método

O método foi validado para determinação da linearidade, precisão, robustez e exatidão (ICH, 2005; USP, 2009b).

- **Linearidade:** para validação do método, três concentrações da SQR (30,0, 60,0 e 120,0 µg/mL) e 3 concentrações (30,0, 60,0 e 120,0 µg/mL) da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi efetuado (Tabela 41).
- **Precisão:** repetibilidade (intramétodo) e precisão (intermétodo) foram determinadas. A repetibilidade do método foi estudada pelas análises das amostras em concentrações diferentes no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada por comparação do método em diferentes dias.
- **Exatidão:** foi determinada pelo teste de recuperação (Tabela 44).
- **Robustez:** a robustez do método foi determinada pela análise de algumas amostras sob várias condições. Os fatores considerados foram tempo de incubação (Tabela 39) e o volume do meio de cultura (Tabela 40).

Tabela 39: Robustez do método microbiológico pela técnica turbidimétrica, considerando o tempo de incubação

Ensaio	Teor (%) encontrado com tempo	Teor (%) encontrado com tempo
	de 18 h	de 24 h
I	99,80	100,15
II	100,08	99,98
III	98,31	101,56
Média ± e.p.m.	99,39 ± 0,49	100,56 ± 0,46

Tabela 40: Robustez do método microbiológico pela técnica turbidimétrica, considerando o volume do meio de cultura

Ensaio	Teor (%) encontrado com	Teor (%) encontrado com 12 mL de
	10 mL de caldo BHI	caldo BHI
I	99,80	100,25
II	100,08	101,36
III	98,31	99,97
Média ± e.p.m.	99,39 ± 0,49	100,52 ± 0,42

6.4.2.5 Determinação da potência do medicamento

Para doseamento da forma farmacêutica, adicionaram-se 200 µL das soluções do padrão e da amostra, com concentração de 60,0 µg/mL, concentração de referência do ensaio (F. BRAS. IV, 1988), em séries de seis tubos contendo 10,0 mL de caldo BHI estéril. Adicionou-se para cada tubo 1,0 mL de caldo BHI inoculado. Incubou-se, em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de 35,0°C ± 2,0°C, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

Determinou-se a absorvância para cada tubo em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm. Em todas as análises um controle positivo (micro-organismo e meio de cultura) e negativo (meio de cultura) foram utilizados. O ensaio foi realizado em três dias.

Em cada ensaio os resultados foram analisados estatisticamente e a potência de cada doseamento calculada pela equação de Hewitt (1977).

Os dados das curvas analíticas de cefuroxima sódica calculados pela ANOVA são mostradas na Tabela 41.

Tabela 41: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de cefuroxima sódica, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F cal	F tab
Preparação	1	0,000257	0,000257	6,19*	4,24
Regressão	1	0,123999	0,123999	2538,9*	4,24
Desvio de paralelismo	1	0,000005	0,000005	0,99	4,24
Quadrático	1	0,000267	0,000267	3,47	4,24
Diferença de quadrático	1	0,000002	0,000002	0,02	4,24
Desvio de linearidade	2	0,000268	0,000089	1,79	3,38
Entre doses	5	0,224449	0,033779	4875092*	2,6
Entre tubos	5	0,000020	0,000003	0,05	2,6
Dentro (erro)	25	0,002273	0,00057	-----	----
Total	35	0,225621	----	----	----

* significativo $p < 0,05$

Os valores da potência de cefuroxima sódica amostra determinados pelo método proposto, encontram-se na Tabela 42.

Tabela 42: Valores determinados para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método turbidimétrico

Dia	Valor encontrado* ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	Média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
1	59,88	99,80		
2	60,05	100,08	99,37 $\pm$ 0,475	0,95
3	58,99	98,31		

*Cada valor corresponde à média de seis determinações.

6.4.2.6 Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado com a finalidade de verificar a exatidão do método proposto da mesma forma que para o doseamento das soluções amostra, com a diferença que, a solução amostra estará adicionada de padrão.

No desenvolvimento do teste de recuperação do doseamento microbiológico foram padronizados valores de 5, 10 e 20% de SQR adicionada, acima dos 100% preconizados.

O preparo das soluções está apresentado na Tabela 43.

Tabela 43: Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de cefuroxima sódica amostra no doseamento microbiológico método turbidimétrico

	Vol. (mL) amostra adicionada (500 µg/mL)	Vol. (mL) solução padrão adicionada (1000 µg/mL)	Concentração de amostra + padrão em 10 mL (µg/mL)*
Amostra	1,2	----	60,00
R1	1,2	0,037	63,75
R2	1,2	0,075	67,50
R3	1,2	0,150	75,00
Padrão	----	1200	60,00

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água.

**Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

Após a execução do ensaio, os tubos foram colocados em banho-maria com agitador orbital, à temperatura de 35,0 ° C ± 2,0 ° C, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo.

A percentagem de cefuroxima sódica amostra recuperada foi calculada pela equação da reta, seguido pela equação 12 (AOAC, 2002).

$$\%R = [(C_r - C_a)/C_p] \times 100$$

Equação 12

em que:

C_r = concentração da solução amostra adicionada da substância química de referência (µg/mL);

C_a = concentração da amostra (µg/mL)

C_p = concentração teórica da substância química de referência adicionada (µg/mL).

Na Tabela 44 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método turbidimétrico.

Tabela 44: Valores do teste de recuperação obtidos em amostras de cefuroxima sódica, pelo ensaio microbiológico, método turbidimétrico

	Adicionado (µg/mL)	Encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)
Recuperação 1	37,5	37,78	100,76	100,81
Recuperação 2	75,0	75,88	101,18	
Recuperação 3	150,0	150,75	100,50	

6.4.2.7 Discussão

O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico permite a determinação da potência do fármaco, pela medida da turbidez (absorvância), causada pela inibição do micro-organismo pelo antimicrobiano.

No desenvolvimento do método turbidimétrico para cefuroxima sódica foram testadas concentrações da SQR que variaram de 30,0 a 120,0 µg/mL. Foram escolhidas as concentrações 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, uma vez que apresentaram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (1988).

A utilização do micro-organismo *M. luteus* baseia-se na sua sensibilidade frente à cefuroxima sódica e também devido ao crescimento do micro-organismo ter sido bastante homogêneo e os halos de inibição formados apresentaram-se bem definidos, além da menor patogenicidade em relação aos outros micro-organismos.

A linearidade do método foi comprovada pelos componentes de paralelismo, coeficiente de correlação e análise de variância dos dados da curva analítica.

A análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da SQR e amostra. Os coeficientes de correlação são 0,9997 e 0,9991, para a SQR e amostral, respectivamente, valores próximos da unidade, os quais são excelentes tratando-se de um ensaio biológico. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da SQR da amostra.

O coeficiente de variação das absorvâncias obtidas pela inibição do crescimento bacteriano no doseamento da amostra foi, em média, de 0,95%, menor que o recomendado de 5% (BRASIL, 2003).

A seletividade foi evidenciada pelo cálculo da homogeneidade de variâncias (F) e pela comparação das médias (t), estando as duas variáveis dentro do esperado, ou seja, valor calculado menor que valor tabelado.

A quantidade de cefuroxima sódica presente nas amostras analisadas, 99,37%, está de acordo com os compêndios oficiais que é de 90,0 a 110,0% (F. Bras. IV, 1988; USP 31, 2009).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada a média de 100,81%.

Os parâmetros estudados para a validação do método turbidimétrico atenderam às especificações para a adequada quantificação da cefuroxima sódica na forma farmacêutica solução injetável.

O método proposto consiste de uma técnica que permite indicar a potência do produto, uma vez que apresenta sensibilidade, linearidade, repetitibilidade, exatidão e precisão adequadas (F. BRAS. IV, 1988).

Também é vantajoso, pois não utiliza reagentes tóxicos ou solventes e é mais rápido que o método de difusão em ágar, visto que são necessários somente 4 horas de incubação, enquanto o outro necessita de no mínimo 18 horas.

6.5 Acidimetria

6.5.1 Considerações gerais

As reações de neutralização incluem a titulação de bases livres, ou de bases formadas pela hidrólise de sais de ácidos fracos, por uma solução padrão de ácido (acidimetria) e a titulação de ácidos livres, ou de ácidos formados pela hidrólise de sais de bases fracas, por uma base padrão (alcalimetria), sendo que as reações envolvem a combinação dos íons hidrogênio e hidróxido para formar água.

As penicilinas e cefalosporinas possuem como requisito mínimo para a atividade a presença de um anel β -lactâmico ligado a uma função ácida. Por hidrólise alcalina com quantidade exatamente conhecida de NaOH rompe-se o anel β -lactâmico e forma-se o sal sódico do derivado do ácido penicilóico. Com solução padrão de HCl doseia-se o NaOH que não reagiu.

6.5.2 Material e método

6.5.2.1 Preparo das soluções

NaOH 0,1 M: a solução foi preparada segundo Morita & Assumpção (1995) e a Farmacopeia Brasileira (1988), dissolvendo-se 40 g de hidróxido de sódio em água purificada isenta de dióxido de carbono e o volume foi completado para 1000 mL em balão volumétrico com o mesmo solvente. Para a padronização, foi pesado exatamente cerca de 5 g de biftalato de potássio previamente triturado e dessecado a 120 °C durante 2 horas. O biftalato foi dissolvido em 75 mL de água isenta de dióxido de carbono. Duas gotas de fenolftaleína SI foram adicionadas à solução que foi titulada com hidróxido de sódio até o aparecimento de cor rosa permanente. A molaridade foi calculada, sendo que cada 204,2 mg de biftalato de potássio equivalem a 1 mL de hidróxido de sódio 1 M. Uma alíquota de 100,0 mL desta solução foi diluída para 1000 mL em balão volumétrico com água purificada isenta de dióxido de carbono, obtendo-se a solução de NaOH 0,1 M.

HCl 0,1 M: a solução também foi preparada segundo Morita & Assumpção (1995) e a Farmacopeia Brasileira (1988), através da diluição de 85 mL de ácido clorídrico R em água purificada para obter 1000 mL e padronizada como segue: foi pesado exatamente cerca de 1,5 g de carbonato de sódio anidro padrão primário previamente dessecado a 270 °C

durante 1 hora e dissolvido em 100 mL de água; 2 gotas de vermelho de metila SI foram adicionadas e a solução foi titulada até coloração fracamente rosa. A solução foi aquecida até ebulição, resfriada e a titulação continuou, repetindo o processo de aquecimento e resfriamento conforme necessário, até que a cor rosa fraca não fosse mais afetada pela continuação da ebulição. A molaridade foi calculada, sendo que cada 52,99 mg de carbonato de sódio anidro equivalem a 1 mL de ácido clorídrico 1 *M*. Uma alíquota de 100,0 mL desta solução foi diluída para 1000 mL em balão volumétrico com água purificada isenta de dióxido de carbono, obtendo-se a solução de HCl 0,1 *M*.

Fenolftaleína SI: foi dissolvido 1 g de fenolftaleína em 100 mL de etanol R.

Vermelho de metila SI: foram dissolvidos 100 mg de vermelho de metila em 100 mL de etanol R.

6.5.2.2 Determinação de cefuroxima sódica no medicamento

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 750 mg de cefuroxima sódica em 25 mL de água purificada isenta de dióxido de carbono, adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína SI e neutralizou-se com HCl 0,1 *M*. Adicionou-se um volume de 25,0 mL de NaOH 0,1 *M* e aqueceu-se em banho-maria durante 20 minutos a 80 °C, tomando a precaução de evitar a absorção de dióxido de carbono. Esfriou-se e titulou-se o excesso de NaOH 0,1 *M* com HCl 0,1 *M* usando fenolftaleína SI como indicador. Repetiu-se a operação sem a cefuroxima sódica; a diferença entre as duas titulações representa a quantidade de NaOH gasta, sendo que 1 mol de NaOH 0,1 *M* corresponde a 44,63 mg de cefuroxima sódica (medida como C₁₆H₁₅N₄NaO₈S).

6.5.2.2.1 Cálculos

O percentual de cefuroxima sódica foi calculado através da Equação 13:

$$\text{Teor (\%)} = [v \times \text{mEq} \times 100] / m$$

Equação 13

Na qual:

v = mL de hidróxido de sódio 0,1 *M*

mEq = miliequivalente da cefuroxima sódica (44,63 mg)

m = massa de cefuroxima sódica (mg)

Os valores experimentais da determinação de cefuroxima sódica amostra pelo método proposto encontram-se na Tabela 45.

Tabela 45: Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método acidimétrico

Ensaio	Volume de NaOH 0,1 M (mL)	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	17,07	761,83	101,57	100,51 ± 0,62	1,39
II	16,87	752,90	100,38		
III	16,60	740,85	98,78		
IV	17,00	758,71	101,16		
V	16,74	747,10	99,61		
VI	17,07	761,83	101,57		

*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

6.5.3 Teste de recuperação

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 2002; USP 32, 2009b). Desta forma, quantidades conhecidas de SQR são adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de cefuroxima sódica SQR, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

6.5.3.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 1000,0 mg de cefuroxima sódica SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de cefuroxima

sódica SQR com concentração de 10,0 mg/mL.

Para o ensaio de recuperação foram adicionados 2,5; 5,0 e 10,0 mL da solução de cefuroxima sódica SQR em concentração de 10,0 mg/mL, nos frascos Erlenmeyers R1, R2 e R3, respectivamente, após a neutralização com HCl a frio.

Para o preparo da solução de referência foram pesados analiticamente 750,0 mg de cefuroxima sódica SQR e transferida para erlenmeyer de 250 mL, dissolvendo-se em 25 mL de água purificada isenta de dióxido de carbono previamente neutralizada à fenolftaleína SI com NaOH 0,01 *M*.

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 750 mg de cefuroxima sódica em 25 mL de água purificada isenta de dióxido de carbono, adicionaram-se 2 gotas de fenolftaleína SI e neutralizou-se com HCl 0,1 *M*. Adicionou-se um volume de 25 mL de NaOH 0,1 *M* e aqueceu-se em banho-maria durante 20 minutos a 80 °C, tomando a precaução de evitar a absorção de dióxido de carbono. Esfriou-se e titulou-se com HCl 0,1 *M* usando fenolftaleína SI como indicador. Os volumes de solução de referência foram adicionados logo após a neutralização a frio. Repetiu-se a operação sem a cefuroxima sódica; a diferença entre as duas titulações representa a quantidade de NaOH gasta, sendo que 1 mL de NaOH 0,1 *M* corresponde a 44,63 mg de cefuroxima sódica (medida como $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$).

O preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação encontra-se descrito na Tabela 46.

Tabela 46: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método acidimétrico

	Quantidade de amostra (mg)	Volume da solução e referência (10 mg/mL)	Concentração final teórica (mg)
A	750	-	750
R1	750	2,5	775
R2	750	5,0	800
R3	750	10,0	850

6.5.3.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 14, descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002):

$$R\% = [C_f - C_u] / C_a \cdot 100$$

Equação 14

Na qual:

C_f = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

C_u = quantidade da amostra

C_a = quantidade da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para cefuroxima sódica amostra estão representados na Tabela 47.

Tabela 47: Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método acidimétrico

	Adicionado (mg)	Volume NaOH 0,1 M (mL)*	Encontrado (mg)	Recuperação (%)
R1	25,0	16,55	738,62	98,48
R2	50,0	16,90	754,24	100,56
R3	100,0	17,13	764,51	101,93

*Cada valor é a média de três determinações.

6.5.4 Discussão

A análise volumétrica, também chamada titrimetria, refere-se à análise química quantitativa efetuada pela determinação do volume de uma solução, cuja concentração é exatamente conhecida, que reage quantitativamente com um volume conhecido de solução que contém a substância a ser determinada.

Na análise titrimétrica, o reagente de concentração conhecida é o titulante e a substância que se titula é o titulado (JEFFREY et al., 1992; HARRIS, 2001).

No atual estágio da Química Analítica, a titrimetria que contempla a titulação volumétrica rompe a barreira dos anos para atingir secularidade. Num mundo de cromatografias, espectrofotometrias e espectroscopias, a titulação segue resolvendo problemas e sempre despertando discussões sobre sua validade, o que permite dentro deste mundo instrumental, desafiar o conhecimento dos analistas na busca de equações químicas que possam interpretar o processo titulométrico, tais como: estequiometria, reação química,

cinética, equilíbrio ou outras análises que legitimem a titulação. Uma grande vantagem da titulação é dispensar, na maioria das análises, o padrão analítico de referência. Além disso, utiliza menor volume de solvente e de aparatos sofisticados (LEITE, 2004).

O ensaio de determinação de cefuroxima sódica por método volumétrico (acidimetria) demonstrou-se simples, de fácil execução, rápido, não havendo a necessidade de equipamentos sofisticados, grande número de reagentes ou longas etapas de extração e preparação da amostra.

A degradação hidrolítica de antibióticos é frequentemente muito usada como etapa preliminar nos seus procedimentos analíticos de determinação, sendo a hidrólise alcalina a mais empregada. A finalidade dessa etapa preliminar é romper o anel β -lactâmico e formar o sal sódico do derivado do ácido peniciloico, podendo ser facilmente determinado por acidimetria (KOROLKOVAS, 1988; MARTINÈZ; FALCÓ; CABEZA, 2002).

O teor médio de cefuroxima sódica determinado no medicamento foi de 100,51%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência dos excipientes.

O método de quantificação por acidimetria foi validado através de análise estatística e fatores como sensibilidade, precisão e exatidão.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas às quantidades de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Obteve-se neste teste recuperação média de 100,32 %. Com este resultado comprovou-se a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de cefuroxima sódica amostra. O desvio padrão relativo foi de 1,39.

6.6 Volumetria em meio não-aquoso

6.6.1 Considerações gerais

Os fármacos que não podem ser doseados em meio aquoso, por serem demasiadamente pouco básicos ou pouco ácidos, são doseados em meio não-aquoso. Isso ocorre porque a teoria considera ácido qualquer substância que tenha tendência a doar um próton e base a substância que aceitará o próton. As substâncias que proporcionam pontos finais indefinidos, em virtude de serem ácidos fracos ou bases fracas, em solução aquosa, frequentemente proporcionam pontos finais mais satisfatórios quando as titulações são efetuadas em meios não-aquosos. Uma vantagem adicional é a de que muitas substâncias que são insolúveis em água são suficientemente solúveis em solventes orgânicos para que possam ser titulados nestes meios não-aquosos (ADAMS; BERGOLD, 2001; ALMEIDA et al., 2002).

Dentre as vantagens do método, destacam-se a rapidez, exatidão, possibilidade de titular dois ou mais fármacos em mistura pela escolha adequada de solventes, entre outras.

O ensaio de determinação de cefuroxima sódica por método volumétrico em meio não-aquoso demonstrou-se simples, de fácil execução, rápido, não havendo a necessidade de equipamentos sofisticados, grande número de reagentes ou longas etapas de extração e preparação da amostra.

A necessidade de degradação prévia a fim de romper o anel β -lactâmico foi descartada, uma vez que a titulação em meio não-aquoso frequentemente proporciona pontos finais satisfatórios quando comparados àqueles obtidos utilizando-se soluções aquosas (bastante indefinidos) em se tratando de ácidos ou bases fracas. Conforme mencionado anteriormente, sabe-se que a capacidade de as substâncias atuarem como ácido ou base depende muito da natureza do solvente empregado, uma vez que ele provê o meio necessário para que ressalte um ou outro caráter. Assim, a intensidade com que o soluto reage com o solvente está na estreita dependência da força dos dois (KOROLKOVAS; FERREIRA, 1986; JEFFREY et al., 1992; HARRIS, 2001).

6.6.2 Material e método

6.6.2.1 Preparo das soluções

Ácido perclórico 0,1 M: a solução foi preparada segundo a Farmacopeia Brasileira (1988), pela diluição de 8,5 mL de ácido perclórico R em 500 mL de ácido acético glacial e 21 mL de anidrido acético; após resfriamento, foi adicionado ácido acético glacial para obter 1000 mL e padronizada como segue: foram pesados exatamente cerca de 700 mg de biftalato de potássio previamente triturado e dessecado a 120 °C durante 2 horas e dissolvidos em 50 mL de ácido acético glacial; 2 gotas de violeta cristal SI foram adicionadas e a solução foi titulada com ácido perclórico até viragem do violeta ao verde azulado. Foi realizado um ensaio em branco a fim de verificar o volume de ácido perclórico consumido pelos 50 mL de ácido acético glacial e a molaridade foi calculada. Cada 20,42 mg de biftalato de potássio equivalem a 1 mL de HClO₄ 0,1 M.

Violeta cristal SI: foram dissolvidos 100 mg de cristal violeta em 10 mL de ácido acético glacial.

6.6.3 Determinação de cefuroxima sódica no medicamento

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 250 mg de cefuroxima sódica em 30 mL de ácido acético glacial; adicionou-se 2 gotas de violeta cristal SI e titulou-se com solução de HClO₄ 0,1 M. Repetiu-se a operação sem a amostra; calculou-se a quantidade de HClO₄ gasta, sendo que 1 mol de HClO₄ 0,1 M corresponde a 44,63 mg de cefuroxima sódica (medida como C₁₆H₁₅N₄NaO₈S).

6.6.3.1 Cálculos

O percentual de cefuroxima sódica foi calculado através da equação 15:

$$\text{Teor (\%)} = [v \times \text{mEq} \times 100] / m$$

Equação 15

Na qual:

v = mL de ácido perclórico 0,1 M

mEq = miliequivalente da cefuroxima sódica (44,63 mg)

m = massa de cefuroxima sódica (mg)

Os valores experimentais da determinação de cefuroxima sódica amostra pelo método proposto encontram-se na Tabela 48.

Tabela 48: Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelo método volumétrico em meio não-aquoso

Ensaio	Volume de HClO ₄ 0,1 M (mL)	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	5,60	249,93	99,97	100,86 ± 0,73	1,79
II	5,76	257,37	102,94		
III	5,50	245,46	98,18		
IV	5,73	255,89	102,35		
V	5,70	254,39	101,75		
VI	5,60	249,93	99,97		

*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

6.6.4 Teste de recuperação

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 2002; USP 32, 2009b). Desta forma, quantidades conhecidas de SQR são adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução amostra para balões volumétricos, aos quais foram adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de cefuroxima sódica SQR, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

6.6.4.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 1250,0 mg de cefuroxima sódica SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de cefuroxima sódica SQR com concentração de 12,5 mg/mL.

Para o ensaio de recuperação dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 250 mg de cefuroxima sódica em 30 mL de ácido acético glacial em frascos Erlenmeyers de 250 mL denominados: A, R1, R2 e R3. Foram adicionados 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução de cefuroxima sódica SQR em concentração de 12,5 mg/mL, nos frascos R1, R2 e R3, respectivamente. Para o preparo da solução padrão foram pesados analiticamente 250,0 mg de cefuroxima sódica SQR e transferida para erlenmeyer de 250 mL, dissolvendo-se em 30 mL de ácido acético glacial. Adicionou-se 2 gotas de violeta cristal SI e titulou-se com solução de HClO_4 0,1 M até viragem do violeta ao verde azulado. Repetiu-se a operação sem a amostra e a SQR; calculou-se a quantidade de HClO_4 gasta, sendo que 1 mL de HClO_4 0,1 M corresponde a 44,63 mg de cefuroxima sódica (medida como $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{NaO}_8\text{S}$).

O preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação encontra-se descrito na Tabela 49.

Tabela 49: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método volumétrico em meio não-aquoso

	Quantidade de amostra (mg)	Volume da solução de referência (10 mg/mL)	Concentração final (mg)
A	250,0		250,0
R1	250,0	1,0	262,5
R2	250,0	2,0	275,0
R3	250,0	4,0	300,0

6.6.4.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002):

$$R\% = [C_f - C_u] / C_a \cdot 100$$

Equação 16

Na qual:

C_f = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

C_u = quantidade da amostra

C_a = quantidade da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para cefuroxima sódica amostra estão representados na Tabela 50.

Tabela 50: Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra pelo método volumétrico em meio não-aquoso

	Adicionado (mg)	Volume HClO₄ 0,1 M (mL)*	Encontrado (mg)	Recuperação (%)	Média (%)
R1	12,5	5,61	250,20	100,08	100,41
R2	25,0	5,64	251,72	100,69	
R3	50,0	5,62	251,12	100,45	

*Cada valor é a média de três determinações.

6.6.5 Discussão

A capacidade de substâncias atuarem como ácido ou como base depende muito da natureza do solvente empregado, sendo que ele desempenha papel muito importante na determinação do caráter ácido-base de uma substância uma vez que ele provê o meio necessário para que ressalte um ou outro caráter. Assim, a intensidade com que o soluto reage com o solvente está na estreita dependência da força dos dois (HARRIS, 2001).

Os solventes utilizados são de natureza relativamente neutra ou ácida; o caráter básico do fármaco é que determina a escolha do solvente. Dos disponíveis, o ácido acético glacial é o mais empregado devido à solubilidade de muitos fármacos e de as reações serem realizadas com ácido perclórico, no caso de bases fracas. O ácido acético glacial é uma base muito mais fraca do que a água e o ácido acético protonado, um ácido mais forte que o íon hidrônio. A debilidade relativa de ácido acético como base e a força de ácido acético protonado como ácido atuam conjuntamente, diminuindo a extensão das reações ácido-básicas em ácido acético em comparação com as reações em água. Os processos de dissociação ocorrem em extensões diferentes, com o ácido perclórico apresentando maior tendência para a dissociação.

Assim, o ácido acético glacial tem capacidade para diferenciar as forças do ácido perclórico, sendo um solvente diferenciador (KOROLKOVAS; FERREIRA, 1986).

O método de detecção do ponto final de doseamento varia de acordo com o pKa

das bases em água. Naquelas que apresentam pKa da ordem de 4, a detecção é por meio de indicadores; já naquelas cujos pKas se situam na faixa de 1 a 4, via de regra é potenciométrica (KOROLKOVAS; FERREIRA, 1986). Os indicadores mais utilizados e as respectivas mudanças de cor são: alaranjado de metila (amarelo a vermelho), azul de timol (amarelo a vermelho), naftolbenzeína (amarelo a verde), verde de malaquita (verde azulado a amarelo), cristal violeta (violeta a verde azulado). Apesar de via de regra, a determinação da cefuroxima deva ser potenciométrica, pois o pKa é igual a 2,5, no nosso trabalho foi possível determinar a quantidade do fármaco com o auxílio de indicador.

O teor médio de cefuroxima sódica determinado no medicamento foi de 100,86%, demonstrando que o método é capaz de detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência dos excipientes.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas às quantidades de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,40%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de cefuroxima sódica amostra. O desvio padrão relativo foi de 0,73.

O método de quantificação por volumetria em meio não aquoso foi validado por meio de análise estatística e fatores como sensibilidade, precisão e exatidão.

6.7 Iodometria

6.7.1 Considerações gerais

Os métodos volumétricos que utilizam reações de oxidação e redução dependem dos potenciais das semi-reações envolvidas no processo. Entretanto, a existência de potenciais favoráveis não é a única condição para se ter uma titulação redox adequada, pois as reações envolvidas em tais processos são frequentemente, lentas.

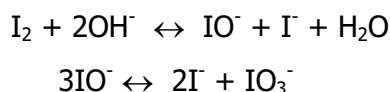
Assim sendo, além dos potenciais favoráveis, os agentes oxidantes e redutores devem ser estáveis no solvente utilizado e a substância a ser determinada deve ser colocada sob um determinado estado da oxidação, definido e estável, antes da titulação ser iniciada. Os reagentes apropriados a este fim, adicionados em excesso ao meio reagente, devem possuir a propriedade de reduzir ou oxidar convenientemente a amostra, sem interferir no resultado final da análise, caso contrário o excesso desta espécie deve ser destruído antes de se iniciar a titulação.

Os métodos volumétricos que envolvem a oxidação de íons iodeto, são baseados na semirreação:



Os íons iodeto exercem uma ação redutora sobre os sistemas fortemente oxidantes, com a formação de quantidades equivalentes de iodo. O iodo liberado é então titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio.

Em pH menor que 8,0 o potencial de redução do sistema iodo-iodeto é independente do pH, mas em meio alcalino, o iodo reage com íons hidroxila, formando íons hipoiodito e iodeto. Os íons hipoiodito são muito instáveis e passam rapidamente a iodato:



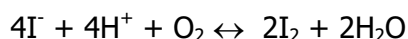
O potencial de redução de certas substâncias aumenta consideravelmente quando se aumenta a concentração de íons hidrogênio na solução. Isso permite que muitos ânions que são oxidantes fracos possam ser reduzidos quantitativamente com íons iodeto.

Através de um controle de pH da solução é possível, às vezes, titular a forma reduzida de uma substância com iodo e em seguida a forma oxidada com tiosulfato de sódio.

O potencial de redução de diversos sistemas pode ser mudado pela adição de uma substância que forme um complexo, um composto pouco dissociado ou pouco solúvel com um ou dois compostos, ou com ambos.

Uma importante aplicação do método iodométrico é a determinação do conteúdo do ácido de soluções. A reação processa-se muito rapidamente e é quantitativa. Se um excesso de iodato e iodeto de potássio é adicionado a uma solução diluída de ácido clorídrico ou outro ácido forte, os íons hidrogênio produzem uma quantidade equivalente de iodo, que pode ser titulada com tiosulfato. Este método é adequado na titulação de muitas soluções diluídas de ácidos fortes, porque uma brusca mudança de cor é obtida no ponto final.

Duas fontes de erro são importantes na titulação iodométrica: a oxidação de uma solução de iodeto pelo ar e a perda de iodo por volatilização. Os íons iodeto em meio ácido são oxidados lentamente pelo oxigênio atmosférico.



Essa reação é muito lenta em meio neutro, mas sua velocidade aumenta com a diminuição do pH e é bastante acelerada pela exposição à luz, pela reação do iodeto com substâncias oxidantes presentes no meio e pela presença de substâncias que apresentem um efeito catalítico.

Na titulação iodométrica de agentes oxidantes, onde um excesso de iodeto se faz presente em solução, não se deve demorar muito para iniciar a titulação do iodo. Se for necessário um maior período de tempo para a reação se completar, o ar deve ser removido da solução e a atmosfera em contato com ela deve ser de dióxido de carbono. Isto pode ser feito adicionando-se ácido à solução a ser titulada com um excesso de iodeto de potássio na forma sólida e em seguida fechar o frasco.

A perda de iodo por volatilização (AMERINE; OUGH, 1980) é evitada pela adição de um grande excesso de íons iodeto, os quais reagem com o iodo para formar íons triiodeto, segundo a reação:



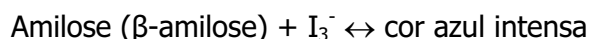
Em titulações à temperatura ambiente ($T \approx 25^\circ\text{C}$), as perdas de iodo por volatilização são desprezíveis se a solução contiver cerca de 4% (m/v) de iodeto de potássio.

A formação de espécies I_3^- não altera nem introduz erros mensuráveis no método iodométrico, porque os potenciais padrão de eletrodo das semirreações são muito próximos e, como consequência, a formação de íons I_3^- pouco afeta o par I_2/I .



Em iodometria é comum o uso de indicadores porque a viragem é pouco perceptível, devido ao cansaço visual que o analista é submetido. O indicador geralmente usado é uma solução aquosa de amido, com o qual se pode determinar concentrações de iodo em solução de até $2 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

O amido é uma substância formada principalmente por dois constituintes macromoleculares lineares, chamados amilose (β -amilose) e amilopectina (α -amilose), com conformações helicoidais. Estas substâncias formam complexos de adsorção com o iodo na forma de íons I_3^- conferindo à solução uma coloração azul intensa.



A interação do iodo com a amilopectina é indesejável porque o complexo formado apresenta um comportamento reversível (é mais estável). Felizmente a interferência deste componente é muito pequena, porque ele precipita durante o preparo da solução aquosa de amido.

A sensibilidade da reação do amido com o iodo diminui com o aumento da temperatura e na presença de álcool etílico e/ ou metílico.

6.7.2 Material e método

6.7.2.1 Preparo das soluções

As soluções empregadas no ensaio iodométrico foram preparadas segundo Morita e Assumpção (1995), Farmacopeia Brasileira (1988) e Harris (2001).

Amido SI: triturar 10,0 g de amido com um pouco de água e adicionar a suspensão em um

litro de água quente, sob agitação. Prosseguir o aquecimento até obtenção de uma solução clara. Esta deve ser filtrada caso apresente turbidez após alguns minutos de aquecimento. Após a solução resultante se resfriar, proceder à sua transferência para um recipiente adequado, mantendo-o fechado e, se possível, sob refrigeração.

Este indicador deve ser adicionado ao meio reagente um pouco antes do ponto final. Em iodometria, a descoloração do iodo é uma boa indicação da proximidade do ponto final, o que permite adicionar o indicador no momento adequado.

O amido possui baixo custo, mas ele apresenta algumas desvantagens: é pouco solúvel em água fria, em solução muito diluída apresenta um ponto final pouco seguro e sofre hidrólise em solução ácida formando produtos que após reagirem com o amido remanescente em solução, conferem à solução uma coloração vermelha (irreversível) que mascara o ponto final da titulação.

Alaranjado de metila SI: foram dissolvidos 100 mg em 100 mL de água purificada.

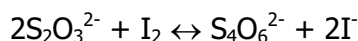
HCl diluído SR: foram diluídos 24 mL de ácido clorídrico R em água para 100 mL.

HCl 1 M: foram diluídos 85 mL de ácido clorídrico R em balão de 1000 mL e completado o volume com água purificada.

Iodo 0,02 M: foram dissolvidos cerca de 28 g de iodo em solução de 72 g de iodeto de potássio em 100 mL de água e 3 gotas de ácido clorídrico R foram adicionadas; o volume foi completado com água a 1000 mL. Padronização: exatamente cerca de 150 mg de trióxido de arsênio foram pesados e dissolvidos em 20 mL de NaOH 1 M aquecendo, se necessário. 40 mL de água foram utilizadas para diluição e 2 gotas de alaranjado de metila SI (solução indicadora) foram acrescentadas. A seguir, foi adicionado ácido clorídrico diluído SR até viragem do amarelo para rosa. Dois gramas de bicarbonato de sódio foram acrescentados e foi feita uma diluição com 50 mL de água juntamente com 3 mL de amido SI. A solução de iodo 0,2 M foi titulada até cor azul. Cada 4,946 mg de trióxido de arsênio equivale a 1 mL de iodo 0,2 M. Uma alíquota de 100,0 mL desta solução de iodo 0,2 M foi tomada e diluída em água para 1000 mL em balão volumétrico, obtendo-se a solução de concentração 0,02 M.

Tiossulfato de sódio 0,02 M: cerca de 50 g de tiossulfato de sódio e 400 mg de carbonato de sódio foram dissolvidos em 1000 mL de água isenta de dióxido de carbono e padronizados como segue: uma alíquota de 25,0 mL de solução de tiossulfato de sódio 0,2 M foi titulada com a solução padronizada de iodo 0,2 M, usando amido SI como indicador. Uma alíquota de 100 mL da solução padronizada de tiossulfato de sódio 0,2 M foi diluída para 1000 mL com água em balão volumétrico, para obtenção de uma solução de concentração 0,02 M.

Os íons tiossulfato são oxidados a tetrationato pelo iodo.



Agentes oxidantes fortes como o bromato, hipoclorito oxidam quantitativamente tiosulfato. Outros agentes oxidantes, como por exemplo, permanganato de potássio, dicromato de potássio e sulfato cérico, provocam uma oxidação incompleta a sulfato. Por essa razão um excesso de iodeto é sempre adicionado na determinação dessas substâncias, antes da titulação com tiosulfato.

6.7.3 Determinação de cefuroxima sódica no medicamento

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 100 mg de cefuroxima sódica em água purificada e completou-se o volume em balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se solução de concentração 1000 µg/mL. Transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL desta solução para frasco de rolha esmerilhada, adicionou-se 5 mL de NaOH 1 *M* e deixou-se em repouso durante 20 minutos. Adicionou-se então 20 mL de solução tampão acetato, 5 mL de HCl 1 *N* e 25,0 mL de iodo 0,02 *M*. Fechou-se o frasco e deixou-se em repouso durante 20 minutos, protegido da luz. Titulou-se o excesso de iodo com solução de tiosulfato de sódio 0,02 *M*, usando amido SI como indicador, adicionado quando a titulação chegou próxima do fim. A outra alíquota de 10,0 mL da solução de amostra adicionou-se 20 mL de solução tampão acetato e 25,0 mL de iodo 0,02 *M*, deixou-se em repouso durante 20 minutos e titulou-se com tiosulfato de sódio 0,02 *M*, usando amido SI como indicador quando a titulação chegou próxima do fim. A diferença entre as titulações representa o volume de iodo 0,02 *M* equivalente à cefuroxima sódica total presente, sendo que 1 mL de iodo 0,02 *M* corresponde a 4,463 mg de cefuroxima sódica (medida como C₁₆H₁₅N₄NaO₈S).

6.7.3.1 Cálculos

O teor de cefuroxima sódica foi determinado pela Equação 17:

$$\text{Teor (\%)} = (v \times \text{mEq} \times 100)/m$$

Equação 17

Em que:

v = volume de iodo 0,02 M (mL)

mEq = miliequivalente de cefuroxima sódica (4,463 mg)

m = massa pesada de cefuroxima sódica

Os valores experimentais da determinação de cefuroxima sódica amostra pelo método proposto encontram-se na Tabela 51.

Tabela 51: Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra por iodometria

Ensaio	Volume de iodo 0,02 M	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
I	2,98	9,93	99,33	100,27 $\pm$ 0,31	0,83
II	3,05	10,16	101,66		
III	3,01	10,03	100,33		
IV	3,00	10,00	100,00		
V	3,02	10,06	100,66		
VI	2,99	9,96	99,66		

*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

6.7.4 Teste de recuperação

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 2002; USP, 2009b). Desta forma, quantidades conhecidas de SQR são adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de cefuroxima sódica SQR, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

6.7.4.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 500,0 mg de cefuroxima sódica SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de cefuroxima sódica SQR com concentração de 5000 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração 1000,0 µg/mL, preparada pela dissolução de 100,0 mg de pó em 100 mL de água purificada.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 10,0 mL da solução amostra para frascos de rolha esmerilhada de 125 mL denominados: A, R1, R2 e R3. Foram adicionados 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução de cefuroxima sódica SQR em concentração de 5000,0 µg/mL, nos balões R1, R2 e R3, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão foram transferidos 10,0 mL de solução de cefuroxima sódica SQR de 1000,0 µg/mL para um frasco de rolha esmerilhada de 125 mL. Adicionou-se 5 mL de NaOH 1 M em cada frasco e deixou-se em repouso durante 20 minutos.

Adicionou-se então 20 mL de solução tampão acetato, 5 mL de HCl 1 M e 25,0 mL de iodo 0,02 M. Fechou-se o frasco e deixou-se em repouso durante 20 minutos, protegido da luz.

Titulou-se o excesso de iodo com solução de tiosulfato de sódio 0,02 M, usando amido SI como indicador, adicionado quando a titulação chegou próxima do fim. À outra alíquota de 10,0 mL da solução de amostra adicionou-se 20 mL de solução tampão acetato e 25,0 mL de iodo 0,02 M, deixou-se em repouso durante 20 minutos e titulou-se com tiosulfato de sódio 0,02 M, usando amido SI como indicador quando a solução chegou próxima do fim. A diferença entre as titulações representa o volume de iodo 0,02 M equivalente à cefuroxima sódica total presente, sendo que 1 mL de iodo 0,02 M corresponde a 4,463 mg de cefuroxima sódica (medida como $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$).

O preparo das soluções para o teste de recuperação encontra-se na Tabela 52.

Tabela 52: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para determinação iodométrica

	Quantidade de amostra (mg)	Volume da SQR (5,0 mg/mL)	Quantidade final (mg)
A	10,0		10,0
R1	10,0	1,0	10,5
R2	10,0	2,0	11,0
R3	10,0	4,0	12,0

6.7.4.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2002):

$$R\% = [C_f - C_u] / C_a \cdot 100$$

Equação 18

Na qual:

C_f = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

C_u = quantidade da amostra

C_a = quantidade da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para cefuroxima sódica amostra estão representados na Tabela 53.

Tabela 53: Teste de recuperação de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra por iodometria

	Adicionado (mg)	Volume iodo 0,02 M (mL)*	Encontrado (mg)	Recuperação (%)	Média (%)
R1	0,5	3,89	10,55	100,47	
R2	1,0	4,03	10,96	99,63	99,97
R3	2,0	4,08	11,98	99,83	

*Cada valor é a média de três determinações.

6.7.5 Discussão

O método iodométrico para determinação de cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável apresenta baixo custo em instrumentação e facilidade de execução em laboratórios de rotina.

O método iodométrico para determinação de cefalosporinas necessita de uma etapa prévia de degradação do anel β-lactâmico, o que se dá geralmente por álcali ou β-lactamases, originando um derivado do ácido correspondente que reage com o iodo. No entanto, o fármaco íntegro não consome iodo. Assim, durante o ensaio, foi necessário analisar a amostra degradada e sem sofrer degradação, a fim de verificar se a mesma já não

se encontrava em processos degradativos influenciados pela temperatura, luz, umidade e outros. O método proposto foi baseado em ensaios iodométricos existentes na literatura para outras cefalosporinas, mostrando-se aplicável e vantajoso em relação a outros ensaios instrumentais de custo elevado.

Foi de extrema importância o controle da temperatura durante o ensaio (25°C), a fim de evitar a volatilização do iodo em solução, embora esse problema tenha sido bastante reduzido com a utilização da solução de triiodeto.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas da SQR foram adicionadas nas soluções de cefuroxima sódica amostra para quantificação da substância. A recuperação média do método foi de 99,97%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se 6 determinações de cefuroxima sódica frascos-ampola. O desvio padrão relativo foi de 0,83%.

O teor médio de cefuroxima sódica determinado nos frascos-ampola foi de 100,27%, demonstrando ser um método adequado para detectar a substância ativa nos frascos-ampola. O método desenvolvido foi validado para a quantificação de cefuroxima sódica em frascos-ampola através de fatores como precisão, exatidão e linearidade.

6.8 Cromatografia líquida de alta eficiência

6.8.1 Considerações gerais

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

Para a análise de muitos fármacos empregam-se detectores UV/Vis fornecendo assim um método de análise exato, preciso e robusto. A cromatografia juntamente com a detecção UV/Vis é capaz de monitorar a estabilidade de fármacos e formulações, detectando produtos de degradação.

A partir de dados encontrados na literatura para outros antimicrobianos (ABDEL-HAMID, 1998; BOMPADRE et al., 1998; PÉHOURCQ; JARRY, 1998; FUJIMOTO et al., 1999; MARONA; SCHAPOVAL, 1999; NISHINO et al., 2000; JOHNSON et al., 2000; EL-WALILY et al., 2000; SORENSEN; SNOR, 2000; JOSHI, 2002; SAMANIDOU et al., 2003; KAKUMANU et al., 2006; CAN; LTIOKKA; ABOUL-ENEIN 2006; TOZO; SALGADO, 2006; MORENO; SALGADO, 2008) e também para a cefuroxima sódica (USP, 2009), alguns parâmetros foram testados para sua determinação.

6.8.2 Material e método

Foram realizados testes preliminares para o desenvolvimento da metodologia de análise para cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável, alternando-se alguns parâmetros apresentados na Tabela 54.

Tabela 54: Parâmetros utilizados para a avaliação de cefuroxima sódica por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Metanol: Água (70:30) Tampão acetato pH 3,4: Acetonitrila (10:1)
Vazão (mL/min)	0,5; 0,8 e 1,0

A partir dos resultados obtidos com as diferentes fases móveis e as diferentes vazões foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do teste.

As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido Waters 1525 Binary HPLC Tump com detecção UV/Vis (Milford, MA), injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e empregou-se coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters.

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de metanol (grau HPLC): água (purificada por osmose reversa) na proporção 70:30 (v:v) e filtrada por membrana de 0,45 µm de tamanho de poro e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, e desgaseificada durante 15 minutos. Após a estabilização do sistema foram injetados volumes pré-fixados de 20,0 µL da solução previamente filtrada em membrana.

A padronização do sistema cromatográfico, equipamento e as condições de trabalho estão apresentados na Tabela 55.

Tabela 55: Condições cromatográficas utilizadas na adequação de método para quantificação da cefuroxima sódica por CLAE

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Metanol: água (70:30)
Coluna	Waters C18 (Wat 054275)
Comprimento de onda	280 nm
Vazão	0,8 mL/min
Sensibilidade de detecção	0,5 AUFS
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	20° ± 1°C

6.8.3 Obtenção da curva analítica

Para a realização da curva analítica foram pesados 50,0 mg de cefuroxima sódica SQR previamente dessecada e transferidos para balão volumétrico de 50 mL completando o volume com a fase móvel utilizada para a obtenção de solução com concentração teórica definida de 1 mg/mL. Desta solução foram transferidas alíquotas de 0,10; 0,11; 0,12; 0,13; 0,14 e 0,15 mL para balões volumétricos de 10 mL, sendo o volume completado com a fase móvel, para a obtenção de soluções de 10,0 a 15,0 µg/mL de cefuroxima sódica SQR.

Destas soluções, foram injetados volumes de 20,0 µL para a obtenção dos respectivos cromatogramas (Figura 22).

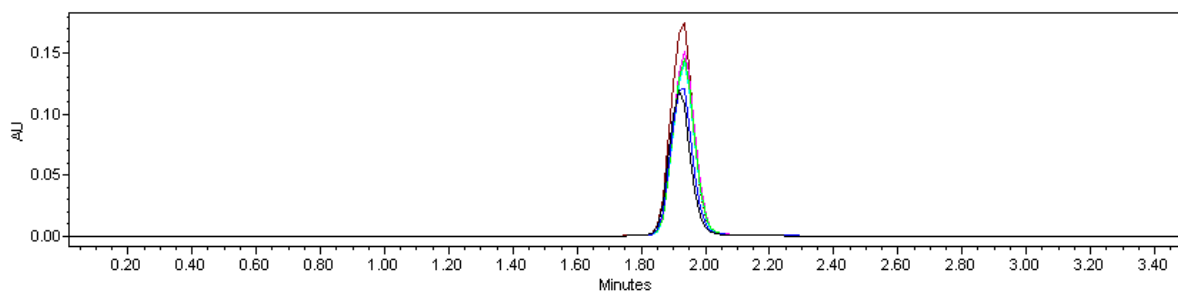


Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE para soluções de cefuroxima sódica SQR: 10 µg/mL (preto); 11 µg/mL (verde claro); 12 µg/mL (verde escuro); 13 µg/mL (azul); 14 µg/mL (rosa); 15 µg/mL (vermelho).

Os resultados das medidas das áreas absolutas para a curva de calibração estão representados na Tabela 56, onde se observa o coeficiente de variação percentual médio.

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de correlação das soluções foram determinados pela análise da regressão linear e estão apresentadas na Figura 23.

Tabela 56: Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica por CLAE

Concentração (µg/mL)	Área do pico	Área absoluta média ± e.p.m.	CV (%)
10,0	559937	559078 ± 46455	0,9291
	558092		
	559206		
11,0	629243	629754 ± 23145	0,4629
	630145		
	629875		
12,0	689382	689222 ± 20410	0,4082
	689526		
	688758		
13,0	752589	752247 ± 34280	0,6856
	751458		
	752695		
14,0	823145	823810 ± 36430	0,7286
	824589		
	823698		
15,0	899532	899813 ± 12525	0,2505
	899896		
	900012		

* cada valor é a média de três determinações

e.p.m. = erro padrão da média

c.v. (%) = coeficiente de variação

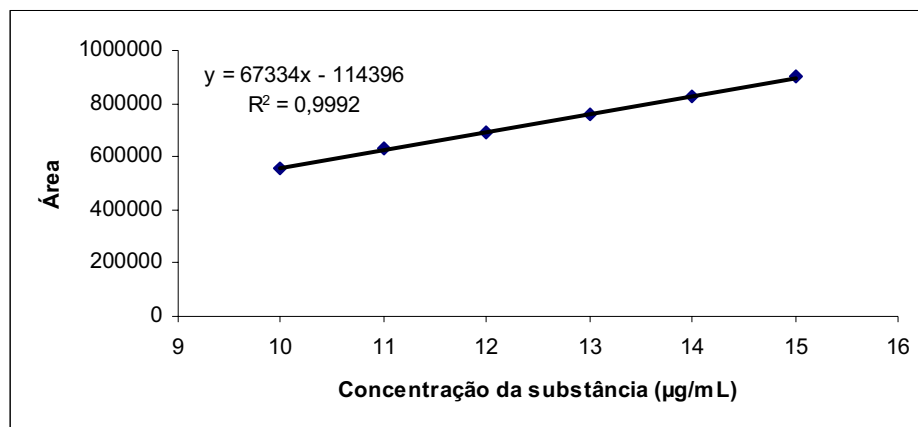


Figura 23: Representação gráfica da curva analítica da solução de cefuroxima sódica em concentrações de 10 a 15 µg/mL por CLAE.

6.8.4 Validação do método

O método foi validado para determinação da linearidade, precisão, robustez e exatidão (ICH, 2005; USP, 2009b).

- **Linearidade:** para validação do método, seis concentrações (10,0 – 15,0 µg/mL) da SQR e seis (10,0 – 15,0 µg/mL) concentrações da amostra foram utilizadas. O cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados foi efetuado (Tabela 57).
- **Precisão:** repetibilidade (intramétodo) e precisão (intermétodo) foram determinadas. A repetibilidade do método foi estudada pelas análises das amostras em concentrações diferentes no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada por comparação do método em diferentes dias (Tabela 58).
- **Exatidão:** foi determinada pelo teste de recuperação (Tabela 63).
- **Robustez:** a robustez do método foi determinada pela variação do analista (Tabela 59) e da vazão da fase móvel (Tabela 60).

Tabela 57: Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de cefuroxima sódica, utilizando o método CLAE

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F cal	F tab
Entre	5	856162406142,9	250121380117,5	2,604	5,06
Regressão	1	854510680929,7	854510680929,7	8058,8*	9,33
Desvio da linearidade	4	1641815213,2	521564914,4	4,4	5,41
Resíduo	12	84648866,1	8805923,0		
Total	17	856255043897,9	-		

*Significativo para $p < 1\%$

Tabela 58: Precisão do método de CLAE representado pelo desvio padrão relativo para cefuroxima sódica

Ensaio	Área do pico*	Encontrado (µg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	691545	12,04	100,33		
II	682258	11,87	98,91		
III	685912	11,94	99,50		
IV	691089	12,03	100,21	99,84 ± 0,24	1,04
V	699896	12,18	101,45		
VI	680178	11,84	98,62		

DPR = desvio padrão relativo

e.p.m. = erro padrão médio

Tabela 59: Robustez do método para CLAE de cefuroxima sódica através da variação do analista

Analista	Área	Área média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
1	691545	688479 $\pm$ 0,27	0,72
	682258		
	685912		
	691089		
	699896		
	680178		
2	691563	634243 $\pm$ 1,25	3,31
	613157		
	599899		
	651955		
	630085		
	618799		

DPR = desvio padrão relativo
e.p.m. = erro padrão médio

Tabela 60: Robustez do método para CLAE de cefuroxima sódica através da variação da vazão da fase móvel

Vazão (mL/min)	Área	Área média $\pm$ e.p.m	DPR(%)
0,8	691545	688479 $\pm$ 0,27	0,72
	682258		
	685912		
	691089		
	699896		
	680178		
1,0	699595	696003 $\pm$ 0,14	0,38
	692278		
	695982		
	698189		
	699396		
	690578		

DPR = desvio padrão relativo
e.p.m. = erro padrão médio

6.8.5 Determinação de cefuroxima sódica no medicamento

6.8.5.1 Preparo da solução de cefuroxima sódica SQR

Foram transferidos volumes de 2,0 mL de solução de cefuroxima sódica SQR com concentração 1000,0 µg/mL para balão volumétrico de capacidade de 10 mL. O volume foi completado com fase móvel para obtenção de uma solução com concentração de 200 µg/mL.

6.8.5.2 Preparo da solução de cefuroxima sódica amostra

Uma quantidade de pó equivalente a quatro pesos médios da amostra foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado com água purificada para obtenção da solução de concentração teórica de 3000,0 µg/mL. Uma alíquota de 50,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 150 mL, completando o volume com a fase móvel, obtendo-se solução de concentração de 1000,0 µg/mL.

A partir desta solução filtrada foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentração final de cefuroxima sódica de 200,0 µg/mL.

6.8.5.3 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela equação 19:

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

Equação 19

Na qual:

C_A = concentração da amostra (µg/mL)

C_{SR} = concentração da substância de referência (µg/mL)

A_A = área da amostra

A_{SR} = área da substância de referência

O teor percentual de cefuroxima sódica na amostra foi calculado pela equação 20:

$$C_{A\%} = C_A \cdot 100 / C_t$$

Equação 20

Na qual:

CA = concentração de cefuroxima sódica encontrada na amostra (µg/mL)

Ct = concentração de cefuroxima sódica teórica na amostra (mg)

Os valores experimentais da determinação de cefuroxima sódica amostra pelo método proposto encontram-se na Tabela 61.

Tabela 61: Quantidades determinadas para o doseamento de cefuroxima sódica amostra por CLAE.

Ensaio	Área do pico	Encontrado (µg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	691545	12,04	100,33		
II	682258	11,87	98,91		
III	685912	11,94	99,50		
IV	691089	12,03	100,21	99,84 ± 0,24	1,04
V	699896	12,18	101,45		
VI	680178	11,84	98,62		

* cada valor é a média de três determinações

DPR = desvio padrão relativo

e.p.m. = erro padrão médio

6.8.6 Teste de recuperação

6.8.6.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 10,0 mg de cefuroxima sódica SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de cefuroxima sódica SQR com concentração de 100 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração 250,0 µg/mL, preparada pela dissolução de 25,0 mg de pó em 100 mL de água purificada. Após, as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm de tamanho de poro.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 0,1 mL da solução

amostra para balões volumétricos de 10 mL denominados: A, R1, R2 e R3. Foram adicionados 0,85, 0,95 e 1,05 mL da solução de cefuroxima sódica SQR em concentração de 100,0 µg/mL, nos balões R1, R2 e R3, respectivamente, e os volumes completados com a fase móvel.

A Tabela 62 apresenta a preparação das soluções de cefuroxima sódica SQR e amostra utilizadas na realização do teste de recuperação.

Tabela 62: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefuroxima sódica para o método CLAE

	Volume da solução amostra 250,0 µg/mL (mL)	Volume da solução de referência 100 µg/mL (mL)	Concentração final em 10 mL (µg/mL)
A	0,1		2,5
R1	0,1	0,85	11,0
R2	0,1	0,95	12,0
R3	0,1	1,05	13,0

Os valores encontrados no teste de recuperação para cefuroxima sódica amostra estão representados na Tabela 63.

Tabela 63: Teste de recuperação de solução de cefuroxima sódica SQR adicionada à solução de cefuroxima sódica amostra por CLAE

	Adicionado (%)	Encontrado (µg/mL)*	Recuperação (%)	DPR (%)
R1	10,0	9,98	99,80	
R2	20,0	20,28	101,40	1,17
R3	30,0	29,65	99,12	

*Cada valor é a média de três determinações.

DPR = desvio padrão relativo

6.8.7 Discussão

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

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica frequentemente empregada na quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas, sendo uma das mais modernas técnicas de separação e quantificação de substâncias em escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

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

A cromatografia, juntamente com a detecção UV/Vis, é capaz de monitorar a estabilidade de fármacos e formulações, detectando produtos de degradação.

Segundo a USP (2009), a fase móvel empregada para determinação de cefuroxima sódica é composta de tampão acetato pH 3,4 e acetonitrila, porém sabe-se que os tampões acabam danificando a coluna com o tempo, o que tornam as análises de CLAE mais complicadas, pois os sais inorgânicos podem danificar a coluna, através da interação com a sílica (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; WATSON, 1999; OHANNESIAN, 2002).

Assim sendo, optou-se pela utilização de metanol-água (70:30) como fase móvel, o que constituiu uma excelente melhora na metodologia, pois com esta fase torna-se desnecessária a lavagem da coluna após as análises. Além disso, a amostra mostrou-se bastante solúvel nessa fase móvel, sem qualquer problema de precipitação.

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 10,0 a 15,0 µg/mL. Os valores para o intercepto e a inclinação da curva analítica foram 67334 e 114396, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9992. A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, no limite de confiança de 1%.

O teor médio determinado de cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável foi de 99,84%, os limites de variação dentro dos dias de análise tiveram média de 1,04 e entre os dias de 2,01% para o ensaio de precisão.

A exatidão do método expressa pela percentagem de recuperação, é de 100,10%.

O método desenvolvido mostrou características de desempenho apropriadas, sendo adequado para a determinação cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável.

O método apresenta vantagens em relação aos encontrados em farmacopeias para a determinação de cefuroxima sódica, uma vez que não emprega tampões na fase

móvel, o fluxo utilizado é menor e a fase móvel é muito simples, sendo desnecessária a troca da fase móvel para a lavagem da coluna após a realização do ensaio.

7 - Análise Comparativa dos Métodos Propostos

É frequentemente necessária a comparação de metodologias para determinar se a variabilidade dos métodos difere de forma significativa. Os ensaios de comparação devem prover dados suficientes para provar a sua equivalência em um determinado intervalo (USP, 2009). Para comparação de métodos, a Farmacopeia americana (USP, 2009) recomenda avaliar os parâmetros de precisão e exatidão. A Tabela 64 apresenta os diferentes parâmetros determinados para os métodos validados neste trabalho.

A comparação entre os métodos em questão mostra que quanto aos parâmetros apresentados na validação todos os métodos são considerados satisfatórios, pois a exatidão é próxima a 100%, e os valores de coeficiente de variação para precisão são menores que 5% (BRASIL, 2003a).

Os métodos avaliados neste trabalho são precisos, exatos e não apresentam diferença estatisticamente significativa, podendo ser utilizados rotineiramente na determinação quantitativa de cefuroxima sódica em forma farmacêutica pó para solução injetável.

A comparação também pode ser feita através da análise dos dados de doseamento obtidos neste trabalho (Tabela 65), utilizando-se a análise de variância.

A análise de variância simples foi utilizada, considerando-se como fator a variação entre os tratamentos. Foram utilizados os valores de teor de cefuroxima sódica forma farmacêutica injetável determinados durante os ensaios de doseamentos. Os dados do tratamento estatístico são apresentados na Tabela 66.

Tabela 64: Aplicabilidade, exatidão e precisão das técnicas propostas para quantificação de cefuroxima sódica

Parâmetro	Técnicas								
	UV ¹	Micro Difusão ²	Turb. ³	Vis ⁴	IV ⁵	Acidimetria ⁶	MNA ⁷	Iodometria ⁸	CLAE ⁹
λ (nm)	280	-	530	510	-	-	-	-	280
Faixa de concentração utilizada y= ax + b	5,0-14,0	30-120	30-120	100-300	0,5-2,0	-	-	-	10,0-15,0
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	mg/mL				µg/mL
	a	0,0412	1,8205Ln	0,0751	0,5053	-	-	-	67334
	b	0,0328	19,297	0,6166	0,179	-0,0114	-	-	-114396
r	0,9996	0,9999	0,9997	0,9991	0,9991	-	-	-	0,9992
n	6	3	3	6	6	-	-	-	6
Exatidão (%)	100,82	100,77	100,21	99,65	99,83	100,32	100,40	99,97	100,10
Precisão	99,49	99,96	99,37	99,82	100,25	100,51	100,86	100,27	99,84

1 UV: método espectrofotométrico na região do ultravioleta

2 Difusão: ensaio microbiológico – método de difusão em ágar

3 Turb: ensaio microbiológico - método turbidimétrico

4 Vis: método espectrofotométrico na região do visível

5 IV: método espectrofotométrico na região do infravermelho

6 Acidimetria: titulação acidimétrica

7 MNA: titulação em meio não aquoso

8 Iodometria: titulação iodométrica

9 CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 65: Valores médios experimentais obtidos para a determinação quantitativa de cefuroxima sódica na forma farmacêutica pó para solução injetável, pelas técnicas avaliados

Amostra	UV ¹	Micro		Vis ⁴	IV ⁵	Acid ⁶	MNA ⁷	Iodom ⁸	CLAE ⁹
		Difusão ²	Turb ³						
I	97,53	99,76	99,80	101,92	101,35	101,57	99,97	99,33	100,33
II	98,41	100,31	100,08	100,68	99,05	100,38	102,94	101,66	98,91
III	100,70	99,94	98,31	98,03	100,98	98,78	98,18	100,33	99,50
IV	98,32	100,13	-	98,22	98,69	101,16	102,35	100,00	100,21
V	99,95	99,38	-	99,93	100,56	99,61	101,75	100,66	101,45
VI	102,40	99,64	-	100,14	100,87	101,57	99,97	99,66	98,62
MÉDIA	99,49	99,96	99,37	99,82	100,25	100,51	100,86	100,27	99,84

- 1 UV: método espectrofotométrico na região do ultravioleta
2 Difusão: ensaio microbiológico – método de difusão em ágar
3 Turb: ensaio microbiológico - método turbidimétrico
4 Vis: método espectrofotométrico na região do visível
5 IV: método espectrofotométrico na região do infravermelho
6 Acidimetria: titulação acidimétrica
7 MNA: titulação em meio não aquoso
8 Iodometria: titulação iodométrica
9 CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 66: Análise da variância dos resultados obtidos para o doseamento de cefuroxima sódica amostra pelas técnicas propostas

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F
Entre	8	7,657537	1,055192	0,000254
Resíduo	45	234162,1	6561,701	
Total	53	234175,9		

Através da análise da variância (ANOVA), os teores de cefuroxima sódica determinados pelas diferentes técnicas foram comparados e os resultados dessa análise indicam que não há diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

As técnicas propostas não diferem estatisticamente, porém apresentam diferenças quanto ao custo e tempo de execução.

As técnicas espectrofotométricas (regiões do ultravioleta, visível e infravermelho) utilizam reagentes de baixo custo e são de simples execução, além de utilizarem baixo

volume de reagente. O infravermelho não utiliza solventes e reagentes, fazendo dele uma técnica limpa.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência exige equipamentos de custo mais alto, nem sempre disponíveis em todos os laboratórios, além de trabalhar com reagentes de custo mais elevado (grau HPLC) e um grande volume dos mesmos, levando a uma grande preocupação com os resíduos gerados por essa técnica.

As técnicas titrimétricas são as de mais fácil execução e rapidez, utilizando reagentes e equipamentos simples e de custo mais baixo, porém necessitam de uma maior quantidade de padrão e amostra na execução do teste.

Dos ensaios microbiológicos, o método de difusão em ágar envolve um tempo de execução maior tornando-o uma técnica desvantajosa; mas com método turbidimétrico podemos executar a técnica em quatro horas diminuindo assim o tempo de espera. É a única técnica proposta que apresenta a peculiaridade de analisar a atividade biológica do fármaco, além de não utilizar solventes nem reagentes em grandes volumes, não causando preocupação com resíduos químicos.

Na comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos propostos, observou-se que a variabilidade entre eles é muito pequena, uma vez que os desvios relativos mostraram-se menores que 2 %, dentro do recomendado pela Resolução 899/2003 (BRASIL, 2003), que considera como valor máximo aceitável 2 %, não se admitindo valores superiores para métodos analíticos.

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

Essa confiabilidade é alcançada a partir da validação dos métodos analíticos.

Segundo LEITE (2002): "não ter validação é ter apenas um número, não um resultado". Logo, a importância da validação de métodos analíticos para garantia e controle da qualidade é incontestável.

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida. É um processo pelo qual se estabelece por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida (RILEY; ROSANSKE, 1996).

A validação não infere que o método seja livre de erros, somente confirma que ele é adequado para a proposta (MEHTA, 1997) e deve ser considerada como parte de um

conceito integrado que visa a assegurar a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001).

Segundo Gil e Batista Filho (2005), "um método analítico deve, idealmente, ser exato para fornecer valor real, ser preciso para fornecer em um menor número de ensaios esse valor real, ser seletivo para que a exatidão não desvie com interferentes potenciais, ser sensível ou capaz de determinar as menores concentrações possíveis e, enfim, responder de forma proporcionalmente linear, ao longo de ampla faixa de concentração".

Todas as técnicas propostas mostraram-se sensíveis para determinação da cefuroxima na forma farmacêutica injetável, variando de 99,37 a 100,86% o que está de acordo com o preconizado pela literatura.

8- Estabilidad

8.1 Considerações gerais

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses e anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas características que possuía quando da época de sua fabricação (VADAS, 2000; ANSEL et al., 2000).

Todas as substâncias estão sujeitas a alguma forma de decomposição química ou física. Algumas classes químicas são mais vulneráveis e tendem a se decompor mesmo em condições brandas. As condições externas envolvidas na deterioração de fármacos e medicamentos são tidas como fatores extrínsecos ou ambientais; entre os principais fatores temos a luz, temperatura, ar e a umidade. Estes fatores podem afetar a estabilidade física de medicamentos e acelerar processos de decomposição química do fármaco (GIL; BATISTA, 2005).

Um bom estudo de estabilidade é meta fundamental de um programa de garantia da qualidade. Outra meta seria a segurança clínica, intimamente relacionada à estabilidade farmacêutica (VADAS, 2000).

A monitorização da estabilidade de medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante seu tempo de validade. Também a segurança e a eficácia podem ser avaliadas por estudos de estabilidade, pelo monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica ou toxicidade.

Classicamente, a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é separada em estudos de estabilidade física ou farmacêutica, química (incluindo-se a bioquímica) e físico-química. Reconhecer a estabilidade física de uma formulação é importante para o profissional e o usuário. Em primeiro lugar, o produto farmacêutico deve manter boa aparência. Alterações como descoloração ou escurecimento devem ser motivos para desconfiança; a uniformidade de dose do ingrediente ativo deve ser assegurada com o tempo, pois alguns produtos são dispensados em embalagens de dosagem múltipla e o fármaco ativo deve ter eficiência durante o tempo de validade esperado da preparação. Para cada forma farmacêutica, há diferentes parâmetros a ser avaliados: propriedades organolépticas, velocidade e volume de sedimentação, consistência e viscosidade, polimorfismo, dureza, desintegração e outras. Várias reações químicas podem resultar na degradação de princípios ativos e excipientes. Qualquer

alteração na estrutura do princípio ativo pode reduzir a atividade terapêutica e levar a efeitos indesejados, devido à formação de produtos tóxicos (VADAS, 2000).

As reações químicas mais comuns são as de oxidação e hidrólise, devido à presença de oxigênio e umidade na própria atmosfera. Outras formas de degradação ocorrem por reações fotoquímicas (isomerização, ciclização, fragmentação), racemização, incompatibilidade com outros componentes da fórmula ou embalagem, entre outras. Algumas vezes mais de uma reação ocorre ao mesmo tempo, outras vezes ocorrem consecutivamente (VADAS, 2000; LUND, 2003).

A maior ou menor vulnerabilidade de uma espécie sofrer uma reação química definida como fator intrínseco de estabilidade. Outros fatores intrínsecos são aqueles associados às propriedades físico químicas, tais como ponto de fusão e coeficiente de solubilidade (GIL; BATISTA, 2005). A umidade, a luz, oxigênio e temperatura podem influenciar durante o período de estocagem das formas farmacêuticas, reduzindo o tempo de estabilidade.

A estabilidade química é importante para selecionar as condições de armazenagem (temperatura, luz, umidade), escolha do recipiente adequado (vidro, plástico claro, âmbar ou opaco), tipo de tampa e para prever as interações ao misturar fármacos e excipientes (ANSEL et al., 2000). A degradação química de excipientes pode acarretar problemas de estabilidade física ou microbiológica (CARVALHO et al., 2005).

O armazenamento, distribuição e uso inadequados podem levar à degradação física e química, resultando em atividade reduzida ou formação de produtos de degradação tóxicos. A degradação tende a ocorrer em condições tropicais de altas temperaturas e umidades e, por causa da interação química entre princípio ativo e excipientes, as formas farmacêuticas são mais vulneráveis à degradação que as substâncias puras. Estudos de estabilidade realizados em climas temperados, no entanto, não fornecem indicação confiável de sua validade em países com condições climáticas extremas. Assim, provas adicionais de estabilidade devem ser solicitadas ao fabricante, que deve assumir a responsabilidade por formular um produto que seja estável nas condições climáticas do local de destino (WHO, 2002; QUALITY ASSURANCE OF PHARMACEUTICALS, 1997).

Na década de 50, concomitante com os acidentes que incentivaram a farmacovigilância, estabeleceram-se as primeiras alternativas para previsão do prazo de validade de medicamentos (CARVALHO et al., 2005).

As possibilidades de degradação ficam evidentes ao se constatar a variedade climática no mundo e a já inevitável globalização, pois a importação e exportação de medicamentos entre regiões com diferentes climas se tornam comuns.

Com a finalidade de prever o prazo de validade do medicamento nos diferentes climas, o mundo foi subdividido em zonas climáticas, com diferentes especificações de temperatura e umidade. Essas especificações devem ser utilizadas pelas empresas para proceder aos estudos de estabilidade quando houver interesse em exportar para determinada zona (VADAS, 2000).

O problema estaria solucionado, não fossem as diferenças no interior de uma mesma zona climática. Pode-se tomar como exemplo o Brasil, situado na zona climática IV, que se caracteriza por alta temperatura e umidade. Outros problemas são desrespeitos às normas de transporte, armazenamento inadequado e uso incorreto de medicamentos. O guia vigente para realização de estudos de estabilidade brasileiro estabelece a necessidade de informação do período de utilização pelo qual o produto mantém sua estabilidade depois da reconstituição, nas condições de armazenamento determinadas, de preparações que requeiram reconstituição ou diluição.

A determinação da vida útil ou *shelf life* é realizada quando se pretende estabelecer o período de tempo no qual um produto de composição definida, procedimento de fabricação estabelecido, numa embalagem determinada é capaz de conservar suas características químicas, físicas, microbiológicas, toxicológicas e de funcionalidade dentro de especificações estabelecidas.

No estudo de estabilidade, os testes físicos variam de acordo com a forma farmacêutica. Nos ensaios químicos, destaca-se a realização do doseamento e ensaios limites para produtos em decomposição enquanto que os ensaios microbiológicos podem incluir ensaios do tipo teste de eficácia de conservante ou mesmo ensaios de potência para fatores de crescimento e antibióticos. Tais estudos devem ser realizados em câmaras climáticas controladas e qualificadas.

A avaliação da velocidade de degradação de um medicamento ou de um de seus componentes possibilita estimar o seu prazo de validade, tempo no qual o produto poderá ser usado, e para medicamentos é caracterizado pelo tempo durante o qual o fármaco perde no máximo 10,0% de sua integridade, fundamentado no estudo de estabilidade sob condições variadas. As velocidades das reações dependem de uma série de condições, tais como: concentração de reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalisadores.

A cinética de uma reação diz respeito à velocidade específica de reação, a qual é expressa por k , que indica a intensidade de degradação ou alteração dos componentes do medicamento durante um determinado tempo. Seja uma reação entre compostos A e B formando produtos C e D, k_1 corresponde à cinética de formação de C e D e k_{-1} a reação inversa. A meia-vida ($t_{1/2}$) de uma reação é um importante termo derivado de equações de cinética química, é definida como tempo necessário para que a concentração de reagente caia pela metade do valor inicial (NUDELMAN, 1975).

A $t_{1/2}$ e o prazo de validade podem ser calculados com base na cinética de reação k , pelas equações:

$$t_{1/2} = 0,693 / k$$

Equação 21

Em que:

$t_{1/2}$ = meia-vida

k = constante específica

$$t_{90} = 0,1054 / k$$

Equação 22

Em que:

T_{90} = meia-vida

k = constante específica

Embora todas as reações obedeçam à lei de ação das massas, a velocidade de uma reação pode variar dependendo do tipo de reação:

As reações são classificadas quanto à cinética como:

I) reação de ordem zero ($n = 0$)

II) reação de primeira ordem ($n = 1$)

III) reação de segunda ordem ($n = 2$)

$$c = k \cdot t + c_0$$

Equação 23

Em que:

c_0 = concentração inicial

c = concentração de produto no tempo t

Logo, considerando-se que o prazo de validade requer a detecção de, no máximo, 10,0% de produtos de degradação, ou seja, no mínimo 90,0% de integridade, a meia-vida ($t_{1/2}$) e $t_{90\%}$ podem ser calculadas (NUDELMAN, 1975).

A estabilidade de cefuroxima sódica foi estudada por vários autores (ZAJAC et al., 2003; IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006) e as amostras foram posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e mostraram-se estáveis por um período médio de 24 horas em temperatura ambiente (24°C).

Nguyen (1991) estudou a estabilidade de soluções de cefuroxima sódica em função da temperatura, pH, tampões e força iônica, no qual observou a ação de tampão acetato e fosfato sobre a cefuroxima sódica. Em relação ao pH, a estabilidade máxima foi no intervalo de 3,5 a 5,5. Na faixa de pH 1 a 9, a diferença máxima observada para as constantes de hidrólise foi de 27%.

Stoeckel e colaboradores (1998) também investigaram a estabilidade frente a variações de pH e verificaram que há formação de quatro produtos de degradação na presença de tampão fosfato.

Pramar e colaboradores (1991) estudaram a estabilidade de cefuroxima axetil em suspensões formuladas a partir dos comprimidos e concluíram que essas suspensões preparadas em 0,1 % de benzoato de sódio e ácido cítrico até pH 3,3, tampão citrato em pH 5,5 e sacarose 85% (p/v) em pH 6,8 são estáveis por até 28 dias quando armazenadas sob refrigeração.

Comprimidos de cefuroxima sódica foram submetidos de acordo com as normas do ICH de 30,0°C a 60,0% UR, 40,0°C a 75,0% UR, analisados durante 1, 2, 3 e 6 meses e analisados por CLAE (IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006).

Oldham (1991) e Scott, Hebron (1992) avaliaram a estabilidade de solução aquosa de cefuroxima sódica e verificaram sua estabilidade em frasco âmbar. Verificaram que essa estabilidade é mantida por durante 24 horas a temperatura ambiente e por 21 dias a 2°C durante uso simulado pelo paciente. Também verificaram que as soluções podem ser congeladas a -30°C durante até 12 meses com negligenciável perda de potência, e ao serem descongeladas à temperatura ambiente, a estabilidade é mantida durante 21 dias a 2°C ou 14 dias a 8°C. Com o acréscimo de cloreto de benzalcônio, a solução manteve a estabilidade por um mês a 4°C.

Outros autores estudaram a estabilidade de cefalosporinas. Messerschmidt (1990) estudou a estabilidade de ceftazidima em pó (formulação extemporânea para

injetáveis) armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz. Os resultados mostraram a degradação do fármaco, sugerindo que as preparações sejam diluídas imediatamente antes do uso. Richardson, Woodford e Andrews (1981) propuseram um intervalo de estabilidade de 6 a 24 horas para a estabilidade da preparação pó para solução injetável quando armazenada em temperatura de 25°C.

A estabilidade da cefuroxima sódica em soluções aquosas, com ou sem tampão fosfato e em soro glicosado foi estudada por Das Gupta e Stewart (1986). Nesse estudo os autores verificaram, por CLAE, que a faixa ótima de pH varia de 4,5 a 7,3. Injeções de cefuroxima em soro glicosado 5% e cloreto de sódio 0,9% foram estáveis por 1 dia (mais de 90% potência) a 25°C e durante pelo menos 30 dias a 5°C. Quando congeladas a -10°C, houve decomposição insignificante após de 30 dias.

Arsène e colaboradores (2002) compararam a degradação da ceftazidima em solução em embalagens plásticas e de vidro em diferentes condições de temperatura e tempo de exposição. O fármaco mostrou-se estável por mais tempo em embalagens de vidro, porém a degradação observada em embalagens plásticas de polipropileno (PP) e cloreto de polivinila (PVC) foi considerável ($2,6 \pm 0,2\%$; $2,1 \pm 0,1\%$ e estatisticamente insignificante para piridina adsorvida, respectivamente, em frascos de PVC e PP).

Estudos de estabilidade de cefoxitina sódica na forma sólida e solução foram realizados a fim de fornecer informação físico química básica necessária para preparar um formulação parenteral apropriada. A cefoxitina sódica é muito solúvel em água e exibe a decomposição de primeira ordem neste meio em pH de 3,0 a 9,0, sendo que a estabilidade máxima na água está em pH 5,0 à 7,0. Os lotes de substância do estado sólido indicaram perdas rápidas iniciais seguidas por um período de deterioração mais lento (OBERHOLTZER; BRENNER, 1979).

O estudo de formas farmacêuticas no estado sólido é um dos grandes problemas das ciências farmacêuticas, principalmente quando se tem fármacos sensíveis à umidade, e não existe a possibilidade de prever as mudanças rápidas de umidade no ambiente. Uma vez que a estabilidade em relação à umidade depende da sensibilidade dos fármacos direta e indiretamente sobre o teor de umidade no ambiente, as relações hidrolíticas podem envolver uma combinação de eventos complexos (WATERMAN; ADAMI, 2005). No estado sólido, os processos fotoquímicos ocorrem na superfície do produto. Na maioria dos casos, o interior do produto sólido será inalterado, independente do tempo de exposição (TØNNESSEN, 2001).

As reações fotoquímicas são processos complexos, que usualmente ocorrem

em duas etapas. A primeira etapa é uma reação primária, que envolve diretamente, a absorção de um fóton, fazendo com que o estado da molécula fique excitado. A reação fotoquímica primária, frequentemente é seguida de reações secundárias (térmicas), devido à presença de produtos intermediários originados dos processos fotoquímicos primários. Diferentes tipos de reações podem ser iniciados fotoquimicamente, por exemplo, redução, desalquilação, hidrólise, oxidação, isomerização, rearranjo de anéis, polimerização ou remoção de diversos substituintes como halogenados ou grupos carboxílicos (TØNNESEN, 2001). Estas reações podem ocorrer por exposição à luz para determinados comprimentos de onda. Quanto menor o comprimento de onda da radiação, mais energia é absorvida por concentração de reagente. Com isso, as radiações absorvidas no ultravioleta contribuem mais facilmente para o início de reações químicas, do que aquelas absorvidas em comprimentos de onda maiores (LACHMAN et al., 2001).

O teste de fotoestabilidade dos fármacos e das suas respectivas formas farmacêuticas finais é importante para garantir a qualidade durante a vigência do produto.

Os protocolos básicos para novos fármacos e respectivos produtos são descritos nas diretrizes do ICH para testes de fotoestabilidade, divulgados desde janeiro de 1998 (ICH, 2009). Essas diretrizes determinam que os testes de fotoestabilidade sejam partes integrais dos testes de estresse, os quais são subdivididos em testes de degradação forçada e testes confirmatórios.

8.2 Parte experimental

8.2.1 Estudo preliminar da estabilidade da cefuroxima

O estudo preliminar da estabilidade da cefuroxima sódica foi realizado em meio ácido e básico, peróxido de hidrogênio 3%, temperatura e luz UVC, empregando-se cefuroxima sódica amostra. As amostras foram avaliadas quanto às características organolépticas de cor, odor e aspecto, por análise visual. Além disso, avaliaram-se as amostras quanto ao teor residual de cefuroxima sódica e possíveis produtos de degradação. O monitoramento da degradação foi efetuado através de método cromatográfico previamente validado. As amostras degradadas na luz UVC (254 nm) e câmara climática foram analisadas em cromatógrafo a líquido Waters composto de

bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-vis Waters 2487, utilizando-se como fase móvel metanol: água (70:30 v:v). Para os estudos de degradação térmica foi utilizada câmara climática espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20W.

As condições empregadas nos estudos preliminares de estabilidade encontram-se descritas a seguir:

➤ **Degradação ácida:** a solução foi preparada transferindo-se 6 mL de água purificada para o frasco contendo o pó para solução injetável e levando-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 M obtendo-se uma solução com concentração 1,25 mg/mL. A solução foi exposta durante uma hora a temperatura ambiente. Após este período, alíquota de 96 µL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com fase móvel obtendo-se solução com concentração de 12 µg/mL.

➤ **Degradação básica:** a solução foi preparada transferindo-se 6 mL de água purificada para o frasco contendo o pó para solução injetável e levando-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Desta solução foi transferida uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com NaOH 0,1 M obtendo-se uma solução com concentração 1,25 mg/mL. A solução foi exposta durante uma hora a temperatura ambiente. Após este período, alíquota de 96 µL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com fase móvel obtendo-se solução com concentração de 12 µg/mL.

➤ **Degradação oxidativa:** a solução foi preparada transferindo-se 6 mL de água purificada para o frasco contendo o pó para solução injetável e levando-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Desta solução foi transferida uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com H₂O₂ 3% obtendo-se uma solução com concentração 1,25 mg/mL. A solução foi protegida com papel alumínio e exposta durante uma hora a temperatura ambiente. Após este período, alíquota de 96 µL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com fase móvel obtendo-se solução com concentração de 12 µg/mL.

➤ **Degradação térmica:** os estudos de degradação térmica foram realizados em estufa climática (40°C e 75% de umidade relativa).

O equivalente a 9 pesos médios do pó para solução injetável e 9 frascos na sua embalagem original foram colocados na câmara. O pó para solução injetável foi retirado da sua embalagem original e colocado em placas de Petri. As análises das amostras expostas foram realizadas no tempo zero e 90 dias. Para o pó para solução injetável, em cada tempo de análise, retirou-se da câmara uma quantidade de pó equivalente a 200 mg de cefuroxima sódica, que foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, perfazendo uma solução de 2000 µg/mL. Foi retirada uma alíquota de 10 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando a solução com água. Desta solução foi retirada uma alíquota de 3,0 mL e transferida para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se concentração final de 12 µg/mL, completando a solução com fase móvel. Esta solução foi levada para análise em CLAE. Para o pó na embalagem original, em cada tempo de análise, retirou-se um frasco intacto da câmara climática e foi feita a ressuspensão do conteúdo com 6 mL de água e levando-se ao banho de ultrassom por 20 minutos. Desta solução foi transferida uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado água obtendo-se uma solução com concentração 1,25 mg/mL. Uma alíquota de 96 µL foi transferida para balão de 10 mL completando-se o volume com fase móvel obtendo-se solução com concentração de 12 µg/mL.

➤ **Degradação fotoquímica:** este estudo foi desenvolvido em câmara espelhada contendo lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C. As amostras eram compostas do pó em sua embalagem original e do pó em uma placa de Petri que foram expostos a uma distância de 10 cm da lâmpada. As amostras foram preparadas conforme citado no item anterior para degradação térmica.

As amostras foram dissolvidas na fase móvel (metanol: água) e filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm antes da análise.

8.2.1.1 Método

O acompanhamento da degradação das amostras foi realizado por CLAE, em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters, citado no item 8.2.1. e por análise microbiológica método de difusão em ágar.

Para a CLAE, a fase móvel foi preparada a partir da mistura de metanol: água na proporção 70:30. Todas as amostras foram dissolvidas em fase móvel e filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm de poro antes da análise.

Na análise microbiológica, foi utilizado o método de difusão em ágar, com 3 placas de Petri, em câmara de fluxo laminar com a transferência de 20 mL do meio de cultura nº 1 de Grove-Randall para o preparo da camada base. Com auxílio de pipetador automático e, após a solidificação da camada base, foram adicionados 5 mL de meio de cultura nº 2 de Grove-Randall com inóculo, *Micrococcus luteus*, a 2%. Em seguida foram adicionados *templates* de aço inoxidável estéreis, um em cada placa e com auxílio de pipetador automático, 200 µL das soluções padrão e amostra foram adicionados em delineamento 3 x 3 (Figura 17).

8.2.1.2 Resultados

8.2.1.2.1 Degradação ácida

O cromatograma obtido por CLAE para cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, submetido à condição de degradação ácida, está apresentado na Figura 24.

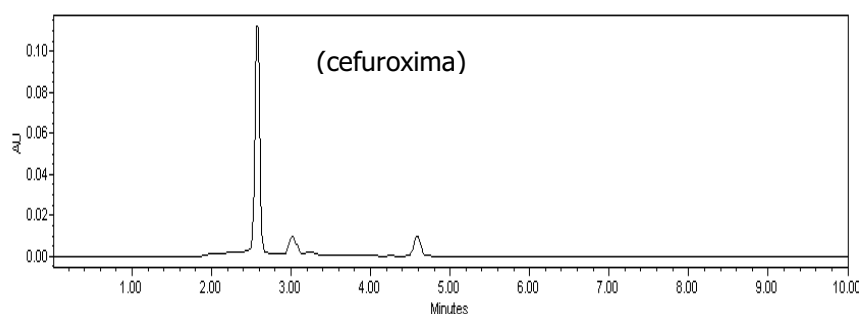


Figura 24: Cromatograma de cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, representando a degradação ácida em HCl 0,1 M. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters.

8.2.1.2.2 Degradação básica

O cromatograma obtido por CLAE para cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, submetido à condição de degradação básica, está apresentado na Figura 25.

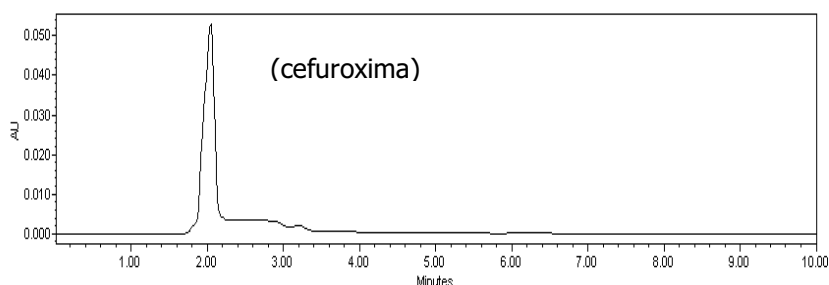


Figura 25: Cromatograma de cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, representando a degradação básica em NaOH 0,1 M. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters

8.2.1.2.3 Degradação oxidativa

O cromatograma obtido por CLAE para cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, submetido à condição de degradação oxidativa, está apresentado na Figura 26.

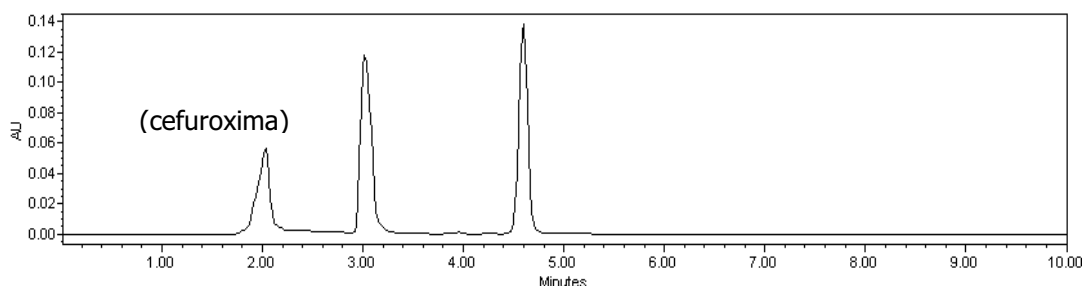


Figura 26: Cromatograma de cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, representando a degradação oxidativa em H₂O₂ 3%. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters

8.2.1.2.4 Degradação térmica

O cromatograma obtido por CLAE para cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, no período de 90 dias, submetido à condição de degradação em câmara climática (40°C/75%), está apresentado na Figura 27.

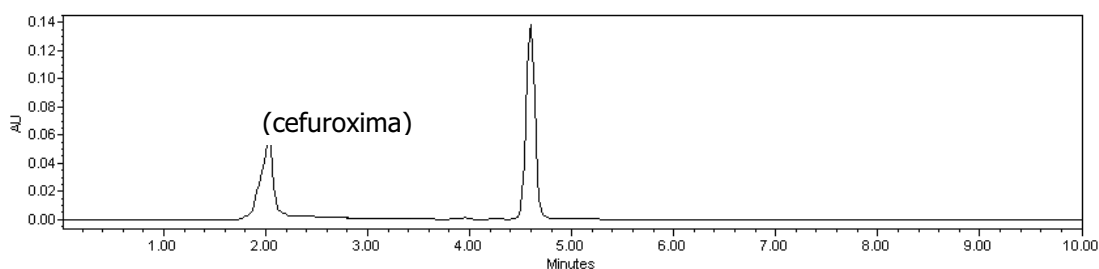


Figura 27: Cromatograma de cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, expostos durante 90 dias, em câmara climática (40°C/75%), representando a degradação térmica. Fase móvel: metanol: água (70:30), utilizando coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e pré-coluna Waters

8.2.1.2.5 Degradação fotoquímica

O cromatograma obtido por CLAE para cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, no período de 30 dias, submetido à condição de degradação fotoquímica em lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C, está apresentado na Figura 28.

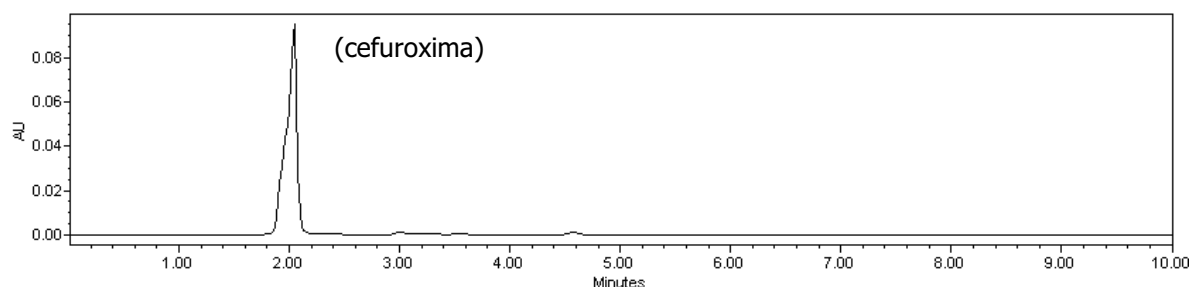


Figura 28: Cromatograma de cefuroxima sódica pó para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, exposto durante 30 dias, em lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C. Fase móvel: metanol: água (70:30).

O cromatograma obtido por CLAE para cefuroxima sódica pó para solução injetável em sua embalagem original, na concentração de 12 µg/mL, no período de 30 dias, submetido à condição de degradação fotoquímica em lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C, está apresentado na Figura 29.

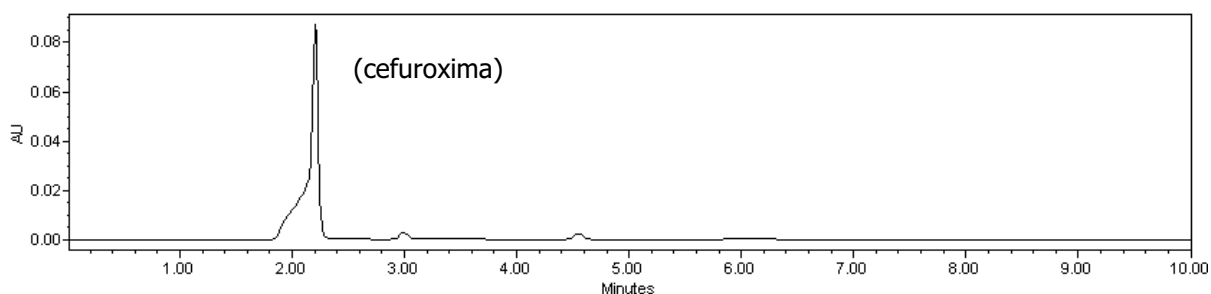


Figura 29: Cromatograma de cefuroxima sódica pó para solução injetável em sua embalagem original, na concentração de 12 µg/mL, exposto durante 30 dias, em lâmpada UVC-254 nm, 20 W (45 cm de comprimento), com temperatura não superior a 25°C. Fase móvel: metanol: água (70:30).

8.2.1.3 Discussão

Embora o desenvolvimento de uma ampla escala de produtos farmacêuticos requeira flexibilidade de como o teste de estresse é conduzido, muitas indústrias aplicam extremas condições de estresse rotineiramente e a explicação destes procedimentos, não são fornecidos. Um exemplo típico é a utilização de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M em refluxo por 8 horas o que geralmente geram produtos de degradação irrelevantes (KLICK et al., 2005).

Neste trabalho expomos a cefuroxima sódica pó para solução injetável em diversas condições de estresse, ácida, básica, oxidativa, fotoquímica e térmica, para verificar a estabilidade preliminar de cefuroxima sódica pó para solução injetável.

Durante o processo de degradação da cefuroxima sódica pó para solução injetável, produtos da reação foram formados exibindo coloração amarela, marrom clara e escura.

No estudo de degradação ácida observa-se que a diminuição do pH não influencia na resolução do pico, mas há formação de produtos de degradação após a

exposição no tempo pré-estabelecido. Esta degradação ocorre rapidamente. Em relação à degradação básica, o fármaco é bem mais sensível, sendo bastante degradado. Observa-se uma cauda no pico de retenção devido ao aumento do pH, o que altera a resolução do pico, alargando-o.

Abdel-Hamid (1998), Berendsen e colaboradores (2009) demonstraram em seus estudos para outras cefalosporinas, a influência do pH e concluíram que cada cefalosporina apresenta um comportamento frente a diferentes valores de pH.

Na degradação oxidativa pode-se observar uma maior sensibilidade do fármaco, pois houve redução no teor de cefuroxima sódica e presença de dois produtos de degradação que forneceram tempos de retenção de 3,0 e 5,5 minutos respectivamente. Este estudo teve como objetivo avaliar se a cefuroxima é sensível a oxidação. Em relação à exposição à câmara climática, utilizando como parâmetros a temperatura de 40°C e 75% de umidade, a cefuroxima mostrou-se sensível, porém apresentou degradação mais lenta.

Em relação à degradação fotoquímica, a cefuroxima sódica pó para solução injetável, demonstrou em sua análise visual, modificações significativas nas características organolépticas. A coloração, que era ligeiramente amarelada, se intensificou até o final do tempo de estudo (30 dias), chegando ao final do experimento completamente marrom. Observou-se também a formação de produtos de degradação, com tempo de retenção de 3,0 e 5,5 minutos respectivamente, para a cefuroxima sódica em sua embalagem original, e em ambos os casos houve uma diminuição no teor do fármaco.

Com base nos resultados obtidos, os quais demonstraram alteração nas características organolépticas (em todas as amostras), na porcentagem residual de cefuroxima sódica e aparecimento de produtos de degradação nos cromatogramas, é possível afirmar que houve degradação do fármaco.

Com isso, verifica-se a importância de proteger este fármaco da luz, inclusive durante todo o processo de produção do medicamento.

8.2.2 Estudo da degradação térmica da cefuroxima sódica

Dados da literatura indicam que cefalosporinas são estáveis à temperatura de 24°C, porém sofrem inícios de degradação em solução aquosa a 37°C (MANDURU et al.,

1996; ROGER; ARRUDA; HAVERSTICK, 1996). Zajac e colaboradores (2003) estudaram a influência da temperatura na cefuroxima axetil e identificaram dois estereoisômeros: anti-cefuroxima axetil e Δ -3-cefuroxima axetil. Os produtos de degradação estão apresentados na Figura 30. No entanto, não especifica a estabilidade em preparações de cefuroxima sódica na forma sólida (pó para solução injetável).

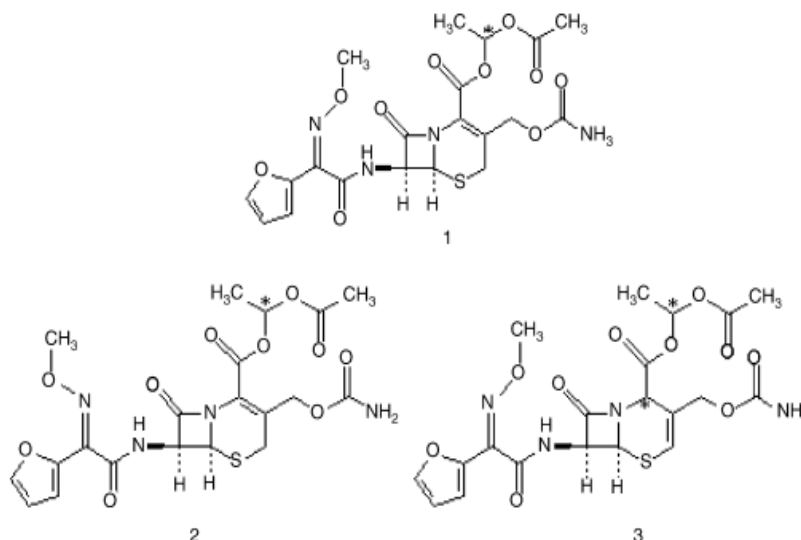


Figura 30: Cefuroxima axetil (1) e seus produtos de degradação: anti-cefuroxima axetil (2) e Δ -3-cefuroxima axetil (3).

Para testar a estabilidade térmica da cefuroxima sódica, nesta forma farmacêutica, foram colocados em câmara climática, e mantida a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{ UR}$, três frascos da amostra, em embalagem de vidro incolor original, e três frascos contendo solução aquosa (125 mg/mL) de cefuroxima sódica.

As amostras da embalagem original foram coletadas nos tempos de exposição de 0, 1, 7, 14, 21, 28, dias. As soluções aquosas (125 mg/mL) foram coletadas após 0, 1, 2, 6, 12 e 24 horas de exposição.

8.2.2.1 Análise em CLAE

Após o tempo de exposição, pesou-se o equivalente a 10,0 mg das amostras expostas em sua embalagem original (pó para solução injetável) e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água. Desta solução foi

transferida alíquota de 120 μL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se concentração teórica de 12,0 $\mu\text{g/mL}$.

Para a análise das soluções aquosas transferiu-se alíquota de 96 μL da solução a 125 mg/mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel para análise cromatográfica obtendo-se concentração de 12,0 $\mu\text{g/mL}$.

Todas as amostras analisadas foram filtradas em membrana de tamanho de poro 0,45 μm . Amostra armazenada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi utilizada como controle.

8.2.2.1.1 Resultados

A Tabela 67 apresenta os resultados obtidos com o pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original mantidas em câmara climática a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{ UR}$, pelo método de CLAE.

Tabela 67: Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original mantidas em câmara climática a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{ UR}$, analisados por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Área	Teor (%)	Teor médio (%) $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	691548	100,01	$100,01 \pm 0,30$	0,79
	690879	99,91		
	692458	100,14		
1	690978	99,93	$99,86 \pm 0,25$	0,56
	689988	99,78		
	690931	99,92		
7	629305	91,01	$91,16 \pm 0,35$	1,08
	631458	91,32		
	630587	91,20		
14	590458	85,39	$85,19 \pm 0,42$	1,62
	587325	84,94		
	589745	85,29		
21	490896	70,99	$70,67 \pm 0,54$	2,64
	489431	70,78		
	485758	70,25		
28	429896	62,17	$62,48 \pm 0,60$	3,22
	430568	62,27		
	435782	63,02		

A Tabela 68 apresenta os resultados obtidos com a solução de cefuroxima sódica mantida em câmara climática a $40 \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{ UR}$, pelo método de CLAE.

Tabela 68: Quantificação de cefuroxima sódica solução mantida em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, analisados por CLAE

Tempo de exposição (horas)	Área	Teor (%)	Teor médio (%) $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	694897	100,49	$100,41 \pm 0,34$	1,03
	695132	100,53		
	693235	100,26		
1	695478	100,58	$100,51 \pm 0,38$	1,32
	693589	100,31		
	696152	100,68		
2	688897	99,63	$99,71 \pm 0,30$	0,79
	690432	99,85		
	689327	99,69		
6	680458	98,41	$98,63 \pm 0,47$	1,99
	681527	98,56		
	684328	98,96		
12	628932	90,96	$90,76 \pm 0,43$	1,69
	625745	90,50		
	628327	90,87		
24	498564	72,11	$72,23 \pm 0,31$	0,87
	500258	72,35		
	499798	72,28		

8.2.2.2 Análise microbiológica

Para a análise microbiológica foi preparada uma solução pesando-se 50,0 mg de cefuroxima sódica exposta em sua embalagem original (pó para solução injetável), e transferindo-a para balão volumétrico de 100,0 mL completando o volume com água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se

soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, respectivamente.

Para o teste da solução foi retirada alíquota de 40 µL da solução a 125 mg/mL e transferida para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com água purificada e obtendo uma concentração de 500 µg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, respectivamente.

8.2.2.2.1 Resultados

A Tabela 69 apresenta os resultados obtidos com o pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original mantidas em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.

Tabela 69: Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original mantidas em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar

Tempo de exposição (dias)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	Teor médio (%) $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	121,35	101,12	101,06 $\pm$ 0,08	0,25
	120,95	101,79		
	121,54	101,28		
1	115,85	96,54	95,23 $\pm$ 0,40	1,44
	114,58	95,48		
	112,41	93,67		
7	105,89	88,24	88,42 $\pm$ 0,41	1,48
	104,45	87,04		
	107,98	107,98		
14	100,65	83,87	84,44 $\pm$ 0,25	0,75
	102,36	85,30		
	100,98	84,15		
21	80,78	67,31	67,19 $\pm$ 0,29	0,79
	79,63	66,35		
	81,52	67,92		
28	73,16	60,96	60,85 $\pm$ 0,65	1,96
	70,59	58,82		
	75,31	62,75		

A Tabela 70 apresenta os resultados obtidos com a solução de cefuroxima sódica mantida em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.

Tabela 70: Quantificação de cefuroxima sódica solução mantida em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar

Tempo de exposição (horas)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	Teor médio (%) $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	121,78	101,48	$101,11 \pm 0,36$	1,09
	122,36	101,96		
	119,85	99,87		
1	120,96	100,80	$100,94 \pm 0,18$	0,54
	121,85	101,54		
	120,57	100,47		
2	119,58	99,65	$99,09 \pm 0,16$	0,49
	118,69	98,91		
	118,45	98,71		
6	116,98	97,48	$97,05 \pm 0,22$	0,67
	116,87	97,39		
	115,52	96,27		
12	107,85	89,87	$88,83 \pm 0,32$	0,96
	106,36	88,63		
	105,58	87,98		
24	84,56	70,47	$69,67 \pm 0,24$	0,47
	83,39	69,49		
	82,87	69,06		

A Figura 31 representa os teores de cefuroxima pó para solução injetável obtidos por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à temperatura, por um período de 28 dias.

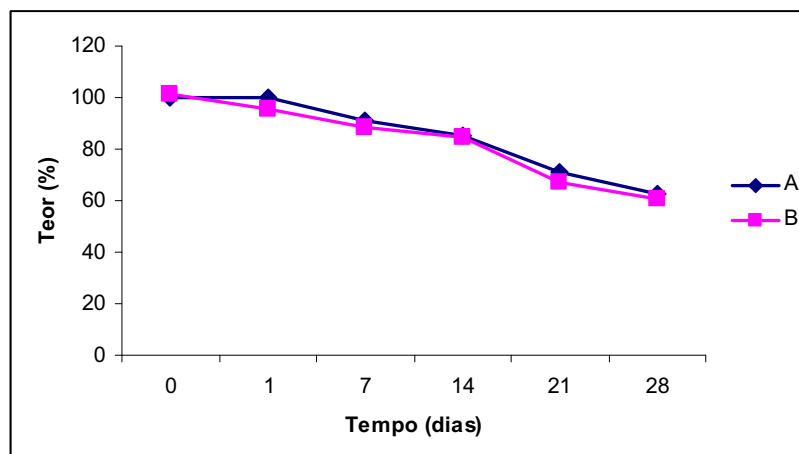


Figura 31: Representação gráfica dos teores de cefuroxima pó para solução injetável obtidos após exposição à câmara climática $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$ por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.

A Figura 32 representa os teores de cefuroxima solução obtidos por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à temperatura, por um período de 24 horas.

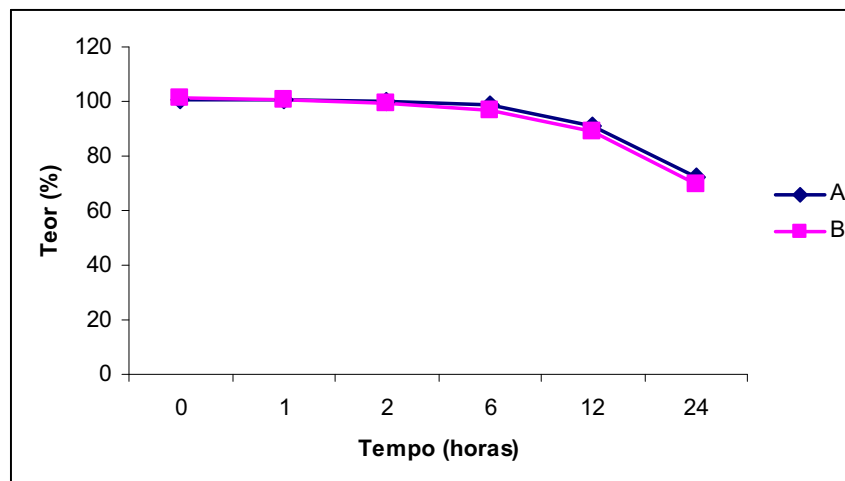


Figura 32: Representação gráfica dos teores de cefuroxima solução obtidos após exposição à câmara climática $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$ por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.

8.2.2.3 Discussão

O estudo da degradação térmica demonstrou que a cefuroxima sódica, tanto na forma sólida (pó para solução injetável) quanto na solução, é susceptível à temperatura nas condições estudadas.

Em seus estudos, Gaspar e colaboradores (2002) observaram que a degradação da cefuroxima é totalmente dependente da água e da temperatura as quais originam quatro diferentes produtos (na sua maioria desconhecidos) resultantes da influência da temperatura. O produto D1 (9,209 min) é um composto instável e que foi totalmente decomposto pelo tempo onde o composto original desapareceu na solução. Os compostos D2 (14,916 minutos), D3 (11,949 min) e D4 (10,665) começam a se formar somente após cerca de 50 h após a dissolução do antibiótico.

Em nosso trabalho as análises foram feitas expondo três frascos da embalagem original e três frascos contendo a solução de cefuroxima sódica em câmara climática ajustada a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$, forçando condições extremas de análise. Este estudo teve como objetivo verificar o decaimento do teor de cefuroxima sódica durante o período de 28 dias para o pó para solução injetável e 24 horas para a solução e também verificar a formação de possíveis produtos de degradação.

As Tabelas 67 e 69 mostram a diminuição dos teores de cefuroxima pó para solução injetável mantida em câmara climática a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR}$ determinados pelos métodos propostos de cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico.

Os resultados demonstraram que a amostra sólida (cefuroxima pó para solução injetável) apresenta diminuição no teor de forma semelhante pelos dois métodos, porém, o ensaio microbiológico apresentou maior sensibilidade em detectar a diminuição da atividade antimicrobiana, demonstrando teores de 101,06%, 95,23%, 88,42%, 84,44%, 67,19%, 60,85% após a exposição à temperatura repectivamente, durante 28 dias, enquanto o método cromatográfico demonstrou teores de 100,01%, 99,86%, 91,16%, 85,19%, 70,67 e 62,48% respectivamente nas mesmas condições (tipo e tempo de exposição).

Os resultados mostraram ainda que a temperatura interfere na estabilidade da cefuroxima pó para solução injetável (amostra sólida) de maneira semelhante, havendo perdas correspondentes nos teores do fármaco e, praticamente, na mesma velocidade, conforme pode ser verificado.

As tabelas 68 e 70 indicam a diminuição nos teores de cefuroxima solução exposta à temperatura quando comparado à diminuição dos teores na forma sólida.

De acordo com o observado para a forma sólida, o ensaio microbiológico mostrou-se mais sensível que o método cromatográfico, com valores de 101,11%, 100,94%, 99,09%, 97,09%, 97,05%, 88,83% e 69,67% durante 24 horas respectivamente para a exposição à temperatura contra teores de 101,41%, 100,51%, 99,71%, 98,63%, 90,76% e 72,23% nas mesmas condições (tipo e tempo de exposição).

Os resultados revelam a contribuição da água na aceleração das reações de degradação de fármacos (EV, 2003). Quando a decomposição do fármaco é resultante de uma reação de hidrólise, como é o caso do anel β -lactâmico, um efetivo meio de estabilizar a molécula é limitar o contato do fármaco com a água, o que é facilmente alcançado pela utilização de formas de dosagens sólidas, como é o caso da cefuroxima, a qual normalmente encontra-se disponível na apresentação extemporânea de pó para solução injetável, justamente em função da sua instabilidade em formulações líquidas em poucas horas, conforme pode ser verificado no presente trabalho.

8.2.3 Estudo da fotodegradação da cefuroxima sódica

É sabido que a ação de agentes físicos tais como: calor, luz, umidade e gases, podem causar alterações químicas e modificações nas características organolépticas de uma determinada substância. Pode ocorrer a formação de produtos tóxicos e/ou a perda parcial ou total da atividade terapêutica do fármaco.

Entre esses agentes, destaca-se a luz, que pode causar reações fotoquímicas. Esta é uma via de degradação de elevada importância para medicamentos, tanto no período de elaboração, como na fase de armazenamento (NUDELMAN, 1975). Uma reação fotoquímica é iniciada pela absorção de radiação eletromagnética (CANET; MANI, 1972). Neste caso, uma das condições para que a reação fotoquímica se realize é que a molécula do fármaco absorva radiação emitida por uma fonte. A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode fotolisar muitas ligações químicas com degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade das substâncias utilizadas em medicamentos e os fotoprodutos formados.

Dados da literatura não descrevem a fotoestabilidade química e fotoprodutos da cefuroxima, desta forma, neste trabalho três amostras, na embalagem original (frasco de vidro incolor) e três frascos contendo solução aquosa (125 mg/mL) de cefuroxima foram colocados sobre um suporte, de tal modo que todas as amostras foram mantidas a uma distância constante e igual a 4 cm da fonte de irradiação.

As amostras foram coletadas nos tempos de exposição de 1, 7, 14, 21 e 28 dias. As soluções aquosas (125 mg/mL) foram coletadas após 6, 12 e 24 horas de exposição.

8.2.3.1 Análise em CLAE

Após o tempo de exposição, pesou-se o equivalente a 10,0 mg das amostras expostas em sua embalagem original (pó para solução injetável) e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água. Desta solução foi transferida alíquota de 120 µL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel (metanol: água, 70:30), obtendo-se concentração teórica de 12,0 µg/mL.

Para a análise das soluções aquosas transferiu-se alíquota de 96 µL da solução a 125 mg/mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel (metanol: água, 70:30) para análise cromatográfica obtendo-se concentração de 12,0 µg/mL.

Todas as amostras analisadas foram filtradas em membrana de tamanho de poro 0,45 µm e volumes de 20 µL foram injetados.

8.2.3.1.1 Resultados

A Tabela 71 apresenta os resultados obtidos com o pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original exposta à radiação UV, pelo método de CLAE.

Tabela 71: Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original exposta à radiação UV, pelo método de CLAE

Tempo de exposição (dias)	Área*	Teor (%)	Teor médio (%) ± e.p.m.	DPR (%)
0	688298	99,54	99,56 ± 0,17	0,27
	686597	99,29		
	690458	99,85		
1	682698	98,73	98,51 ± 0,16	0,24
	679432	98,25		
	681327	98,53		
7	679458	98,26	97,99 ± 0,17	0,26
	675896	97,74		
	677412	97,96		
14	671835	97,15	97,16 ± 0,16	0,23
	673478	97,39		
	670298	97,94		
21	665789	96,28	96,20 ± 0,16	0,24
	663258	95,92		
	666485	96,38		
28	659468	95,37	95,54 ± 0,16	0,15
	656608	95,57		
	661532	96,66		

*Cada valor é a média de três determinações.

DPR = desvio padrão relativo

e.p.m. = erro padrão médio

A Tabela 72 apresenta os resultados obtidos com a solução de cefuroxima sódica exposta à radiação UV, pelo método de CLAE.

Tabela 72: Quantificação de cefuroxima sódica solução exposta à radiação UV, pelo método de CLAE

Tempo de exposição (horas)	Área*	Teor (%)	Teor médio (%) ± e.p.m.	DPR (%)
0	690471	99,85	100,21 ± 0,20	0,36
	692879	100,20		
	695432	100,57		
6	675698	97,72	97,53 ± 0,16	0,24
	672548	97,26		
	674896	97,60		
12	605789	87,61	87,33 ± 0,19	0,32
	604369	87,40		
	601458	86,98		
24	599487	86,69	86,73 ± 0,13	0,16
	598756	86,59		
	600987	86,91		

*Cada valor é a média de três determinações.

DPR = desvio padrão relativo

e.p.m. = erro padrão médio

8.2.3.2 Análise microbiológica

Para a análise microbiológica foi preparada uma solução pesando-se 50,0 mg de cefuroxima sódica exposta em sua embalagem original (pó para solução injetável), e transferindo-a para balão volumétrico de 100,0 mL completando o volume com água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 500 µg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, respectivamente.

Para o teste da solução foi retirada alíquota de 40 µL da solução a 125 mg/mL e transferida para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com água purificada e obtendo uma concentração de 500 µg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,6; 1,2 e 2,4 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o

volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 30,0; 60,0 e 120,0 µg/mL, respectivamente.

8.2.3.2.1 Resultados

A Tabela 73 apresenta os resultados obtidos com o pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original exposta à radiação UV, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.

Tabela 73: Quantificação de pó para injeção de cefuroxima sódica em sua embalagem original exposta à radiação UV, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar

Tempo de exposição (dias)	Concentração (µg/mL)	Teor (%)	Teor médio (%) ± e.p.m.	DPR (%)
0	119,87	98,79	100,08 ± 0,37	1,24
	121,56	100,18		
	122,87	102,26		
1	118,56	97,714	96,34 ± 0,39	1,37
	116,89	96,33		
	115,23	94,96		
7	117,56	96,88	96,99 ± 0,33	0,97
	118,93	98,01		
	116,58	96,08		
14	115,81	95,44	94,02 ± 0,37	1,27
	113,56	93,59		
	112,87	93,02		
21	114,25	94,16	94,32 ± 0,32	0,94
	115,69	95,34		
	113,43	93,48		
28	113,58	93,60	93,56 ± 0,32	0,92
	114,61	94,45		
	112,37	92,61		

DPR = desvio padrão relativo
e.p.m. = erro padrão médio

A Tabela 74 apresenta os resultados obtidos com a solução de cefuroxima sódica exposta à radiação UV, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.

Tabela 74: Quantificação de cefuroxima sódica solução sódica exposta à radiação UV, por ensaio microbiológico-método de difusão em ágar.

Tempo de exposição (horas)	Concentração (µg/mL)	Teor (%)	Teor médio (%) ± e.p.m.	DPR (%)
0	121,56	100,18	101,13 ± 0,31	0,88
	122,89	101,27		
	123,68	101,93		
6	117,32	96,67	95,48 ± 0,37	1,27
	115,98	95,58		
	114,25	94,16		
12	106,46	88,17	89,32 ± 0,40	1,43
	109,79	90,93		
	107,32	88,88		
24	101,32	83,91	83,42 ± 0,26	0,63
	100,98	83,63		
	99,87	82,71		

DPR = desvio padrão relativo
e.p.m. = erro padrão médio

A Figura 33 representa os teores de cefuroxima pó para solução injetável obtidos por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à temperatura, por um período de 28 dias.

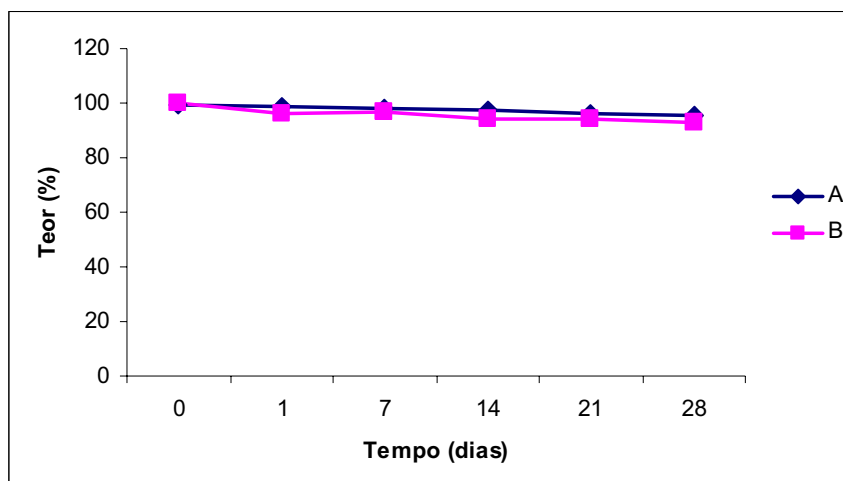


Figura 33: Representação gráfica dos teores de cefuroxima pó para solução injetável obtidos após exposição à radiação UV por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.

A Figura 34 representa os teores de cefuroxima solução obtidos por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à temperatura, por um período de 24 horas.

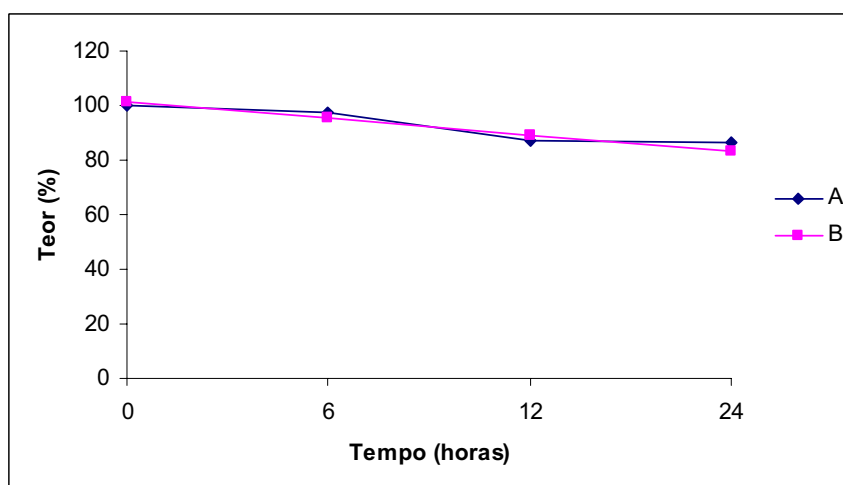


Figura 34: Representação gráfica dos teores de cefuroxima solução obtidos após exposição à radiação UV por CLAE (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.

8.2.3.3 Discussão

O estudo de fotodegradação demonstrou que a cefuroxima é susceptível à luz UVC (254 nm) nas condições estudadas.

As diminuições nos teores do fármaco podem ser visualizadas nas Figuras 33 e 34, respectivamente para a amostra sólida (pó para solução injetável) e para a solução, onde essa diminuição mostra-se nítida em função do tempo de exposição.

Esse fato confirma a necessidade do correto armazenamento do medicamento, uma vez que os processos degradativos têm início quando condições adversas de luminosidade, temperatura e/ou radiação estão presentes. Os resultados indicam que o fármaco deve ser utilizado imediatamente após a preparação da solução aquosa; períodos de tempo maiores devem ser analisados caso a caso.

O ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar-cilindros em placas mostrou maior sensibilidade em detectar a diminuição da atividade antimicrobiana de cefuroxima que o método cromatográfico, indicando ser de extrema importância a sua realização em produtos que necessitam da confirmação de sua atividade biológica, como é o caso dos fármacos antimicrobianos.

O método desenvolvido e validado em CLAE demonstrou a capacidade de diferenciar os produtos de degradação do fármaco não degradado. Podemos observar nas Tabelas 71 e 72, respectivamente para amostra sólida e solução, o decaimento do teor de cefuroxima, após os tempos de exposição pré-determinados. Após exposição de 28 dias, o pó para solução injetável exposto a luz UVC, apresentou teor residual de 95,54% e após exposição de 24 horas da solução, o teor de 86,73%.

A Figura 33 mostra que a amostra sólida (pó para solução injetável) de cefuroxima apresenta um decaimento mais drástico no teor do fármaco quando comparado com a solução (Figura 34). Esse fato confirma a necessidade do correto armazenamento do medicamento, uma vez que os processos degradativos têm início quando condições adversas de luminosidade, temperatura e/ou radiação estão presentes. Os resultados indicam que o fármaco deve ser utilizado imediatamente após a preparação da solução aquosa; períodos de tempo maiores devem ser analisados caso a caso.

8.2.3.4 Discussão Geral

O estudo da estabilidade de cefuroxima sódica pó para solução injetável foi um dos objetivos deste trabalho, tendo em vista a pequena quantidade de informações na literatura. Os trabalhos encontrados citam a susceptibilidade da cefuroxima axetil a degradação básica (ZAJAC et al., 2003; IVANA; LJILJANA; MIRA, 2006).

Neste capítulo inicialmente, foram realizados os testes preliminares a fim de conhecer quais os fatores eram importantes para a degradação da cefuroxima sódica.

Observamos que o fármaco é sensível a degradação ácida, alcalina oxidativa e apresenta diferenças nos cromatogramas obtidos em CLAE quando preparada em soluções de ácido clorídrico, hidróxido de sódio ou peróxido de hidrogênio. Assim, soluções cefuroxima sódica devem ser utilizadas em curto período de tempo após a preparação, além da necessidade de abrigo da luz, evitar a exposição a altas temperaturas e controlar possíveis variações de pH. Tais requisitos são de extrema importância para a segurança do medicamento, pois segundo Nudelman (1975) "o que pode acontecer a um paciente, gravemente enfermo, que recebe um medicamento deteriorado, que não contém as doses terapêuticas prescritas, ou se a contém, não está biologicamente disponível"?

9 – Conclusões



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

Os métodos para análise qualitativa de cefuroxima sódica na forma farmacêutica injetável, propostos neste trabalho são métodos relativamente simples. As análises qualitativas permitiram caracterizar o fármaco através da espectrofotometria nas regiões infravermelho, visível e ultravioleta, da cromatografia em camada delgada e das reações de coloração, que demonstraram resultados positivos quando comparados com aqueles da SQR.

As determinações de faixa de fusão, umidade, resíduo por incineração, solubilidade e caracteres físicos permitiram verificar a possível presença de impurezas na SQR e o estudo de análise térmica, realizado pelo método termogravimétrico, foi possível demonstrar que a cefuroxima sódica SQR não apresentou degradações ou impurezas antes do desenvolvimento dos métodos quantitativos.

Os métodos espectrofotométricos são largamente utilizados nas análises quantitativas de fármacos por apresentarem bom nível de exatidão e precisão. Muitos autores admitem que estes métodos, quando bem conduzidos, apresentam valores de exatidão e precisão compatíveis com os níveis de exigência adotados nos códigos oficiais. Em relação à sensibilidade, pode ser feita certa restrição devido à imensa diversificação das estruturas químicas encontradas entre os fármacos. O uso de equipamentos relativamente simples e a utilização da água como solvente/reagente para a determinação das análises espectrofotométricas, junto à facilidade de execução, constituem vantagens complementares, que justificam o largo emprego do método no controle de qualidade. A estes fatores, soma-se o custo relativamente baixo.

Entre os métodos modernos de análise e de utilização considerada indispensável por laboratórios, a cromatografia ocupa lugar de destaque, devido à sua facilidade em efetuar separação, identificação e quantificação das espécies químicas. Dentre os diversos tipos existentes, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais utilizadas, devido à sua característica mais importante, que é a elevada eficiência atingida. A CLAE utiliza equipamentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados e apresenta capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, mesmo em pequenas quantidades, em escala de tempo de poucos minutos, com alta exatidão, precisão e sensibilidade. As amostras podem ser líquidas ou sólidas; os gases são as únicas amostras que não podem ser determinadas por este tipo de cromatografia.

Mesmo apresentando tantas vantagens, a CLAE também tem algumas restrições, como por exemplo, o alto custo na aquisição da instrumentação, na manutenção das fases móveis de alto grau de pureza e das colunas, além da geração de resíduos devido ao maior consumo de solventes.

O ensaio microbiológico é um método que não se restringe à quantificação de fármacos, mas que pode também ser empregado na observação de mudanças nas características de potência destas substâncias frente aos microrganismos-teste (USP 32, 2009). Além disto, é capaz de determinar a potência em concentrações baixas de analito. Métodos microbiológicos são os únicos capazes de determinar a potência de agentes antimicrobianos e, embora consumam maior tempo de análise, esta desvantagem foi praticamente eliminada com a validação de um ensaio turbidimétrico.

Os métodos titulométricos apresentam aparelhagem simples e são de rápida execução, porém sua reação deve ser simples e praticamente instantânea ou com grande velocidade. Apresentam como desvantagens o ponto final da titulação, que na maioria das vezes é realizada através de mudança de cor verificada pela visão humana. Um segundo aspecto negativo a ser dito, é o consumo de maior quantidade de amostra, comparada aos outros métodos.

No estudo de estabilidade, foi possível concluir que a cefuroxima sódica sofre degradação tanto na forma sólida (pó para solução injetável) como na forma líquida (solução) quando exposta a fatores como temperatura e radiação. O estudo de estabilidade procurou demonstrar a importância do correto armazenamento de fármacos, dando ênfase à proteção contra exposição à temperatura elevada ou radiação, a fim de se garantir os teores de fármaco aceitáveis durante o período de validade do medicamento.

Desta forma podemos eleger o método cromatográfico como seletivo, sensível, preciso, exato nos permitindo a separação dos componentes de uma amostra; sendo aplicável ao estudo dos produtos de decomposição. Quanto ao método UV, de segunda escolha por ser menos seletivo, mas como capacidade de quantificação de pequenas quantidades de analito e com custo relativamente menor que um cromatógrafo CLAE.

O método microbiológico, embora sensível e útil na avaliação da potência do analito frente ao micro-organismo indicador, apresenta algumas dificuldades de execução como aquisição das cepas por seu custo, padronização das placas, camadas de ágar base e inóculo, inserção dos cilindros sobre a superfície do ágar, controle de temperatura da estufa de cultura bem como medição do halo de inibição pelo analista.

Quanto aos métodos por titulometria, contam como pontos positivos a facilidade de aquisição de vidrarias, mas em se tratando de calibrações, o custo aumenta cerca de 4 vezes o preço da mesma; reagentes e soluções, há a necessidade de padronização e correto preparo, o ponto final ou de viragem também pode ser influenciado pelo observador no reconhecimento da mudança de cor; porém se faz necessário ponderar que a quantidade de amostra empregada no ensaio se torna bem maior devido a baixa sensibilidade destes métodos em questão.

Referências Bibliográficas

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

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

ADAMS, A.I.H.; BERGOLD, A.M. Doseamento do cloridrato de sertralina por cromatografia líquida de alta eficiência e volumetria em meio não-aquoso. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 37, n. 3, p. 329-334, 2001.

AGBABA, D.; ERIC, S.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; ZIVANOV, S.; STAKIC, D. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins using ferrihydroxamate method. **Spectroscop. Lett.**, v. 30, n. 2, p. 309-319, 1997.

AKIO, K.; HISAKAZU, Y.; RYOICHI, O.; YUKO, S.; AIKO, M.; MATSUHISA, I. Antibacterial activity of β -lactam antibiotics against extended-spectrum β -lactamase producing bacteria. **Jpn. J. Antibiot.**, v. 52, n. 9, p. 585-594, 1999.

ALARFAJ, N.A.; ABDEL-RAZEQ, S.A. Flow-injection chemiluminescent determination of cefprozil using Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II)-permanganate system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, p. 1423-1427, 2006.

ALMEIDA, E.D.; PETZHOLD, C.L.; ZANOTTO, A.R.; BERGOLD, A.M. Doseamento do aciclovir por volumetria em meio não-aquoso. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 23, n. 2, p. 277-287, 2002.

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

ALWARTHAN, A.A.; METWALLY, F.H.; AL-TAMIMI, S.A. Spectrophotometric assay of certain cephalosporins based on formation ethylene blue. **Anal. Lett.**, v. 26, n. 12, p. 2619-2635, 1993.

AL-ZOUBI, N.; KOUNDOURELLIS, J.E.; MALAMATARIS, S. FT-IR and Raman spectroscopic methods for identification and quantitation of orthorhombic and monoclinic paracetamol in powder mixes. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 459-468, 2002.

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Methods for analysis of must and wines**. New York: John Wiley & Sons, 1980.

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

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

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568p.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15. ed. Arlington, 2002. v.1, p.xvii.

APPELBAUM, P.C. Are cephalosporins appropriate for the treatment of acute otitis media in this of increasing antimicrobial resistance among common respiratory tract pathogens? **Clin. Pediatr.**, v. 44, p. 95–107, 2005.

ARSENE, M.; FAVETTA, P.; FAVIER, B.; BUREAU, J. Comparison of ceftazidime degradation in glass bottles and plastic bags under various conditions. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 27, p. 205-209, 2002.

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. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, p. 557-564, 1999a.

AYAD, M. M.; SHALABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E.; ELSAID, H. M. Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of certain cephalosporins. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 975-983, 1999b.

BARNARD, J.A.; CHAYEN, R. **Metodos modernos de analisis quimico**. Bilbao: Urmo, 1970. p. 75-83.

BEBAWY, L.I.; EL KELANI, K.; ABDEL FATTAH, L. Fluorimetric determination of some antibiotics in raw material and dosage forms through ternary complex formation with terbium (Tb³⁺). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 1219-1225, 2003.

BERENDSEN, B.J.A.; ESSERS, M.L.; MULDER, P.P.J.; VAN BRUCHEM, G.D.; LOMMEN, A.; VAN OVERBEEK, W.M.; STOLKER, L.A.M. Newly identified degradation products of ceftiofur and cephapirin impact the analytical approach for quantitative analysis of kidney. **J. Chrom. A**, v. 1216, p. 8177-8186, 2009.

BIZZARRO, M.J.; DEMBRY, L.M.; BALTIMORE, R.S.; GALLAGHER, P.G. Changing patterns in neonatal Escherichia coli sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **Pediatrics**, v. 121, n. 4, p. 689-696, 2008.

BLOCK, S.L.; DOERN, G.V.; PFALLER, M.A. Oral β -lactams in the treatment of acute otitis media. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, p. 19S–30S, 2007.

BOMPADRE, S.; FERRANE, L.; LEONE, L. On-line solid extraction of cephalosporins. **J. Chrom. A**, v. 812, p. 191-196, 1998.

BONILLA, F.L.G. **Validação de metodologia para análise de moxifloxacino em comprimidos**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

BRITISH Pharmacopoeia 2005. London: The Stationary Office, 2001. v. 1, p. 345-347.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: The Stationary Office, 2010. v. 2, p. 2475.

BRASIL, Leis, decretos. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e

correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos e dão outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, 24 set. 1976.

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

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 1 de 29 de julho de 2005. Guia para realização dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos a fim de prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, 16 nov. 2004.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004. Determina a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, 16 nov. 2004.

BRASIL, Leis, decretos, etc.... Resolução nº 16, de 2 de março de 2007. Aprova o BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 16, de 2 de março de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, 21 ago. 2006.

BRONZWAER, S.L.A.M; CARS, O.; BUCHHOLZ, U.; MOLSTAD, S.; GOETTSCH, W.; VELDHUIJZEN, I.K.; KOOL, J.L.; SPRENGER, M.J.W.; DEGENER, J.E. A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. **Emerging Infect. Dis.**, v. 8, p. 278-282, 2002.

BROOK, I. Review use of oral cephalosporins in the treatment of acute otitis media in child. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 24, p. 18-23, 2004.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick & Adelberg's: Medical Microbiology**. 22nd. ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 144-175.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p. 859.

BUGAY, D.E.; NEWMAN, A.W.; FINDLAY, W.P. Quantitation of cefepime 2HCl dihydrate in cefepime 2HCl monohydrate by diffuse reflectance IR and powder X-ray diffraction techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p. 49-61, 1996.

CAN, N.O.; ALTIOKKA, G.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Determination of cefuroxime axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 576, p. 246, 2006.

CANET, M.M.; MANI, J.C. **Photochemistry and molecular reactions**. Jerusalém: Keter Press, 1972.

CARVALHO, J.P.; SANTOS, A.Z.; SA, A.S.; TEIXEIRA, C.S.; NOGUEIRA, M.S. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Rev. Fármacos & Medicamentos**, v. 34, n.VI, 2005.

CHAUDHARI, S.V.; ASHWINI, K.; ANURADHA, A.; TANDALE, R.S.; VAVIA, P.R. Simultaneous UV spectrophotometric method for the estimation of cefuroxime axetil and probenecid from solid dosage forms. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 68, p. 59-63, 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo, Edgar Blücher, 1998.

CLASS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Focus**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

DAIKOS, G.L.; VÁZQUEZ, J.; MARTÍN, E.; GALARZA, P.; GIMÉNEZ, M.; AGUILAR, L.; CORONEL, P. In vitro susceptibility of Spanish isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to cefditoren and other antimicrobial agents. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 29, p. 471-483, 2007.

DAS GUPTA, V.; STEWART, K.R. Stability of cefuroxime sodium in some aqueous buffered solutions and intravenous admixtures. **J. Clin. Hosp. Pharm.**, v. 11, n. 1, p. 47-54, 1986.

DENOOZ, R.; CHARLIER, C. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromat. B**, v. 864, p. 161-167, 2008.

DOERN, G.V.; HEILMANN, K.P.; HUYNH, H.K.; RHOMBERG, P.R.; COFFMAN, S.L.; BRUEGGEMANN, A.B. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 6, p. 1721-1729, 2001.

DOERN, G.V.; BROWN, S.D. Antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract pathogens in the USA: data from PROTEKT US. **J. Infect.**, v. 48, p. 56-65, 2004.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. **Int. J. Pharm.** v. 321, p. 1-11, 2006.

DOLLERY, C. **Therapeutic drugs**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. v. I. p. 83-156.

DORT, M.V.; WALDEN, C.; WALKER, E.; REYNOLDS, S.; LEVY, F.; SARUBBI, F. An outbreak of infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae* in an extended care facility. **J. Hosp. Infect.**, v. 66, p. 59-64, 2007.

EL-GINDY, A.; EL WALILY, A.F.M.; BEDAIR, M.F. First-derivative spectrophotometric and LC determination of cefuroxime and cefadroxil in urine. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 23, p. 341-352, 2000.

EL-MAMMLI, M.Y. Spectrophotometric determination of flucoxacillin in pharmaceutical preparations some nitrophenols as a complexing agent. **Spectrochim. Acta A**, v. 59, p. 771-776, 2003.

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

EL-WALILY, A.F.M.; GAZY, A.A.; BELAL, S. F.; KHAMIS, E.F. Quantitative determination of some thiazole cephalosporins through complexation with palladium (II) chloride. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 22, p. 385-392, 2000.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: an integrated approach. **J. Pharm Biomed. Anal.**, v. 24, p. 755-767, 2001.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5. ed. European directorate for the quality of medicines. France: Strasbourg Cedex, 2005. p. 1695-1697.

EV, L.S.; SCHAPOVAL, E.E.S. B Microbiological assay for determination of ofloxacin injection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.27, p. 91-96, 2002.

EV, L.S. Estabilidade de medicamentos. In: GOMES, M.J.V.M.; REIS, A.M.M. **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.235-250.

EWING, G.W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

FARMACOPEIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. p.v.5.2.17-v.5.2.17.-15, vi.1.9.-8.

FARMACOPEIA portuguesa. 4 ed. São Paulo: Atheneu 2002. p.166-168.

FELMINGHAM, D.; WHITE, A.R.; JACOBS, M.R.; APPELBAUM, P.C.; POUPARD, J.; MILLER, L.A.; GRÜNEBERG, R.N. The Alexander project: the benefits from a decade of surveillance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, n 2, p. ii3-ii21, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA: an overview. Disponível em: www.cfsan.fda.gov/fdaoview.html. Acesso em: 13 ago 2009.

FOREMAN, J. Collected applications. In: **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**, Mettler-Toledo, 2000. p. 4, 22, 26, 29, 32.

FORSYTH, A.; MOYES, A.; YOUNG, H. Increased ciprofloxacin resistance in gonococci isolated in Scotland. **Lancet**, v. 356, p. 984–1985, 2000.

FRATINI, L. **Estudo de métodos físico-químicos e microbiológicos para a análise de ciprofloxacino**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 1993. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

FREITAS, H.S.A.; HAMANN, E.M. Epidemiological aspects of *Haemophilus influenzae* meningitis in Distrito Federal (DF), Brazil, before introduction of the conjugate vaccine. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 1, p. 25-34, 2004.

FROELICH, P.E. **Doseamentos físico-químicos do norfloxacino**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 1991. Dissertação. (Mestrado em Farmácia).

FUJIMOTO, H.; NAGAOKA, T.; NISHINO, I.; UMEDA, T. Determination of a new oral cephalosporin, S-1090, in human plasma and urine by direct injection high-performance

liquid chromatography with ultraviolet detection and column switching. **J. Chrom. B**, v. 728, p. 125-131, 1999.

FUNASA - Boletim Eletrônico Epidemiológico 2008. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em: 23 jun. 2010.

FURUYA, R.; TANAKA, M. Neisseria gonorrhoeae infections. **Nipp. Rins.**, v. 67, n. 1, p. 129-135, 2009.

GASPAR, A.; ANDRASI, M.; KARDOS, S. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. **J. Chromatogr. B**, v. 775, p. 239-246, 2002.

GHOSH, M.; ERAS, J. *Haemophilus influenzae* CAPD peritonitis in an HIV-infected patient. **J. Infect.**, v. 54, p. e119-e120, 2007.

GIL, E.S.; BATISTA FILHO, R.O.P. Validação de processos. In: GIL, E.S.; ORLANDO, R.M.; MATIAS, R.; SERRANO, S.H.P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Uniderp, 2005. p. 43-54.

GIRON-FOREST, D.; GOLDBRONN, C.H.; PIECHON, P. Thermal analysis methods for pharmacopeial materials. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.7, n. 12, p. 1421-1433, 1989.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals. **Focus**, v. 1, n. 5, p. 191-199, 1998.

GOETZ, M.; MUSSER, J.; WARD, J. Nosocomial transmission of disease caused by non typeable strains of *Haemophilus influenzae*. **Am. J. Med.**, v. 96, p. 342-347, 1994.

GOUGH, J.; KRAAK, W.A.; ANDERSON, E.C.; NICHOLS, W.W.; SLACK, M.P.; MCGHIE, D. Cross infection by non encapsulated *Haemophilus influenzae*. **Lancet**, v. 336, p. 159-160, 1990.

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

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 48, n. 2, p. 247-253, 2008.

GREENWOOD, D.; PEARSON, N.H.; O'GRADY, F. Cefuroxime: a new cephalosporin antibiotic with enhanced stability to enterobacterial β -lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 2, p. 337-343, 1976.

GUPTA, V.B.; O'CONNOR, K.G.; QUEZADA-GOMEZ, C. Care coordination services in pediatric practices. **Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. 1517-1521, 2004.

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

HARDMAN; J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.) **Goodman & Gilman: the pharmacological basis of therapeutics**. 11th. ed. New York: McGraw Hill, 2006. p. 1206-1213.

HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2001. p. 224-260, 355-367, 434-526.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F.X. **Thermal analysis**: fundamentals and applications to polymer. New York: John Wiley & Chichester, 1994. p. 89-92.

HARTIGAN-GO, K. Developing a pharmacovigilance system in the Philippines, a country of diverse culture and strong traditional medicine background. **Toxicology**, v. 181-182, p. 103-107, 2002.

HENRY, N.K.; HOECKER, J.L.; RHODES, K.H. Antimicrobial therapy for infants and children: guidelines for the inpatient and outpatient practice of pediatric infectious diseases. **Mayo Clin. Proc.**, v. 75, p. 86-97, 2000.

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

HOBAN, D.J.; DOERN, G.V.; FLUIT, A.C.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; JONES, R.N. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, n. 2, p. S81-S93, 2001.

HOBAN, D.J.; FELMINGHAM, D. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 2, p. 49- 59, 2002.

HOEGER, P.H. Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *S. aureus* strains in children with atopic dermatitis. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 15, n. 5, p. 474-477, 2004.

ICH - International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95). 2005. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 24 mai. 2010.

ICH - International Conference on Harmonization. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, 2009. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 24 mai. 2010.

ISON, C.A.; WOODFORD, P.J.; MADDERS, H.; CLAYDON, E. Drift in susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin and emergence of therapeutic failure. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 2919- 2922, 1998.

IVANA, I.; LJILJANA, Z.; MIRA, Z. A stability indicating assay method for cefuroxime axetil and its application to analysis of tablets exposed to accelerated stability test conditions. **J. Chromat. A**, v. 1119, p. 209-215, 2006.

IVASKA, A.; NORDSTRÖM, F. Determination of some cephalosporins by differential pulse polarography and linear scan voltammetry. **Anal. Chim. Acta**, v. 146, p. 87-95, 1983.

JACOBS, M.R.; FELMINGHAM, D.; APPELBAUM, P.C.; GRÜNEBERG, R.N. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 229- 246, 2003.

JAMASBI, E.S.; ROUHOLLAHI, A.; SHAHROKHIAN, S.; HAGHGOO, S.; AGHAJANI, S. The electrocatalytic examination of cephalosporins carbon paste electrode modified with CoSalophen. **Talanta**, v. 71, p. 1669-1674, 2007.

JEFFREY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel: Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1992. p. 213-254, 314-325, 521-542, 597-608.

JELINSKA, A.; DUDZINSKA, I.; ZAJAC, M.; OSZCZPOWICZ, I. The stability of the amorphous form of cefuroxime axetil in solid state. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, p. 1075-1081, 2006.

JOHNSON, M.A.; ALLANSON, J.A.; CAUSON, R.C. Determination of the cephalosporin antibiotic cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromat. B**, v. 740, p. 71-80, 2000.

JOHNSON, D.M.; STILWELL, M.G.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. Emergence multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2003). **Diagn. Microbiol. Inf. Dis.**, v. 56, p. 69-74, 2006.

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

JONES, R.N.; CRITCHLEY, I.A.; WHITTINGTON, W.L.H.; JANJIC, N.; POTTUMARTHY, S. Activity of faropenem tested against *Neisseria gonorrhoeae* isolates including fluoroquinolone-resistant strains. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 53, p. 311-317, 2005a.

JONES, R.N. Reevaluation of enterobacteriaceae MIC/disk diffusion zone diameter regression scattergrams for 9 β -lactams: adjustments of breakpoints for strains producing extended spectrum β -lactamases. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 52, p. 235-246, 2005b.

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

JORDANS, J.Z.; SLACK, M.P. *Haemophilus influenzae*: then and now. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, p. 935-948, 1995.

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

JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 795-809, 2002.

KAI, M.; KINOSHITA, H.; MORIZONO, M. Sensitive determination of a β -lactam antibiotic, cefaclor by liquid chromatography with chemiluminescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, p. 1765-1771, 2003.

- KAKUMANU, V.K.; ARORA, V.K.; BANSAL, A.K. Development and validation of isomer specific RP-HPLC method for quantification of cefpodoxime proxetil. **J. Chromatogr. B**, v. 835, p. 16-20, 2006.
- KAM, K.M.; KAM, S.S.Y.; CHUENG, D.T.L.; TUNG, V.W.A.; AU, W.F.; CHEUNG, M.M. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Hong Kong. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 436-439, 2003.
- KANDARAPU, R.; GROVER, V.; CHAWLA, H.P.S.; GARG, S. Evaluation of the compatibility of ketorolac tromethamine with selected polymers and common tablet excipients by thermal and isothermal stress testing. **S. T. P. Pharma Sci.**, v. 11, n. 6, p. 449-457, 2001.
- KARLOWSKY, J.A.; KELLY, L.J.; THORNSBERRY, C.; JONES, M.E.; SAHM, D.A.F. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2540-2545, 2002.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 11, p. 150-151.
- KIMURA, S.; ISHIGURO, M.; ISHII, Y.; ALBA, J.; YAMAGUCHI, K. Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 1454-1460, 2004.
- KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; SAIFON, P.; LAESRIPA, C.; KITPHATI, R.; MUNDY, L.M. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, n. 3, p. 349-355, 2007.
- KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBEST, A.J.; SANGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharm. Technol.**, p. 48-66. February, 2005.
- KOETH, L.; GOOD, C.E.; APPELBAUM, P.C.; GOLDSTEIN, E.J.C.; RODLOFF, A.C.; CLAROS, M.; DUBREUIL, L.J. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, p. 1039-1044, 2004.
- KOROLKOVAS, A.; FERREIRA, E.I. Análise titulométrica em meio não-aquoso. **Rev. Port. Farm.**, v. 36, n. 1. p.1-21, 1986.
- KOROLKOVAS, A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico guanabara**. 2006/2007 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KRZEK, J.; DABROWSKA-TYLKA, M. Simultaneous determination of cefuroxime axetil and cefuroxime in pharmaceutical preparations by thin-layer chromatography and densitometry. **Chromatographia**, v. 58, p. 231-234, 2003.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. Teste de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LEE, R.W. Open-label, randomized comparison of the efficacy and tolerability of clarithromycin, levofloxacin, and cefuroxime axetil in the treatment of adults with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. **Clin. Therap.**, v. 24, n. 9, p. 1414-1425, 2002.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. p. 13-20.

LEITE, F. A fantástica titrimetria: titulação volumétrica. **Rev. Anal.**, v. 12, p. 30-34, 2004.

LEITE, S.N.; VASCONCELLOS, M.P.C. Adesão à terapêutica medicamentosa: elementos para a discussão de conceitos e pressupostos adotados na literatura. **Ciênc. Saúde Col.**, v.8, n.3, p. 775-782, 2003.

LENEHAN, C.E.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W.; ESSERY, K.M. Preliminary evaluation of dual acidic potassium permanganate and Tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chemiluminescence detection for the HPLC. Determination of *Papaver somniferum* alkaloids. **Aust. J. Chem.**, v. 57, p. 1001-1004, 2004.

LEMKE, T. Characterization of stability and compatibility. **LaborPreaxis**, v.27, p. 28-30, 2003.

LI, Y.; LU, J. Chemiluminescence flow-injection analysis of β -lactam antibiotics using the luminol-permanganate reaction. **Luminescence**, v. 21, p. 251, 2006.

LLANES, R.; SOSA, J.; GUZMAN, D.; LLOP, A.; VALDES, E.A.; MARTINEZ, I.; PALMA, S.; LANTERO, M.I. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995–1999): implications for treatment of gonorrhea. **Sex. Transm. Dis.**, v. 30, p. 10– 14, 2003.

LOPES, H.V. Gonorrhoea: new therapeutic failure. **Rev. Panam. Infectol.**, v. 9, n. 2, p. 65-66, 2007.

LUND, W. **The Pharmaceutical Codex. Principles and Practice of Pharmaceutics**. 12. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994. v. 20, p. 20-24, 2003.

MA, Q.L.; YANG, J.H.; WU, X.; HUANG, F.; SUN, L.M. A selective fluorimetric method for the determination of some β -lactamic antibiotics supported by natural science foundations of China and Shandong province. **Anal. Lett.**, v. 33, p. 2689, 2000.

MANDURU, M.; FARIELLO, A.; WHITE, R. L.; FOX, J. L.; BOSSO, J. A. Stability of ceftazidime sodium and teicoplanin sodium in a peritoneal dialysis solution. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 53, p. 2731-2734, 1996.

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

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Desarrollo del análisis microbiológico para la determinación de espafloxacino en polvo y en comprimidos. **Inf. Tecnol.**, v.9, n.5, p.251-254, 1998.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. A high-performance liquid chromatographic assay of sparfloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.20, p.413-17, 1999.

MARTINDALE: **The Complete drug reference**. 35. ed. Barcelona: Pharmaceutical Press, 2007. p. 213.

MARTINÈZ, L.G.; FALCÓ, P.C.; CABEZA, A.S. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 405-423, 2002.

MATKOVIC, S.R.; VALLE, G.M.; GALLE, M.; BRIAND, L.E. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopia infrarroja. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 527-532, 2004.

MAZZEI, T.; CASSETTA, M.I.; FALLANI, S.; ARRIGUCCI, S.; NOVELLI, A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of antimicrobial agents for the treatment of uncomplicated urinary tract infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 28S, p. S35–S41, 2006.

MCEVOY, G.K. Cephalosporins: cefuroxime sodium. Cefuroxime axetil. In: **AHFS Drug Information**. Bethesda: ASHP, 2003. p. 223-231.

MEHTA, A.C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

MERCK index. 14th ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, 2006. p. 323.

MESSERCHMIDT, W. Pharmazeutische Kompatibilität von ceftazidim und metronidazol. **Pharmazeutische Zeitung**, v. 135, p. 36-38, 1990.

MIYAWA, J. H.; SCHULMAN, S.G.; PERRIN, J.H. Postcolumn chemiluminescence as a detection technique in the liquid chromatographic analysis of beta-lactam ring containing compounds. **Biol. Chem.**, v. 11, p. 224, 1998.

MORENCY, P.; DUBOIS, M.J.; GRÉSENGUET, G.; FROST, E.; MÂSSE, B.; DESLANDES, S.; SOMSÉ, P.; SAMORY, A.; MBERYO-YAAH, F.; PÉPIN, J. An etiology of urethral discharge in Bangui, Central African Republic. **Sex Transm. Infect.**, v. 77, p. 125– 129, 2001.

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

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

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

MORETTO, L.D.A. Estabilidade de fármacos e medicamentos. **Pharm. Techn.**, v. 3, n. 4, p.46-48, 1999.

- MORETTO, L.D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharm. Techn.**, v. 4, p. 4-48, 2000.
- MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Cienc. Tecnol. Alim.**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1995. 630p.
- NAVARRO, P.G.; EL BEKKOURI, A.; REINOSO, E.R. Fluorescence accompanying methanolysis of β -lactam antibiotic. **Biomed. Chromatogr.**, v. 13, p. 105-106, 1999.
- NAZIR, J.; URBAN, C.; MARIANO, N.; BURNS, J.; TOMMASULO, B.; ROSENBERG, C.; SEGAL-MAURER, S.; RAHAL, J.J. Quinolone resistant *Haemophilus influenzae* in a long term care facility: clinical and molecular epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1564-1569, 2004.
- NEMUTLUA, 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.
- NGUYEN, N.A.T. The relationship of diastereomer hydrolysis kinetics to shelf-life predictions for cefuroxime axetil. **Pharm. Res.**, v. 8, n. 7, p. 893-898, 1991.
- NICOLÓSI, M. Validação de métodos analíticos. **Controle de contaminação**, v. 54, p.12-21, 2003.
- NISHINO, I.; FUJIMOTO, H.; UMEDA, T. Determination of a new oral cephalosporin, cefmatilen hydrochloride hydrate, and its seven metabolites in human and animal plasma and urine by coupled systems of ion-exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chrom. B**, v. 749, p. 101-110, 2000.
- NUDELMAN, S.N. **Estabilidade de medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.
- NUNES, R.R. Profilaxia antibiótica em cirurgia urológica - proposta de protocolo simplificado. **Acta Urol.**, v. 23, n. 4, p. 91-99, 2006.
- OBERHOLTZER, E. R.; BRENNER, G. S. Cefoxitin sodium: solution and solid-state chemical stability studies. **J. Pharm. Sci.**, v.68, n.7, p.863-866, 1979.
- O'CALLAGHAN, C.H.; SYKES, R.B.; GRIFFITHS, A.; THORNTON, J. Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic: activity in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 9, p. 511-519, 1976.
- OHANNESIAN; S. **Handbook of Pharmaceutical Analysis**. New York: Informa HealthCare, 2002. 585p.
- OLDHAM, G.B. Formulation and stability of cefuroxime eye drops. **Int. J. Pharm. Pract.**, v. 1, p. 19-22, 1991.
- OMAR, M.A.; ABDELMAGEED, O.H.; ATTIA, T.Z. Kinetic spectrofluorimetric determination of certain cephalosporins in human plasma. **Talanta**, v. 77, p. 1394-1404, 2009.

OMAR, M.A.; ABDELMAGEED, O.H.; ATTIA, T.Z. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins in pharmaceutical formulations. **Int. J. Anal. Chem.**, v. 12, 2009.

PARTANI, P.; GURULE, S.; KHURROO, A.; MONIF, T.; BHARDWAJ, S. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of cefuroxime in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. **J. Chrom. B**, v. 878, p. 428-434, 2010.

PASTEELNICK, L.A. Analytical methods validation. In: BERRY, I.R.; NASH, R.A. **Pharmaceutical process validation**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 411-28.

PATEL, S.A.; PATEL, M.N.; PATEL, M.M. Spectrophotometric estimation of cefotaxime and ceftriaxone in pharmaceutical dosage forms. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 68, p. 278, 2006.

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

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

PICHICHERO, M.E.; REINER, S.A.; YAMAUCHI, T.; BROOK, I.; JENKINS, S.G.; MANFORD GOOCH, W.; SHER, L. Controversies in the medical management of persistent and recurrent acute otitis media. Recommendations of a clinical advisory committee. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.**, v. 183, p. 1-12, 2000.

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

PICHICHERO, M.E. Use of selected cephalosporins in penicillin-allergic patients: a paradigm shift. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 3, p. 3-8, 2007.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PONG, A.L.; BRADLEY, J.S. Guidelines for the selection of antibacterial therapy in children. **Pediatr. Clin. North. Am.**, v. 52, p. 869-894, 2005.

PRAMAR Y.; DAS GUPTA V.; BETHEA C.; ZERAI T. Stability of cefuroxime axetil in suspensions. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 16, p. 341-344, 1991.

QUALITY ASSURANCE OF PHARMACEUTICALS: **A Compendium of Guidelines and Related Materials**. Geneva, World Health Organization, 1997. v. 1. 238 p.

RAFALSKIĬ, V.V.; STRACHUNSKIĬ, L.S.; KRECHIKOVA, O.I.; EĬDEL'SHTEĬN, I.A.; AKHMETOVA, L.I.; BABKIN, P.A.; GUGUTSIDZE, E.N.; IL'INA, V.N.; KOGAN, M.I.; KOPYLOV, V.V. Resistance of ambulatory urinary infection pathogens according to the data of multicenter microbiological studies UTIAP-I and UTIAP-II. **Urologiia**, v. 2, p. 13-17, 2004.

RANJANE, P.N; GANDHI, S.V.; KADUKAR, S.S.; RANHER, S.S. Simultaneous determination of cefuroxime axetil and ornidazole in tablet dosage form using reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chin J Chrom.**, v. 26, n 6, 2008.

RIBEIRO, H. **A Bíblia do 5S, da implantação à excelência**. Salvador: Casa da Qualidade, 2006.

RICHARDSON, B.L.; WOODFORD, J.D.; ANDREWS, G.D. Pharmacy of ceftazidime. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 8, p. 233-236, 1981.

RIGA, A.; COLLINS, R. Differential scanning calorimetry and differential thermal analysis. In: **Encyclopedia of Analytical Techniques**. London: Wiley, 2000. (Chapter 13).

RILEY, C. M.; ROSANSKE, T. W. **Development and validation of analytical methods**. London: Pergamon, 1996. v. 3, 352 p.

RILEY, C.M.; ROSANSKE, T.W. MicroAnalytica. **Anal. Chim. Acta**, n. 338, p. 362, 1997.

RISHA, P.G.; VERVAET, C.; VERGOTE, G.; VAM BROTEL, L.; REMON, J.P. Drug formulation intended for the global market should be tested for stability under tropical climatic conditions. **Eur. J. Clin. Pharm.**, v. 59, p. 135-141, 2003.

RODENAS, V.; GARCÍA, M.S.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; ALBERO, M.I. Spectrophotometric methods for the determination of cephadrine or ceftazidime in human urine using batch and flow-injection procedures. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p.1687-1693, 1997.

RODRIGUES, P. C. **Bioestatística**. Rio de Janeiro: Universitária, 1986. p. 98-100.

ROGER, P.D.; ARRUDA, E.; HAVERSTICK, D.M. Stability of vancomycin, gentamicin and ceftazidime in peritoneal dialysis solution. **ASHP Midyear Clinical Meeting**, v. 31, p. 32, 1996.

ROY, S.; RIGAA, A.T.; ALEXANDER, K.S. Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals. **Thermoch. Acta**, v. 392–393, p. 399–404, 2002.

RYAN, D.M.; O'CALLAGHAN, C.H.; MUGGLETON, P.W. Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic: activity in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 9, p. 520–525, 1976.

SADLEJ-SOSNOWSKA, N.; OCIOS, A.; FUKS, L. Selectivity of similar compounds' identification using IR spectrometry: β -Lactam antibiotics. **J. Mol. Struc.**, v. 792–793, p. 110–114, 2006.

SALEH, G.A.; EL-SHABOURY, S.R.; MOHAMED, F.A.; RAGEH, A.H. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins using oxidized quercetin reagent. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 75, n. 5, p. 946-954, 2009.

SALEM, H; ASKAL, H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck 's salt. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 347-354, 2002.

SALEM, H.; SALEH, G.A. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.28, p.1205-1213, 2002.

- SALGADO, H.R.N.; RONCARI, A.F.F. Microbiological assay for determination of azithromycin in ophthalmic solutions. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 40, n. 6, p. 544-549, 2006.
- SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 40, p. 443-446, 2006.
- SAMANIDOU, V.F.; HAPESHI, E.A.; PAPADOYANNIS, I.N. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporins antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. **J. Chromatogr. B**, v.788, p.147-158, 2003.
- SANTORO, M.I.R.M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1988. 122p.
- SCHOLZ, H.; NABER, K.G. Einteilung der oral cephalosporine. **J. Chemother.**, v. 8, p. 227-229, 1999.
- SCOTT, L.J.; ORMROD, D.; GOA, K.L. Cefuroxime axetil: An updated review of its use in the management of bacterial infections. **Drugs**, v. 61, p. 1455-1500, 2001.
- SCOTT H.; HEBRON, B. Formulation and stability of cefuroxime eye drops. **Int. J. Pharm. Pract.**, v. 1, p. 19-22, 1992.
- SHIRNER, R. L.; HERMANN, C.K.F.; MORRILL, T.C.; CURTIN, D.Y.; FUSON, R.C. **The systematic identification of organic compounds**. New York: Wiley, 1998.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. v. 1, p. 292-316.
- SORENSEN, L. K.; SNOR, L. K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. **J. Chrom. A**, v. 882, p. 145-151, 2000.
- SOUZA, M.J.; BITTENCOURT, C.F.; SOUZA-FILHO, P.S. Microbiological assay for enrofloxacin injection. **Int. J. Pharm.**, v. 271, p. 287-291, 2004.
- STEPPE, M.; PRADO, M.S.A.; TAVARES, M. F. M.; PINTO, T.J. A; KEDOR-HACKMANN, E.R.M; SANTORO, M.I.R.M. Comparison of micellar electrokinetic chromatography, liquid chromatography, and microbiologic assay for analysis of cephalexin in oral suspensions. **J. AOAC Int.**, v. 86, n. 4, p. 707-713, 2003.
- STOECKEL, K.; HOFHEINZ, W.; LANEURY, J. P.; DUCHENE, P.; SHEDLOFSKY, S.; BLOUIN, R. A. Stability of cephalosporin prodrug esters in human intestinal Juice: implications for oral bioavailability. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2602-2606, 1998.
- STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, v.31, p.63-70, 1995.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C.M Intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v.16, n. 9-10, p. 51-56, 2004.

STROM, B. **Pharmacoepidemiology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. 876p.

TANAKA, M.; NAKAYAMA, H.; NOTOMI, T.; IRIE, S.; TSUNODA, Y.; OKADOME, A.; SAIKA, T.; KOBAYASHI, I. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Japan, 1993–2002: continuous increasing of ciprofloxacin-resistant isolates. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 24S, p. 15–22, 2004.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Infect. Control.**, v. 34, n. 5, p. 3-10, 2006.

THABAUT, A.; MEYRAN, M.; SOFER, L.; MORAND, A.; LABIA, R. Interactions of ceftibuten with extended-spectrum beta-lactamases: A bacteriological and enzymatic analysis. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 20, p. 49-54, 1994.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **The United States Pharmacopeia: the official compendia of standards**. 32th. ed. Rockville, MD, 2009a. p. 1700.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 32). The National Formulary (NF 31). By authority of United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2009b. p. 683.

THONGPOON, C.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S.; WHEATLEY, R. A.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of cefadroxil using potassium permanganate and formaldehyde system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 42, p. 277-282, 2006.

THOGPOON, C.; LIAWMANGRATH, B.; LIAWMANGRATH, S.; WHEATLEY, R.A.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of cephalosporins in pharmaceutical preparations using tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)-potassium permanganate system. **Anal. Chim. Acta**, v. 553, p. 123-133, 2005.

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

TØNNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 225, p. 1-14, 2001.

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

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

VADAS, E.B. Stability of pharmaceutical products. In: **REMINGTON: The science and practice of pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 986-994.

VADAS, E.B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENNARO, A. R. (Ed.) **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1022-1031.

VAN DYCK, E.; ALARY, M.; GUÉDOU, A.; ABDELLATI, S.; LAFIA, E.; ANAGONOU, S. Antimicrobial susceptibilities and plasmid patterns of *Neisseria gonorrhoeae* in Benin. **Int. J. STD AIDS**, v. 12, p. 89–93, 2001a.

VAN DYCK, E.; KARITA, E.; ABDELLATI, S.; DIRK, V.H.; NGABONZIZA, M. Antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Kigali, Rwanda, and trends of resistance between 1986 and 2000. **Sex. Transm. Dis.**, v. 28, p. 539–545, 2001b.

VAN KRIMPEN, P.C.; VAN BENNEKOM, W.P.; BULT, A. Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. **Pharm. Weekbl.**, v. 9, p. 1–23, 1987.

VERHOEF, J.A.; GILLISSEN, A. Resistant *Haemophilus influenzae* in community-acquired respiratory tract infections: a role for cefixime. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 21, p. 501–509, 2003.

VENERANDA, M.; LEE, C.; O'CONNOR, N.; IVERSON, C.J.; OHYE, R.G.; WHITICAR, P.M.; HALE, J.A.; TREES, D.L.; KNAPP, J.S.; EFFLER, P.V.; WEINSTOCK, H.S. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cefixime. **Clin. Infect. Dis.** v. 37, p. 849–852, 2003.

WANG, J.A.; MEYER, T.F.; RUDEL, T. Cytoskeleton and motor proteins are required for the transcytosis of *Neisseria gonorrhoeae* through polarized epithelial cells. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 298, n. 3-4, p. 209-221, 2008.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana**: Uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos: Temas selecionados, v. 1, n. 4, p. 1-6, Brasília, 2004.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.**, v. 293, p. 101-125, 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 1999. 337p.

WENGER, J.D.; WARD, J.I. ***Haemophylus influenzae* vaccine**. 4. ed. Filadelfia: Plotkin, 2004. p. 239-268.

WHO, Fifty World Health Assembly: Emerging and other communicable diseases: antimicrobial resistance. A51/44, 1998.

WOZNIAK, T.; HICKS, J. Cefuroxime sodium. In: FLOREY, K. (Ed.). **Analytical Profiles of Drug Substances**. San Diego: Academic Press, v. 20, p. 209–237, 1991.

ZAJAC, M.; JELINSKA, A.; DOBROWOLSKI, L.; OSZCZAPOWICZ, I. Evaluation of stability of cefuroxime axetil in solid state. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 1181-1187, 2003.

ZUHRI, A.Z.A.; RADY, A.H.; EL-SHAHAWI, M.S.; AL-DHAHERI, S. Spectrophotometric determination of ampicillin by ternary complex formation with 1,10-phenantroline and copper(II). **Microchem. J.**, v. 50, p. 111-115, 1994.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical products

International Journal of Pharmaceutics