



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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE
CEFAZOLINA SÓDICA EM PÓ LIOFILIZADO
PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL**

MESTRANDA: TAHISA MARCELA PEDROSO

ORIENTADOR: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Araraquara-SP

2013

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

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE
CEFAZOLINA SÓDICA EM PÓ LIOFILIZADO
PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL**

TAHISA MARCELA PEDROSO

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

ORIENTADOR: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Araraquara-SP

2013

Ficha Catalográfica

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

Tahisa Marcela Pedroso

P372a Análise químico-farmacêutica de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável / Tahisa Marcela Pedroso. – Araraquara, 2013
153 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Cefazolina sódica. 2. Cefalosporinas. 3. Controle de qualidade.
4. Métodos analíticos. 5. CLAE. 6. Ensaio microbiológico. 7.
Espectrofotometria. 8. Validação. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient.
II. Título.

CAPES: 40300005

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

TAHISA MARCELA PEDROSO

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE
CEFAZOLINA SÓDICA EM PÓ LIOFILIZADO PARA
SOLUÇÃO INJETÁVEL**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Prof. Dr. ARMANDO DA SILVA CUNHA JUNIOR

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Aprovada em 04 de Abril de 2013.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Este é um momento muito especial e almejado para expressar em palavras todo o meu reconhecimento e gratidão às pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, por essa graça tão desejada e agora alcançada, por me iluminar e me guiar em todas as etapas de minha vida, me conceder saúde, perseverança, paciência e capacidade para realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa de estudo (Processo Nº 2011/03307-4).

Ao meu companheiro José Roberto Ribeiro por todo seu apoio e incentivo.

À minha mãe Maria Inês de Brito Pedroso e aos meus familiares pelo amor e compreensão.

À minha orientadora, professora Doutora Hérica Regina Nunes Salgado, o meu agradecimento pela oportunidade concedida, pela confiança, paciência, compreensão, amizade e colaboração.

Aos meus colegas de laboratório, que dividiram comigo conhecimentos fundamentais, além das frustrações, anseios e principalmente, as alegrias proporcionadas ao decorrer deste período: Ana Carolina Kogawa, Andressa Figueiredo, Flávia Fiorentino, Josilene Corrêa, Lucélia Magalhães, Lucas Chierentin e Rudy Bonfilio pela convivência e incentivo em toda essa temporada, sentirei saudades. Em especial, à minha querida amiga Eliane Tótolli, que esteve presente me apoiando e orientando, durante toda a realização deste trabalho. Terei para sempre uma enorme gratidão, meus sinceros agradecimentos.

À empresa ABL Antibióticos do Brasil Ltda. (Cosmópolis-SP), pela gentil doação dos medicamentos analisados neste trabalho.

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

Aos docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação científica.

À Prof^ª. Dra. Taís Maria Bauab e Prof. Dr. Rudy Bonfilio por terem participado do meu exame de qualificação e igualmente ao Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior e Prof. Dr. Marlus Chorilli por compor a banca examinadora contribuindo com sugestões pertinentes para tornar este trabalho melhor.

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

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, os meus agradecimentos.

RESUMO

Os antimicrobianos têm um papel fundamental no controle de doenças infecciosas. As cefalosporinas se mantêm como uma classe de antimicrobianos que se sobressaem pela sua importância terapêutica, elevada frequência de utilização, segurança e efetividade contra um amplo espectro microbiano. A cefazolina sódica (CFZ) é um agente antimicrobiano β -lactâmico, classificada como cefalosporina de primeira geração, muito utilizado como agente terapêutico e na profilaxia perioperatória. Neste trabalho foram desenvolvidos novos métodos analíticos para análise qualitativa e para a quantificação de cefazolina sódica, visando a obtenção de métodos mais rápidos, mais seguros para os operadores, mais econômicos e de fácil execução, que são essenciais para a análise desta cefalosporina na indústria farmacêutica. Na análise qualitativa, a cefazolina foi estudada quanto a sua solubilidade, ponto de fusão, pH, espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e na região de infravermelho (IV), cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possibilitando a identificação da amostra. Para quantificação do fármaco três métodos foram validados. O método espectrofotométrico na região do ultravioleta foi validado utilizando o comprimento de onda de 270 nm, com faixa linear de concentração de 8 a 28 $\mu\text{g/mL}$ utilizando água purificada como solvente, o teor foi de 99,10% e a exatidão foi de 100,56%. Ensaio microbiológico por método turbidimétrico utilizou o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, com faixa linear de 6 a 11,46 $\mu\text{g/mL}$ e apresentou potência de 100,07% e exatidão foi 99,92%. A validação do método por CLAE foi realizada empregando fase móvel composta por água purificada e acetonitrila (60:40 v/v), com pH 8 ajustado com trietilamina (TEA), no comprimento de onda de 270 nm, o tempo de retenção foi de 3,6 minutos, na faixa linear avaliada de 30 a 80 $\mu\text{g/mL}$, o teor foi de 100,39% e a exatidão de 100,37%. Análises estatísticas corroboraram para avaliação dos resultados obtidos nos parâmetros de validação. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para nível de significância de 5%, demonstrando ser equivalentes para a quantificação da cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável. Os métodos desenvolvidos cumpriram todos os requisitos exigidos pelos órgãos oficiais como FARMACOPEIA BRASILEIRA, FDA e ICH, mostrando-se adequados e simples, podendo ser empregados para a análise de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável na indústria farmacêutica, contribuindo para melhorar o controle de qualidade do fármaco comercializado.

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

ABSTRACT

The antimicrobials have a crucial role in the control of infectious diseases. Cephalosporins remain one class of antimicrobials that stand out for their therapeutic importance, high frequency of use, safety and effectiveness against a broad microbial spectrum. Cefazolin sodium (CFZ) is a β -lactam antimicrobial agent, classified as first-generation cephalosporin, often used as a therapeutic agent and for perioperative prophylaxis. In this work, new analytical methods were developed for qualitative and quantitative analysis of cefazolin sodium in lyophilized powder, seeking obtain method faster, safer for operators, more economical and easiness of implementation, which are essential for the analysis of this cephalosporin in pharmaceutical industry. For qualitative analysis, several methods were performed, including analyzes of solubility, melting point and pH; ultraviolet (UV) and infrared (IR) spectrophotometry; thin layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) allowing the identification of samples. For quantification of the drug, three analytical methods were validated. The spectrophotometric method in the ultraviolet region was validated at 270 nm, with a linear range of concentration from 8 to 28 mg/mL, using purified water as solvent, the content of 99.10% accuracy of 100.56%. In the microbiological assay by turbidimetric method, *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 was used as microorganism test, with linear range from 6 to 11.46 mg/mL, the method presented potency of 100.07% and accuracy of 99,92%. Validation of the HPLC method consisted of mobile phase composed of purified water and acetonitrile (60:40 v/v), adjusted to pH 8 with triethylamine (TEA), and detection wavelength of 270 nm, yielding a retention time of 3.6 minutes in the linear range evaluated from 30 to 80 μ g/mL, content of 100.39% accuracy of 100.37%. The developed methods showed excellent validation results, and the statistical analysis corroborated for its assessment. The developed methods showed no statistical difference for a significance level of 5%, proving to be equivalent to the quantification of cefazolin sodium in samples of lyophilized powder for injectable solution. The methods developed have met all requirements demanded by official agencies BRAZILIAN PHARMACOPEIA, FDA and ICH, shown to be appropriate and simple, could be used for the analysis of cefazolin sodium powder lyophilized for injectable solution in the pharmaceutical industry, helping to improve the quality control of the drug marketed.

Keywords: Cefazolin sodium, cephalosporins, quality control, analytical methods, HPLC, microbiological assay, spectrophotometry, validation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
4. ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO.....	53
4.1. Substância Química de Referência (SQR).....	56
4.2. Forma Farmacêutica.....	56
5. ANÁLISE QUALITATIVA.....	57
5.1. Características físicas.....	58
5.1.1. Método.....	58
5.1.2. Resultados.....	58
5.2. Determinação de solubilidade.....	58
5.2.1. Material.....	58
5.2.2. Método.....	59
5.2.3. Resultado.....	59
5.2.4. Discussão.....	60
5.3. Determinação de umidade.....	60
5.3.1. Material.....	61
5.3.2. Método.....	61
5.3.3. Resultado.....	62
5.3.4. Discussão.....	63
5.4. Determinação da faixa de fusão.....	63
5.4.1. Material.....	63
5.4.2. Método.....	64
5.4.3. Resultado.....	64
5.4.4. Discussão.....	65
5.5. Determinação do pH.....	65
5.5.1. Material.....	65
5.5.2. Método.....	66
5.5.3. Resultado.....	66
5.5.4. Discussão.....	66
5.6. Cromatografia em camada delgada.....	66
5.6.1. Material.....	67
5.6.2. Método.....	67

5.6.3. Resultado.....	69
5.6.4. Discussão.....	71
5.7. Espectrofotometria na região de infravermelho.....	72
5.7.1. Material.....	73
5.7.2. Método.....	73
5.7.3. Resultado.....	74
5.7.4. Discussão.....	75
5.8. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	76
5.8.1. Material.....	77
5.8.2. Método.....	77
5.8.3. Resultados.....	77
5.8.4. Discussão.....	79
5.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	80
5.9.1. Material.....	80
5.9.2. Método.....	80
5.9.3. Resultados.....	81
5.9.4. Discussão.....	85
6. ANÁLISE QUANTITATIVA.....	87
6.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	88
6.1.1. Material.....	89
6.1.2. Método.....	89
6.1.3. Curva de Ringbom.....	89
6.1.4. Obtenção da curva analítica.....	90
6.1.5. Determinação do teor de CFZ pó liofilizado para solução injetável.....	91
6.1.6. Validação.....	91
6.1.7. Resultados.....	94
6.1.8. Discussão.....	99
6.2. Ensaio microbiológico por método turbidimétrico.....	100
6.2.1. Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos.....	100
6.2.2. Execução do ensaio.....	101
6.2.3. Material.....	102
6.2.4. Ensaio.....	103
6.2.5. Obtenção da curva analítica.....	103
6.2.6. Determinação do teor de CFZ pó liofilizado para solução injetável.....	104

6.2.7. Validação do método.....	104
6.2.8. Resultados.....	106
6.2.9. Discussão.....	110
6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	111
6.3.1. Material.....	111
6.3.2. Método.....	112
6.3.3. Determinação do teor de CFZ pó liofilizado para solução injetável.....	113
6.3.4. Conformidade do sistema cromatográfico.....	113
6.3.5. Validação do método analítico por CLAE.....	113
6.3.6. Resultados.....	118
6.3.7. Discussão.....	127
7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS.....	130
8. DISCUSSÃO GERAL.....	133
9. CONCLUSÕES.....	136
10. TRABALHOS REALIZADOS.....	138
11. REFERÊNCIAS.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Núcleo penicilina (a) cefalosporina (b) cefamicina (c).....	25
Figura 2- Estrutura química da CFZ (CAS 27164-46-1).....	37
Figura 3- Ponto de fusão de CFZ pó liofilizado para solução injetável.....	65
Figura 4- Cromatogramas de CFZ SQR (a) e CFZ pó liofilizado para solução injetável (b), nos sistemas 1, 2, 3 e 4 reveladas em vapor de iodo.....	69
Figura 5- Cromatogramas de CFZ SQR (a) e CFZ pó liofilizado para solução injetável (b), nos sistemas 5, 6, 7 e 8 reveladas em vapor de iodo.....	69
Figura 6- Cromatogramas de comparação de CFZ SQR (1), CFZ pó liofilizado para solução injetável (2), cefoxitina (3), ceftazidima (4), ceftriaxona (5) e cefuroxima (6). Revelação em vapor iodo (A) e em câmara de ultravioleta (UVA 365 nm) (B), usando metanol como solvente	70
Figura 7- Cromatograma de cefazolina pó liofilizado para solução injetável intacto (1) e em solução: neutra (2), fotolítica (3), básica (4), ácida (5), e oxidativa (6), utilizando fase móvel água purificada: etanol (1:9) v/v e revelados em câmara ultravioleta (luz UVA 365 nm) logo após o preparo (A), após 0,50 h de degradação (B), após 6 h de degradação (C), após 24 h de degradação (D), após 96 h de degradação (E) e 168 h de degradação (F).....	70
Figura 8- Espectro na região de infravermelho de CFZ SQR (A) e pó liofilizado para solução injetável (B) em pastilhas de KBr.....	73
Figura 9- Espectros na região de infravermelho de cefazolina SQR (preto) e pó liofilizado para solução injetável (vermelho) sobreposto.....	74
Figura 10- Espectro de referência de CFZ disponível na biblioteca de dados do espectrofotômetro Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer modelo: IR Prestige-21 IR Affinity-1 FTIR-8400S/Kyoto – Japan (A) e espectro disponível no compêndio oficial - Japanese Pharmacopoeia 2011 (B)	74
Figura 11- Fórmula estrutural do núcleo cefalosporínico.....	75
Figura 12- Espectro de absorção na região do ultravioleta de CFZ SQR, em comparação a CFZ pó liofilizado para solução injetável, ambas em concentração de 20 µg/mL utilizando água como solvente.....	77
Figura 13- Espectro de absorção na região do ultravioleta, solução de CFZ SQR na concentração de 20 µg/mL, utilizando como solvente: água (A); tampão fosfato pH 6 (B); tampão fosfato pH 8 (C); metanol (D); ácido clorídrico 0, 1 M (E); hidróxido de sódio 0,1 M (F)	78

Figura 14- Espectro de absorção na região do ultravioleta, solução de CFZ SQR na concentração de 20 µg/mL, utilizando como solvente: água, tampão fosfato pH 6 e tampão fosfato pH 8.....	79
Figura 15- Coeficiente de distribuição de CFZ determinado por <i>software</i> ACD/Labs.....	82
Figura 16- Cromatograma de CFZ SQR (preto) e pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de 60 µg/mL, obtidos com fase móvel: água: acetonitrila (60:40 v/v), pH 8 ajustado com TEA e fase estacionária: Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm) 5 µm.....	85
Figura 17- Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para CFZ SQR no comprimento de onda de 270 nm.....	95
Figura 18- Curva analítica de CFZ SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, a 270 nm.....	96
Figura 19- Curvas analíticas de soluções de cefazolina SQR e pó liofilizado para solução injetável, em concentrações de 6,0; 8,4 e 11,76 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico turbidimétrico.....	107
Figura 20- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL logo após o preparo (a) e após 48 horas (b), sob degradação: básica (NaOH 0,1 M) a 60 °C.....	119
Figura 21- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: ácida (HCl 0,001 M) a 60 °C.....	119
Figura 22- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: neutra (água) a 60 °C.....	120
Figura 23- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: Oxidativo (H ₂ O ₂ 3%) a 60 °C.....	120
Figura 24- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: Fotolítica (luz UV) em temperatura ambiente.....	121
Figura 25- Curva analítica de CFZ SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando fase móvel: água: acetonitrila (60:40 v/v) pH 8 ajustado com TEA. Fase estacionária: Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm) 5 µm.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de cefalosporinas por gerações.....	26
Tabela 2- Métodos de CLAE para a determinação de CFZ em matriz biológica.....	43
Tabela 3- Métodos de CLAE para a determinação de CFZ em forma farmacêutica.....	45
Tabela 4- Testes farmacopeicos qualitativos.....	46
Tabela 5- Testes farmacopeicos quantitativos.....	47
Tabela 6- Valores de pKa descritos para CFZ.....	55
Tabela 7- Termos descritivos para o teste de solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira, 2010.....	59
Tabela 8- Solubilidade da CFZ pó liofilizado para solução injetável em diferentes solventes a 25 °C.....	60
Tabela 9- Método de umidade da CFZ pó liofilizado para solução injetável determinado através de analisador de umidade por infravermelho.....	62
Tabela 10- Ponto de fusão obtido para as amostra de CFZ pó liofilizado para solução injetável.....	64
Tabela 11- Faixas de frequências e grupamentos correspondentes das bandas observadas nos espectros de infravermelho de cefazolina SQR e pó liofilizado para solução injetável.....	75
Tabela 12- Fases móveis e colunas testadas durante o desenvolvimento do método de CLAE...	81
Tabela 13- Parâmetros estabelecidos para a determinação de CFZ pó liofilizado para solução injetável, pelo método CLAE.....	82
Tabela 14- Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.....	84
Tabela 15- Obtenção da curva de Ringbom de CFZ por espectrofotometria no UV.....	90
Tabela 16- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	92
Tabela 17- Construção da curva de Ringbom por espectrofotometria na região do UV para CFZ SQR, no comprimento de onda de 270 nm.....	94
Tabela 18- Valores de absorvância determinados para a curva analítica de CFZ SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 270 nm.....	95

Tabela 19- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de CFZ SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	96
Tabela 20- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico na região do UV para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.....	97
Tabela 21- Análise da precisão interdias do método espectrofotométrico na região do UV para determinação de CFZ, por análise de variância (ANOVA).....	97
Tabela 22- Análise da precisão entre-analistas do método espectrofotométrico na região do UV para análise de CFZ SQR por teste <i>t</i> de Student.....	97
Tabela 23- Determinação da exatidão do método analítico para análise CFZ por espectrofotometria na região do UV.....	98
Tabela 24- Avaliação da robustez do método analítico para análise de CFZ por espectrofotometria na região do UV.....	98
Tabela 25- Parâmetros estudados para a avaliação de potência de CFZ em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico.....	101
Tabela 26- Parâmetros padronizados para avaliação de CFZ em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico.....	102
Tabela 27- Absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade do ensaio microbiológico para avaliação de cefazolina em pó liofilizado para solução injetável por método turbidimétrico.....	106
Tabela 28- Avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.....	107
Tabela 29- Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de CFZ, utilizando o método turbidimétrico.....	108
Tabela 30- Precisão intermediária do método turbidimétrico para cefazolina em pó liofilizado para solução injetável.....	108
Tabela 31- Avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.....	109
Tabela 32- Teste de recuperação do método turbidimétrico.....	109
Tabela 33- Teste de robustez utilizando o modelo experimental de Plackett-Burman.....	116
Tabela 34- Fatores selecionados e níveis de variabilidade.....	117
Tabela 35- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico.....	118

Tabela 36- Valores das áreas referentes ao pico de CFZ SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico.....	122
Tabela 37- Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de CFZ SQR, utilizando o método por CLAE.....	123
Tabela 38- Precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de CFZ por CLAE.....	123
Tabela 39- Análise estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias.....	124
Tabela 40- Análise estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre-analista	124
Tabela 41- Exatidão do método analítico para análise CFZ por CLAE.....	124
Tabela 42- Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de CFZ por CLAE.....	125
Tabela 43- Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman.....	126
Tabela 44- Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando espectrofotometria na região do ultravioleta, doseamento microbiológico por turbidimétrico e CLAE.....	131
Tabela 45- Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de CFZ pó liofilizado para solução injetável, pelos métodos propostos.....	131

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Cálculo de desvio padrão relativo (DPR).....	51
Equação 2- Porcentagem de perda por dessecação.....	62
Equação 3- Assimetria do pico cromatográfico.....	83
Equação 4- Fator de alargamento do pico cromatográfico.....	83
Equação 5- Fator de capacidade do pico cromatográfico.....	84
Equação 6- Número de pratos do pico cromatográfico.....	84
Equação 7- Equação de Lambert-Beer.....	88
Equação 8- Cálculo da concentração de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.....	91
Equação 9- Valor percentual de CFZ nas amostras.....	91
Equação 10- Porcentagem de CFZ recuperada.....	93
Equação 11- Limite de detecção.....	93
Equação 12- Limite de quantificação.....	93
Equação 13- Cálculo da potência de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.....	104
Equação 14- Avaliação do efeito das alterações nos parâmetro de robustez por Plackett-Burman.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
As	Fator de assimetria
ATCC	<i>American Type Cultura Collection</i>
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
BV	Balão volumétrico
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFZ	Cefazolina sódica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQ	Controle de qualidade
DAD	Dedector de Arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
e.p.m	Erro padrão da média
FC	Fator de cauda
F_{cal}	Valor de F calculado
F_{tab}	Valor de F tabelado
FM	Fase móvel
GL	Graus de liberdade
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IV	Infravermelho
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
N	Número de pratos
OMS	Organização Mundial da Saúde
QM	Quadrados médios
PLPs	<i>Proteínas de ligação das penicilinas</i>
r	Coefficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R_f	Fator de retenção

SQ	Soma dos quadrados
LSS	Lauril sulfato de sódio
SQR	Substância química de referência
TEA	Trietilamina
t_R	Tempo de retenção
UPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas
UV	Ultravioleta

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em muitos países as altas taxas de morbidade e mortalidade devido às doenças infecciosas são responsáveis por elevados custos sociais e econômicos. Desde a sua descoberta por Brotzu, em 1948, as cefalosporinas se mantêm como uma classe de antimicrobianos que se sobressaem pela sua importância terapêutica, elevada frequência de utilização, segurança e efetividade contra um amplo espectro de agentes microbianos. As cefalosporinas provêm do fungo *Cephalosporium acremonium*, que deu origem a três antibióticos diferentes denominados de cefalosporinas P, N e C. O isolamento do ácido 7-aminocefalosporânico do núcleo ativo da cefalosporina C foi um passo essencial para a produção de vários derivados semissintéticos com atividade antibacteriana muito maior do que a substância original, tornando um grupo de antimicrobianos que representam, sem dúvida, um importante e crescente grupo na medicina atual. Tais antimicrobianos são semelhantes às penicilinas e possuem atividade contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (BROTZU, 1948; RANG et al., 2008; BRUNTON et al., 2012).

A cefazolina sódica (CFZ) é um agente antimicrobiano β -lactâmico, disponível comercialmente na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável e como solução oftálmica. A CFZ pertencente ao grupo de cefalosporinas de primeira geração que se destaca visto que pode ser administrada com menos frequência em virtude da sua meia-vida mais longa. Seu uso é frequentemente empregado na prática clínica por sua eficácia na profilaxia cirúrgica e como agente terapêutico (KUSABA, 2009; BRUNTON et al., 2012).

Contudo, para que o fármaco seja usado pela população com segurança e tenha a eficácia terapêutica esperada, é fundamental o uso de métodos analíticos validados pelo controle de qualidade para avaliar as características físico-químicas do fármaco, bem como a pureza da matéria prima utilizada na fabricação e ainda assegurar que a dosagem esteja correta. Sabe-se que mesmo com o crescente rigor dos órgãos competentes, os pacientes ainda estão sujeitos a usarem medicamentos sem a qualidade almejada.

É importante ressaltar que, quando se trata de medicamentos, a qualidade não é apenas uma questão de valorização e concorrência mercadológica, mas sim uma questão ética, pois, diferente de muitos produtos comercializados, os medicamentos têm como finalidade a saúde do indivíduo e a inobservância desses critérios pode interferir nas características biofarmacêuticas, podendo levar a graves consequências.

Introdução

Embora haja muitos estudos relacionados à CFZ disponíveis na literatura, são poucos os trabalhos que apresentam o desenvolvimento de métodos analíticos aplicados ao controle de qualidade da forma farmacêutica. Com isso, o desenvolvimento e validação de metodologias para quantificação do fármaco, priorizando a otimização de técnicas com menores custos, menores tempos de análise e facilidade de execução, são de alta relevância para análise desta cefalosporina no controle de qualidade da indústria farmacêutica.

Nesse sentido, considerando que a cefazolina sódica é um fármaco comumente usado, justifica-se o fato deste trabalho propor a realização de técnicas analíticas para avaliar as características físico-químicas do fármaco, bem como o desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos para quantificação da cefazolina sódica na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, que são imprescindíveis para a garantia da qualidade na produção de medicamentos seguros e apropriado para uso da população.

OBJETIVOS

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Desenvolver e validar métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.

Métodos qualitativos:

Realizar testes de identificação de CFZ baseada nas suas características físicas.

- ✓ Avaliar a solubilidade de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.
- ✓ Determinar a umidade de CFZ pó liofilizado para solução injetável empregando a técnica de perda por dessecação.
- ✓ Avaliar o ponto de fusão de CFZ substância química de referência (SQR) e pó liofilizado para solução injetável.
- ✓ Determinar o pH da solução de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.
- ✓ Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.
- ✓ Desenvolver método por espectrofotometria na região ultravioleta (UV) e na região de infravermelho (IV) para identificação de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.
- ✓ Desenvolver método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação de CFZ em pó liofolizado para solução injetável.

Métodos quantitativos:

Desenvolver e validar métodos de análises quantitativas de CFZ em pó liofilizado para solução injetável por:

- ✓ Espectrofotometria na região ultravioleta.
 - ✓ Ensaio microbiológico por turbidimetria.
 - ✓ Cromatografia líquida de alta eficiência.
-
- Realizar análise comparativa dos métodos quantitativos desenvolvidos e validados para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas são antimicrobianos frequentemente utilizados na prática clínica, por terem largo espectro de atividade antimicrobiana, possuírem baixa toxicidade, sendo indicados no tratamento de diversos tipos de infecções (CHAN et al., 1986; SALGADO, TOZO, 2007; MORENO, SALGADO, 2010; BRUNTON et al., 2012).

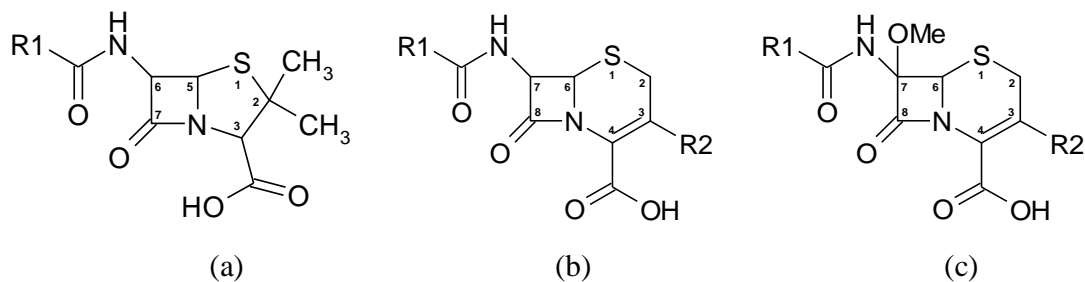
Assim como as penicilinas, as cefalosporinas são antimicrobianos β -lactâmicos de ampla utilização, juntos, constituem o maior grupo de antimicrobianos disponíveis. Surgiram nas décadas de 1940 e 1960, respectivamente, sendo, ainda hoje, os mais comercializados e de vasta importância terapêutica (OHMORI et al., 2011). Novos fármacos pertencentes a estes grupos continuam sendo sintetizados, visando à obtenção de antimicrobianos mais eficazes, estáveis e menos tóxicos (ALEKSEEV, 2010). Seu mecanismo de ação decorre da inibição da síntese de parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de uma maneira similar à penicilina, pois apresentam semelhanças estruturais (SALGADO, TOZO, 2007; BRUNTON et al., 2012). Devido à estas semelhanças, estimava-se que os indivíduos com antecedentes de reações alérgicas à penicilina possuíam maior tendência a desenvolverem reações alérgicas às cefalosporinas, originadas pela reatividade cruzada relacionada com o anel β -lactâmico, presente em ambas (NORBY, 1987; ANTUNEZ et al., 2006). No entanto, há controvérsias, pois vários trabalhos demonstram que as cefalosporinas podem ser empregadas com segurança no tratamento de indivíduos alérgicos à penicilina e ainda se sobressaem por serem resistentes à penicilinase (GOODMAN et al., 2001; PICHICHERO, 2007; DEPESTEL et al., 2008).

Vários trabalhos divulgados na literatura descrevem o surgimento das cefalosporinas por meio do fungo *Cephalosporium acremonium* isolado, em 1948, por Brotzu, no mar próximo a uma saída de esgoto na costa da Sardenha. Os estudos realizados naquela época constataram 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 tifoide em meados da Segunda Guerra Mundial. Os líquidos das culturas nos quais o fungo da Sardenha era cultivado continham 3 antibióticos distintos, que foram denominados cefalosporina P, N e C. À partir do núcleo ativo da cefalosporina C, se obteve o ácido 7-aminocefalosporânico e modificações químicas estruturais oriundas de substituições em suas cadeias laterais permitiram o surgimento de vários antimicrobianos semissintéticos semelhantes às penicilinas e com maior atividade antibacteriana (BROTZU, 1948;

Revisão Bibliográfica

AL-MOMANI, 2001; MARTINEZ et al., 2002; SAMANIDOU et al., 2003; EL-SHABOURY et al., 2007; BRUNTON et al., 2012). A adição de diferentes compostos nas cadeias laterais em R1 e/ou R2 no núcleo cefêmico da cefalosporina influencia diretamente na função do fármaco, de modo que os substituintes na posição 7 do anel β -lactâmico estão relacionados à alteração da atividade antibacteriana destes compostos e substituições na posição 3 do anel diidrotiazina estão associadas à alterações no metabolismo e nas propriedades farmacocinéticas do fármaco (MOHAMED et al., 2008; RANG et al., 2008; BRUNTON et al., 2012). As cefamicidas são antimicrobianos que diferem das cefalosporinas, por possuírem um grupo metóxi na posição 7 do anel β -lactâmico no núcleo do ácido 7-aminocefalosporânico, como apresentado na Figura 1.

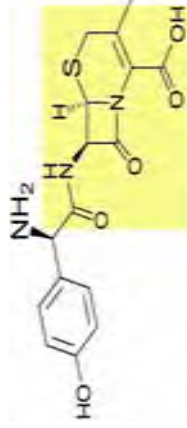
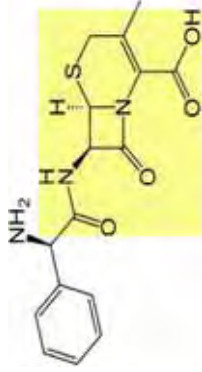
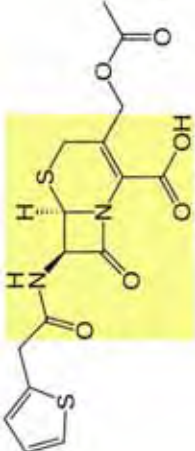
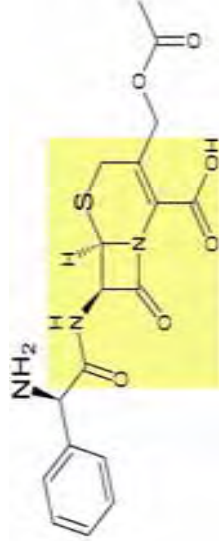
Figura 1- Núcleo penicilina (a) cefalosporina (b) cefamicina (c)



Fonte: BRUNTON et al., 2012

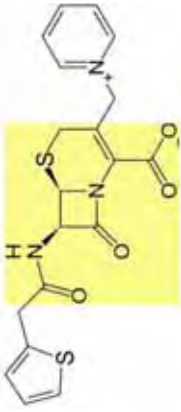
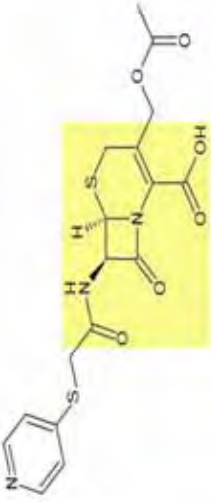
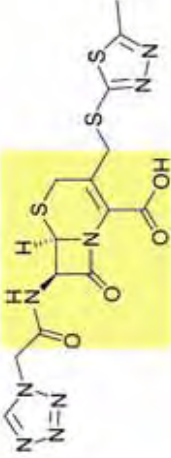
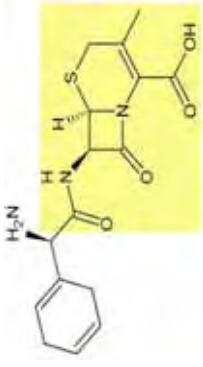
As cefalosporinas e as cefamicidas podem ser classificadas com base nas suas estruturas químicas, farmacológicas, resistência à β -lactamase ou espectro antimicrobiano, no entanto o crescente surgimento de novos fármacos destas classes a cada ano nos permitiu estabelecer um sistema de classificação por “gerações” que se tornou muito usual. A classificação por gerações baseia-se nas características gerais do fármaco e na sua atividade antimicrobiana (REYGAERT, 2011; BRUNTON et al., 2012). Recentemente, com a síntese de ceftaroline e ceftobiprole, já são cinco as gerações de cefalosporinas existentes (REYGAERT, 2011; JACQUELINE, TATTEVIN, 2012). A cada nova geração de cefalosporinas lançada se observa um aumento progressivo no alargamento do espectro de bactérias Gram-negativas, certa redução na atividade contra bactérias Gram-positivas e maior resistência às β -lactamases da primeira para a quinta geração (EL-SHABOURY et al., 2007; KUSABA, 2009). As diferenças estruturais das cefalosporinas e suas indicações terapêuticas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela I- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^o	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^o
<p data-bbox="323 1541 347 1675">Cefadroxila</p>  <p>The chemical structure of Cefadroxil is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A hydroxyl group is attached to the 4-position of the thiazolidine ring. A side chain is attached to the 3-position, consisting of a methylene group, a carbonyl group, and a chiral center with an amino group and a para-hydroxyphenyl ring.</p>	<p data-bbox="284 1025 308 1182">1ª GERAÇÃO</p> <p data-bbox="323 224 419 1211">Indicada para o tratamento das infecções de pele, do trato urinário e infecções otorrinolaringológicas, causada por <i>S. pneumoniae</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>Klebsiella spp</i>, estafilococos coagulase-negativo e <i>S. pyogenes</i>.</p>
<p data-bbox="579 1541 603 1675">Cefalexina</p>  <p>The chemical structure of Cefalexin is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A hydroxyl group is attached to the 4-position of the thiazolidine ring. A side chain is attached to the 3-position, consisting of a methylene group, a carbonyl group, and a chiral center with an amino group and a phenyl ring.</p>	<p data-bbox="595 224 754 1211">Indicada para o tratamento de infecções do trato respiratório e da pele causadas por <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. pyogenes</i>, otite média devido a <i>S. pneumoniae</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. pyogenes</i> e <i>M. catarrhalis</i>, infecções ósseas causadas por <i>S. aureus</i> e/ou <i>P. mirabilis</i>, infecções do trato geniturinário, incluindo prostatite aguda, causada por <i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i> e <i>K. pneumoniae</i>.</p>
<p data-bbox="850 1541 874 1675">Cefalotina</p>  <p>The chemical structure of Cefalotin is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A hydroxyl group is attached to the 4-position of the thiazolidine ring. A side chain is attached to the 3-position, consisting of a methylene group, a carbonyl group, and a chiral center with an amino group and a 2-thienylmethyl group.</p>	<p data-bbox="866 224 1090 1211">Indicada para o tratamento de infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, incluindo peritonite, infecções do trato geniturinário, septicemia, incluindo endocardite, infecções gastrintestinais, infecções ósseas e articulares, quando estas forem causadas por micro-organismos sensíveis, como <i>E. coli</i>, estafilococos produtores e não produtores de β-lactamase, estreptococos β-hemolíticos do grupo A, <i>S. viridans</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>Klebsiella sp.</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>Salmonella sp</i> e <i>Shigella sp</i>.</p>
<p data-bbox="1121 1541 1145 1675">Cefaloglicina</p>  <p>The chemical structure of Cefaloglycin is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A hydroxyl group is attached to the 4-position of the thiazolidine ring. A side chain is attached to the 3-position, consisting of a methylene group, a carbonyl group, and a chiral center with an amino group and a phenyl ring. Additionally, a propionic acid side chain is attached to the 6-position of the thiazolidine ring.</p>	<p data-bbox="1121 275 1145 1211">Indicada para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias sensíveis.</p>

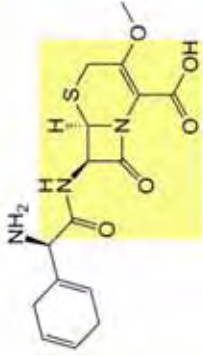
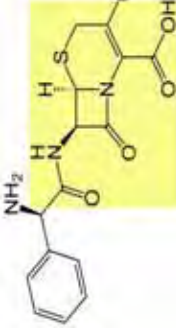
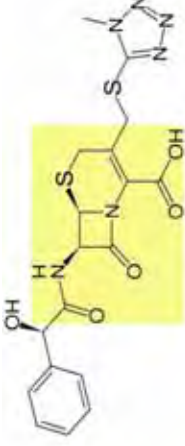
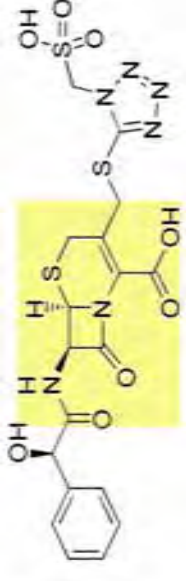
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p>Cefaloridina</p>  <p>The chemical structure of Cefaloridina is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazolidine ring. The dihydrothiazolidine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 4-position. The side chain consists of a methylene group attached to a pyridine ring. The beta-lactam ring has a hydrogen atom at the 5-position and a side chain at the 3-position. The side chain at the 3-position consists of a methylene group attached to a thiazolidine ring, which is further substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Utilizada na medicina humana e veterinária para pneumonia pneumocócica, infecções estafilocócicas e estreptocócicas, mas seu uso foi suspenso devido sua nefrotoxicidade.</p>
<p>Cefapirina</p>  <p>The chemical structure of Cefapirina is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazolidine ring. The dihydrothiazolidine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 4-position. The side chain at the 4-position consists of a methylene group attached to a pyridine ring. The beta-lactam ring has a hydrogen atom at the 5-position and a side chain at the 3-position. The side chain at the 3-position consists of a methylene group attached to a thiazolidine ring, which is further substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Indicada para o tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis.</p>
<p>Cefazolina</p>  <p>The chemical structure of Cefazolina is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazolidine ring. The dihydrothiazolidine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 4-position. The side chain at the 4-position consists of a methylene group attached to a pyridine ring. The beta-lactam ring has a hydrogen atom at the 5-position and a side chain at the 3-position. The side chain at the 3-position consists of a methylene group attached to a thiazolidine ring, which is further substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Utilizadas para a profilaxia cirúrgica e no tratamento de infecções bacterianas da pele, infecções causadas por bactérias moderadamente graves que envolvem os pulmões, ossos, estômago, articulações, sangue, válvula cardíaca e infecção do trato urinário. É clinicamente eficaz contra infecções causadas por estafilococos e estreptococos.</p>
<p>Cefradina</p>  <p>The chemical structure of Cefradina is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazolidine ring. The dihydrothiazolidine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 4-position. The side chain at the 4-position consists of a methylene group attached to a pyridine ring. The beta-lactam ring has a hydrogen atom at the 5-position and a side chain at the 3-position. The side chain at the 3-position consists of a methylene group attached to a thiazolidine ring, which is further substituted with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Possui espectro de atividade semelhante à cefalexina.</p>

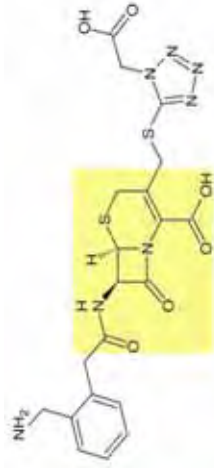
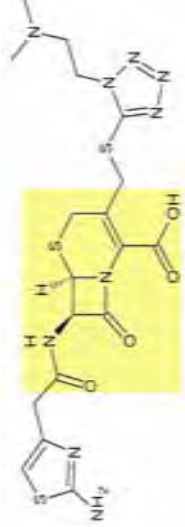
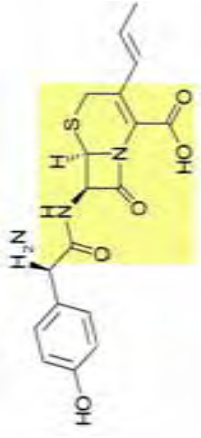
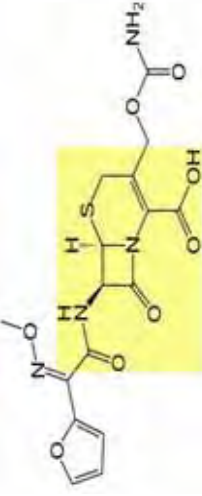
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p data-bbox="284 1532 309 1675">Cefroxadine</p>  <p>The chemical structure of Cefroxadine is a third-generation cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazolidine ring. The dihydrothiazolidine ring has a methoxy group at the 6-position and a carboxylic acid group at the 4-position. The beta-lactam ring has an amino group at the 3-position and is substituted at the 7-position with a phenylacetamido group.</p>	<p data-bbox="296 230 464 1211">É indicada para infecções otorrinolaringológicas (sinusite, amigdalite, faringite, otite média), infecções do trato respiratório inferior (bronquite, broncopneumonia, pneumonia), infecções do trato urogenital (pielonefrite, cistite, uretrite, prostatite), infecções da pele e tecidos moles (abscessos, furunculose, piodermites, impetigo) e infecções traumáticas.</p>
2ª GERAÇÃO	
<p data-bbox="609 1554 635 1653">Cefaclor</p>  <p>The chemical structure of Cefaclor is a second-generation cephalosporin. It has a core structure similar to cefadroxil, with a phenylacetamido group at the 7-position and a chlorine atom at the 6-position of the dihydrothiazolidine ring.</p>	<p data-bbox="609 230 671 1211">Indicada para o tratamento de certas infecções por bactérias tais como pneumonia, infecções de ouvido, pulmão, pele, garganta e do trato urinário.</p>
<p data-bbox="861 1532 887 1675">Cefamandol</p>  <p>The chemical structure of Cefamandol is a second-generation cephalosporin. It features a core structure with a hydroxyethyl side chain at the 7-position and a 1,2,4-triazol-5-ylmethyl group at the 6-position of the dihydrothiazolidine ring.</p>	<p data-bbox="868 230 930 1211">Indicada para o tratamento de infecções graves causadas por micro-organismos susceptíveis.</p>
<p data-bbox="1120 1541 1145 1675">Cefonicida</p>  <p>The chemical structure of Cefonicida is a second-generation cephalosporin. It has a core structure with a hydroxyethyl side chain at the 7-position and a 1,2,4-triazol-5-ylmethyl group at the 6-position of the dihydrothiazolidine ring. Additionally, it has a sulfonamide group at the 3-position of the beta-lactam ring.</p>	<p data-bbox="1120 230 1254 1211">Sua atividade é muito semelhante ao cefamandol, é usado para infecções do trato urinário, infecções respiratórias, infecções de tecidos moles e ossos, causados por <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Proteus</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Haemophilus</i> e <i>Citrobacter</i>.</p>

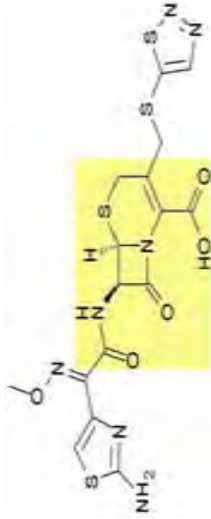
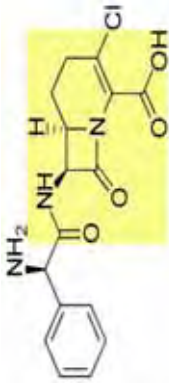
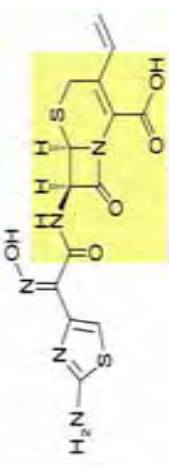
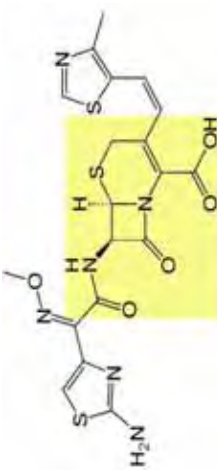
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p data-bbox="277 1541 309 1675">Ceforanida</p>  <p>The chemical structure of Ceforanida is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a pyrazole ring. The pyrazole ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has an amino group and a phenyl ring with a methylamino group.</p>	<p data-bbox="277 235 384 1218">Indicada para o tratamento de infecções do trato respiratório inferior e urinário, bem como para o tratamento de infecções da pele, ossos e articulações, para septicemia, endocardite e profilaxia da cirurgia.</p>
<p data-bbox="571 1541 603 1675">Cefotima</p>  <p>The chemical structure of Cefotima is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a pyrazole ring. The pyrazole ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has an amino group and a phenyl ring with a methylamino group.</p>	<p data-bbox="571 235 678 1218">Possui atividade de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, usado para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias sensíveis.</p>
<p data-bbox="831 1541 863 1675">Cefprozila</p>  <p>The chemical structure of Cefprozila is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a pyrazole ring. The pyrazole ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has an amino group and a phenyl ring with a methylamino group.</p>	<p data-bbox="831 235 981 1218">Indicada para o tratamento das infecções respiratórias, infecções da pele e tecido mole causadas por <i>S. pneumoniae</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>S. pyogenes</i> (estreptococos do grupo A β-hemolítico), <i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>Klebsiella</i> sp e estafilococos coagulase-negativo.</p>
<p data-bbox="1114 1541 1145 1675">Cefuroxima</p>  <p>The chemical structure of Cefuroxima is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a pyrazole ring. The pyrazole ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has an amino group and a phenyl ring with a methylamino group.</p>	<p data-bbox="1114 235 1300 1218">Indicada para o tratamento de bronquite, sinusite, amigdalite, infecções do ouvido, infecções da pele, gonorreia, infecções do trato urinário causadas por bactérias Gram-positivas: <i>S. aureus</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>S. pyogenes</i> e Gram-negativas: <i>E. coli</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>parainfluenzae</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>M. catarrhalis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> (incluindo cepas produtoras de β-lactamase).</p>

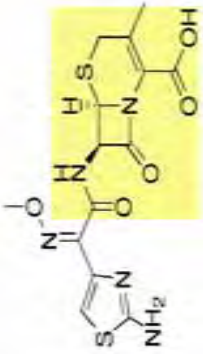
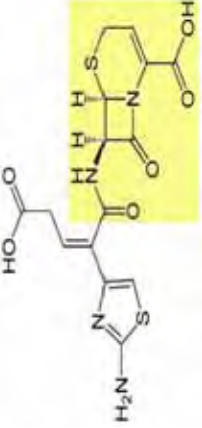
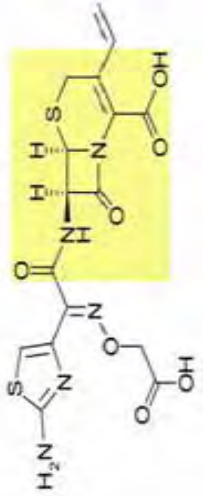
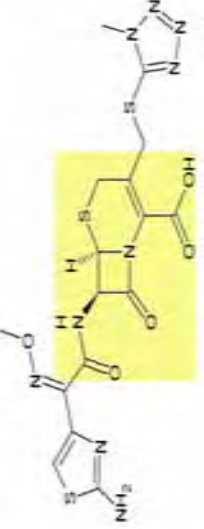
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p data-bbox="284 1532 309 1688">Cefuzonama</p>  <p>The chemical structure of Cefuzonama is a third-generation cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a six-membered dihydrothiazine ring. The dihydrothiazine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has an amino group at the 2-position and a methyl group at the 4-position. The beta-lactam ring has a carboxylic acid group at the 4-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position.</p>	<p data-bbox="284 376 309 1218">Indicada para o tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis.</p>
<p data-bbox="571 1532 596 1688">Loracarbef</p>  <p>The chemical structure of Loracarbef is a first-generation cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a six-membered dihydrothiazine ring. The dihydrothiazine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position. The beta-lactam ring has a carboxylic acid group at the 4-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position.</p>	<p data-bbox="571 232 772 1218">Comercializada sob o nome Lorabid, recebeu a aprovação para comercialização da FDA em 1991, mas teve seu uso suspenso em 2006. Usada para tratar infecções bacterianas do trato respiratório, bronquite crônica, pneumonia, sinusite, amigdalite, faringite, abscessos de pele, infecções do trato urinário e pielonefrite, causadas por <i>E. coli</i>, <i>S. pyogenes</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. saprophyticus</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>H. influenzae</i> e <i>M. catarrhalis</i>.</p>
3ª GERAÇÃO	
<p data-bbox="858 1554 884 1666">Cefdinir</p>  <p>The chemical structure of Cefdinir is a third-generation cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a six-membered dihydrothiazine ring. The dihydrothiazine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position. The beta-lactam ring has a carboxylic acid group at the 4-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position.</p>	<p data-bbox="858 232 995 1218">Indicada para o tratamento de infecções do trato respiratório, pele e tecidos moles, infecções otorrinolaringológicas causadas por <i>H. influenzae</i>, <i>H. parainfluenzae</i>, <i>S. pneumoniae</i> (cepas sensíveis à penicilina), <i>S. pyogenes</i>, <i>M. catarrhalis</i> e <i>S. aureus</i> (incluindo a produção de cepas β-lactamase).</p>
<p data-bbox="1098 1487 1123 1733">Cefditoren pivotino</p>  <p>The chemical structure of Cefditoren pivotino is a third-generation cephalosporin. It features a central beta-lactam ring fused to a six-membered dihydrothiazine ring. The dihydrothiazine ring has a methyl group at the 2-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position. The beta-lactam ring has a carboxylic acid group at the 4-position and a side chain at the 3-position. The side chain consists of a methylene group connected to a 5-membered thiazolidine ring, which has a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 4-position.</p>	<p data-bbox="1098 232 1267 1218">Indicada para o tratamento de bronquite, pneumonia, faringite, amigdalite e infecções de pele causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo eficaz contra <i>S. pneumoniae</i>, <i>S. pyogenes</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>H. arainfluenzae</i>, <i>M. catarrhalis</i> (incluindo cepas produtoras de β-lactamase), <i>S. agalactiae</i> e <i>S. aureus</i> (incluindo cepas produtoras β-lactamase susceptíveis à meticilina).</p>

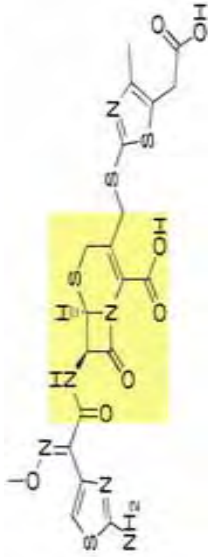
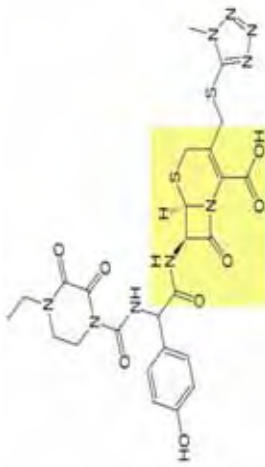
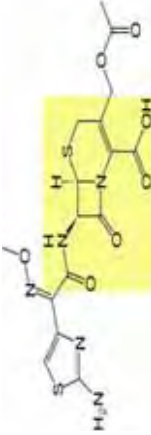
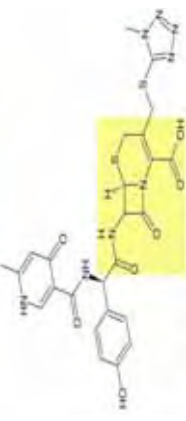
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^o	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^o
<p data-bbox="277 1541 309 1668">Cefetamet</p>  <p>The chemical structure of Cefetamet is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a dihydrothiazine ring. A side chain is attached to the 3-position of the beta-lactam ring, consisting of a methylene group, a nitrogen atom bonded to a methyl group, and a carbonyl group. The carbonyl carbon is also bonded to a 2-aminothiazole ring. A carboxylic acid group is attached to the 4-position of the dihydrothiazine ring.</p>	<p data-bbox="277 555 309 884">INDICAÇÃO TERAPÊUTICA^o</p> <p data-bbox="277 235 454 1220">Indicada para infecções como pneumonia, exacerbações agudas da bronquite crônica, sinusite, amigdalites, infecções urinárias e uretrites gonocócicas. Não têm atividade sobre enterococos e estafilococos resistentes à meticilina. A cefetamet é inativa contra a maioria das cepas de <i>Enterobacter</i> e de <i>P. aeruginosa</i> e têm uma fraca atividade contra anaeróbios</p>
<p data-bbox="560 1541 592 1668">Ceftibuteno</p>  <p>The chemical structure of Ceftibuteno is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a dihydrothiazine ring. A side chain is attached to the 3-position of the beta-lactam ring, consisting of a methylene group, a nitrogen atom bonded to a methyl group, and a carbonyl group. The carbonyl carbon is also bonded to a 2-aminothiazole ring. A carboxylic acid group is attached to the 4-position of the dihydrothiazine ring.</p>	<p data-bbox="560 235 710 1220">Usada para tratar exacerbações agudas bacterianas de bronquite crônica, otite média, faringite e amigdalite causadas por <i>H. influenzae</i>, <i>M. catarrhalis</i>, <i>E. coli</i> (<i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>), <i>P. vulgaris</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>P. providencia</i>, <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp. e <i>Streptococcus</i> sp.</p>
<p data-bbox="839 1541 871 1668">Cefixima</p>  <p>The chemical structure of Cefixima is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a dihydrothiazine ring. A side chain is attached to the 3-position of the beta-lactam ring, consisting of a methylene group, a nitrogen atom bonded to a methyl group, and a carbonyl group. The carbonyl carbon is also bonded to a 2-aminothiazole ring. A carboxylic acid group is attached to the 4-position of the dihydrothiazine ring.</p>	<p data-bbox="839 235 1045 1220">Indicada para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por <i>E. coli</i> e <i>P. mirabilis</i>, otite média causada por <i>H. influenzae</i>, <i>M. catarrhalis</i> (a maioria dos quais são β-lactamase positiva) e <i>S. pyogenes</i>, faringite e amigdalite causada por <i>S. pyogenes</i>, bronquite aguda e exacerbações agudas de bronquite crônica causada por <i>S. pneumoniae</i> e <i>H. influenzae</i> (β-lactamase de amostras positivas e negativas) e gonorreia sem complicações, causada por <i>N. gonorrhoeae</i>.</p>
<p data-bbox="1118 1541 1150 1668">Cefmenoxima</p>  <p>The chemical structure of Cefmenoxima is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a dihydrothiazine ring. A side chain is attached to the 3-position of the beta-lactam ring, consisting of a methylene group, a nitrogen atom bonded to a methyl group, and a carbonyl group. The carbonyl carbon is also bonded to a 2-aminothiazole ring. A carboxylic acid group is attached to the 4-position of the dihydrothiazine ring.</p>	<p data-bbox="1118 235 1252 1220">Possui largo espectro de actividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, semelhante à cefotaxima. Usada no tratamento de infecções ginecológicas e obstétricas causadas por bactérias aeróbias suscetíveis (incluindo os gonococos) e anaeróbias.</p>

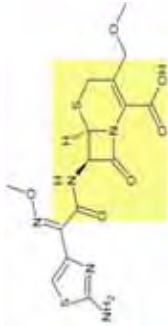
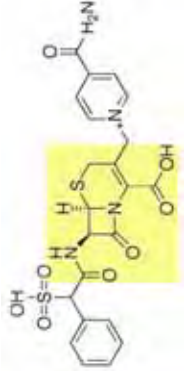
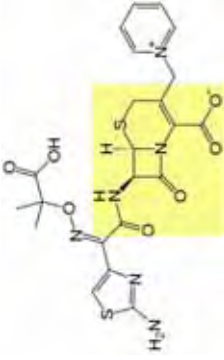
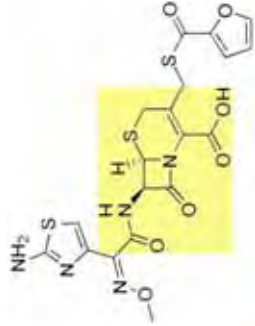
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p>Cefodizima</p>  <p>The chemical structure of Cefodizima is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a thiazolidine ring. The thiazolidine ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has a methyl group and a side chain containing a thiazolidine ring with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Indicada para infecções urinárias, faringites, sinusites, infecções respiratórias, infecções da pele e tecidos moles, otite média e amigdalites provocadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos suscetíveis, sendo utilizada especialmente nas infecções respiratórias e infecções urinárias graves refratárias à terapêutica convencional.</p>
<p>Cefoperazona</p>  <p>The chemical structure of Cefoperazona is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a thiazolidine ring. The thiazolidine ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has a methyl group and a side chain containing a thiazolidine ring with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Indicada para o tratamento de infecções bacterianas causadas por micro-organismos suscetíveis, eficaz no tratamento de <i>P. aeruginosa</i>.</p>
<p>Cefotaxima</p>  <p>The chemical structure of Cefotaxima is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a thiazolidine ring. The thiazolidine ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has a methyl group and a side chain containing a thiazolidine ring with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Usada na profilaxia cirúrgica e para tratar gonorreia, meningite e infecções graves, incluindo infecções do sistema urinário e rins (pielonefrite).</p>
<p>Cefpiramida</p>  <p>The chemical structure of Cefpiramida is shown. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. A side chain is attached to the thiazolidine ring, consisting of a methylene group, a sulfur atom, and a thiazolidine ring. The thiazolidine ring has a methyl group and a carboxylic acid group. The beta-lactam ring has a methyl group and a side chain containing a thiazolidine ring with a methyl group and a carboxylic acid group.</p>	<p>Indicada para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias sensíveis, tais como <i>P. aeruginosa</i>.</p>

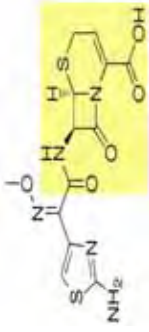
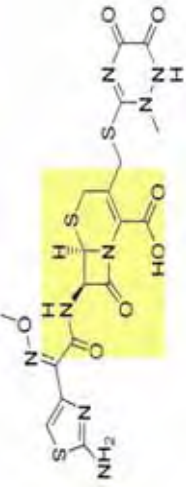
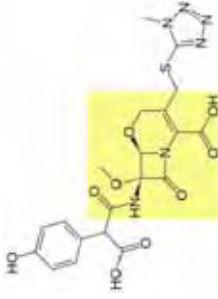
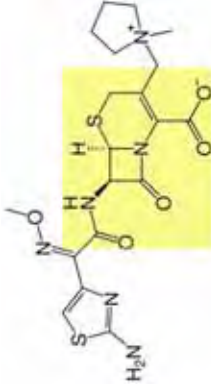
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p data-bbox="284 1473 308 1753">Cefpodoxima proxetila^b</p> 	<p data-bbox="284 230 387 1238">Indicada para o tratamento de indivíduos com infecções leves a moderadas causadas por cepas suscetíveis de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. As exceções notáveis incluem <i>P. aeruginosa</i>, <i>Enterococcus</i> e <i>B. fragilis</i>.</p>
<p data-bbox="526 1541 550 1686">Cefsulodina</p> 	<p data-bbox="526 230 598 1238">Utilizada na profilaxia cirúrgica e para o tratamento de muitos tipos de infecções do sangue, ossos ou articulações, do trato respiratório, da pele e do trato urinário.</p>
<p data-bbox="782 1541 805 1686">Ceftazidima</p> 	<p data-bbox="782 230 1013 1238">Indicada para o tratamento de indivíduos com infecções causadas por cepas sensíveis de organismos em infecções respiratórias, da pele, do trato urinário, septicemia bacteriana, infecções dos ossos e articulações, infecções ginecológicas, infecções intra-abdominais (incluindo peritonite) e infecções do sistema nervoso central (incluindo meningite). É ativa contra muitas cepas resistentes à ampicilina e outras cefalosporinas, tem atividade contra micro-organismos Gram-negativos, <i>Pseudomonas</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>.</p>
<p data-bbox="1085 1552 1109 1675">Ceftiofur^c</p> 	<p data-bbox="1085 387 1109 1238">Indicada para o tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis.</p>

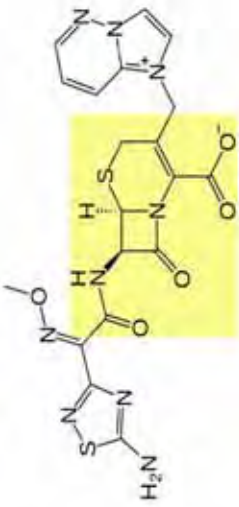
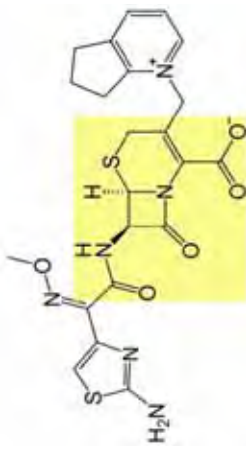
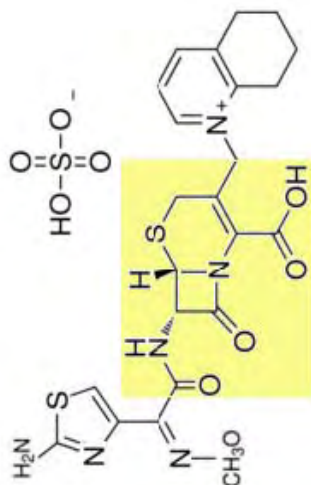
Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

CEFALOSPORINA ^o	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^o
<p>Ceftizoxima</p> 	<p>É altamente resistente a um largo espectro de β-lactamases sendo ativa contra uma ampla gama de micro-organismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos, usada para o tratamento de infecções devido a cepas sensíveis de micro-organismos.</p>
<p>Ceftriaxona</p> 	<p>Indicada para o tratamento das infecções de pele, tecido mole, infecções do trato respiratório, trato urinário e infecções otorrinolaringológicas causadas por <i>S. pneumoniae</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>S. pyogenes</i> (estreptococos do grupo A β-hemolítico), <i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>Klebsiella</i> sp e estafilococos coagulase-negativo.</p>
<p>Latamoxef ou Moxalactam</p> 	<p>Indicada principalmente em condições como infecção óssea e articular, infecções gastrointestinais, infecções ginecológicas, meningite, infecções do trato respiratório, septicemia, infecções da pele, tecidos moles e infecção do trato urinário.</p>
4ª geração	
<p>Cefepima</p> 	<p>Indicada para o tratamento de pneumonia causada por <i>S. pneumoniae</i>, incluindo os casos associados com bacteremia, <i>P. aeruginosa</i>, <i>K. pneumoniae</i> ou <i>Enterobacter</i>, infecções do trato urinário causado por <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>P. mirabilis</i>, infecções da pele por <i>S. aureus</i> (apenas cepas sensíveis à meticilina), <i>S. pyogenes</i> e infecções intra-abdominais causadas por <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>B. fragilis</i>.</p>

Continua na próxima página

Tabela 1 (Continuação)- Classificação de cefalosporinas por gerações

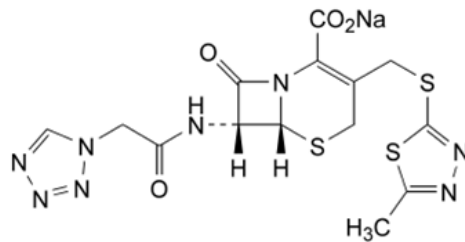
CEFALOSPORINA ^a	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA ^a
<p data-bbox="284 1545 311 1702">Cefozoprana</p> 	<p data-bbox="284 403 311 1254">Indicada para o tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis.</p>
<p data-bbox="603 1556 630 1691">Cefpiroma</p> 	<p data-bbox="603 515 630 1254">É considerado altamente ativo contra bactérias Gram-negativas.</p>
<p data-bbox="922 1545 949 1702">Cefquinoma^f</p> 	<p data-bbox="922 235 1165 1254">Uso veterinário, para doença respiratória bovina causada por <i>M. haemolytica</i> e <i>P. multocida</i>, mastite aguda ou septicemia por <i>E. coli</i>, dermatite, necrose bulbar infecciosa e necrobacilose interdigital. Em suínos, contra infecções bacterianas pulmonares e vias respiratórias causadas por <i>P. multocida</i>, <i>H. parasuis</i>, <i>A. pleuropneumoniae</i> e <i>Streptococcus</i>. Mastite-metrite-agalactia (MMA) envolvida com <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i> e no tratamento de lesões leves ou moderadas causadas por <i>S. hyicus</i>, artrite causada por <i>Streptococcus</i> spp. e <i>E. coli</i>.</p>

Continua na próxima página

3.2 Cefazolina sódica

A cefazolina sódica (CFZ), antimicrobiano β -lactâmico semissintético classificado como uma cefalosporina de primeira geração, disponível comercialmente na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável e como solução oftálmica, não possuindo absorção por via oral (BOLÓS et al., 1987). Seu uso na prática clínica destaca-se por se manter há anos como fármaco de escolha na profilaxia perioperatória (pré-operatório, intra-operatório e pós-operatório) (KUSABA, 2009). Uma dose única de cefazolina imediatamente antes da cirurgia constitui a profilaxia mais usada em diversos procedimentos cirúrgicos (BRUNTON et al., 2012) e reduz a incidência de infecções que podem representar graves complicações em indivíduos submetidos a cirurgias (WANG et al., 2004). A estrutura química da CFZ está representada na Figura 2.

Figura 2- Estrutura química da CFZ (CAS 27164-46-1)



Fonte: British Pharmacopoeia, 2010.

Embora o espectro antibacteriano de CFZ seja típico das outras cefalosporinas de primeira geração, ela se sobressai por demonstrar atividade contra algumas espécies de *Enterobacter* e por ter meia-vida mais longa podendo ser administrada em intervalos menos frequentes. Sua eficácia como agente terapêutico é satisfatoriamente reconhecida, o que a torna preferida dentre as cefalosporinas deste grupo (KUSABA, 2009; BRUNTON et al., 2012).

A CFZ é oficialmente descrita na British Pharmacopoeia, 2010; European Pharmacopoeia, 2005; Farmacopeia Portuguesa, 2005; Japanese Pharmacopoeia, 2011 e na United States Pharmacopoeia, 2010, em que métodos por cromatografia líquida com detector UV são empregados para sua avaliação.

3.2.1. Espectro de ação e aplicações clínicas

A CFZ é um antimicrobiano de amplo espectro, semelhante à cefalotina (LIANG et al., 1994; YEH, CHI, 2001; EL-DESOKY et al., 2005), apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e

Revisão Bibliográfica

atividade relativamente moderada contra micro-organismos Gram-negativos, tais como *E. coli*, *Proteus* e *Klebsiella* (RANG, 2008; KUSABA, 2009; BRUNTON et al., 2012). A CFZ é indicada para profilaxia perioperatória de diferentes tipos de cirurgias, tais como a profilaxia de endometrite em cesariana (SWEETMAN, 2009), cirurgias cardiovasculares, gastrintestinais, histerectomia, artroplastia, entre outras. No entanto, é válido ressaltar que a posologia deve ser ajustada em relação às diferentes indicações médicas, levando em consideração o quadro clínico do indivíduo, com intuito de manter os níveis de fármaco acima da concentração inibitória mínima (CIM). Desta forma, é possível alcançar a excelência na eficácia e segurança terapêutica, minimizando possível desenvolvimento de resistência ao fármaco, que vem sendo usado há mais de 40 anos como fármaco de escolha para profilaxia cirúrgica (KUSABA, 2009).

Como agente terapêutico, a CFZ é indicada para o tratamento de infecções bacterianas causadas por organismos sensíveis em vários órgãos, como estruturas da pele, trato respiratório, genital, urinário, vias biliares, infecções ósseas, articulares, infecções estafilocócicas em geral e em alguns casos de septicemia decorrente de micro-organismos suscetíveis (LIANG et al., 1994; KUSABA, 2009). É usada também no tratamento de endocardite (por estafilococos) e peritonite associada à diálise peritoneal ambulatorial contínua (SWEETMAN, 2009).

3.2.2. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação das cefalosporinas é similar ao das penicilinas (RANG, 2008; KUSABA, 2009). Considerando que a parede celular bacteriana é imprescindível para o crescimento e desenvolvimento destes micro-organismos, o mecanismo de ação das cefalosporinas consiste na inibição da síntese da parede celular bacteriana, sendo letal ao micro-organismo. A parede celular bacteriana é composta por peptidoglicano, um componente heteropolimérico que proporciona estabilidade mecânica rígida em virtude da sua estrutura reticulada. O peptidoglicano é constituído de cadeias de glicanos que consistem em filamentos lineares de dois aminoaçúcares alternados e unidos por meio de ligações cruzadas de cadeias peptídicas, sendo esses aminoaçúcares o N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico. O ácido N-acetilmurâmico é um pentapeptídeo com dipeptídeo D-alanil-D-alanina terminal. A biossíntese do peptidoglicano envolve cerca de 30 enzimas bacterianas e pode ser dividida em três estágios de reações. O último estágio consiste na finalização da ligação cruzada, onde a molécula de glicina terminal da ponte da pentaglicina liga-se a quarta molécula do pentapeptídeo (D-alanina), liberando a quinta molécula (também D-alanina).

Revisão Bibliográfica

Os antimicrobianos β -lactâmicos são bactericidas que agem inibindo essa última etapa da síntese do peptidoglicano (BRUNTON et al., 2012).

Além da inibição da transpeptidase, é importante considerar que as bactérias possuem várias *proteínas de ligação das penicilinas* (PLPs), que variam quanto às suas afinidades pelos diferentes antibióticos β -lactâmicos, mas sempre resultam em interações covalentes. As PLPs catalisam a reação de transpeptidação que remove a alanina terminal para formar uma ligação cruzada com um peptídeo adjacente, resultando em uma parede celular rígida. Os β -lactâmicos são análogos estruturais do substrato D-alanil-D-alanina natural e ligam-se covalentemente às PLPs no sítio ativo, inibindo assim a reação de transpeptidação, bloqueando a síntese de peptidoglicano e levando a morte celular (KATZUNG, 2010; BRUNTON et al., 2012).

3.2.3. Mecanismo de resistência

A resistência às cefalosporinas pode estar relacionada com a incapacidade de o antimicrobiano atingir seus locais de ação, ou na alteração das PLPs, que são alvos das cefalosporinas, de modo que os antibióticos passam a ligar-se às enzimas bacterianas (β -lactamases) capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico e inativar a cefalosporina (BRUNTON et al., 2012).

3.2.4. Farmacocinética

Como a CFZ é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, sua administração se dá por infusão intravenosa ou intramuscular. Após uma dose de 500 mg administrada por via intramuscular, as concentrações plasmáticas são de, no mínimo, 30 $\mu\text{g/mL}$ em 1 hora. Cerca de 85% de cefazolina se liga às proteínas plasmáticas. A meia-vida sérica da CFZ é de aproximadamente 1,5 horas após administração intravenosa e aproximadamente 2 horas após administração intramuscular, sendo aumentada em indivíduos com insuficiência renal, pois é excretada por filtração glomerular e alguma secreção tubular renal (KORDS et al., 1976; KUSABA, 2009; SWEETMAN, 2009). O uso de CFZ durante a gravidez deve ser restrito a casos expressamente necessários, pois não há estudos adequados e bem controlados para esse grupo de indivíduos, mas sabe-se que durante a gravidez ocorre a diminuição de albumina disponível, conseqüentemente a capacidade de ligação às proteínas plasmáticas passa a ser menor e a concentração de fármaco livre torna-se maior, alterando a sua farmacocinética (KUSABA, 2009). Em levantamento bibliográfico realizado na 36ª edição do Martindale - The Complete Drug Reference, é relatado que a Academia Americana de Pediatria considera o tratamento compatível com aleitamento materno, pois segundo os estudos realizados, a

Revisão Bibliográfica

quantidade do fármaco encontrada no leite é extremamente pequena (equivalente a menos de 0,075% da dose) e efeitos adversos não foram observados em crianças amamentadas cujas mães estavam recebendo CFZ (SWEETMAN, 2009). A CFZ é capaz de atravessar a barreira placentária, no entanto, isso não impede sua utilização em cesarianas (SAMER et al., 2000). Entretanto, a segurança para utilização em prematuros e em recém-nascidos não foi estabelecida (KUSABA, 2009).

3.2.5. Reações adversas

Efeitos colaterais de CFZ não são comuns; apesar de sua baixa prevalência, alguns casos de hipersensibilidade e colite pseudomembranosa são descritos por Kusaba em 2009 e por Pipet e colaboradores em 2011. A possibilidade de indivíduos com insuficiência renal apresentarem encefalopatia e convulsões é considerada se a dosagem apropriada do fármaco não for devidamente ajustada (KUSABA, 2009). Há relatos que o fármaco esteja associado a raros casos de hipoprotrombinemia e Síndrome de Stevens-Johnson (SWEETMAN, 2009).

3.2.6. Interações medicamentosas

A mistura de antibacterianos β -lactâmicos e aminoglicosídeos pode resultar em inativação de ambas as substâncias e a administração concomitante destes fármacos propicia o aumento da incidência de nefrotoxicidade. A CFZ potencializa os efeitos da varfarina e a probenicida eleva a concentração plasmática de CFZ aumentando os riscos de toxicidade. Não se recomenda a mistura de CFZ com outras medicações; se clinicamente necessários, devem ser administrados separadamente (SWEETMAN, 2009).

3.2.7. Métodos analíticos

Estudos científicos envolvendo o desenvolvimento, aperfeiçoamento e validação de métodos analíticos visando à redução de custo e tempo de análise, tornando o método viável e de fácil execução na indústria farmacêutica, são fundamentais para garantir a qualidade do produto já comercializado.

A estabilidade de CFZ foi estudada por Furlanetto e colaboradores, em 1994; neste trabalho, o fármaco foi submetido à degradação acelerada em três diferentes temperaturas (37, 45 e 60 °C) por 180 dias; as análises foram feitas por polarografia e os dados foram processados utilizando equação

Revisão Bibliográfica

de Arrhenius para prever o prazo de validade. Os resultados apresentados indicaram que o fármaco em análise possui estabilidade, já que apenas as amostras armazenadas a 60 °C apresentaram decomposição de mais de 10%. A presença de formas polimórficas também foi pesquisada neste mesmo período por calorimetria exploratória diferencial e difração de raios X. Os autores observaram que a CFZ manteve a sua cristalinidade quase que inalterada com o envelhecimento, independente do armazenamento e da temperatura.

Entretanto, sabe-se que as técnicas de liofilização empregadas no processo de fabricação do fármaco podem resultar na formação de produtos amorfos e cristalinos; o conteúdo amorfo de uma substância cristalina altera as suas propriedades físico-químicas, tornando o fármaco mais solúvel e menos estável, o que conseqüentemente irá interferir na sua biodisponibilidade, podendo modificar o desempenho da forma farmacêutica (OGUCHI et al., 1995).

Diferentes formas cristalinas de CFZ são descritas na literatura desde 1978, quando Pikal e colaboradores caracterizaram nove diferentes formas cristalinas de CFZ por calorimetria e difração de raios X. Em 1990, Kalinkova e colaboradores apresentaram um estudo comparativo de quatro formas cristalinas de CFZ por espectrometria na região do infravermelho, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. A atividade antibacteriana destas quatro formas cristalinas foi avaliada em 1999 por Opalchenova e Kalinkova. Neste trabalho, a concentração inibitória mínima de CFZ sobre 182 bactérias Gram-positivas e 98 Gram-negativas foram analisadas por difusão em ágar e diferenças significativas foram constatadas na atividade microbiológica.

Oguchi e colaboradores (1995) descreveram um método por calorimetria para avaliar as diferentes formas cristalinas e possíveis elementos secundários aderidos no momento da cristalização de CFZ gerados com o sistema *Freeze-Drying*. Prováveis formas amorfas também foram investigadas por calorimetria, em um estudo apresentado por Chadha e colaboradores, em 2005.

Alguns métodos analíticos para identificação e quantificação de CFZ são descritos na literatura, tais como: bromometria (KAMINSKI, BODOR, 1979); calorimetria (FARHADI et al., 2002; SALEM, ASKAL, 2002; OMAR et al., 2009); eletroforese capilar (MAYER, 2003; SUM et al., 2011); espectrofotometria na região ultravioleta (UV) e visível (VIS) (PAPAZOVA et al., 1983; AYAD et al., 1999; AMIN et al., 2000; SALEH et al., 2001; SALEM, ASKAL, 2002; SALEH et al., 2003; SALEH et al., 2009; RAGEH et al., 2010); fluorimetria (BEBAWY et al., 2003); índice de refração (WENG et al., 2004); luminescência (YANG et al., 1999); polarografia (OGOREVC, HUDNIK, 1985; EL-DESOKY et al., 2005); quimioluminescência (SUN et al., 2004);

Revisão Bibliográfica

THONGPOON et al., 2005; LI, LU, 2006) e radiossensibilidade (CRUCQ et al., 2000). Dentre estes diversos métodos citados, encontram-se métodos baseados na formação de complexos metálicos, transferência de carga em reações químicas, técnicas que envolvem processos de degradação e oxidação do fármaco em ácido sulfúrico, entre outros. Embora estes diferentes métodos possam ser empregados para análise do fármaco, sendo adequados para o propósito a que foram desenvolvidos, suas vantagens e desvantagens devem ser consideradas, para avaliar sua viabilidade. Infelizmente, alguns métodos demonstraram ser complexos e demorados, ou pouco seletivos e alguns dispõem de alto investimento com equipamentos e materiais. Em contrapartida, o controle de qualidade na indústria farmacêutica requer métodos analíticos confiáveis, capazes de assegurar a eficácia terapêutica do fármaco comercializado, mas que sejam simples, rápidos, versáteis, que não exijam procedimentos complicados ou onerosos e que não gerem resíduos tóxicos, para que, desta maneira, possam ser empregado nas análises laboratoriais com segurança.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais modernas técnicas de separação e quantificação de substâncias. Metodologias cromatográficas priorizando menor tempo de análise, que sejam economicamente viáveis, com baixo consumo de solventes orgânicos é um tema de alta relevância, que tem ganhado destaque. Preconiza-se ainda que o método seja seguro ao operador e que não polua o meio ambiente, posto que atualmente a sustentabilidade vem sendo discutida e encorajada mundialmente.

Os vários métodos por CLAE envolvendo análise de CFZ encontrados na literatura foram organizados cronologicamente nas Tabelas 2 e 3 e os métodos oficiais existentes em compêndios farmacopeicos para este fármaco estão descritos nas Tabelas 4 e 5. Muitos dos métodos descritos até o momento são voltados para a quantificação de CFZ em matriz biológica, necessitando pré-tratamento da amostra, entre outros procedimentos demorados, que requerem equipamentos sofisticados, de custos elevados ou uso de grandes quantidades de solventes orgânicos que são tóxicos para os operadores e para o meio ambiente. No entanto são poucos os trabalhos validados para quantificação de CFZ na forma farmacêutica, visando o controle de qualidade do fármaco pós-fabricação, proporcionando segurança para o usuário (Tabela 3).

Revisão Bibliográfica

Tabela 2- Métodos de CLAE para a determinação de cefazolina em matriz biológica

COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	REFERÊNCIA
ODS-Sil-X-II, Vydac RP e Corasil C ₁₈	5% de metanol, 95% de carbonato de amônio 0,05 M	UV 254	0,50	8,00	WHITE et al., 1975
Packing	0,02 M de fosfato de sódio monobásico, pH 6,2 ajustado com hidróxido de sódio 1 M	UV 254	0,50	^a	ZAPPALA et al., 1975
DEAE-Sephadex® A-25 (Cl) (200 x 1,5 mm)	FM1: 0,2 M de acetato de sódio e ácido acético (pH 4,5 e 6,0) FM2: 0,2 M de acetato de sódio 0,1 M hidróxido de sódio (pH 8,0) FM3: 0,2 M de acetato de sódio e ácido acético 146 g/L em cloreto de sódio (pH 3,5)	UV 272	5,00	^b	TORTOLANI, ROMAGNOLE, 1976
Phenyl Corasil Waters® (570 x 2 mm, 37 a 50 µm)	10 a 15% de metanol em 1% de ácido acético aquoso	UV 254	2,00	3,10	WOLD, 1977
Phenyl Corasil® (900 x 2 mm)	10-13% de Metanol em acetato de amônio aquoso 0,2 M	UV 254	2,00	2,50	WOLD, TURNIPSEED, 1977
µBondapak® C ₁₈ (300 x 3,9 mm, 10 µm)	Tampão acetato 0,01 M (pH 4,8) e metanol ou acetoneitrila	UV 275	1,50	4,20	BRISSON et al., 1981
Pak C ₁₈ Waters® (100 x 8 mm)	Metanol: Ácido acético, 7,5 mL/L (30:70 v/v) pH 5,5 ajustado com TEA	UV 254	3,00	3,60	DANZER, 1983
Bondapak fenil	Gradiente de solução aquosa de 10 mM/L de acetato de amônio, pH 4,2 em metanol e água	UV 250	2,00	pH 7,0= 6,60 pH 5,0= 9,20 pH 4,6= 9,20 pH 4,2= 9,20 pH 4,0= 9,90	ANNESLEY et al., 1984
µ-Bondapak C ₁₈ Waters® (300 x 4 mm, 10 µm)	Acetato de sódio 0,01 M: Acetonitrila-Metanol na proporção de 96:4 v/v (86:14 v/v) pH 5,2	UV 254	2,50	5,00	SIGNS et al., 1984
µBondapak®	Solução tampão 0,1 M de acetato de sódio (pH 3,85): acetoneitrila (89: 11 v/v)	UV 254	2,00	4,65	BAYOUMI et al., 1986

Continua na próxima página

^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

^bDado disponível em volume de eluição em diferentes pHs: pH 4,5 - 138 mL; 6 - 125 mL e 8 - 122 mL

Revisão Bibliográfica

Tabela 2 (Continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefazolina em matriz biológica

COLONA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	REFERÊNCIA
Nova-Pak® C ₁₈ 100 Econosphere® C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) Ultrasphere® C ₈ ou C ₁₈	0,02 M fosfato de sódio monobásico: metanol (77:23 v/v) pH 5,0	UV 270	1,00	9,50	LIANG et al., 1994
C ₈ C ₁₈ e NH ₂ Supelcosil® LC-18 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	0,01 M de di-hidrogenofosfato de sódio pH 5,3: acetonitrila (17:3 v/v para plasma e 41:9 v/v para fluido de diálise peritoneal) FM1: Metanol: acetonitrila: tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 (20:15:65 v/v/v) e 5 mM TBA H ₂ SO ₄ FM2: Metanol: 0,01 M tampão fosfato pH 7,0 (30:70 v/v) e 5 mM TBA H ₂ SO ₄	UV 254 UV 273	^a 1,00	^a FM1: 5,0 FM2: 6,0	NAHATA, 1990 BOMPADRE et al., 1998a
HP ODS Hewlett-Packard® (200 x 4 mm, 5 µm)	FM1: 10 mM de dihidrogenofosfato de sódio aquoso ortofosfato e metanol (90:10 v/v) pH 5,0 FM2: 30% de metanol em 10 mM de dihidrogenofosfato de sódio aquoso ortofosfato	UV 273	1,00	8,90	BOMPADRE et al., 1998b
LiChrospher® 100 PR ₁₈ (125 x 4 mm) Pré coluna: HP-Hypersil® ODS-C ₁₈ (200 x 2,1 mm)	Acetonitrila: 0,05 M di-hidrogenofosfato de sódio pH 3,0	DAD 220-600	0,75	5,20	MARTINEZ et al., 1998
Sep Pak® C ₁₈ Nova-Pak® C ₁₈ 4 mm	Solução aquosa de 10 mM de fosfato de potássio dibásico e 10 mM brometo de cetiltrimetilamônio (pH 6,5): acetonitrila (73:27 v/v)	UV 274	Eluição por gradiente programado	10,10	AL-RAWITHI et al., 2000
Supelcosil C ₁₈ DB	0,5% de ácido acético em acetonitrila: água (15:85 v/v)	UV 254	2,00	0,95	PUFAL et al., 2000
Nova-Pak C ₁₈ (100 x 8 mm, 4 µm)	Fosfato de potássio dibásico 10 mM e brometo de acetyl trimetil amônio 10 mM: acetonitrila (73:27 v/v) pH 6,5 ajustado com ácido fosfórico	UV 274	Eluição por gradiente programado	10,10	SAMER et al., 2000
Fenil Waters Nova-Pak® (150 x 3,9 mm 4 µm)	Gradiente de proporções entre as fases móveis: FM 1: Acetonitrila: Octanosulfônico (1:10 v/v) FM 2: Acetonitrila: Metanol: Octanosulfônico (3:1,5:10 v/v/v)	UV 270	1,00	12,8 + 0,23	SØRENSEN et al., 2000

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

Revisão Bibliográfica

Tabela 2- (Continuação)- Métodos de CLAE para a determinação de cefazolina em matriz biológica

COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	REFERÊNCIA
Microbore® C ₁₈ (150 x 1 mm, 5 µm)	Metanol: acetoneitrila: ácido fosfórico monossódico 100 mM (20:10:70 v/v/v) pH 4,5	UV 270	0,05	6,6	TSAI, CHEN, 2000
LiChroCART® Purospher® C ₁₈ (125 x 3 mm, 5 µm)	0,05% Ácido trifluoroacético em água: metanol: acetoneitrila	DAD fluorescência 270	Eluição por gradiente programado	10,90	BARANOWSKA et al., 2006
Kromasil® 100, C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Acetoneitrila: água (60:40 v/v)	UV 256	0,75	4,1	ARAYNE et al., 2007
Monolítica Phenomenex Onyx® C ₁₈ (200 x 4,6 mm)	Gradiente de hidrogeno-fosfato de potássio dibásico (pH 7,0): metanol	UV 254	1,00	5,8	FARTHING et al., 2008
Pré-coluna: Phenomenex Onyx TM C ₁₈ (50 x 4,6 mm)					
Inertsil ODS-3 (250 x 4 mm, 5 µm)	Gradiente de concentrações de acetato de amônio 0,05 M: acetoneitrila	UV 265	1,40	24,0	KARAGEORGOU et al., 2012

Tabela 3- Métodos de CLAE para a determinação de cefazolina em formas farmacêutica

COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO (nm)	Vazão (mL/min)	Tempo de Retenção (min)	REFERÊNCIA
Coluna ODS C ₁₈ (150 x 0,3 mm ID, 5 µm)	Água: metanol: contendo 0,5% de ácido acético (60:40 v/v)	UV 262	0,004	8,50	MOORE et al., 1991
Spheri 5 ODS-224 (220 x 4,6 mm)	Lauril sulfato de sódio 0,10 M/ml	UV 260	1,00	± 1,60	PINTO et al., 1995
Phenomenex C ₁₈ ODS C ₁₈	Solução aquosa com 10% de ácido acético: 2- propanol: água (4:9:87 v/v/v)	UV 240	^a	2,97	FARAG, 1998
Microbondapak C ₁₈	Água: acetoneitrila: ácido fosfórico (85:15:1,46 v/v/v) pH 3,5 ajustado com TEA	UV 254	1,50	^a	SHINDE et al., 1998
SS Wakosil II C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão de fosfato (pH 6,8): metanol (5:2 v/v)	UV 254	1,00	5,72	LALITHA et al., 2010

^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract)

Revisão Bibliográfica

Tabela 4- Testes farmacopeicos qualitativos

TESTES FARMACOPEICOS QUALITATIVOS		
CARACTERÍSTICA	IDENTIFICAÇÃO	REFERÊNCIAS
<p>Aspecto: Pó branco ou quase branco, muito higroscópico</p> <p>Solubilidade: Facilmente solúvel na água, muito pouco solúvel em etanol</p> <p>pH: Solução a 10% em água - pH de 4,0 a 6,0</p> <p>Apresenta polimorfismo</p>	<p>A. Espectrofotometria de absorção no infravermelho</p> <p>B. Teste da reação do sódio</p>	<p>Farmacopeia Portuguesa 2005</p> <p>European Pharmacopoeia 2005</p> <p>British Pharmacopoeia 2010</p>
<p>Aspecto: Pó cristalino branco a amarelo</p> <p>Solubilidade: Muito solúvel em água e em formamida, pouco solúvel em metanol e praticamente insolúvel em etanol</p> <p>pH: Solução a 10% em água - pH de 4,5 a 6,5</p>	<p>A. Espectrometria de absorção no UV-visível.</p> <p>B. Espectrometria de absorção no infravermelho</p> <p>C. Espectrometria de ressonância magnética nuclear</p> <p>D. Teste da reação do sódio</p>	<p>Japanese Pharmacopoeia XVI 2011</p>
<p>Aspecto: Pó cristalino branco ou quase branco, inodoro</p> <p>Solubilidade: Facilmente solúvel na água, em cloreto de sódio 0,9% e em soluções de glicose, muito pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em clorofórmio e em éter</p> <p>pH: Solução a 10% em água - pH de 4,0 a 6,0</p>	<p>A. Espectrofotometria de absorção no UV</p> <p>B. Teste da reação do sódio</p>	<p>USP 33, 2010</p>

Revisão Bibliográfica

Tabela 5- Testes farmacopeicos quantitativos

TESTES FARMACOPEICOS QUANTITATIVOS					
MÉTODO	COLUNA	FASE MÓVEL:	CONDIÇÕES:	SISTEMA DE DETECÇÃO (nm)	REFERÊNCIA
CLAE	C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	Acetonitrila: Solução A (10:90) v/v Solução A: 2,77 g/L de fosfato de sódio R e 1,86 g/L de ácido cítrico R	Vazão: 1,0 mL/min Injeção: 20 µL Temperatura: 25 °C	UV 270	Farmacopeia Portuguesa, 2005 European Pharmacopoeia, 2005 British Pharmacopoeia, 2010
CLAE	C ₁₈ (150 x 4 mm)	Acetonitrila: Solução A (6,5:93,5) v/v Solução A: 2,27 g/L de fosfato de sódio R e 0,47 g de ácido cítrico R	Vazão: Ajustar a vazão de modo que o tempo de retenção da cefazolina seja cerca de 8 min Injeção: 20 µL Temperatura: 25 °C	UV 254	Japanese Pharmacopoeia XVI 2011
CLAE	C ₁₈ (250 x 4,6 mm)	Acetonitrila: Solução A (10:90) v/v Solução A: 0,9 mg/mL de fosfato de sódio R e 1,298 mg/mL de ácido cítrico R	Vazão: 1,5 mL/min Injeção: 20 µL Temperatura: 30 °C	UV 210 e 254	USP 33, 2010

Revisão Bibliográfica

Recentemente, um trabalho baseado no método de cromatografia por afinidade eletroforética (EAC) foi elaborado por Rani e colaboradores (2011) para separar uma mistura de cinco cefalosporinas, dentre elas a CFZ. Alguns trabalhos descrevem métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas – LC-MS (BECKER et al., 2004; OHMORI et al., 2011), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de massas – UPLC-MS (AHSMAN et al., 2009; CARLIER et al., 2012) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray e seletiva reação de monitorização íon trap LC-ESI-SEM-MS (FAGERQUIST, LIGHTFIELD, 2003), para determinação de CFZ, dentre outros fármacos, presentes em plasma.

Os métodos mais comuns empregados para análise de cefalosporinas são a cromatografia líquida associada ao método de detecção UV e os ensaios microbiológicos. A espectrofotometria na região de ultravioleta é um importante recurso utilizado para quantificação de substâncias, uma vez que está relacionada com a estrutura eletrônica da molécula. A técnica consiste na absorvidade de um composto químico de acordo com a estrutura molecular do composto, a intensidade da radiação incidente, a concentração da substância, o caminho óptico, o solvente utilizado, a temperatura e o comprimento da radiação (KOROLKOVAS, 1988). O método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta vem sendo empregado como prova de identificação, por comparação do perfil espectral de vários compostos químicos; tal recurso é importante para fins de caracterização da substância a partir da obtenção dos comprimentos de onda de maiores absorvâncias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A utilização deste método para quantificação de fármacos na forma farmacêutica também tem se destacado por apresentar características favoráveis para aplicações no controle de qualidade. Os métodos desenvolvidos por espectrofotometria UV têm demonstrado resultados igualmente precisos, exatos e reprodutíveis aos preconizados em compêndios oficiais, com a vantagem de serem práticos, rápidos e de baixo custo (MARONA, SCHAPOVAL, 1999; GOMES, SALGADO, 2005; SALGADO, OLIVEIRA, 2005; MORENO, SALGADO, 2008b; MORENO, SALGADO, 2009; FIORENTINO, SALGADO, 2011; BONFILIO et al., 2011; SILVA et al., 2012b). Apesar das suas inúmeras vantagens, toda técnica tem suas limitações; neste sentido os métodos por espectrofotometria na região de ultravioleta não apresentam especificidade para diferir estruturas químicas que apresentem os mesmos cromóforos, quando comparados à metodologia por infravermelho e cromatografia de alta eficiência, capazes de distinguir substâncias semelhantes e detectar produtos de degradação.

Revisão Bibliográfica

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de estruturas complexas (LOPES, 2004). Os átomos presentes nas moléculas possuem diferentes modos vibracionais em frequências específicas, correspondentes aos níveis de energia absorvida pela amostra quando um feixe de luz monocromático o atravessa. A partir desta energia absorvida em dado comprimento de onda, um espectro de transmitância ou de absorvância característico da molécula é produzido. Recentemente, esta técnica foi empregada com êxito na validação de metodologia para a quantificação de ceftazidima e de ampicilina sódica (MORENO, SALGADO, 2012a; TÓTOLI, SALGADO, 2012).

Dentre as técnicas analíticas disponíveis, a cromatografia líquida de alta eficiência predomina como uma das mais relevantes técnicas de separação e quantificação de substâncias, capaz de apresentar resultados confiáveis de alta resolução, eficiência, seletividade e sensibilidade. O amplo número de trabalhos com esta metodologia disponível na literatura decorre das inúmeras vantagens que o método proporciona (MARONA et al., 1999; SALGADO et al., 2005; TOZO, SALGADO, 2006; LOPES, SALGADO, 2008; MORENO, SALGADO, 2008b; LOPES, SALGADO, 2009; SALGADO et al., 2009; CAZEDEY et al., 2009; BONFILIO et al., 2009; CAZEDEY et al., 2011; PASSONI, SALGADO, 2011; VIEIRA, SALGADO, 2011; MORENO, SALGADO, 2012b; CORRÊA et al., 2012; SILVA, SALGADO, 2012c). Ainda que os métodos por CLAE possam ser empregados para infinitas finalidades e são atualmente os mais utilizados para quantificação do teor de fármacos, eles sozinhos não podem inferir análises de potência em relação à atividade do fármaco frente aos micro-organismos. Para isso a associação de ensaios microbiológicos, tais como metodologia por difusão em ágar ou por turbidimetria são indispensáveis e corroboram para melhor avaliar o fármaco (SALGADO et al., 2006; GOMES, SALGADO, 2006; SALGADO, TOZO, 2007; MORENO, SALGADO, 2007; LOPES, SALGADO, 2010; CAZEDEY, SALGADO, 2011; FIORENTINO; SALGADO, 2012).

Poucos trabalhos microbiológicos para análise de CFZ foram encontrados na literatura. Em 1974, representantes do laboratório Smith Kline & French Laboratories, na Filadélfia, Pensilvânia - EUA descreveram um bioensaio fotométrico semiautomático para determinação quantitativa do até então recém-lançado antimicrobiano CFZ. Neste método, *Streptococcus faecalis* ATCC 10541 e solução de tampão fosfato 1% pH de 6,0 a 7,0 foram utilizados. O método desenvolvido foi comparado aos tradicionais métodos por difusão em ágar e as inúmeras vantagens do ensaio por turbidimetria foram exaltadas. É relevante considerar que para a realização deste método investimentos adicionais na aquisição do equipamento para implantação automatizada do “Sistema

Revisão Bibliográfica

Autoturb” e o preparo de solução tampão são necessários (PITKIN et al.,1974). Também por ensaio turbidimétrico a atividade de CFZ foi avaliada em relação às colônias de enterobactérias por Greenwood e colaboradores, em 1975. O método por difusão em ágar foi utilizado por Yeh e Chi em 2001 para definir a atividade de cefalotina e cefazolina contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. A atual edição da Farmacopeia Brasileira (2010) não apresenta monografia para CFZ em seu compêndio, mas traz o ensaio microbiológico por difusão em ágar com cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p) para análise de CFZ no capítulo de ensaios microbiológicos de antibióticos.

A utilização de métodos espectrofotométricos (UV) validados associados a ensaios biológicos permitem que controle de qualidade possa executar suas atividades de forma simples, sem necessitar de grande infraestrutura. Os ensaios microbiológicos são fundamentais para predizer a atividade do antimicrobiano, mas sozinhos, não conseguem distinguir a atividade de várias substâncias ativas em uma mesma amostra e não permitem determinar, separar e quantificar possíveis produtos de degradação ou interferentes, para isso o método por cromatografia líquida de alta eficiência é o mais adequado. Portanto, tais métodos são importantes e se complementam.

3.2.8. Validação de métodos analíticos

A escolha do método a ser desenvolvido depende das características do fármaco e da finalidade da análise, sendo necessário levar em consideração fatores que priorizem a otimização das condições que se dispõe como equipamentos, reagentes e infraestrutura. O método deve ainda ser simples, rápido, prático, de baixo custo e baixo risco ocupacional e ambiental.

A validação de método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto primordial da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura (BARROS, 2002). A validação começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, os órgãos regulatórios do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às autoridades regulatórias, evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; ICH, 2005). O desenvolvimento de métodos que permitam quantificar fármacos em matéria prima, produto semiacabado e em medicamento é fundamental para o controle de qualidade destes produtos no âmbito da indústria farmacêutica.

Revisão Bibliográfica

Órgãos como ICH, ISO, ANVISA e INMETRO exigem o item validação de métodos analíticos como requisito fundamental para assegurar a qualidade do produto (ISO, 1999; BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; ICH, 2005; INMETRO, 2011). A Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 - GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS (BRASIL, 2003) determina que a validação deva garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e exatidão adequadas à análise. São destacados os seguintes aspectos:

- **Especificidade e Seletividade:** É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- **Linearidade:** É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Precisão: A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. A precisão é determinada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada por meio de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão é expressa através do desvio padrão relativo - DPR (Equação 1).

$$DPR = \frac{DP}{m\acute{e}dia} \times 100$$

Equação 1

Em que:

DP= desvio padrão

Média= média dos valores obtidos

- **Limite de Detecção:** Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

Revisão Bibliográfica

- Limite de Quantificação: É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.
- Exatidão: É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.
- Robustez: É a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o processo de validação analítica, conhecimentos de estatística são fundamentais, uma vez que a interpretação correta dos resultados assegura a conformidade com as exigências regulatórias, além de evitar falsas conclusões nos estudos realizados.

A validação de métodos analíticos é imprescindível para o controle de qualidade na produção de medicamentos seguros, o que justifica o desenvolvimento deste trabalho.

ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO

4. Aspectos gerais do fármaco

Nome genérico: Cefazolina sódica (CAS 27164-46-1)

Nome químico: (6R,7R)-3-[[[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]metil]-8-oxo-7-[(1H-tetrazol-1-il) acetil] amido]-5-tia-1-azabicyclo [4.2.0]-oct-2-eno-2-carboxilato de sódio.

Fórmula química: C₁₄H₁₃N₈NaO₄S₃

Massa molecular: 476,5 g/mol

Teor de sódio: 48,3 mg/g

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco, muito higroscópico; é facilmente solúvel na água e muito pouco solúvel em etanol (EP, 2005; FP, 2005; BP, 2010; USP 33, 2010).

Categoria: Antimicrobiano

Classe: Cefalosporina de primeira geração

pH: De 4 e 6.

pKa: O pKa da CFZ foi calculado usando *software* ACD/Labs 6.0 que exibiu valores de 2,6 ± 0,50 para o grupo carboxílico e 10 para amida secundária presentes na estrutura química de CFZ. Estes resultados estão de acordo com os valores de pKa citados na literatura para CFZ (Tabela 6).

Aspectos gerais do fármaco

Tabela 6- Valores de pKa descritos para CFZ

pKa	Condições	Referência
2,15 (Espectrofotometria)	—	Zappala et al., em 1975,
2,05 (Titulação potenciométrica)	—	Liang et al., 1994
2,50	—	Pinto et al., 1995
2,54	Água	Chadha et al., 2005
2,78	0,10 M/mL Lauril sulfato de sódio	El-Shaboury et al., 2007
2,10	—	
2,67 (Titulação potenciométrica)	1,0 M KCl	
2,73 (Titulação potenciométrica)	0,7 M KCl	
2,79 (Titulação potenciométrica)	0,4 M KCl	
2,86 (Titulação potenciométrica)	0,1 M KCl	
2,71 (Titulação potenciométrica)	1,0 M KNO ₃	
2,77 (Titulação potenciométrica)	0,7 M KNO ₃	Alekseev et al., 2010
2,81 (Titulação potenciométrica)	0,4 M KNO ₃	
2,87 (Titulação potenciométrica)	0,1 M KNO ₃	
2,95 (Titulação potenciométrica)	I = 0	
2,75 (Titulação potenciométrica)	—	
2,54 (Titulação potenciométrica)	I = 0,5	
10,87	—	Drug Bank, 2012

Comercialização de CFZ no Brasil: No Brasil, a CFZ é comercializada como: cefazolina sódica (genérica) pelos Laboratórios Antibióticos do Brasil Ltda (ABL) e Eurofarma, Ceftrat[®] pelo Laboratório União Química, Celozina[®] pelo Laboratório Cellofarm, Cezolin[®] pelo Laboratório Biochimico, Duocef[®] pelo Laboratório Bergamo, Fazolon[®] pelo Laboratório Ariston, Zolin[®] pela Itaca Laboratórios e Kefazol[®] pelo Laboratório Eli Lilly do Brasil (SWEETMAN, 2009).

Comercialização de CFZ no mundo: A cefazolina é comercializada desde 1970, estando disponível em países como: **África do Sul:** Cefacidal[®]; Izacef[®]; Kefzol[®]; Ranzol[®]; **Alemanha:** Basocef[®]; Elzogram[®]; **Argentina:** Cefalomicina[®]; Cefamezin[®]; **Austrália:** Kefzol[®]; **Áustria:** Kefzol[®]; Servazolin[®]; Zolicef[®]; **Bélgica:** Cefacidal[®]; Kefzol[®]; **Canadá:** Kefzol[®]; **Chile:** Kefzol[®]; **Espanha:** Areuzolin[®]; Brizolina[®]; Camil[®]; Caricef[®]; Cefa[®]; Resan[®]; Cefacene[®]; Cefadrex[®]; Dacovo[®]; Fazoplex[®]; Filoklin[®]; Gencefal[®]; Intrazolina[®]; Kefol[®]; Kurgan[®]; Neofazol[®]; Tasep[®]; Tecfazolina[®]; Zolival[®]; **EUA:** Ancef[®]; Zolicef[®]; **Filipinas:** Cifoxim[®]; Cizo[®]; Cloviz[®]; Fazol[®]; Fonvicol[®]; Ilozef[®]; Lupex[®]; Maxcep[®]; Megacef[®]; Oryant[®]; Samarial[®]; Stancef[®]; Zofadep[®]; Zolival[®]; **França:** Cefacidal[®]; **Grécia:** Biozolin[®]; Vifazolin[®]; **Holanda:** Cefacidal[®]; Cefamezin[®]; Kefzol[®]; Servazolin[®]; **Hong Kong:** Cefamezin[®]; **Hungria:** Totacef[®]; **Índia:** Azolin[®]; Reflin[®]; Zolfin[®]; **Indonésia:** Biozolin[®]; Cefazol[®]; **Israel:** Cefamezin[®]; Kefazin[®]; Kefzol[®]; Totacef[®]; **Itália:**

Aspectos gerais do fármaco

Acef[®]; Cefabiozim[®]; Cefamezin[®]; Cefazil[®]; Cromezin[®]; Nefazol[®]; Recef[®]; Sicef[®]; Silzolin[®]; Totacef[®]; **Japão**: Cefamezin[®]; Otsuka[®]; Cez[®]; **México**: Cefacidal[®]; **Nova Zelândia**: Kefzol[®]; Zepilen[®]; **Polônia**: Biofazolin[®]; Tarfazolin[®]; **Portugal**: Cefamezin[®]; Kurgan[®]; **República Tcheca**: Kefzol[®]; Orizolin[®]; Vulmizolin[®]; **Rússia**: Cefamezin[®] (Цефамезин); Ifizol[®] (Ифизол); Intrazoline[®] (Интразолин); Kefzol[®] (Кефзол); Orizolin[®] (Оризолин); Reflin[®] (Рефлин); **Suíça**: Kefzol[®]; **Tailândia**: Cefalin[®]; Cefamezin[®]; Cefazillin[®]; Cefazol[®]; Cefzolin[®]; Fazolin[®]; Zefa[®]; Zepilen[®]; Zolicef[®]; Zolimed[®]; **Turquia**: Cefamezin[®]; Cefozin[®]; Equizolin[®]; Iespor[®]; Maksiporin[®]; Sefamax[®]; Sefazol[®] e **Venezuela**: Cefacidal[®]; Cefarizon[®]; Celozina[®]; Kefzol[®] (SWEETMAN, 2009).

4.1. Substância Química de Referência (SQR)

A substância de referência utilizada foi o padrão secundário com teor declarado de 98,2%, lote: F366391 e código para identificação: QA423D, fabricado em novembro de 2010 com validade até novembro de 2013.

4.2. Forma Farmacêutica

Foram utilizadas amostras comerciais de CFZ (genérica) na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável em frasco ampola contendo 1g de substância ativa (lote: 203674C validade 02/2013).

A SQR e a forma farmacêutica foram gentilmente cedidas pelo laboratório ABL Antibióticos do Brasil Ltda. (Cosmópolis-SP).

4.2.1 Diluentes da Forma Farmacêutica

A cefazolina sódica 1g, por via intramuscular deve ser reconstituída com 2,5 mL de água estéril para injeção, podendo também ser reconstituída com solução de lidocaína 0,5%, sendo que o produto reconstituído de lidocaína 0,5% não pode ser administrado por via intravenosa. A cefazolina sódica 1g, por via intravenosa deve ser reconstituída com 10 mL de água estéril para injeção. O produto reconstituído tem cor levemente amarelada e a sua estabilidade é de 12 horas em temperatura ambiente (15 a 30 °C) ou 24 horas sob-refrigeração (2 a 8 °C) protegido da luz.

ANÁLISE QUALITATIVA

5. ANÁLISE QUALITATIVA

A caracterização de substâncias ativas pelo controle de qualidade é indispensável para obtenção de medicamentos eficazes e estáveis, garantindo o seu conteúdo nas especialidades farmacêuticas e a sua conservação durante todo o período em que é comercializado.

Neste trabalho as características físicas do fármaco (solubilidade, ponto de fusão e pH) foram avaliados e os métodos qualitativos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta, espectrofotometria no infravermelho e cromatografia de alta eficiência foram utilizados para análise e identificação de CFZ pó liofilizado para solução injetável.

5.1 Características físicas

5.1.1 Método

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

5.1.2 Resultado

A CFZ apresentou-se sob a forma de pó branco e inodoro. A descrição está de acordo com a citada pelo fabricante e na bibliografia pesquisada (EP, 2005; FP, 2005; JP, 2006; MERCK INDEX, 2006; USP 33, 2010; SWEETMAN, 2009; BP, 2010).

5.2. Determinação de solubilidade

Embora o teste de solubilidade não possa ser tomado no sentido estrito de constante física, ele complementa e corrobora com os demais ensaios, sendo preditivo na determinação da melhor solubilidade para testes quantitativos, podendo ter um valor definitivo caso a substância não apresente a solubilidade mínima exigida, principalmente, no solvente água (Farmacopeia Brasileira, 2010).

5.2.1 Material

Todas as determinações foram realizadas em tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, com auxílio de micropipeta e agitador Phoenix modelo AT: 56. Os solventes utilizados foram: acetato de etila PA (Synth), acetona PA (Qhemis), ácido acético 0,1 M PA (Qhemis), ácido clorídrico 0,1 M PA (Qhemis), água purificada (Milli-Q®), clorofórmio PA (Synth),

Análise qualitativa

diclorometano PA (Synth), etanol PA (Cinética), éter etílico PA (Qhemis), hidróxido de sódio 0,1 M PA (Merck), metanol PA (Synth) e *n*-butanol PA (Synth). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

5.2.2. Método

Foram transferidos 10 mg de CFZ pó liofilizado para solução injetável descrito no item 4.2. para os tubos de ensaios, aos quais foram adicionadas alíquotas crescentes de solvente sob agitação em agitador Phoenix modelo AT: 56 para observação quanto à dissolução do produto. O ensaio de solubilidade foi realizado a 25 °C conforme o preconizado na Farmacopeia Brasileira, 2010. A solubilidade encontrada é designada por termos descritivos como consta nas monografias e os seus significados estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7- Termos descritivos no teste de solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira

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

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

5.2.3. Resultados

Os resultados obtidos foram apresentados segundo os termos descritivos disponíveis na Farmacopeia Brasileira (2010), a expressão partes refere-se à dissolução de 1 g do soluto em 1 mL do solvente. A fim de minimizar o consumo de amostra e solventes, as quantidades utilizadas neste teste foram adequadas proporcionalmente para 10 mg de soluto. Os resultados obtidos no teste de solubilidade para CFZ pó liofilizado para solução injetável em diferentes solventes encontram-se no Tabela 8.

Tabela 8- Solubilidade da CFZ pó liofilizado para solução injetável em diferentes solventes a 25 °C

Solventes	Termo descritivo
Acetato de etila	Muito pouco solúvel
Acetona	Pouco soluvel
Ácido acético 0,1 M	Muito pouco solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Praticamente insolúvel
Água Purificada	Facilmente solúvel
Clorofórmio	Praticamente insolúvel
Diclorometano	Praticamente insolúvel
Etanol	Muito pouco solúvel
Éter etílico	Praticamente insolúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	Facilmente solúvel
Metanol	Pouco solúvel
<i>n</i> -butanol	Praticamente insolúvel

5.2.4. Discussão

A solubilidade é um método qualitativo que caracteriza a amostra de acordo com a sua polaridade, sendo útil na identificação e pureza dos fármacos. Este parâmetro também é necessário para a determinação dos solventes a serem utilizados nos testes quantitativos. De acordo com os parâmetros avaliados, os resultados obtidos para amostra de CFZ pó liofilizado para solução injetável são condizentes com compêndios oficiais de referência, apresentando ser facilmente solúvel em água e muito pouco solúvel em etanol (EP, 2005; FP, 2005; USP 33, 2010; BP, 2010); pouco solúvel em metanol (JP, 2011); praticamente insolúvel clorofórmio e éter (THE MERCK INDEX, 2006; USP 33, 2010). Portanto, ainda que os resultados de solubilidade apresentados pelas farmacopeias e descritos na Tabela 5 difiram entre si, todos os resultados encontrados estão dentro das especificações farmacopeicas. Essas pequenas diferenças na solubilidade relatadas nos compêndios oficiais podem ser justificadas devido à presença de formas polimórficas presentes na amostra (PIKAL et al., 1978; KALINKOVA et al., 1990, FURLANETTO et al., 1994; OGUCHI et al., 1995; OPALCHENOVA, KALINKOVA 1999; CHADHA et al., 2005), que podem estar interferindo na solubilidade e estabilidade do fármaco. Contudo, o fármaco mostrou ser facilmente solúvel em água, solvente escolhido para o uso nos testes quantitativos a serem realizados.

5.4.3. Determinação de umidade

Considerando que muitas substâncias farmacopeicas encontram-se na forma hidratada ou com água absorvida, os métodos de determinação de umidade são de alta relevância. O método de perda

Análise qualitativa

por dessecação é usualmente realizado para verificar a quantidade de substância volátil presente na amostra. No caso de ser a água a única substância volátil, seu teor pode ser determinado pelo método volumétrico de Karl Fischer.

Portanto o teor de umidade da amostra de CFZ descrita no item 4.2. foi analisado pela técnica de perda por dessecação usando balança por infravermelho que avalia a presença de substâncias voláteis, por um ensaio gravimétrico e pelo método volumétrico de Karl Fischer.

5.3.1. Material

O método de perda por dessecação foi realizado em analisador de umidade por infravermelho, modelo IV-2000 (Gehaka, SP, Brasil) empregando balança com aquecimento por radiação infravermelha, que permite avaliar a umidade da amostra.

O teor de água foi determinado por equipamento de Karl Fischer ORION[®] modelo AF8, usando Reagente de Karl Fischer isento de piridina, metanol da marca Vetec Química Fina com no máximo 0,005% de água e tartarato de sódio diidratado (padrão volumétrico para padronização do reagente de Karl Fischer contendo $15,66 \pm 0,05\%$ H₂O).

5.3.2. Método

A determinação de substâncias voláteis da amostra de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável (descrita no item 4.2) foi realizada de acordo com a técnica para determinação da perda por dessecação utilizando balança por infravermelho, preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010). O método de dessecação em analisador de umidade por infravermelho consiste em secar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada, durante o tempo necessário. Neste ensaio, o conteúdo de um frasco de CFZ pó liofilizado para solução injetável foi pesado e registrado. Após, foi transferido para o equipamento, onde permaneceu por 1 hora a 105 °C. O teor de umidade foi calculado automaticamente pelo equipamento.

Para confirmar o tempo que a amostra deve permanecer no analisador de umidade por infravermelho, foi realizado um teste gravimétrico. Neste teste, a CFZ pó liofilizado para solução injetável foi exatamente pesada em balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo[®], Suíça), no interior de um pesa-filtro previamente dessecado nas mesmas condições da análise e tarado. Após a pesagem, o pesa-filtro foi levado à estufa modelo 702.780 (Quimis, SP, Brasil) a 105 °C, para a dessecação da amostra. O procedimento foi realizado em triplicata e o peso do pesa-filtro contendo a amostra foi analisado de 30 em 30 minutos, até a constatação de peso constante. A expressão

Análise qualitativa

“dessecação até peso constante” significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg/g da substância em exame. Após esse procedimento a perda em peso foi calculada em porcentagem pela Equação 2 (Farmacopeia Brasileira, 2010).

$$\% \text{ Perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

Pa= peso da amostra

Pu= peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação

Ps= peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação

A determinação de água da amostra de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável (descrita no item 4.2) foi determinada pela técnica de Karl Fischer usando, reagente de Karl Fischer padronizado com padrão de tartarato de sódio diidratado. Procedeu-se a titulação e os resíduos foram descartados de acordo com os procedimentos de biossegurança.

Os três ensaios (análise de determinação da perda por dessecação, ensaio gravimétrico e ensaio volumétrico por Karl Fischer) foram realizados em triplicata e as determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010).

5.3.3. Resultados

Os resultados encontrados para os métodos de determinação de umidade são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Teor de umidade da CFZ pó liofilizado para solução injetável determinado por Karl Fischer e em analisador de umidade por infravermelho

Ensaio ^a	Karl Fischer	Balança de infravermelho	Gravimétrico
	Teor de umidade (%)	Teor de umidade (%)	Teor de umidade (%)
1	1,63	2,50	0,90
2	1,54	2,40	0,89
3	1,62	2,60	0,86
Média	1,60	2,50	0,88
DP^b	0,04	0,10	0,02
EPM^c	0,02	0,05	0,01

^aCada ensaio é a média de três determinações em dias diferentes; ^bDP= Desvio padrão; ^cEPM= Erro Padrão da Média.

5.3.4. Discussão

O teor obtido por analisador de umidade por infravermelho foi de 2,5%, enquanto que, o teor de umidade encontrado no teste gravimétrico foi de 0,88%, os resultados indicam que 1 hora de dessecação a 105 °C é suficiente para remover a umidade presente do fármaco em análise. Já o teor de umidade apresentado pelo método por Karl Fischer foi de 1,6%. Resalta-se que dentre os teste realizados, o método de Karl Fischer baseia-se na redução de iodo pelo dióxido de enxofre na presença de água. O método volumétrico (Karl Fischer) é aplicado apenas para a determinação de água e tem suas limitações, enquanto que os métodos de determinação de umidade de perda por dessecação (método gravimétrico e por analisador de umidade por infravermelho) são capazes de detectar substâncias voláteis, além de não gerar resíduos tóxicos a serem descartados. Dentre os métodos realizados, o método de determinação de umidade por balança de infravermelho apresentou ser o mais apropriado, por ser simples prático e rápido.

É interessante lembrar que cada molécula de água possui massa molar equivalente a 18,015 g/mol, portanto a umidade excessiva pode interferir na pesagem da quantia exata de fármaco, levando a resultados duvidosos de teor ou potência, em análises quantitativas. O teor de umidade acima do especificado também pode indicar má conservação das matérias primas propiciando a deterioração dos produtos. Com isso a determinação de umidade é útil para se estabelecer o tempo de dessecação ao qual a amostra deve ser submetida prévia às análises quantitativas, sendo um ensaio de extrema importância para a obtenção de pesagem precisa e resultados confiáveis.

5.4. Determinação do ponto de fusão

A ponto de fusão de uma substância é a temperatura a qual uma substância sólida se fluidifica, e é evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A determinação do ponto de fusão é um método simples, econômico e rápido, frequentemente empregado 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 diminuição do ponto de fusão ou alargar a faixa de fusão de um determinado composto (GRAHAM, 1995).

5.4.1. Material

Foram utilizados tubos capilares com 1,6 mm de espessura e 7,5 cm de comprimento e equipamento automático Stuart Scientific SMP3 - Staffordshire, UK.

Análise qualitativa

5.4.2. Método

O ponto de fusão foi determinado pelo método do capilar. Após dessecar a CFZ SQR por 1 hora a 105 °C, uma porção de CFZ em pó liofilizado para solução injetável foi introduzida e compactada em tubos capilares, de modo a formar coluna de aproximadamente 3 a 4 cm de altura. Os capilares foram inseridos verticalmente no equipamento automático Stuart Scientific, utilizando-se taxa de aquecimento de 1,0 °C por minuto, prosseguindo até 10,0 °C após a completa fusão do fármaco.

5.4.3. Resultado

Para a realização do ponto de fusão, foram utilizadas amostras de CFZ SQR descrita no item 4.1., submetidas a três ensaios efetuados em dias diferentes, sendo que cada ensaio foi composto pela determinação simultânea de três capilares. O mesmo procedimento foi realizado para amostras de CFZ pó liofilizado para solução injetável (4.2.), a fim de comparar os resultados. O ponto de fusão foi observado visualmente e os resultados obtidos estão apresentados da Tabela 10.

Tabela 10- Ponto de fusão obtido para as amostra de CFZ pó liofilizado para solução injetável

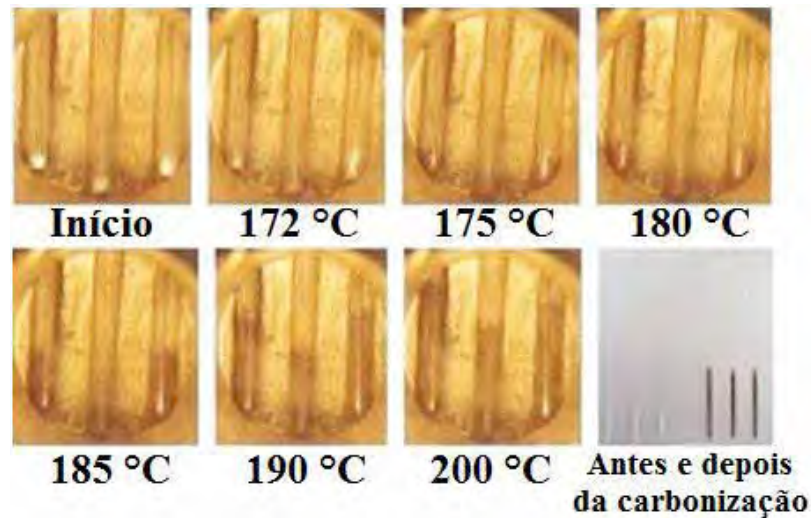
Ensaio ^a	Mudança de cor (°C)	Ponto de fusão (°C)
1	172,9	180,2
2	172,6	181,0
3	172,4	180,6
Média	172,6	180,6
DP^b	0,146	0,221
DPR^c	0,25	0,40

^aCada ensaio é a média de três determinações;

^bDP= Desvio Padrão;

^cDPR= Desvio Padrão Relativo.

A CFZ pó liofilizado para solução injetável apresentou início de degradação, visualizada em torno de 172 °C pela alteração de cor das amostras, aumentando progressivamente de intensidade até sua completa carbonização, de branco a amarelo-alaranjado-marrom-preto (Figura 3). No entanto, a fusão das amostras foi evidenciada a partir de 180 °C e a sua ebulição foi observada até 200 °C. O mesmo procedimento foi realizado para CFZ SQR, que apresentou características semelhantes.

Figura 3- Ponto de fusão de CFZ pó liofilizado para solução injetável

5.4.4 Discussão

Nos compêndios consultados (EP, 2006; FP, 2005; JP, 2011; MERCK, 2006; BP, 2010; SWEETMAN, 2009; FB, 2010; USP 33, 2010), o ponto de fusão da CFZ não é apresentado. Zappala e colaboradores, (1975) descreveram o ponto de fusão da cefazolina em 190 °C. Laudos de análises de fornecedores como West-Ward Pharmaceuticals com sede em Eatontown, Nova Jersey, EUA, indicam que a faixa de fusão para o fármaco em estudo é de 180 °C a 200 °C e o nos laudos do fornecedor chinês ChemKoo o ponto de fusão para CFZ é 190 °C. Assim sendo, os resultados encontrados são condizentes com os dados descritos na literatura.

5.5. Determinação do pH

O pH é o número que representa convencionalmente a concentração dos íons hidrogênio numa solução aquosa. Por razões práticas, a sua definição é experimental. A determinação potenciométrica do pH é efetuado medindo a diferença de potencial entre dois eletrodos mergulhados na solução; um destes é um eletrodo sensível aos íons hidrogênio e o outro um eletrodo de referência (por exemplo, um eletrodo de calomelano saturado) (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005).

5.5.1. Material

O pH da solução de CFZ pó liofilizado para solução injetável foi obtido em peagâmetro marca Micronal modelo B474. O equipamento de medida é um voltímetro habitualmente graduado em unidades de pH.

5.5.2. Método

O peagâmetro foi previamente calibrado em solução de pH 7 e em solução de pH 4, conforme requerido pelo equipamento. Após calibração, os eletrodos foram mergulhados na solução de CFZ pó liofilizado para solução injetável preparad conforme descrito no item 5.5.2.1. e as leituras foram realizadas em temperatura controlada de 25 °C.

5.5.2.1. Preparo da solução

A solução para análise foi preparada pesando 1 g de CFZ pó liofilizado para solução injetável, adicionada em balão volumétrico de 10 mL, que foi completado com água purificada.

5.5.3. Resultado

O teste foi realizado em triplicata e a média das três determinações de pH para CFZ pó liofilizado para solução injetável foi de 4,88 com DPR de 0,41.

5.5.4. Discussão

Os resultados obtidos na análise de pH encontram-se de acordo com as especificações da FP, 2005; EP, 2006; USP 33, 2010 e BP, 2010 que estabelecem a faixa de pH de 4 a 6 e com a JP, 2011, em que a faixa de pH especificada é de 4,5 a 6,5, para solução de CFZ em água purificada 0,1 g/mL.

5.6. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, que consiste na separação de compostos através da migração de substâncias por afinidade à fase estacionária. É um método simples, rápido, visual e econômico, usado para o acompanhamento de reações orgânicas e identificação de compostos (COLLINS et al., 2006; DEGANI et al., 1998; MORENO, SALGADO, 2010).

A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta, com a qual é possível caracterizar muitas moléculas farmacêuticas. Além disso, é de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Considerando que os compêndios oficiais não descrevem testes de cromatografia em camada delgada para identificação de CFZ (EP, 2006; FP, 2005; JP, 2011; USP 33, 2010; BP, 2010; FB, 2010), buscou-se na literatura estudos que os descrevessem (VANDAMME, VOETS, 1972; BHUSHAN, THIONG'O, 2002; CHOMA, 2007; MOHAMED, 2008; SINGH, MAHESHWARI, 2010). No entanto, muitos dos métodos encontrados, geralmente utilizam como fase móvel, misturas

Análise qualitativa

de vários solventes tóxicos e agentes reveladores de difícil descarte. Estudos para a identificação de cefalosporinas por CCD também foram considerados (TOZO, 2007; MORENO, 2007; VIEIRA, 2010; ALESSIO, 2012). Desta forma, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de nova técnica por CCD, mais prática e simples, para identificação da cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável, com a utilização de solventes menos tóxicos e mais econômicos, que também seja capaz de detectar a presença de produtos de degradação.

5.6.1. Material

As placas utilizadas para identificação do fármaco foram cromatofolhas TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Alemanha) adquiridas comercialmente. Para o preparo das diferentes fases móveis testadas, foram usados os seguintes solventes: acetonitrila (J.T. Baker), ácido acético (Qhemis), ácido fórmico (Synth), água purificada (Milli-Q), etanol (Synth), metanol (Synth), clorofórmio (Synth) e diclorometano (Quimex). Para as análises dos produtos de degradação é necessário o preparo de soluções de: hidróxido de sódio 0,001 M (Cinética), ácido clorídrico 0,001 M (Qhemis) e peróxido de hidrogênio 3% (Vetec Química Fina). A SQR e a amostra em pó liofilizado para solução injetável utilizado foram descritas nos itens 4.1. e 4.2., respectivamente. As pesagens dessas substâncias foram realizadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

5.6.2. Método

A fase móvel foi preparada em proveta e foi transferida para cuba cromatográfica de vidro onde permaneceu até sua saturação. Alíquotas de 10 µL de cada solução preparada conforme descrito no item 5.6.2.1. foram adicionadas em placas de sílica com as dimensões de 10,0 x 10,0 cm previamente ativadas em estufa a 105 °C por 1, foi revelada em vapores de iodo (Synth, SP, Brasil). Realizou-se a comparação das manchas CFZ hora. Estas placas foram inseridas individualmente em cuba cromatográfica com a fase móvel, onde permaneceram até a eluição dos compostos por 8 cm. Em seguida, a placa foi retirada e, após a evaporação do solvente SQR e pó liofilizado para solução injetável, quanto ao tamanho, forma, posição e valores de R_f calculados.

Os seguintes sistemas de fases móveis foram testados:

Sistema 1: diclorometano:metanol: acetonitrila:ácido acético 5% (6:4:2:2) v/v/v/v

Sistema 2: clorofórmio:metanol: ácido fórmico (18:2:1) v/v/v

Sistema 3: clorofórmio: metanol: ácido fórmico (18:7:1) v/v/v

Sistema 4: água: metanol (2:8) v/v

Análise qualitativa

Sistema 5: metanol

Sistema 6: água: etanol (3:7) v/v

Sistema 7: água: etanol (2:8) v/v

Sistema 8: água: etanol (1:9) v/v

5.6.2.1. Preparo da solução

Para preparo da solução a ser impregnada na placa de sílica, pesou-se o equivalente a 25 mg de SQR e transferiu-se para balões volumétricos de 5 mL; o volume foi completado com água (Milli-Q), obtendo solução de 5 mg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para cefazolina pó liofilizado para solução injetável.

5.6.2.2. Degradação acelerada

Soluções de amostra de cefazolina sódica (5,0 mg/mL) foram submetidas à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica, com objetivo de avaliar se o sistema cromatográfico escolhido é capaz de detectar a degradação da cefazolina sódica na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável e revelar a presença de possíveis produtos de degradação. Para análise de eventual degradação em condições neutra e fotolítica as soluções foram preparadas conforme descrito do item 5.6.2.1. Sendo que, para a condição neutra a solução foi imersa em banho maria a 60 °C, enquanto que a fotodegradação foi induzida pela exposição da solução à luz ultravioleta, utilizando uma câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W. Já as soluções de estresse básico, ácido e oxidativo, as soluções foram preparadas de modo semelhante ao descrito do item 5.6.2.1. mas ao invés de água, o volume foi completado com soluções de NaOH 0,001 M, HCl 0,001 M e peróxido de hidrogênio 3%, respectivamente e permaneceram em banho maria a 60 °C. Todos os solventes utilizados para eluição da amostra foram solventes de grau analítico. As soluções submetidas a estresse foram observadas de tempos em tempos por um período de 168 horas de degradação usando a metodologia descrita do item 5.6.2. Após a revelação das placas por fluorescência em câmara UV (luz UVA 365 nm), realizou-se a comparação das manchas CFZ pó liofilizado para solução injetável intacto, logo após o preparo (não degrada), em relação a manchas originadas no processo de degradação.

Análise qualitativa

5.6.3. Resultados

As Figuras 4 e 5 apresentam as fotografias dos cromatogramas de CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável nos solventes dos sistemas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente, reveladas em vapor de iodo.

Figura 4- Cromatogramas de CFZ SQR (a) e CFZ pó liofilizado para solução injetável (b), nos sistemas 1, 2, 3 e 4 reveladas em vapor de iodo

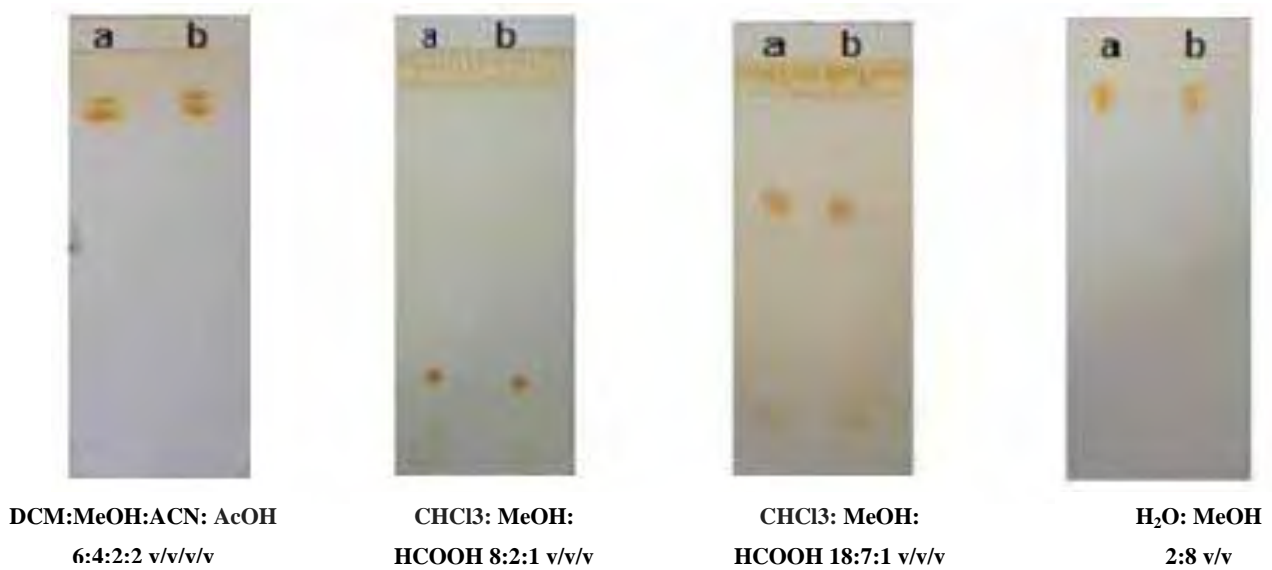
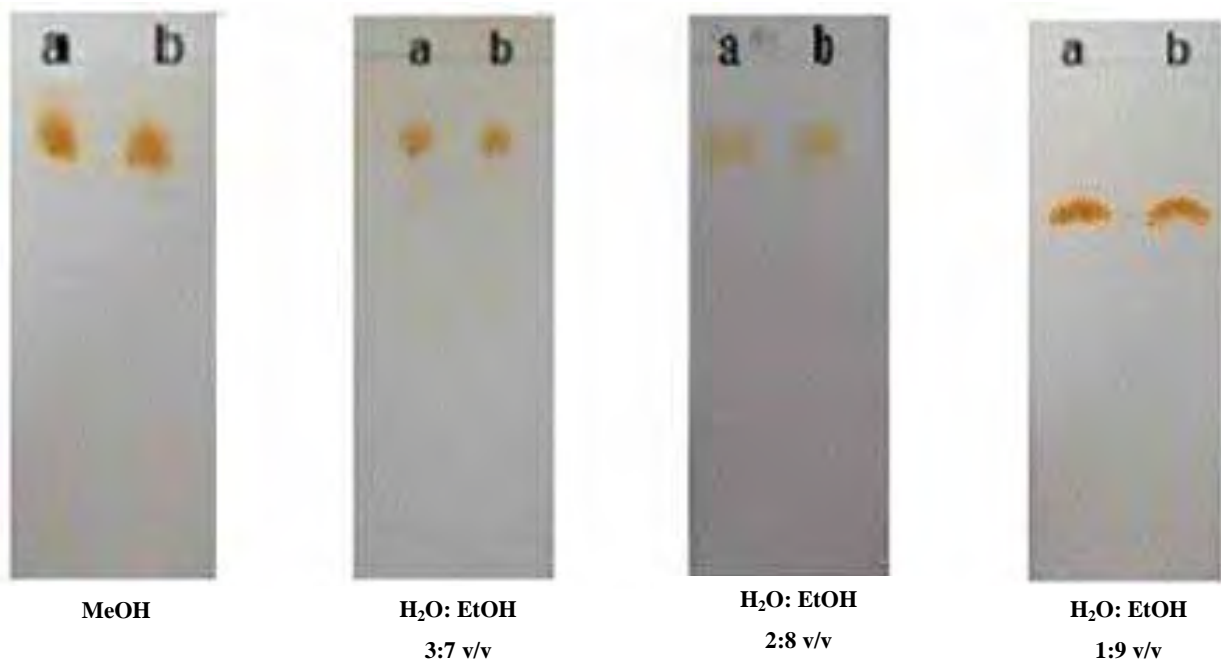


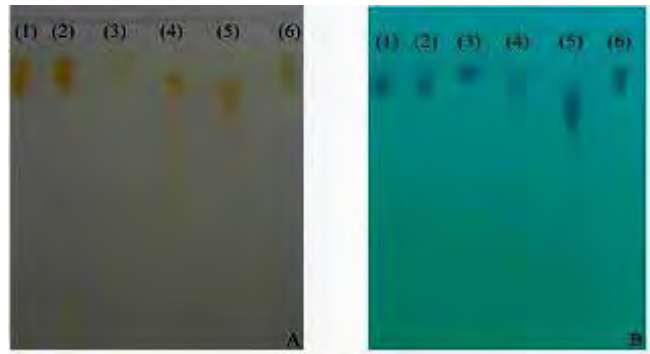
Figura 5- Cromatogramas de CFZ SQR (a) e CFZ pó liofilizado para solução injetável (b), nos sistemas 5, 6, 7 e 8 reveladas em vapor de iodo



Análise qualitativa

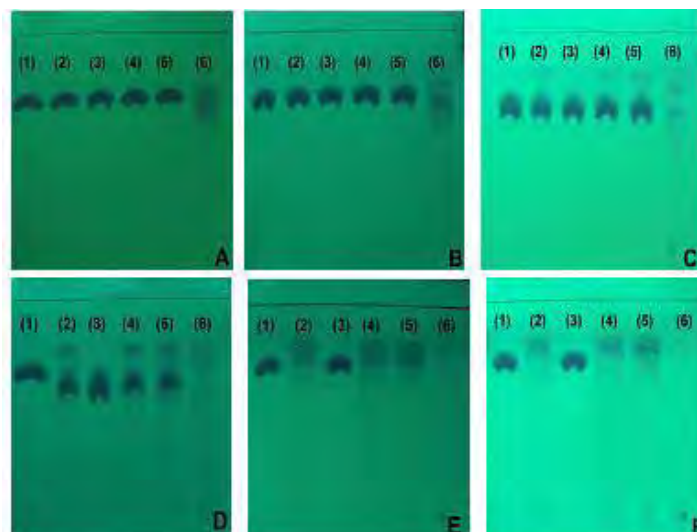
A Figura 6 apresenta as fotografias dos cromatogramas de várias cefalosporinas em comparação a CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável usando metanol como solvente.

Figura 6- Cromatogramas de comparação de CFZ SQR (1), CFZ pó liofilizado para solução injetável (2), cefoxitina (3), ceftazidima (4), ceftriaxona (5) e cefuroxima (6). Agente revelador: vapor de iodo (A) e sob luz UV (UVA 365 nm) (B), usando metanol como solvente



A Figura 7 mostra as fotografias dos cromatogramas de CFZ pó liofilizado para solução injetável intacto e submetido a estresse em solução neutra, fotolítica, básica, ácida e oxidativa, utilizando o sistema 8 como fase móvel água:etanol (1:9) v/v revelados em luz ultravioleta.

Figura 7- Cromatograma de cefazolina pó liofilizado para solução injetável intacto (1) e em solução: neutra (2), fotolítica (3), básica (4), ácida (5) e oxidativa (6), utilizando fase móvel água:etanol (1:9) v/v e revelados em câmara UV (luz UVA 365 nm) logo após o preparo (A), após 0,50 h de degradação (B), após 6 h de degradação (C), após 24 h de degradação (D), após 96 h de degradação (E) e 168 h de degradação (F)



5.6.4. Discussão

Os resultados encontrados indicam que a CFZ é facilmente identificável, apresentando mancha característica e intensa de coloração roxa, em câmara de UVA 365 nm e marrom em vapor de iodo, nos sistemas testados. O sistema 1 composto por diclorometano:metanol:acetoneitrila:ácido acético 5% (6:4:2:2 v/v/v/v) não foi satisfatório por não apresentar uma mancha bem definida. No sistema 2, clorofórmio:metanol:ácido fórmico (18:2:1 v/v/v) houve pouca migração do fármaco. No sistema 3, clorofórmio:metanol:ácido fórmico (18:7:1 v/v/v) a amostra apresentou R_f de 0,61; no entanto, ainda trata-se de uma fase móvel composta por solventes de maior toxicidade. Almejando melhorar o método para torná-lo mais simples e economicamente acessível, proporções de água:metanol foram testadas. O sistema 4 utilizando como fase móvel água:metanol (2:8 v/v) obteve R_f de 0,84; já no sistema 5 foi proposto utilizar apenas metanol como fase móvel, obtendo R_f de 0,82. Esta fase móvel foi utilizada para tentar identificar e diferenciar cinco cefalosporinas: cefazolina, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona e cefuroxima, que embora apresentassem R_{fs} próximos 0,82; 0,85; 0,83; 0,74 e 0,84, respectivamente, apresentaram manchas características, como é demonstrado no cromatograma na Figura 6. Contudo, esta fase móvel eluiu rapidamente e não conseguiu separar com clareza as manchas adicionais geradas quando a amostra foi submetida a estresse ácido, básico, alcalino e fotolítico. Buscando alternativas para melhor separação destes produtos, proporções de água:etanol (sistemas 6, 7 e 8) foram testadas a fim de diminuir a força de eluição da fase móvel. Os sistemas 6, 7 e 8 obtiveram resultados satisfatórios com R_{fs} de 0,81; 0,83 e 0,75, respectivamente, além de terem como vantagens a baixa toxicidade e o fácil descarte.

Dentre esses sistemas apresentados, o sistema 8 composto por água: etanol (1:9 v/v) destacou-se por conseguir melhor separação das manchas adicionais geradas sob condições de estresse. Assim, foi o escolhido para a realização do estudo de estabilidade. Este estudo tem como finalidade indicar a capacidade do método proposto em detectar a formação de produtos de degradação. Para isso, o método foi conduzido em condições de estresse, onde o fármaco foi submetido à exposição fotolítica em temperatura ambiente e à hidrólise ácida, básica, neutra e oxidativa, em temperatura de 60 °C. Em situações de estresse oxidativo, as manchas referentes a produtos de degradação apareceram imediatamente após o preparo e desapareceram completamente após 24 horas. Para as condições de estresse de hidrólise ácida, básica e neutra, pontos adicionais foram observados durante o período analisado. O maior número de manchas visualizadas ocorreu nas amostras submetidas a condições de estresse ácida, básica e neutra, respectivamente. Nas condições fotolíticas não houve formação de manchas adicionais no período observado (168 horas).

Análise qualitativa

O método desenvolvido mostrou ser adequado para identificar CFZ e pode ser aplicado para a análise qualitativa de CFZ em formas farmacêuticas, contribuindo para melhorar o controle de qualidade deste produto, com as vantagens de se utilizar uma fase móvel de fácil preparo, com poucos solventes, de modo econômico e seguro para os operadores.

5.7. Espectrofotometria na região de infravermelho

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa e é de alta relevância na determinação da pureza e até quantificação de substâncias orgânicas. Vem sendo amplamente utilizada em linhas de produção e no controle de processos industriais. Possui vantagens como a redução no tempo de análise, diminuição nas quantidades de amostra e identificação ou caracterização de estruturas complexas (LOPES, FASCIO, 2004).

Os equipamentos destinados ao registro de espectros na região do infravermelho consistem em uma fonte luminosa apropriada, um monocromador e um detetor. O espectro é geralmente apresentado em função da transparência, isto é, a relação entre a intensidade da radiação transmitida e a intensidade da radiação incidente. Pode igualmente ser apresentado em função da absorvância, no qual a absorvância é definida como sendo o logaritmo decimal do inverso da transparência. Assim, permitem registrar espectros que são característicos da molécula como um todo (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2010).

Informações químicas e físicas, de característica qualitativa e quantitativa, também podem ser obtidas a partir dos espectros no infravermelho próximo, região de 13300 a 4000 cm^{-1} , que são caracterizados pela absorção da radiação por sobretons e combinação de modos vibracionais fundamentais de ligações como C-H, N-H, O-H e S-H (SILVERSTEIN et al., 2007). Em 2008, Elizarova e colaboradores sugeriram um método de identificação de medicamentos baseado nesta região espectral a ser introduzido na Farmacopeia russa. No mesmo ano, Zhang e colaboradores descreveram um método para a determinação do teor de umidade em β -lactâmicos também fundamentado nos espectros de infravermelho próximo, porém a comparação direta entre o espectro da amostra e da substância química de referência nesta região não é recomendada. Já a espectrofotometria no infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) é considerada um ensaio de identificação por excelência sendo capaz de diferenciar substâncias com pequenas diferenças estruturais e, portanto, é a mais empregada para fins de identificação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Análise qualitativa

5.7.1. Material

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu® (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500 cm^{-1} , com intervalos de 2 cm^{-1} . Para a obtenção dos espectros foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio - KBr de grau analítico da marca Synth (São Paulo, Brasil). Antes de sua utilização, o KBr foi dessecado a 120 °C em estufa modelo 702.780 (Quimis®, SP, Brasil), até peso constante. A SQR e amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.1. e 4.2.

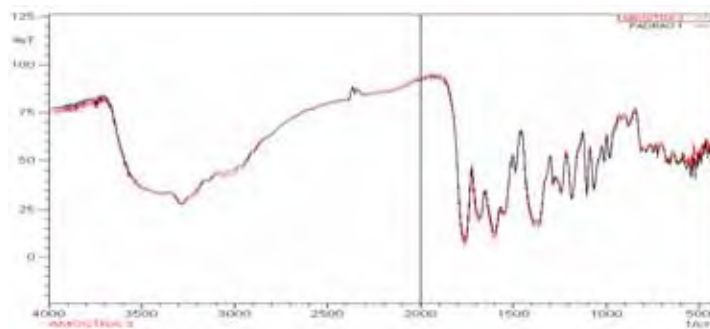
5.7.2. Método

A massa equivalente a 1,5 mg de CFZ SQR previamente dessecada por 1 h a 105 °C, foi pesada e triturada em gral de ágata, junto a 150 mg de KBr dessecado e pulverizado. Para confecção dessas pastilhas de brometo de potássio 1%, essa massa foi acondicionada em moldes especiais e posteriormente prensada a vácuo sob pressão de 80.000 kN formando discos transparentes. O mesmo procedimento foi realizado para e CFZ pó liofilizado para solução injetável. A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do software *IR Solution*.

5.7.3 Resultados

Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentaram características similares para CFZ SQR e amostra em pó liofilizado para solução injetável como demonstrado sobreposta na na Figura 8 onde estes espectros encontram-se sobreposte separadamente na Figura 9, a Figura 10 apresenta os espectros de referência para CFZ disponíveis na biblioteca de dados do equipamento utilizado e o espectro apresentado pela JAPANESE PHARMACOPOEIA (2011).

Figura 8- Espectros na região de infravermelho de cefazolina SQR (preto) e pó liofilizado para solução injetável (vermelho) sobreposto



Análise qualitativa

Figura 9- Espectro na região de infravermelho de CFZ SQR (A) e em amostra de cefazolina em pó liofilizado para solução injetável (B) em pastilhas de KBr

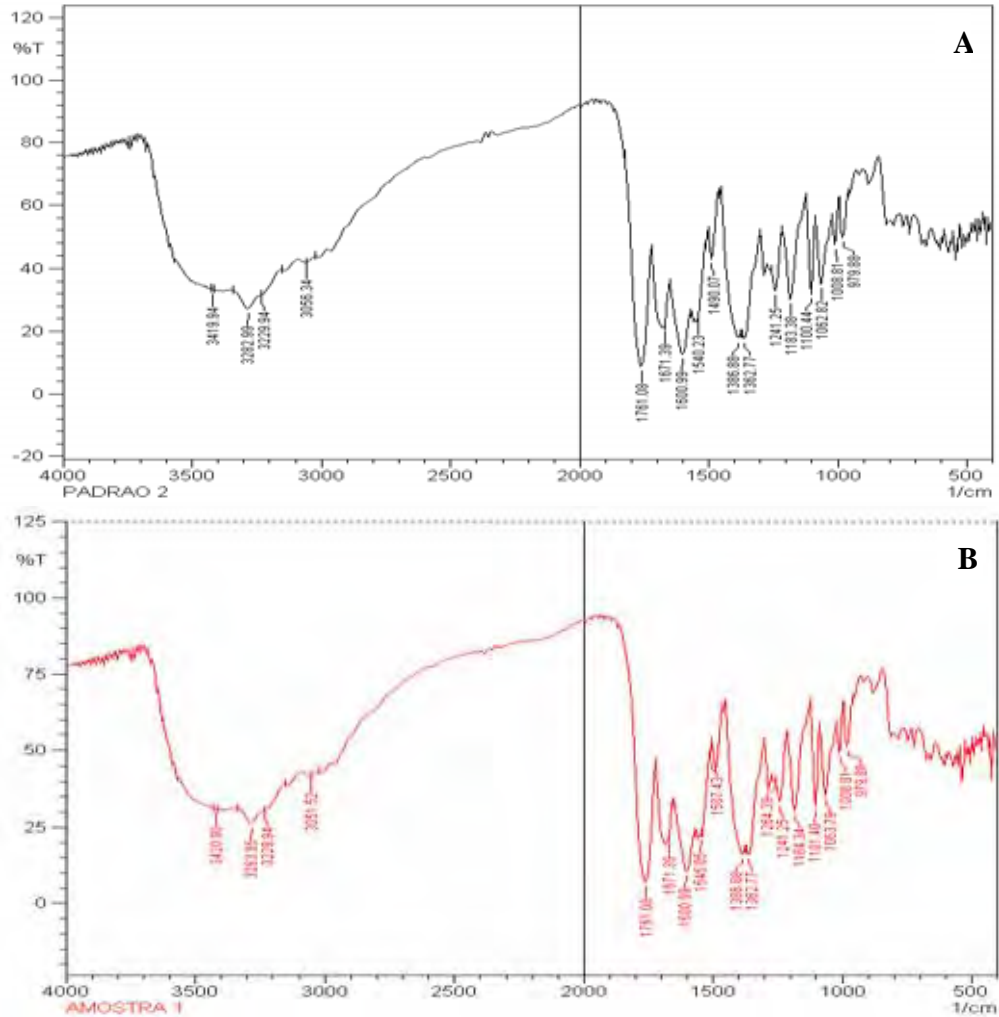
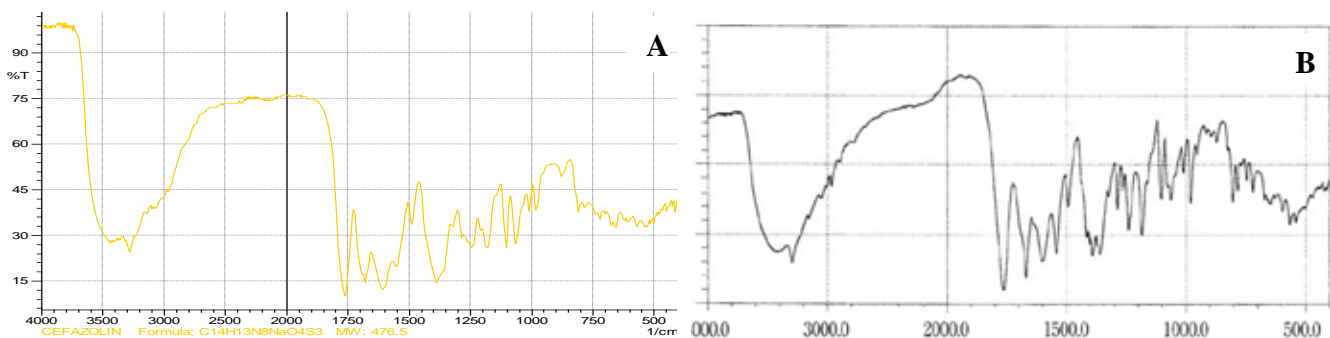


Figura 10- Espectro de referência de CFZ disponível na biblioteca de dados do espectrofotômetro Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer modelo: IR Prestige-21 IR Affinity-1 FTIR-8400S/Kyoto – Japan (A) e espectro disponível no compêndio oficial - Japanese Pharmacopoeia 2011 (B)



Análise qualitativa

Os espectros de absorção na região do infravermelho para CFZ em pastilhas de KBr apresentaram bandas de absorção características de compostos cefalosporínicos, como apresentados na Tabela 11 e estão de acordo com o núcleo cefalosporínico exposto na Figura 11.

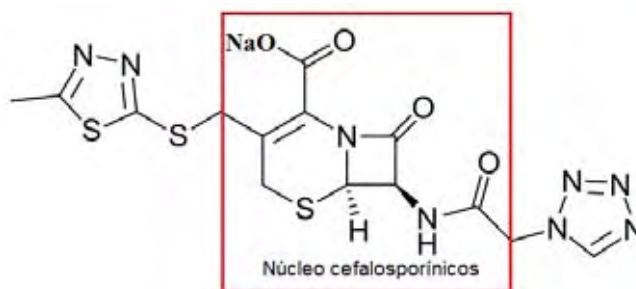
Tabela 11- Faixas de frequências e grupamentos correspondentes das bandas observadas nos espectros de infravermelho de cefazolina SQR e pó liofilizado para solução injetável

Faixa de frequência (cm) Visualizada	Faixa de frequência (cm) Referência ^a	Grupamentos responsáveis
3282; 3419	3500-3300	Estiramento do grupamento N-H e C-H
3056-3229	3100-3000	Estiramento do grupamento -C=N e -N=N
2900	3000-2850	Estiramento do grupamento -C-H
1761	1760-1700 ^b	Estiramento do grupamento carboxilato C=O
1671	1680-1630	Estiramento do grupamento amida C=O
1600, 1386	1600-1400	Estiramento do grupamento carboxilato COO ⁻
1600, 1540, 1490	1600, 1580, 1500, 1450	Estiramento do grupamento C=C de aromático
1241, 1183, 1100, 1062	1350-1000	Estiramento do grupamento C-N
1540	1640 – 1550	Estiramento do grupamento N-H de amida secundária

^aPAVIA et al., 2010

^bValores de referência para grupamento carbonila de ácido carboxílico.

Figura 11- Fórmula estrutural do núcleo cefalosporínico



5.7.4. Discussão

A espectrofotometria no IV é um método de identificação de excelência no controle de qualidade de medicamentos, considerado por muitos autores como uma espécie de “impressão digital” do composto, podendo ser usado na identificação de substâncias por comparação ao espectro de referência. Os espectros de absorção na região do infravermelho para CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável em pastilhas de KBr apresentaram bandas características de compostos cefalosporínicos, como as bandas de estiramento do grupamento N-H que foram demonstradas próximas a 3419, 3282 cm^{-1} ; em 3229 e 3056 cm^{-1} apresentam-se as bandas de

Análise qualitativa

estiramento do grupamento =C-H, enquanto que em 1761 cm^{-1} aparecem as bandas de estiramento do grupamento carboxilato, em torno de 1671 cm^{-1} encontram-se as bandas de estiramento do grupamento C=O que corresponde a carbonila da amida e em $1600, 1540, 1490\text{ cm}^{-1}$ encontram-se as bandas de estiramento do grupamento C=C de aromático. Sugere-se ainda que as bandas apresentadas em 1600 e 1386 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupamento carboxilato COO^- . As bandas presentes em $1241, 1183, 1100$ e 1062 cm^{-1} representam os estiramento do grupamento C-N e a banda em 1540 cm^{-1} é referente ao estiramento do grupamento N-H da amida secundária. Os anéis tetrazol e tiadiazol presentes na molécula são compostos por aminas terciárias e, portanto, não apresentam bandas características nos espectros de infravermelho. Os espectros obtidos para cefazolina SQR e pó liofilizado para solução injetável (Figura 8), sobrepostos na Figura 9, e comparados aos espectros apresentados na literatura (Figura 10), apresentam as mesmas bandas de absorção características, confirmando o propósito desta técnica, na identificação da molécula por comparação com um padrão de referência. A técnica de espectrofotometria na região do infravermelho permite correlacionar os picos apresentados nos espectros, para, desta forma, caracterizar a substância em análise. Apresenta ótimas evidências de identidade de uma estrutura, sendo prático, rápido e seletivo, com a vantagem de necessitar de pequenas quantidades de amostra, ter um viável custo x benefício (referente à instrumentação), ampliar a capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, além de não gerar resíduos de solventes orgânicos.

5.8. Espectrofotometria na região do ultravioleta

Espectros de absorção na região de ultravioleta são empregados como prova de identificação, por comparação do perfil espectral, em que as leituras de padrão e amostra são efetuadas simultaneamente e em condições idênticas quanto a comprimento de onda, tamanho de cubeta, etc. Espectrofotômetros utilizados na região do ultravioleta são dotados, fundamentalmente, de fonte de radiação; seletor de comprimento de onda; celas de absorção (cubetas) para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática; detector de radiação e uma unidade de leitura e de processamento de sinal. A fonte de radiação são lâmpadas de deutério (160 a 380 nm) e tungstênio (320 a 2500 nm). Os espectrofotômetros possuem registradores gráficos que permitem a obtenção dos espectros de absorção das substâncias em meio digital. Tal recurso é importante para fins de caracterização da substância a partir da obtenção dos comprimentos de onda de maiores absorvâncias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Análise qualitativa

5.8.1 Material

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV mini-1240, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os solventes testados foram: água purificada (Milli-Q[®]), ácido clorídrico PA 0,1 mol/L (Synth), hidróxido de sódio PA 0,1 mol/L (Merck), metanol PA (Synth), tampão fosfato 1% pH 6 e tampão fosfato 1% pH 8. A SQR e as amostras de pó liofilizado para solução injetável utilizado foram descritas nos itens 4.1. e 4.2., respectivamente.

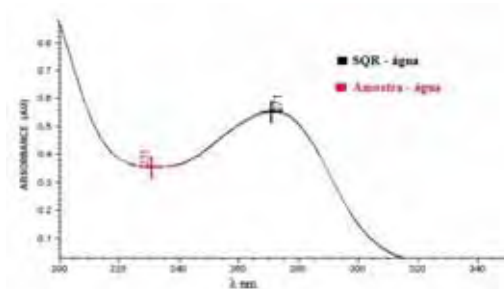
5.8.2 Método

A massa equivalente a 20,00 mg de CFZ SQR, previamente dessecada por 1 h a 105 °C foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com água purificada, obtendo-se solução-mãe de 200 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas soluções em água, metanol, ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M, tampão fosfato 1% pH 6 e tampão fosfato 1% pH 8, contendo 20,0 µg/mL de CFZ. Os espectros de absorção foram registrados na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm. O mesmo procedimento foi realizado para CFZ pó liofilizado para solução injetável, em que, a massa de 20 mg de amostra foi pesada a partir de um *pool* de amostras do conteúdo de vinte frascos-ampola.

5.8.3 Resultados

Os espectros de amostra de CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável, preparadas segundo o item 5.8.2., foram analisados em vários solventes na concentração de 20,0 µg/mL. Na Figura 12, o espectro das soluções aquosas de CFZ SQR encontra-se sobreposto ao espectro de CFZ na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável.

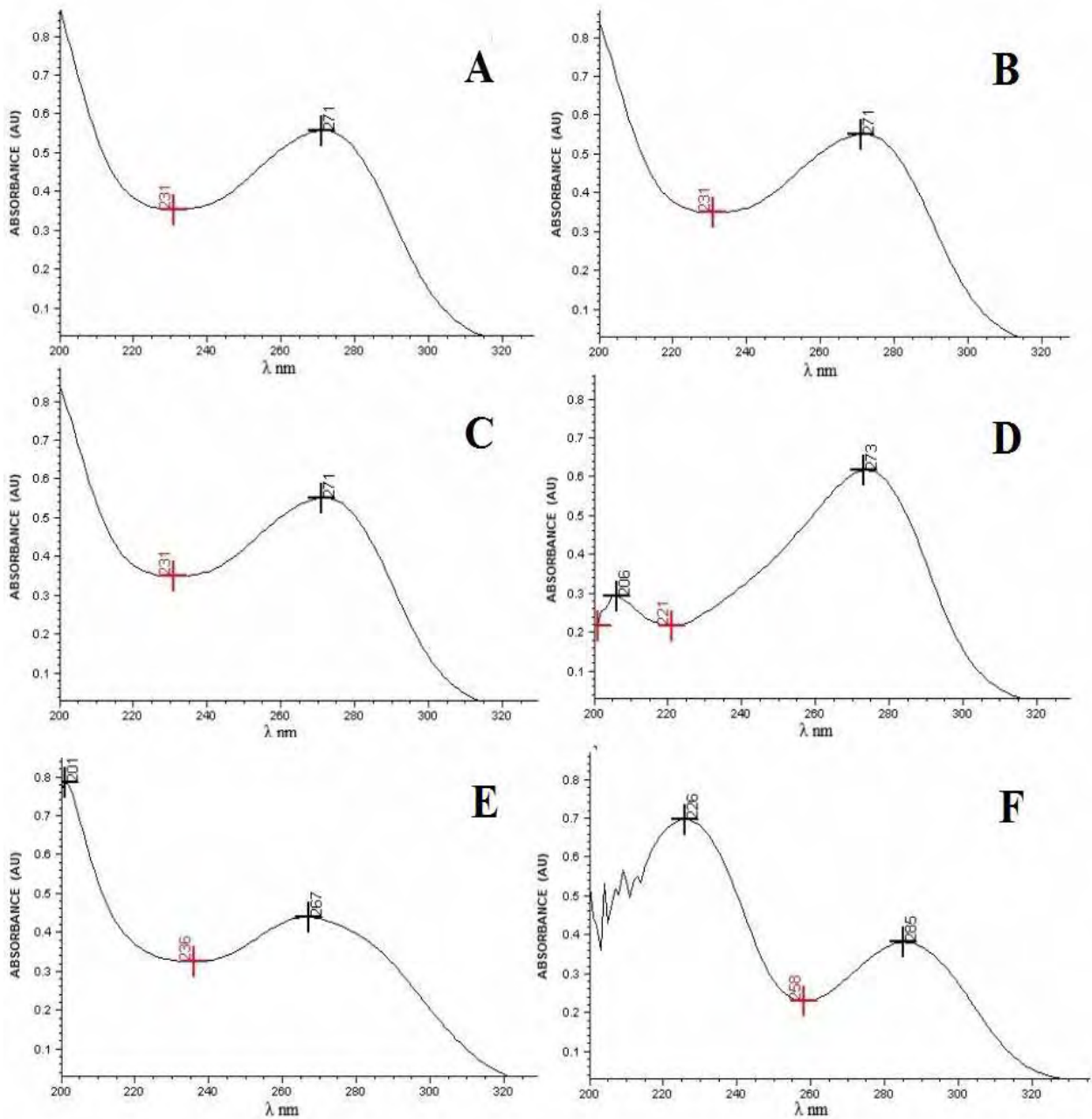
Figura 12- Espectro de absorção na região do ultravioleta de CFZ SQR, em comparação a CFZ pó liofilizado para solução injetável, na concentração de 20 µg/mL utilizando água como solvente



Análise qualitativa

Os perfis espectrais de CFZ SQR em diversos solventes são apresentados na Figura 13.

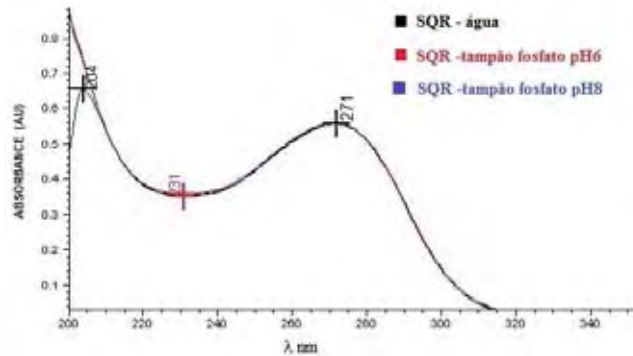
Figura 13- Espectro de absorção na região do ultravioleta, solução de CFZ SQR na concentração de 20 µg/mL, utilizando como solvente: água (A); tampão fosfato pH 6 (B); tampão fosfato pH 8 (C); metanol (D); ácido clorídrico 0,1 M (E); hidróxido de sódio 0,1 M (F)



Nota-se na Figura 14 que não houve diferença significativa no espectro de absorção na região do UV para solução de SRQ preparadas em água, tampão pH 6 e tampão pH 8.

Análise qualitativa

Figura 14- Espectro de absorção na região do ultravioleta, solução de CFZ SQR na concentração de 20 µg/mL, utilizando como solvente: água, tampão fosfato pH 6 e tampão fosfato pH 8



5.8.4. Discussão

A absorção molecular na região do ultravioleta depende da estrutura eletrônica da molécula. Assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes (SILVERSTEIN et al., 2007).

As amostras de CFZ SQR e a CFZ pó liofilizado para solução injetável dissolvidas em água purificada na concentração de 20 µg/mL foram comparadas entre si. Ambas mantiveram máximo de absorção no comprimento de onda em 271 nm, com uma pequena diferença de absorvância de 0,5585 para CFZ SQR e 0,5554 para CFZ em pó liofilizado para solução injetável (Figura 12). Dentre os solventes testados, a água apresentou resultados semelhantes às soluções de tampão fosfato 1% pH 6 e tampão fosfato 1% pH 8, com máximo de absorção no comprimento de onda em 271 nm e absorvância em torno de 0,5585 (Figura 14), enquanto que utilizando metanol, o máximo de absorção observado foi de 0,6521, em 273 nm, em meio ácido foi de 267 nm com absorvância de 0,4417 e em meio básico foi de 285 nm e absorvância de 0,5221. Após análise dos espectros, optou-se em usar água purificada como solvente, por apresentar características adequadas nos espectros e por possuir vantagens econômicas e ambientais, tais como ser de fácil aquisição e descarte, ter baixo custo e não gerar resíduos tóxicos ao operador e ao meio ambiente.

Os resultados apontam que os perfis espectrais demonstrados para CFZ SQR e amostra em pó liofilizado para solução injetável, dissolvidos em vários solventes, são condizentes, podendo ser empregados como prova de identificação por comparação. O método corrobora para análise qualitativa de rotina realizada no laboratório de controle de qualidade, podendo ser usado para a identificação de CFZ na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável, através das suas características de absorção, com as vantagens de ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo.

5.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa são os mais comumente utilizados devido à sua habilidade de separar substâncias semelhantes (KAZAKEVICH, LOBRUTTO, 2007). Este método consiste em se obter uma fase estacionária mais apolar em relação à fase móvel. Assim, a molécula eluirá quando a afinidade pela fase móvel for maior que pela fase estacionária. As moléculas eluíam em tempos diferentes de acordo com a sua hidrofobicidade e deste modo são separadas (SCHLUTER, 1999).

5.9.1 Material

Para a realização do método foram utilizados CFZ SQR e para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2. O método por cromatografia líquida de fase reversa foi realizado em sistema Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, USA), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com loop de 20 µL (Rheodyne Breeze[®], CA, USA). A análise do fármaco em estudo foi realizada isocraticamente em coluna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 5 µm (250 mm x 4,6 mm) Agilent[®] (Santa Clara, CA, USA), em temperatura ambiente. O ensaio foi realizado com vazão de 0,5 mL/min, usando detector UV a 270 nm. As áreas dos picos foram integradas usando o programa de *software* Empower[®].

5.9.2 Método

5.9.2.1 Preparo da solução de CFZ SQR

Foi pesada a massa equivalente a 10,00 mg de CFZ SQR e transferida para balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com a fase móvel, para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg/mL. Aliquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL para obtenção das concentrações de trabalho.

5.9.2.2 Preparo da solução de CFZ pó liofilizado para solução injetável

O conteúdo de vinte frascos-ampola contendo peso médio de 1,07 g de CFZ em pó liofilizado para solução injetável (descritos no item 4.2.) foi acondicionado em um recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, 10 mg de CFZ foi pesado e transferido para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água, para a obtenção de solução com

Análise qualitativa

concentração de 200,0 µg/mL. Desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das soluções de trabalho.

5.9.2.3 Preparo das fases móveis

Diferentes fases móveis foram testadas. As fases móveis foram constituídas por diferentes proporções de solventes de grau CLAE tais como: acetonitrila (JT Baker), etanol (JT Baker), metanol (JT Baker) e água purificada (Milli-Q®). Cada fase móvel foi filtrada em membrana filtrante de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore®), sob vácuo e desgaseificada no ultrassom (Unique UltraSonic Cleaner Modelo USC – 2850A) durante 30 minutos antes do uso.

5.9.3 Resultados

Ensaio preliminares foram efetuados, a fim de se obter um método confiável, de modo a evitar danos à coluna cromatográfica e tentar diminuir a formação de resíduos. Vários sistemas de fases móveis foram testados em diferentes colunas cromatográficas em temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 10 µL e a vazão variou entre 0,5 a 1,0 mL/min. O comprimento de onda de 270 nm foi pré-estabelecido por varredura em detector UV. As fases móveis e as diferentes colunas testadas durante o desenvolvimento do método estão apresentadas na Tabela 12.

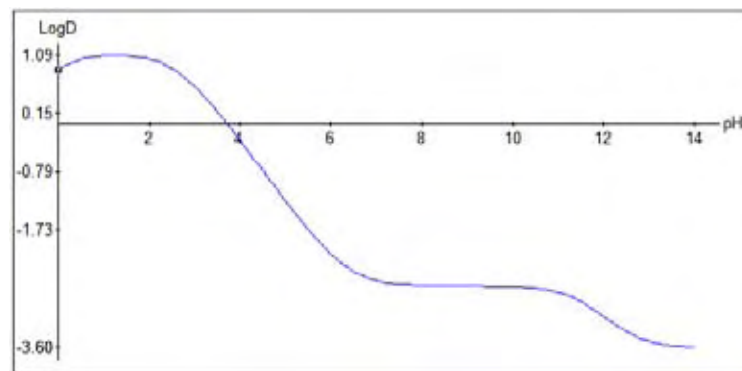
Tabela 12- Fases móveis e colunas testadas durante o desenvolvimento do método de CLAE

Fase móvel	Coluna
Água: etanol (40:60 v/v)	Kinetex C ₁₈ Phenomenex (150 x 4,6 mm)
Água: etanol (50:50 v/v)	
Água: etanol (60:40 v/v)	
Água: etanol (70:30 v/v)	
Água: etanol (80:20 v/v)	
Água: metanol (40:60 v/v)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm)
Água: metanol (50:50 v/v)	
Água: metanol (60:40 v/v)	
Água: metanol (70:30 v/v)	
Água: metanol (80:20 v/v)	
Água: acetonitrila (40:60 v/v)	Symmetry C ₁₈ Waters (250 x 4,6 mm)
Água: acetonitrila (50:50 v/v)	
Água: acetonitrila (60:40 v/v)	
Água: acetonitrila (70:30 v/v)	
Água: acetonitrila (80:20 v/v)	

Análise qualitativa

Para estabelecer as melhores condições de trabalho, o coeficiente de distribuição (log D) foi determinado usando *software* ACD/Labs, sendo que o coeficiente de distribuição consiste na avaliação do coeficiente de partição (log de P) em diferente pHs. Os resultados indicam que o pH em que a solubilidade do fármaco é mais estável corresponde à faixa entre 7 a 9 (Figura 15). Portanto, a fase móvel foi ajustada para pH 8 usando para isso, gotas de trietilamina.

Figura 15- Coeficiente de distribuição de CFZ determinado por *software* ACD/Labs



De acordo com os resultados obtidos, os parâmetros estabelecidos para o método analítico por CLAE estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13- Parâmetros estabelecidos para a determinação de CFZ pó liofilizado para solução injetável, pelo método CLAE

Fase móvel	Água: ACN (60:40 v/v); pH 8 ajustado com TEA
Coluna	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm)
Deteção	270 nm
Vazão	0,5 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Temperatura	25 °C ± 2
Tempo de retenção	3,6 minutos

5.9.3.1 Conformidade do sistema cromatográfico

No desenvolvimento de um método analítico é necessário verificar se os requisitos de pré-validação estão em conformidade, como calibração dos equipamentos, estabilidade das soluções de amostras, padrões, reagentes e das fases móveis, bem como a conformidade do sistema.

A conformidade do sistema cromatográfico é de suma importância para assegurar resultados confiáveis, reproduzíveis e seguros (PASCHOAL, RATH, 2008). O teste de conformidade do

Análise qualitativa

sistema cromatográfico (*system suitability*) estabelecido pelo ICH (2005) é uma etapa essencial para assegurar o bom desempenho do cromatógrafo durante a realização das análises.

A conformidade do sistema cromatográfico foi verificada injetando seis replicatas de soluções de CFZ SQR na concentração de trabalho de 60 µg/mL. Os parâmetros de assimetria do pico, fatores de alargamento, fator de capacidade e número de pratos foram calculados segundo a USP 33, 2010 (Equações 3 a 6). O tempo de retenção, a área do pico e o DPR destes parâmetros também foram avaliados.

A assimetria do pico (T) é a medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido longitudinal. É calculada pela medida da largura do pico na base a 5% da altura do pico (W 0,05) e pela distância entre o máximo do pico e a cauda (f) conforme apresentado na Equação 3 (USP 33, 2010).

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

Equação 3

Em que:

T= Assimetria do pico

W 0,05= Largura do pico na base a 5% da sua altura

f= Distância entre o máximo do pico e a cauda

O fator de alargamento (T) é definido pela soma da distância do ponto frontal até o ponto médio com a distância ponto médio até o ponto posterior, dividido por duas vezes a distância do ponto frontal até o ponto médio, com todas as mensurações feitas em 5% da altura do pico máximo, como apresentado na Equação 4 (USP 33, 2010).

$$T = \frac{a+b}{2 \cdot a}$$

Equação 4

Em que:

T= Fator de alargamento

a= Distância do ponto frontal até o ponto médio em 5% da altura do pico

b= Distância do ponto médio até o ponto posterior em 5% da altura do pico

O fator de capacidade (k') é a medida da posição do pico de interesse relativo ao composto não retido e calcula-se pela Equação 5 (USP 33, 2010).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Equação 5

Em que:

k' = Fator de capacidade

t_R = Tempo de retenção do pico de interesse

t_0 = Tempo do composto não retido (volume morto)

O número de pratos (N) é definido como uma medida da eficiência da coluna cromatográfica e é calculado pela Equação 6 (USP 33, 2010).

$$N = 16 \times \frac{t^2}{W}$$

Equação 6

Em que:

t = Tempo de retenção da substância analisada

W = Largura do pico medido na sua base

Na Tabela 14 encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros de assimetria do pico, fatores de alargamento, número de pratos, tempo de retenção e área do pico cromatográfico apresentado para CFZ em pó liofilizado para solução injetável.

Tabela 14- Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável

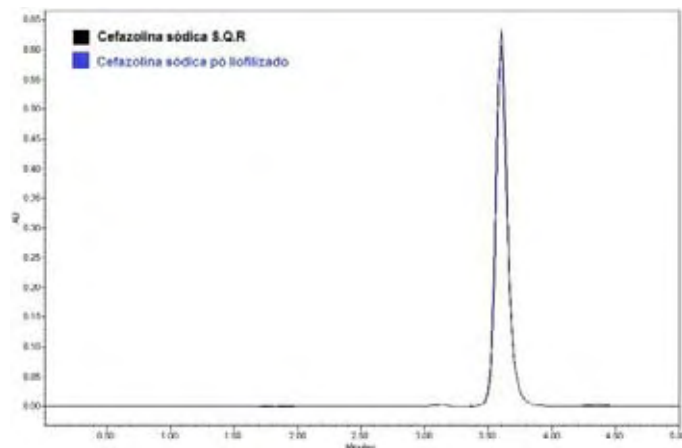
Parâmetros avaliados ^a						
	Assimetria ($\leq 2,0$)	Fator de Alargamento ($\leq 2,0$)	Fator de Capacidade ($> 2,0$)	Pratos (>2000)	Tempo de Retenção (min)	Área
	1,0	0,36	2,27	7803,61	3,603	4063634
	1,0	0,36	2,27	7833,96	3,610	4094335
	1,0	0,36	2,27	7838,30	3,611	4077877
	1,0	0,36	2,27	7868,73	3,618	4097063
	1,0	0,38	2,27	7807,94	3,604	4090641
	1,0	0,36	2,27	7855,68	3,615	4085460
Média	1,0	0,36	1,0	7834,70	3,61	4084835
^b DPR	0,0	1,69	0,0	0,33	0,16	0,30

^aFonte= Food and Drug Administration – FDA (2004); ^bDPR= Desvio padrão relativo.

Análise qualitativa

O cromatograma de CFZ pó liofilizado para solução injetável obtido pelo método proposto demonstrou resolução e simetria do pico satisfatória, além de um tempo de retenção adequado visando curto tempo de análise (3,6 minutos), como ilustrado na Figura 16.

Figura 16- Cromatograma de CFZ SQR – (preto), CFZ pó liofilizado para solução injetável – (azul), ambos na concentração de 60 µg/mL, obtidos com fase móvel: água: acetonitrila (60:40 v/v), pH 8 ajustado com TEA e fase estacionária: Zorbax Eclipse Plus C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm, 5 µm)



5.9.4. Discussão

No método cromatográfico para a identificação de CFZ proposto neste trabalho, buscou-se diminuir os custos operacionais de modo a evitar danos à coluna cromatográfica, diminuir o tempo de análise e a diminuir a produção de resíduos tóxicos. Para isso, diferentes fases móveis foram avaliadas em diferentes colunas cromatográficas. Os três solventes testados (acetonitrila, etanol e metanol) apresentaram condições favoráveis para a validação. O solvente acetonitrila foi escolhido por ser menos viscosa e com isso obter maiores números de pratos, assim a fase móvel sugerida foi água: acetonitrila (60:40 v/v), pH 8 ajustado com TEA.

O método por cromatografia líquida de alta eficiência apresentou resultados satisfatórios quanto aos testes de conformidade. Tais testes são essenciais para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estejam aptos para identificar e quantificar o fármaco em análise. Os dados obtidos na verificação da conformidade do sistema cromatográfico (Tabela 14) indicam que o sistema desenvolvido é seguro e confiável, estando de acordo com o preconizado pelo FDA, 2004, em que os parâmetros sugeridos são: Assimetria do pico e o fator de alargamento ≤ 2 ; fator de capacidade > 2 ; Número de pratos > 2000 ; todos com DPR inferior a 2%.

Análise qualitativa

O tempo de retenção de 3,6 minutos é considerado satisfatório, pois para se adequar a rotina das indústrias farmacêuticas, os métodos desenvolvidos precisam apresentar um curto tempo de análise, devido à demanda operacional produtiva. Com isso, a velocidade da análise tem se tornado cada dia mais importante para o controle de qualidade. Este trabalho propôs o desenvolvimento de um método capaz de separar a CFZ em um curto tempo de análise. O método apresenta uma fase móvel simples, não necessitando de preparo de solução tampão como constituinte, conseguindo com isso maior aproveitamento da vida útil da coluna cromatográfica de forma a minimizar custos. Com a diminuição no tempo de análise, conseqüentemente se tem a diminuição do consumo de solventes orgânicos, tendo sempre uma preocupação com o meio ambiente, de forma a gerar menos resíduos. Deste modo, o método proposto pode ser empregado para análise de CFZ na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável.

ANÁLISE QUANTITATIVA

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

A análise espectrofotométrica quantitativa na região ultravioleta tem como princípio a relação direta existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância. É calculada matematicamente pela Lei de Lambert-Beer, em que a absorção de radiação, em determinado comprimento de onda, é mensurada quando atravessa uma amostra, pois há uma relação exponencial entre a transmissão de luz, a espessura da camada do meio absorvente e a concentração da solução. A absorvância dada pelos espectros eletromagnéticos é obtida através da equação de Lambert-Beer (Equação 7) (ROCHA; TEIXEIRA, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

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

Equação 7

Em que:

A - absorvância

I₀ - intensidade da radiação monocromática que incide na amostra

I - intensidade da radiação que emerge da amostra

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

c - concentração da espécie absorvente (mol/L)

b - distância percorrida pelo feixe através da amostra (cm).

A espectrofotometria na região do ultravioleta ocorre pela absorção de energia que, ao ser quantizada, conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado e, portanto, depende da estrutura eletrônica da molécula, solvente, temperatura e comprimento de onda da radiação (SILVERSTEIN et al., 2007).

Esta técnica é amplamente utilizada em análise quantitativa, devido à sua simplicidade, facilidade de execução, reprodutibilidade, sensibilidade e exatidão, aliadas ao custo reduzido, ao menor tempo de análise e ampla aplicabilidade no controle de qualidade de rotina. Neste sentido, o desenvolvimento e validação de métodos utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta

Análise quantitativa

para análise e quantificação de CFZ na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável é de alta relevância.

6.1.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV mini-1240, empregando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e como solvente água purificada (Milli-Q[®]).

6.1.1.1 Preparo da solução de CFZ SQR

Uma quantidade equivalente a 20,00 mg de CFZ SQR previamente dessecada por 1 h a 105 °C foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com água purificada, obtendo-se a solução-mãe na concentração de 200 µg/mL.

6.1.1.2 Preparo das soluções de CFZ na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável.

A massa de 20 mg de CFZ pó liofilizado para solução injetável foi devidamente pesada a partir de um *pool* de amostras de 20 frascos-ampola, previamente dessecada por 1 h a 105 °C. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água purificada, para a obtenção da solução-mãe de 200 µg/mL.

6.1.2 Método

Alíquotas de 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mL da solução-mãe de CFZ SQR com concentração de 200 µg/mL preparada no item 6.1.1.1 foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada. O mesmo procedimento foi realizado para CFZ pó liofilizado para solução injetável, preparada no item 6.1.1.2. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda máximo de 270 nm. A SQR e a amostra utilizadas foram descritas no item 4.1. e 4.2. Para zerar o equipamento utilizou-se como branco a água purificada.

6.1.3 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi obtida com o objetivo de estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região UV apresentava linearidade. A partir da solução-mãe, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL cujos volumes foram completados

Análise quantitativa

com água purificada, obtendo concentrações crescentes de 2 a 176 µg/mL de CFZ, como apresentado na Tabela 15. As leituras foram feitas em comprimento de onda de 270 nm.

Tabela 15- Obtenção da curva de Ringbom de CFZ por espectrofotometria no UV

Pontos	Vol. da Solução de CFZ (200 µg/mL) (mL)	Concentração teórica (µg/mL) ^a
1	0,1	2,0
2	0,2	4,0
3	0,3	6,0
4	0,4	8,0
5	0,5	10,0
6	0,6	12,0
7	0,7	14,0
8	0,8	16,0
9	0,9	18,0
10	1,0	20,0
11	1,2	24,0
12	1,4	28,0
13	1,6	32,0
14	1,9	38,0
15	2,2	44,0
16	2,5	50,0
17	2,9	58,0
18	3,3	66,0
19	3,8	76,0
20	4,3	86,0
21	4,8	96,0
22	5,3	106,0
23	6,3	126,0
24	7,3	146,0
25	8,8	176,0

^aBalão volumétrico de 10 mL

6.1.4. Obtenção da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica de CFZ, transferiram-se alíquotas de 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mL da solução descrita no item 6.1.1.2 para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentrações finais de 8, 12, 16, 20, 24 e 28 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 270 nm, utilizando água purificada como branco.

6.1.5. Determinação do teor de CFZ pó liofilizado para solução injetável

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 270 nm. O doseamento de CFZ foi realizado em triplicata nas concentrações de 20 µg/mL e o seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 8 e 9.

$$C_A = A_A \times \frac{C_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Equação 8

Em que:

C_A = concentração da amostra (µg/mL)

A_A = absorvância da amostra

C_{SQR} = concentração da substância química de referência

A_{SQR} = absorvância da substância química de referência

O valor percentual de CFZ nas amostras foi calculado pela Equação 9.

$$C_A \% = \frac{(C_A \times 100)}{C_T}$$

Equação 9

Em que:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de CFZ encontrada na amostra (µg/mL)

C_T = Concentração teórica de CFZ na amostra (µg/mL)

6.1.6. Validação**6.1.6.1 Linearidade**

A linearidade do método foi obtida através da análise de três curvas analíticas em três dias diferentes. Cada curva foi construída conforme descrito no item 6.1.4. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por análise de variância (ANOVA).

6.1.6.2 Precisão

A precisão do método foi realizada por ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, que foram avaliadas pelo cálculo de DPR das amostras e pelo teste *t* de Student e ANOVA.

Análise quantitativa

6.1.6.2.1 Repetibilidade

Sete soluções de CFZ SQR na concentração 20 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais e foi avaliado pelo DPR.

6.1.6.2.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária através de análises de soluções de CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável, na concentração de 20 µg/mL, executadas por diferentes analistas e em diferentes dias. As análises foram realizadas em sete replicatas.

6.1.6.2.2.1 Interdias

Sete soluções de CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável na concentração de 20 µg/mL foram preparadas e analisadas por três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais e os resultados foram avaliados pelo DPR e análise de variância (ANOVA).

6.1.6.2.2.2 Entre-analistas

Sete soluções de CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável na concentração 20 µg/mL foram preparadas e analisadas, por dois diferentes analistas, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados foram avaliados pelo DPR dos teores e por teste *t* de Student.

6.1.6.3 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de adição, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra e calculada matematicamente por recuperação. As amostras foram preparadas em triplicata, de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	CFZ amostra (200 µg/mL) (mL)	CFZ SQR (200 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^a
Amostra	0,6	-	12,0
R1	0,6	0,2	16,0
R2	0,6	0,4	20,0
R3	0,6	0,6	24,0
SQR	-	0,6	12,0

^aBalão volumétrico de 10 mL

A percentagem de CFZ recuperada foi calculada pela Equação 10.

$$\%R = \left[\frac{(C_R - C_A)}{C_P} \right] \times 100$$

Equação 10

Em que:

C_R = concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

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

C_P = concentração teórica adicionada da solução da SQR ($\mu\text{g/mL}$)

6.1.6.4 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. O cálculo foi realizado segundo a Equação 11.

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

Equação 11

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.6.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. O cálculo foi realizado segundo a Equação 12.

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

Equação 12

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.6.6 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos teores obtidos variando-se o comprimento de onda, avaliado pelo DPR e teste t de Student.

Análise quantitativa

6.1.7 Resultados

As características do espectro de absorção da solução de CFZ utilizando água purificada como solvente encontra-se na Figura 12 e foi discutida na seção 5.8.4.

6.1.7.1 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta. Para isso, as medidas de absorvância das amostras testadas foram convertidas em transmitância. Estes dados foram plotados em um gráfico de transmitância *versus* o log da concentração CFZ em $\mu\text{g/mL}$ como demonstrado na Tabela 17 e apresentada graficamente na Figura 17.

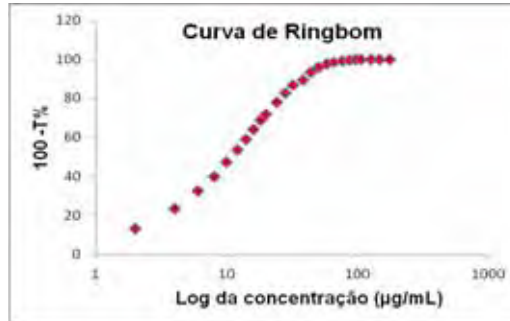
Tabela 17- Construção da curva de Ringbom por espectrofotometria na região do UV para CFZ SQR, no comprimento de onda de 270 nm

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Média Absorvâncias	10 abs.	%T (100/10 abs.)	100 - % T ^a
2	0,0622	1,1539	86,6658	13,3342
4	0,1185	1,3138	76,4892	23,5108
6	0,1746	1,4949	67,3804	32,6196
8	0,2253	1,6799	60,0851	39,9149
10	0,2815	1,9122	52,9095	47,0905
12	0,3382	2,1786	46,5479	53,4521
14	0,3934	2,4739	41,0866	58,9134
16	0,4499	2,8177	36,1576	63,8424
18	0,5019	3,1764	31,4822	68,5178
20	0,5546	3,5861	28,5343	71,4657
24	0,6515	4,4826	22,3086	77,6914
28	0,7617	5,7771	17,3097	82,6903
32	0,8702	7,4170	13,4825	86,5175
38	0,9743	9,4248	10,6104	89,3896
44	1,1685	14,7389	6,7848	93,2152
50	1,3655	23,2013	4,3101	95,6899
58	1,6082	40,5741	2,4646	97,5354
66	1,8062	63,9997	1,6840	98,3160
76	2,0621	115,3767	0,8667	99,1333
86	2,3687	233,7057	0,4720	99,5280
96	2,6049	402,6446	0,2484	99,7516
106	2,8289	674,2993	0,1483	99,8517
126	3,2733	1876,3755	0,0533	99,9467
146	3,5590	3622,1072	0,0276	99,9724
176	3,9850	9661,1884	0,0104	99,9896

^aBalão volumétrico de 10 mL

Análise quantitativa

Figura 17- Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para CFZ SQR no comprimento de onda de 270 nm



6.1.7.2 Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de CFZ SQR em água purificada, usadas para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18- Valores de absorvância determinados para a curva analítica de CFZ SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 270 nm

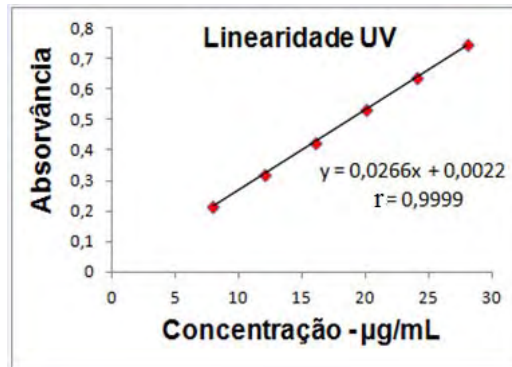
Concentração (µg/mL)	Absorvância ^a	Absorvância média ± DP ^b	DPR ^c (%)
8	0,2177	0,2149 ± 0,0044	2,02
	0,2098		
	0,2172		
12	0,3242	0,3199 ± 0,0075	2,29
	0,3113		
	0,3243		
16	0,4318	0,4278 ± 0,0049	1,13
	0,4224		
	0,4292		
20	0,5422	0,5362 ± 0,0088	1,62
	0,5261		
	0,5403		
24	0,6327	0,6381 ± 0,0121	1,91
	0,6520		
	0,6297		
28	0,7439	0,7464 ± 0,0098	1,33
	0,7572		
	0,7381		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP= Desvio padrão/ ^cDPR= Desvio padrão relativo

Análise quantitativa

A curva analítica de CFZ SQR (Figura 18) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

Figura 18- Curva analítica de CFZ SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, a 270 nm



A curva analítica de CFZ foi calculada por análise de variância (ANOVA) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de CFZ SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,59322	0,11864	1702,03*	3,11
Regressão linear	1	0,59319	0,59319	8509,72*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,11	3,26
Resíduo	12	0,0008365	0,000069708		
Total	17	0,59406			

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

6.1.7.4 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se o resultado com base no DPR. Sete soluções de CFZ SQR preparadas na concentração de 20 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 0,32%.

Análise quantitativa

A precisão intermediária foi avaliada através da precisão interdias e entre-analistas. Os valores de teor de CFZ em pó liofilizado para solução injetável, determinados durante a avaliação da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 20. As precisões interdias e entre-analistas apresentaram DPR de 0,75 e 1,02%, respectivamente.

Tabela 20- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico na região do UV para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável

Precisão interdias		Precisão entre-analistas	
Dia	Teor ^a (%)	Analista	Teor ^a (%)
1	99,91	A	99,07
2	98,95		
3	98,45	B	100,50
Teor médio (%)	99,10		99,78
DPR^b (%)	0,75		1,02

^a média de sete determinações; ^b DPR= Desvio padrão relativo

A precisão interdia foi avaliada por análise de variância, enquanto a precisão entre-analistas foi avaliada por Teste *t* de Student, conforme apresentado nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21- Análise da precisão interdias do método espectrofotométrico na região do UV para determinação de CFZ, por análise de variância (ANOVA)

Fonte da variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F calculado ^a	F tabelado
Entre grupos	1,53038E-05	2	7,6519E-06	2,82	3,55
Dentro dos grupos	4,85086E-05	18	2,69492E-06		
Total	6,38124E-05	20			

^aSignificativo para $p < 0,05\%$

Tabela 22- Análise da precisão entre-analistas do método espectrofotométrico na região do UV para análise de CFZ SQR por teste *t* de Student

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes ^a						
Fonte da variação	Média	Graus de liberdade	Variância	T calculado	valor-P	T tabelado
Analista 1	0,5346	6	1,66191E-05	2,03	0,06	2,17
Analista 2	0,5277	6	6,33239E-05			

^aSignificativo para $p < 0,05\%$

Análise quantitativa

6.1.7.5 Exatidão

Na Tabela 23 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico, utilizando água purificada como solvente, a 270 nm.

Tabela 23- Determinação da exatidão do método analítico para análise CFZ por espectrofotometria na região do UV

	CFZ SQR adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	CFZ SQR encontrado ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^a (%)
R1	4	3,99	99,82		
R2	8	8,14	101,74	100,56	1,03
R3	12	12,01	100,11		

^aDPR= Desvio padrão relativo

6.1.7.7 Limite de detecção e Limite de quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados para LD e LQ foram 0,22 $\mu\text{g/mL}$ e 0,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.1.7.8. Robustez

Alterações no comprimento de onda de absorção foram realizadas para avaliação da robustez do método. Na execução de análises do pó liofilizado para solução injetável, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os desvios padrão relativo foram inferiores a 0,93%, comprovando a robustez do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme demonstra a Tabela 24.

Tabela 24- Avaliação da robustez do método analítico para análise de CFZ por espectrofotometria na região do UV

Comprimento de onda (nm)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
268	101,10	
270	101,88	0,93
272	100,00	

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

6.1.8 Discussão

O método foi desenvolvido e validado utilizando água purificada como solvente, baseando-se na intensidade de absorção dos cromóforos presentes no fármaco com este solvente. Apresenta como vantagens ser um método rápido, prático e reproduzível, de simplicidade no preparo das amostras, baixo custo e fácil descarte, não agredindo o meio ambiente e sendo seguro ao operador.

A análise da curva de Ringbom permitiu verificar a faixa em que as concentrações apresentam linearidade, as concentrações selecionadas para o desenvolvimento do método foi de 8 a 28 µg/mL. Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de CFZ SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, no intervalo utilizado. O gráfico da concentração *versus* absorvância foi plotado e demonstrou haver linearidade adequada na faixa de 8 a 28 µg/mL. A equação da reta para o método foi: $y = 0,0266x + 0,0022$, com coeficiente de correlação de 0,9999.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados nas curvas analíticas produzidas em diferentes dias. Os valores encontrados para limites de detecção e quantificação foram 0,22 µg/mL e 0,67 µg/mL, respectivamente, o que demonstra que a faixa utilizada encontra-se acima dos limites e, portanto, com valores adequados de concentração.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). O valor experimental obtido na análise intradia apresentou DPR de 0,32% para análise de sete replicatas de CFZ SQR realizada no mesmo dia e sob as mesmas condições. Já na precisão interdia, as análises foram realizadas em dias diferentes obtendo-se teor médio de 99,10% e DPR de 0,75%. Ferramentas estatísticas (ANOVA) foram utilizadas para confirmar que a um nível de significância de 5% as absorvâncias das amostras entre os dias analisados não diferiram estatisticamente, obtendo-se um F calculado de 2,82 que, portanto é menor que o F tabelado observado (3,55). A precisão entre-analistas apresentou um DPR de 1,02% e foi avaliada por teste *t* de Student que corroborou a eficácia do método, pois o valor encontrado para o T calculado de 2,03 foi menor que o valor de T tabelado (2,17), mostrando que a um nível de significância de 5% as médias não diferem estatisticamente, portanto os resultados obtidos demonstram que o método é preciso.

A exatidão foi avaliada pelo método da adição e calculada matematicamente por recuperação. Os resultados obtidos encontram-se na faixa de 99,82 – 101,74%, estando estes valores próximos a 100%.

Análise quantitativa

O parâmetro escolhido para a avaliação da robustez do método foi o comprimento de onda. Os resultados obtidos, variando-se o comprimento de onda em duas unidades acima e duas unidades abaixo, não demonstraram diferença significativa na quantificação da amostra. O teste foi avaliado por ANOVA, apresentando F calculado de 0,14 que por ser menor que o F tabelado (3,55), pode-se dizer que a um nível de significância de 5% as médias não diferem estatisticamente demonstrando assim ser robusto para o parâmetro analisado.

O método espectrofotométrico proposto cumpriu todos os requisitos exigidos pelos órgãos oficiais (ICH, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 33, 2010), mostrando-se adequado, apresentando simplicidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, podendo ser empregado para doseamento de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.

6.2. ENSAIO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

O método turbidimétrico é um método usado para avaliação de potência de antimicrobianos de forma simples e rápida, quando comparado com os tradicionais ensaios microbiológicos por difusão em ágar. Baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez da suspensão de micro-organismos sensíveis ao agente antimicrobiano, ambos contidos em meio de cultura líquido. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa. Neste contexto, foi desenvolvido e validado método microbiológico turbidimétrico para avaliação de potência de CFZ pó liofilizado para solução injetável.

6.2.1 Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Diversos testes preliminares foram realizados para padronização das condições a serem utilizadas no método. Variaram-se parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 25).

*Análise quantitativa***Tabela 25-** Parâmetros estudados para a avaliação de potência de CFZ em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10535 IAL 2393 <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 IAL 636 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 26923 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 1851 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
Meios de cultura	caldo <i>Brain Heart Infusion</i> - BHI caldo Caseína-soja caldo <i>Müller Hinton</i>
Tempo de incubação	3 e 4 horas
Temperatura de incubação	35 °C
Concentração do inóculo	1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0%
Solução diluente	água purificada tampão fosfato pH 6,0 tampão fosfato pH 8,0
Concentrações das soluções de amostra	2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 µg/mL (Razão= 2) 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 µg/mL (Razão= 2) 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0 µg/mL (Razão= 2) 6,0; 9,0 e 16,2 µg/mL (Razão= 1,8) 5,0; 9,0; 16,2 µg/mL (Razão= 1,8) 6,0; 9,6; 15,36 µg/mL (Razão= 1,6) 5,0; 8,0; 12,8 µg/mL (Razão= 1,6) 6,0; 9,0; 13,5 µg/mL (Razão= 1,5) 5,0; 7,5; 11,25 µg/mL (Razão= 1,5) 4,0; 6,0; 9,0 µg/mL (Razão= 1,5) 6,0; 8,4; 11,76 µg/mL (Razão= 1,4) 5,0; 7,0; 9,8 µg/mL (Razão= 1,4) 6,0; 8,4; 11,76 µg/mL (Razão= 1,4)

6.2.2 Execução do ensaio

A partir dos resultados obtidos com as diferentes condições do método, estabeleceram-se os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico (Tabela 26).

Análise quantitativa

Tabela 26- Parâmetros padronizados para avaliação de CFZ em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 26923
Meio de cultura	caldo <i>Brain Heart Infusion</i> - BHI
Tempo de incubação	4 horas
Temperatura de incubação	35 °C
Concentração do inóculo	4%
Solução diluente	água purificada
Concentrações das soluções de amostra	6,0; 8,4; 11,76 µg/mL (R 1,4)

6.2.3 Material

No doseamento microbiológico foi utilizado o meio de cultura ágar caseína-soja para repique de manutenção da cepa do micro-organismo e caldo *Brain Heart Infusion* - BHI para a realização do ensaio, ambos da marca Acumedia Manufacturers (EUA). Para a realização deste método, a água purificada, as ponteiras e os tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, contendo o meio de cultura e devidamente fechados com tampão de algodão envolvido em gaze, foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Luferco, SP, Brasil) por 15 minutos a 121 °C. Para a incubação, utilizaram-se incubador Shaker modelo MA420 (Marconi, SP, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás, SP, Brasil). Formaldeído grau analítico (Qhemis) foi usado para interromper o crescimento dos micro-organismos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro modelo DU 530 (Beckman Coulter, CA, EUA). Também foram usados micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, PR, Brasil); balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo, Suíça) e balança semi-analítica modelo B160 (Micronal, SP, Brasil).

6.2.3.1 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura foi preparado conforme indicado em seu respectivo rótulo, sendo dissolvido em água purificada sob aquecimento. Dez mililitros foram distribuídos em todos os tubos de ensaio e foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos.

6.2.3.2 Preparo do inóculo

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 foi repicado em caldo BHI e incubado de 18 a 24 horas, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C. Posteriormente o inóculo foi padronizado com transmitância de 25,0 ± 2,0% em espectrofotômetro a 580 nm, como preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010).

Análise quantitativa

6.2.3.3 Preparo das soluções de CFZ SQR

Foram transferidos o equivalente a 20,00 mg de CFZ SQR para balão volumétrico de 100 mL, obtendo solução de 200 µg/mL. Desta solução, alíquotas de 0,300; 0,420 e 0,588 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para a obtenção das concentrações de 6,00; 8,40 e 11,76 µg/mL, sendo representadas como P1, P2 e P3 respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em água purificada.

6.2.3.4 Preparo das soluções de CFZ na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável

A massa de 20 mg de CFZ pó liofilizado para solução injetável foi devidamente pesada a partir de um *pool* de amostras de 20 frascos-ampola, previamente dessecada por 1 h a 105 °C. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água purificada, obtendo a solução-mãe de 200 µg/mL. Desta solução, alíquotas de 0,300; 0,420 e 0,588 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para a obtenção das concentrações de 6,00; 8,40 e 11,76 µg/mL, sendo representadas como A1, A2 e A3 respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em água purificada.

6.2.4 Ensaio

Após autoclavação dos tubos contendo caldo BHI e preparo das soluções com diferentes concentrações da amostra, adicionaram-se em cada tubo, 200 µL de solução da amostra e 400 µL do inóculo padronizado em 580 nm com transmitância de $25 \pm 2\%$. Os tubos de ensaio foram acondicionados em banho de aquecimento com agitador orbital, com 32 rotações por minuto à temperatura de $35,0 \text{ °C} \pm 2,0 \text{ °C}$, por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se o crescimento microbiano com adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% em todos os tubos. Determinou-se a turbidez de cada tubo pela absorvância dada em espectrofotômetro a 530 nm. O equipamento foi zerado com o controle negativo (tubo contendo 10,0 mL de caldo e 500 µL de formaldeído 12%).

6.2.5 Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida conforme o ensaio descrito no item 6.2.4., utilizando-se o delineamento 3x3, conforme o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração *versus* a média das absorvâncias de cada uma das

concentrações da SQR. Foram realizadas três curvas, sendo uma curva em cada dia, durante três dias consecutivos.

6.2.6 Determinação da potência de CFZ em pó liofilizado para solução injetável

A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (2004) (Equação 13). A equação utiliza as médias das leituras de absorvância dos tubos obtidas com as três doses de CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável, realizados em triplicata e analisados em cada ensaio.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

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

Em que:

$$F = 1/3 [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) - (\bar{P}1 + \bar{P}2 + \bar{P}3)]$$

I = logaritmo da razão das doses

$$E = 1/4 [(\bar{A}3 + \bar{P}3) - (\bar{A}1 + \bar{P}1)]$$

6.2.7 Validação do método

6.2.7.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada por uma curva analítica construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, conforme descrito no item 6.2.5. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.2.7.2 Precisão

Para avaliação da precisão foram realizadas análises de precisão por repetibilidade (intradia) e quanto à precisão intermediária (interdia e entre-analista).

6.2.7.2.1. Repetitividade

A precisão foi avaliada quanto à repetitividade (intradia). Nesta análise, sete soluções de CFZ SQR na concentração mediana da curva analítica (8,40 µg/mL), foram preparadas e analisadas, no

Análise quantitativa

mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. Os resultados foram avaliados pelo DPR entre as absorvâncias resultantes.

6.2.7.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pelo DPR das potências obtidas em três curvas analíticas realizadas em diferentes dias (interdia) e por dois diferentes analistas (entre-analista).

6.2.7.3 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições estabelecidas, tais como: comprimento de onda de leitura dos tubos (525, 530, 535 nm), volume de meio de cultura nos tubos de ensaio (9,8; 10 e 10,2 mL) e marca do meio de cultura utilizado (BHI Acumedia e BHI Imedia). Realizou-se a análise de potência das amostras de CFZ em condições normais e alteradas paralelamente, avaliando a interferência das modificações no resultado final.

6.2.7.4 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de adição e calculada pela quantidade recuperada como demonstrado na Equação 10. Neste ensaio, preparou-se uma solução de CFZ SQR, conforme item 6.2.3.3, com concentração de 200 µg/mL. Desta solução, alíquotas de 0,300; 0,420 e 0,588 mL foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se as soluções de 6,00; 8,40 e 11,76 µg/mL, correspondentes a P1, P2 e P3, respectivamente. Para o preparo das soluções para avaliação das recuperações, volumes de 0,092 mL (R1), 0,190 mL (R2) e 0,288 mL (R3) da solução SQR (200 µg/mL) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 0,30 mL da solução de CFZ pó liofilizado para solução injetável preparado na mesma concentração que a SQR e completadas com água purificada. Desta forma, as seguintes concentrações foram obtidas: R1: 7,84 µg/mL, representando amostra de 80% de potência, R2: 9,80 µg/mL, representando amostra de 100% de potência e R3: 11,76 µg/mL, representando amostra de 120% de potência, conforme apresentado na Tabela 27.

Tabela 27- Exatidão realizada por teste de adição pelo método turbidimétrico

	AMOSTRA (mL)	AMOSTRA (µg/mL)	PADRÃO ADICIONADO (mL)	PADRÃO ADICIONADO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)
A	0,30	6,00	—	—	6,00
R1	0,30	6,00	0,092	1,84	7,84
R2	0,30	6,00	0,190	3,80	9,80
R3	0,30	6,00	0,288	5,76	11,76

6.2.8 Resultados

Para o desenvolvimento do método turbidimétrico para quantificação de cefazolina em pó liofilizado para solução injetável, diferentes doses de cefazolina sódica e diferentes micro-organismos foram testados a fim de se encontrar a faixa linear para o método. Após os testes preliminares, realizados com vários micro-organismos, verificou-se que o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150 não apresentou bom crescimento, indicando controles positivos baixos e próximos à menor concentração de antimicrobiano testada. O micro-organismo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 IAL 636 não apresentou resultados uniformes e reprodutíveis. Houve grande variação nas absorvâncias encontradas para o mesmo teste realizado em dias diferentes e observaram-se grumos de crescimento microbiano nos diversos caldos inoculados, o que interferiu nas análises. Com *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 foram usadas concentrações de até 40 µg/mL de fármaco, mas não se observou atividade do antimicrobiano utilizando apenas 1% de inóculo padronizado. A *Escherichia coli* ATCC 10535 IAL 2393 também foi testada, embora se saiba que o antimicrobiano em estudo possui modesta atividade frente a micro-organismos Gram-negativos, o que foi comprovado pelos ensaios microbiológicos. Optou-se, então, por trabalhar com o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, por apresentar ótimos resultados em diferentes concentrações testadas em que o método mostrou-se reprodutível. Ainda assim, todas as diferentes cepas deste micro-organismo disponíveis no laboratório foram testadas a fim de se aperfeiçoar ainda mais os resultados encontrados.

A escolha do micro-organismo *Staphylococcus aureus* baseou-se na sua sensibilidade frente à CFZ e pela sua facilidade de crescimento. As concentrações escolhidas que apresentaram melhor linearidade foram 6,00; 8,40 e 11,76 µg/mL, as quais permitiram doseamentos de amostras com potência em torno de 100% com adequado paralelismo em relação à reta do padrão.

Análise quantitativa

6.2.8.1 Linearidade

Os valores de absorvância obtidos para as soluções em diferentes concentrações de CFZ SQR e em pó liofilizado para solução injetável durante avaliação da linearidade do método encontram-se na Tabela 28.

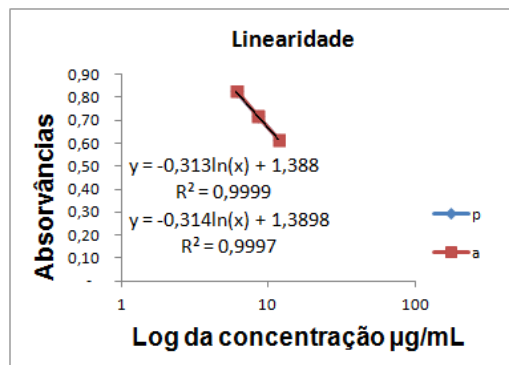
Tabela 28- Absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade do ensaio microbiológico para avaliação de cefazolina em pó liofilizado para solução injetável por método turbidimétrico

Absorvâncias ^a						
µg/mL	P1	P2	P3	A1	A2	A3
	0,844	0,718	0,604	0,804	0,719	0,604
	0,838	0,739	0,638	0,836	0,735	0,642
	0,802	0,703	0,610	0,809	0,703	0,606
Média^a	0,828	0,720	0,617	0,839	0,719	0,617
DPR^b	2,72	2,51	2,97	2,01	2,23	3,45

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

As curvas analíticas de cefazolina SQR e amostra (Figura 19) foram construídas com as médias dos valores das absorvância de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, foram: $y = -0,313\ln(x) + 1,388$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999 para a CFZ SQR e $y = -0,314\ln(x) + 1,3898$, com r de 0,9997 para o fármaco em pó liofilizado para solução injetável.

Figura 19- Curvas analíticas de soluções de cefazolina SQR e pó liofilizado para solução injetável, em concentrações de 6,0; 8,4 e 11,76 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico turbidimétrico



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de CFZ é mostrada na Tabela 29.

Análise quantitativa

29- Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de CFZ, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Preparação	1	0,0000003	0,0000003	0,00258	4,96
Regressão	1	0,1335630	0,1335630	1141,43*	4,96
Desvio de Paralelismo	1	0,0000003	0,0000003	0,002848	4,96
Quadrático	1	0,0000387	0,0000387	0,330868	4,96
Diferença de Quadrático	1	0,0000032	0,0000032	0,027009	4,96
Entre doses	5	0,1336055	0,0267211	228,358*	3,33
Entre tubos	2	0,0031476	0,0015738	13,44990*	4,10
Dentro (erro)	10	0,0011701	0,0001170		
Total	17	0,1379233			

*Significativo para $p < 0,05$

6.2.8.2 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). A precisão por repetibilidade foi avaliada pelo DPR de sete tubos com a dose mediana de CFZ SQR. Os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 1,57%.

Para a determinação da precisão intermediária, três curvas analíticas foram construídas em diferentes dias. Os ensaios foram comparados entre si e resultaram em uma potência média de 100,07%, com DPR de 0,36%. Os ensaios experimentais também foram realizados por diferentes analistas e apresentaram potência média de 100,45% e DPR de 0,28, como apresentado na Tabela 30.

Tabela 30- Precisão intermediária do método turbidimétrico para cefazolina em pó liofilizado para solução injetável

Precisão intermediária				
	Precisão interdias		Precisão entre-analistas	
	1º dia	100,25	Analista 1	100,25
	2º dia	100,30		
	3º dia	99,66	Analista 2	100,65
média		100,07		100,45
DPR^a		0,36		0,28

^aDPR= Desvio padrão relativo

Análise quantitativa

6.2.8.3 Robustez

A robustez foi avaliada mediante a realização de alterações do comprimento de onda de leitura dos tubos, volume de caldo nos tubos e marca do meio de cultura utilizado. As alterações realizadas não provocaram mudanças nos resultados de potência das amostras de pó liofilizado para solução injetável doseada pelo método. Os DRPs entre os teores foram inferiores a 1%, comprovando a robustez do método proposto para os parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 31.

Tabela 31- Avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de CFZ em pó liofilizado para solução injetável

Variável	Parâmetro alterado	Cefazolina ^a (%)	Média (%)	DPR ^b (%)
Comprimento de onda (nm)	525	100,57	100,66	0,60
	530	100,10		
	535	101,30		
Volume de meio de cultura (mL)	9,5	100,13	99,48	0,59
	10,0	99,32		
	10,5	98,99		
Marca do meio de cultura	Acumedia	100,37	100,47	0,15
	Imedia	100,58		

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

6.2.8.4 Exatidão

Determinou-se a exatidão do método através do teste de adição que foi calculado por recuperação. Utilizando a Equação 10, obteve-se valor médio de exatidão de 99,92%. Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 32.

Tabela 32- Teste de adição pelo método turbidimétrico

	CFZ SQR adicionado (µg/mL)	CFZ SQR encontrado ^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
R1	1,84	1,84	100,04	99,92	0,53
R2	3,8	3,75	98,76		
R3	5,76	5,73	99,52		

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

6.2.9 Discussão

O ensaio turbidimétrico é um método simples e principalmente rápido, quando comparado aos tradicionais ensaios por difusão em ágar. O método por difusão em ágar tem, dentre as suas limitações, a dificuldade de difusibilidade de alguns fármacos no meio de cultura sólido e ainda, a reatividade entre o meio de cultura e o fármaco em determinados casos (SILVA, 2012a). No ensaio por difusão em ágar é imprescindível que se tenha um crescimento microbiológico homogêneo, para formação de halos de inibição regulares e bem delimitados, com diâmetro adequado para validação. Tais fatores interferentes são diminuídos no método turbidimétrico, dado que o ensaio é realizado em caldo como meio de cultura.

Embora os ensaios físico-químicos sejam ainda mais rápidos e práticos, os ensaios microbiológicos se fazem necessários uma vez que os ensaios físico-químicos muitas vezes não são capazes de sozinho assegurar a eficácia da atividade antimicrobiana, podendo gerar conclusões falsas sobre qualidade do medicamento. Neste contexto, o ensaio turbidimétrico é muito importante para avaliar a potência de antimicrobianos, sendo um adequado método a ser aplicado na rotina laboratorial, onde a disponibilidade de tempo e equipamentos são limitados.

As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 foram escolhidas para a validação do método, pois embora apresentem uma estreita faixa de trabalho, o micro-organismo foi sensível ao fármaco em estudo e proporcionou resultados precisos e reprodutíveis. Cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram anteriormente indicadas para análise de CFZ na Farmacopeia Brasileira, 2010, que embora não apresente monografia para CFZ em seu compêndio, traz o ensaio microbiológico por difusão em ágar para análise de CFZ no capítulo de ensaios microbiológicos de antibióticos.

Na validação do método microbiológico turbidimétrico, a linearidade do método foi comprovada pelos coeficientes de correlação de 0,9999 e 0,9997 para cefazolina SQR e pó liofilizado para solução injetável, respectivamente. Além disso, a análise de variância demonstrou significativa regressão e ausência de desvios da linearidade e paralelismo nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes angulares das retas obtidas com padrão e pó liofilizado para solução injetável para solução injetável não diferiu estatisticamente, demonstrando sua eficiência. Os resultados obtidos para precisão intermediária apresentaram potência de 100,45% para análises entre-analistas com DRP de 0,28% e 100,07 para análise interdia com DRP de 0,36%. Já na precisão por repetitividade (intadia) a absorvância média de 7 replicatas foi de 0,758 com DRP de 1,57%. Com isso, os resultados apresentados apontam que

Análise quantitativa

o método é preciso. No estudo da exatidão, determinada pelo método de adição, obteve-se resultado médio de 99,92%, o qual comprovou a capacidade do método de determinar a potência de modo exato. As pequenas alterações efetuadas nos parâmetros do método durante a avaliação da robustez, como variação do comprimento de onda, volume de meio de cultura e a marca do meio de cultura, não causaram efeitos significativos. A robustez também foi avaliada quanto ao tempo de incubação no *shaker*, no entanto o método não foi robusto, portanto este é um parâmetro importante e que deve ser observado para obtenção de resultados precisos.

Todos os parâmetros avaliados na validação do método foram satisfatórios, bem como os resultados de regressão e paralelismo. As análises estatísticas não apresentaram diferenças significativas entre o F calculado e o F tabelado. Este trabalho vem propor um método simples e de viável execução, para a avaliação de potência de CFZ em pó liofilizado para solução injetável, que mostrou ser seguro e está de acordo com o estabelecido em guias nacionais e internacionais.

6.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida é um processo de separação em que os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases na coluna cromatográfica, as quais denominadas como fase móvel (composta por solventes de diferentes polaridades) e fase estacionária sólida (MEYER, 2010).

Os estudos para desenvolvimento do método analítico por CLAE foram embasados em trabalhos disponíveis na literatura (MARONA et al., 1999; MARONA, SCHAPOVAL, 2001; SALGADO et al., 2005; TOZO, SALGADO, 2006; LOPES, SALGADO, 2008; MORENO, SALGADO, 2008; LOPES, SALGADO, 2009; SALGADO et al., 2009; CAZEDEY et al., 2009; BONFILIO et al., 2009; CAZEDEY et al., 2011; VIEIRA, SALGADO, 2011; MORENO, SALGADO, 2012b; CORRÊA et al., 2012; SILVA, SALGADO, 2012c). Diferentes sistemas cromatográficos foram testados com objetivo de encontrar condições favoráveis, como anteriormente apresentadas no item (5.9.3) e novas condições foram propostas para quantificação de CFZ na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável por CLAE.

6.3.1. Material

Para a realização do método foram utilizados CFZ SQR e pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2. Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água ultrapura obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Milipore, USA). Os solventes acetonitrila, etanol e metanol utilizado na preparação das fases móveis possuía

Análise quantitativa

grau HPLC e foram adquiridos da J.T. Baker (México). Os reagentes utilizados para a degradação foram ácido clorídrico 0,001 M (Qhemis), hidróxido de sódio 0,001 M (Cinetica), peróxido de hidrogênio 3% (Vetec Química Fina). As soluções foram filtradas em membrana filtrante de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore) e foram desgaseificadas em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, SP, Brasil). Para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de fase reversa foi utilizado equipamento Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, USA), conectado a detector UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com loop de 20 µL (Rheodyne Breeze, CA, USA). As colunas Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 5 µm (250 mm x 4,6 mm) Agilent e Symmetry C₁₈, 5 µm (250 x 4,6 mm) Waters, foram utilizadas. As áreas dos picos foram integradas usando o programa de *software* Empower. Também foram utilizados banho-maria modelo Q334M (Quimis, SP, Brasil) e balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

6.3.2 Método

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação de CFZ foram apresentadas na Tabela 13. A fase móvel constituída de água:ACN (60:40 v/v); pH 8 ajustado com TEA, foi preparada segundo o item 6.3.2.1. O volume de 10 µL de solução de CFZ nas concentrações de trabalho (6.3.2.2 e 6.3.2.3) foi injetado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters em vazão de 0,5 mL/min. A análise do fármaco foi realizada isocraticamente em colunas Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 5 µm (250 mm x 4,6 mm) por detector UV, no comprimento de onda de 270 nm. O ensaio foi realizado em temperatura ambiente.

6.3.2.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel escolhida consistiu de água purificada (Milli-Q) e acetonitrila (JT Baker) na proporção de 60:40 v/v, pH ajustado para 8 com gotas de trietilamina (Merck). A fase móvel foi filtrada em membrana filtrante de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore), sob vácuo e desgaseificada em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, SP, Brasil), durante 30

6.3.2.2 Preparo da solução de CFZ SQR

A massa equivalente a 10,00 mg de CFZ SQR previamente dessecada por 1 h a 105 °C foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com fase móvel, para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg/mL. Aliquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e

Análise quantitativa

4,0 mL, desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL para gerar soluções com a concentração final requerida de 30; 40; 50; 60; 70 e 80 µg/mL.

6.3.2.3 Preparo da solução de CFZ pó liofilizado para solução injetável

O conteúdo de 20 frascos contendo peso médio de 1,07 g de CFZ pó liofilizado para solução injetável foi adicionado a um recipiente adequado. A partir deste *pool* de amostras, a massa de 10 mg de CFZ foi pesada e transferida para balão volumétrico de 50 mL para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg/mL. Alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL para obtenção das soluções com a concentração da faixa de trabalho correspondente a 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL.

6.3.3 Determinação do teor de CFZ pó liofilizado para solução injetável

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em cromatógrafo no comprimento de onda de 270 nm. O doseamento de CFZ foi realizado em triplicada, nas concentrações de 60 µg/mL e o seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 8 e 9.

6.3.4 Conformidade do sistema cromatográfico

O ICH (2005) estabelece teste de conformidade do sistema cromatográfico como parte do processo de validação. Como o teste é uma etapa essencial para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estão aptos para a validação do método, sendo um pré-requisito de fundamental importância, a conformidade do sistema cromatográfico foi anteriormente apresentada no item 5.9.3.1 em que se deu a escolha desses parâmetros.

6.3.5 Validação do método analítico por CLAE

O método foi validado de acordo com o as diretrizes BRASIL (2003), FDA (2004) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação, limite de detecção, robustez e exatidão.

6.3.5.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Para a curva analítica foi preparado uma solução de CFZ SQR na concentração de

Análise quantitativa

200 µg/mL (solução-mãe). A partir da solução-mãe, alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel para a obtenção das concentrações de trabalho de 30; 40; 50; 60; 70 e 80 µg/mL.

As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada pelo estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) foi empregado para avaliação dos resultados obtidos.

6.3.5.2 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e excipientes (BRASIL, 2003). A seletividade do método foi determinada submetendo a solução amostra de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável (200 µg/mL) à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica, para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação da cefazolina sódica. As amostras foram diluídas em fase móvel para concentração final de 60 µg/mL, concentração em que as amostras foram injetadas no equipamento. A solução amostra foi preparada em HCl 0,001 M para a hidrólise ácida e NaOH 0,001 M para a hidrólise básica. Estas amostras foram aquecidas a 60 °C por 48 horas e foram neutralizadas com NaOH 0,001 M e HCl 0,001 M, respectivamente, antes de serem injetadas no equipamento. A degradação neutra e oxidativa foram realizadas submetendo a solução amostra de CFZ na concentração de 60 µg/mL, preparadas em água purificada e em peróxido de hidrogênio 3% respectivamente, sob exposição à temperatura de 60 °C, em banho de aquecimento, por 48 horas.

A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta (UVC, 254 nm) em temperatura ambiente (25 °C ± 2) por 48 horas. Assim, a capacidade indicadora de estabilidade do método foi estabelecida através da resolução obtida entre o pico principal da CFZ e de seus produtos de degradação.

6.3.5.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do DPR percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6.3.5.3.1 Repetibilidade

Sete determinações sucessivas de CFZ na concentração de 60 µg/mL foram realizadas no mesmo dia, utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista. As áreas dos picos cromatográficos foram avaliadas pelo DPR.

6.3.5.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por diferentes analistas e em diferentes dias.

6.3.5.3.2.1 Entre-dias

Sete determinações sucessivas de CFZ na concentração de 60 µg/mL foram preparadas diariamente, por três dias consecutivos, utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista. Os resultados foram avaliados pelo DPR e por análise estatística de variância (ANOVA).

6.3.5.3.2.2 Entre-analistas

Sete determinações sucessivas de CFZ na concentração de 60 µg/mL foram realizadas no mesmo dia, mas por analistas diferentes, utilizando as mesmas condições experimentais, método e equipamento. As áreas dos picos cromatográficos foram avaliadas pelo DPR e por análise estatística de variância (ANOVA). Além disso, cada analista realizou um doseamento sob as mesmas condições experimentais e os teores obtidos foram analisados pelo DPR.

6.3.5.4 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados segundo preconizado na literatura (ICH, 2005), que se baseiam no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. As soluções foram analisadas experimentalmente em triplicata e calculadas pelas Equações 11 e 12.

6.3.5.5 Robustez

Robustez é o grau de reprodutibilidade do teste, a resistência do método frente a pequenas variações nas condições cromatográficas estabelecidas para obtenção do teor de CFZ. Neste trabalho, a robustez do método foi testada quanto à influência de pequenas variações dos parâmetros

Análise quantitativa

pré-definidos como: marca da coluna cromatográfica, marca do solvente acetonitrila, vazão, proporção da fase móvel, volume da injeção, comprimento de onda e temperatura.

As diferentes condições também foram avaliadas simultaneamente pelo modelo fatorial Plackett-Burman, em que é realizado uma matriz de 15 experimentos variando 7 parâmetros em nível superior e inferior. Os resultados obtidos foram calculados usando a metodologia proposta por Youden & Steiner (1975). Na Tabela 33 é apresentada a combinação fatorial utilizada no teste Plackett-Burman, onde as letras de A a G representam os fatores selecionados; os números 1 a 15 representam o número de experimentos ($2n + 1$), sendo que n é o número de fatores, em que 0 corresponde aos parâmetros normais pré-estabelecidos no processo, enquanto que os 1 e -1 são os níveis superiores e inferiores a esses parâmetros.

Tabela 33- Teste de robustez utilizando o modelo experimental de Plackett-Burman

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

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

A escolha das variáveis (Fatores) e os níveis que devem ser testados são muito importantes para obtenção de um teste de robustez confiável. As variáveis devem ser condizentes com a realidade prática e os níveis devem refletir a variação que pode ser geralmente observada. Os fatores e os níveis de variação testados são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34- Fatores selecionados e níveis de variabilidade

Fator	Unidade	Limite	Condição variada (1)	Condição Normal (0)	Condição variada (-1)
A. Marca da Coluna	----	----	Waters	Agilent	Waters
B. Vazão da fase móvel	mL/min	2	0,52	0,50	0,48
C. Marca da acetonitrila	----	----	Tedia	J. T. Baker	Tedia
D. Proporção da FM	%	2	62:38 v/v	60:40 v/v	58:42 v/v
E. Volume da injeção	µL	2	12	10	8
F. Comprimento de onda	λ	2	272 nm	270 nm	268 nm
G. Temperatura da sala	°C	2	27	25	23

-1= Nível inferior; 0= Nível Normal e +1 Nível superior.

A robustez foi determinada em triplicata a partir de injeções de soluções padrão contendo 60 µg/mL de CFZ, sob as mesmas condições experimentais estabelecidas.

Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média do doseamento realizado em triplicata correspondente aos parâmetros normais foi comparada às médias dos doseamentos correspondentes aos níveis alterados.

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

A Equação 14 exemplifica a avaliação do efeito da alteração do parâmetro A- Marca da coluna, do mesmo modo os outros parâmetros também foram avaliados (BERZAS et al., 2004).

$$\sqrt{2} \times S > |DA| \quad \text{Equação 14}$$

Em que:

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

Sendo que:

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

Análise quantitativa

6.3.5.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método da adição e foi calculada pela quantidade recuperada, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 35, em triplicata, e a percentagem de cefazolina recuperada foi calculada pela Equação 10.

Tabela 35- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico

	CFZ amostra (100 µg/mL) (mL)	CFZ (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^a
Amostra	1,5	-	30
R1	1,5	0,9	48
R2	1,5	1,5	60
R3	1,5	2,1	72
Padrão	-	1,5	30

^aBalão volumétrico de 10 mL

6.3.6 Resultados

O cromatograma típico de CFZ obtido pelo método proposto foi apresentado na Figura 16 e demonstrou excelentes resultados quanto à resolução, simetria do pico e ótimo tempo de retenção de 3,6 minutos.

6.3.6.1 Seletividade e estudos de degradação forçada

O estudo da degradação forçada da amostra de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável foi realizado para verificar as propriedades indicadoras de estabilidade do método proposto. Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de cefazolina sódica, sendo que nas condições ácidas e alcalinas picos adicionais foram apresentados. A amostra foi mais estável em condição neutra e apresentou maior degradação em condição ácida. As Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 apresentam os cromatogramas obtidos após as degradações básica, ácida, neutra, oxidativa e fotolítica, respectivamente, onde é possível visualizar os picos adicionais correspondentes aos produtos de degradações, sendo que o pico principal de cefazolina sódica é apresentado ao tempo de retenção de 3,6 minutos. Assim, demonstrou-se a seletividade do método proposto para a análise de produtos farmacêuticos de cefazolina sódica.

Análise quantitativa

Figura 20- Cromatograma de CFZ 60 $\mu\text{g/mL}$ tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: básica (NaOH 0,1 M) a 60 °C

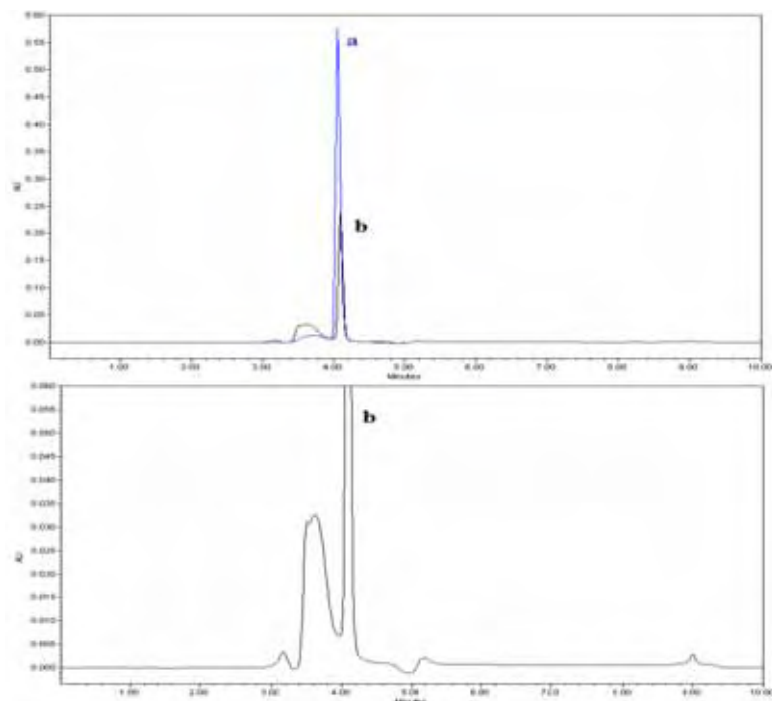
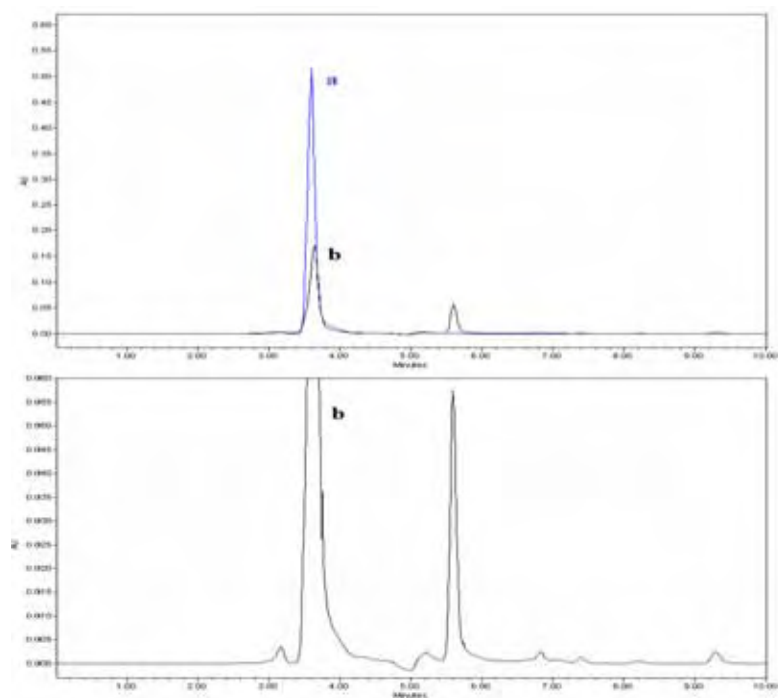


Figura 21- Cromatograma de CFZ 60 $\mu\text{g/mL}$ tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: ácida (HCl 0,001 M) a 60 °C



Análise quantitativa

Figura 22- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: neutra (água) a 60 °C

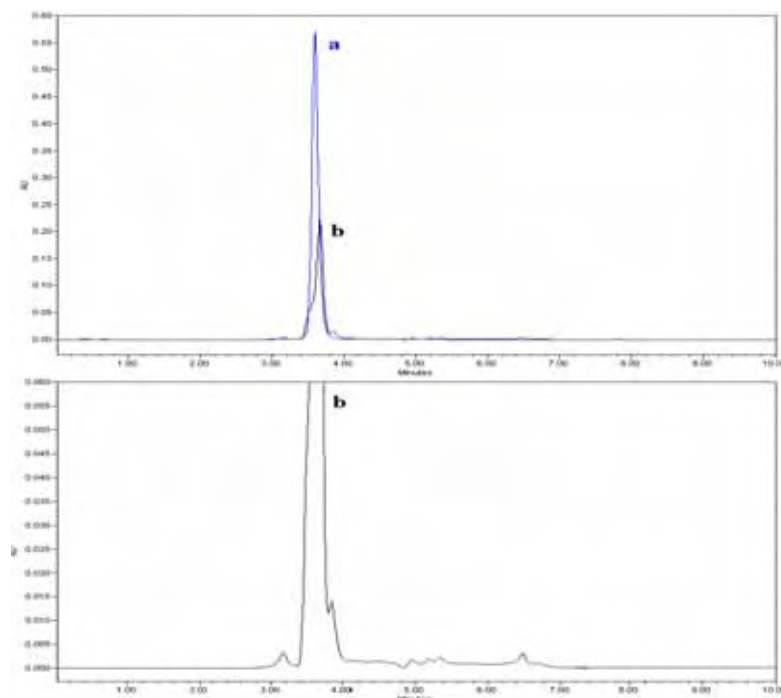
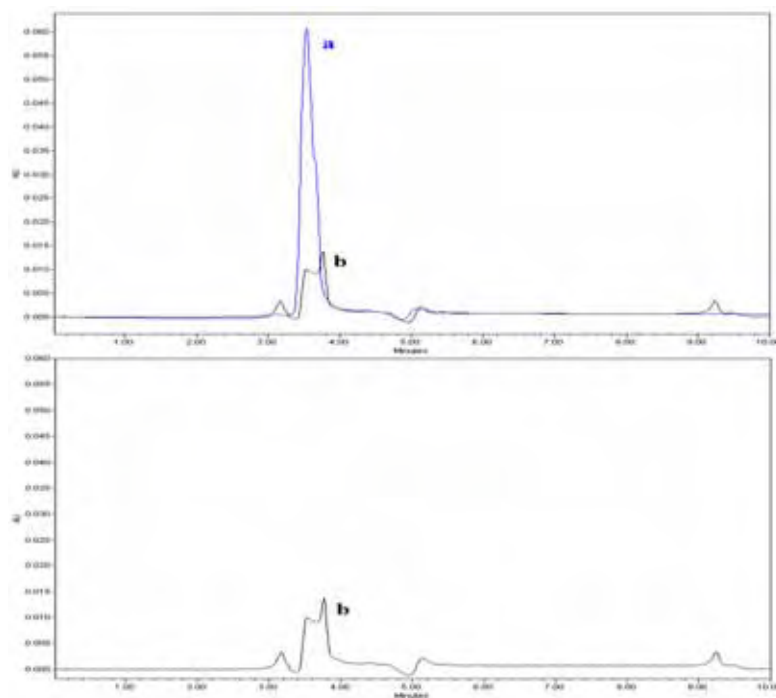
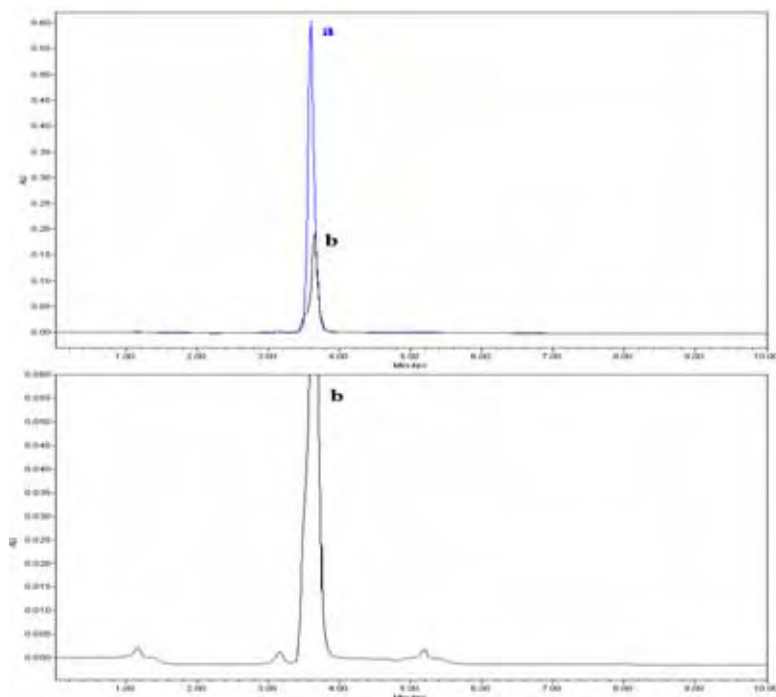


Figura 23- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: Oxidativo (H₂O₂ 3%) a 60 °C



Análise quantitativa

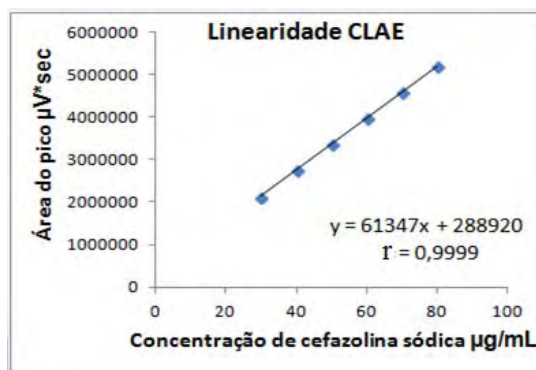
Figura 24- Cromatograma de CFZ 60 µg/mL tempo zero (a) e após 48 horas (b), sob degradação: Fotolítica (luz UV) em temperatura ambiente



6.3.6.2 Linearidade

Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foram plotados em relação à respectiva concentração, observando-se linearidade adequada na faixa de 30-80 µg/mL, conforme ilustrado na Figura 25.

Figura 25- Curva analítica de CFZ SQR obtida pelo método cromatográfico, utilizando fase móvel: água: acetonitrila (60:40 v/v) pH 8 ajustado com TEA. Fase estacionária: Zorbax Eclipse Plus C₁₈ Agilent (250 x 4,6 mm) 5 µm



Análise quantitativa

Na Tabela 36 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de CFZ SQR.

Tabela 36- Valores das áreas referentes ao pico de CFZ SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Áreas ^a (AU)	Área média ± DP ^b	DPR ^c (%)
30	2152162	2110833 ± 39644,70	1,87
	2107217		
	2073120		
40	2764639	2752218 ± 15017,54	0,55
	2756486		
	2735528		
50	3349823	3372399 ± 19837,64	0,58
	3380328		
	3387046		
60	3971999	3969727 ± 55822,03	1,40
	3912803		
	4024378		
70	4572851	4589643 ± 85494,54	1,86
	4513790		
	4682288		
80	5154763	5183200 ± 66068,28	1,27
	5136111		
	5258725		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR= Desvio padrão relativo

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de CFZ SQR é apresentada na Tabela 37.

*Análise quantitativa***Tabela 37-** Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de CFZ SQR, utilizando o método por CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	19760858787504,8	3952171757500,9	1396,43*	3,11
Regressão linear	1	19760858787504,8	19760858787504,8	6982,14*	4,75
Desvio da Linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,00	3,26
Resíduo	12	33962392533,3	2830199377,7	-	-
Total	17	19794821180038,2	-	-	-

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

6.3.6.3 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no DPR. Sete soluções de CFZ SQR preparadas na concentração de 60 µg/mL foram submetidas à análises sucessivas e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 0,84%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de três amostras, em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais de teores de 100,29%, 100,11% e 100,79%, com teor médio de 100,39% e DPR de 0,35%. Na precisão entre-analistas, duas amostras foram avaliadas por dois analistas, obtendo-se valores experimentais de 98,49% e 100,12%, com média de 99,31% e DPR de 1,17, conforme demonstrado na Tabela 38.

Tabela 38- Precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de CFZ por CLAE

Dia	Precisão interdias			Analista	Precisão entre-analistas		
	Teor ^a (%)	Teor médio (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (%)	Teor médio (%)	DPR ^b (%)
1	100,29			A	100,12		
2	100,11	100,39	0,35	B	98,49	99,31	1,17
3	100,79						

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

Análise quantitativa

Os resultados obtidos na precisão interdia e precisão entre-analistas também foram avaliados estatisticamente, comparando as áreas das sete soluções realizadas em cada dia de experimento por análise de variância (ANOVA), como apresentado nas Tabelas 40 e 41.

Tabela 39- Análise estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão interdias

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	269208531,8	2	134604265,9	0,10784	0,898340252	3,554557146
Dentro dos grupos	22465779885	18	1248098882			
Total	22734988417	20				

Tabela 40- Análise estatística por análise de variância (ANOVA) para precisão entre-analista

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	718684,5714	1	718684,5714	0,00026	0,987358595	4,747225336
Dentro dos grupos	32952861485	12	2746071790			
Total	32953580170	13				

6.3.6.4 Exatidão

Determinou-se a exatidão do método através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida e os resultados experimentais, que correspondem à porcentagem média de 100,37%, encontram-se na Tabela 41.

Tabela 41- Exatidão do método analítico para análise CFZ por CLAE

	CFZ SQR adicionado (µg/mL)	CFZ SQR encontrado ^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
R1	18	18,21	101,16		
R2	30	30,16	100,52	100,37	0,86
R3	42	41,76	99,44		

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

6.3.6.5 Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico foi 3,10 µg/mL. Por sua vez, o LQ calculado foi 9,41 µg/mL.

*Análise quantitativa***6.3.6.6 Robustez**

A robustez foi avaliada propiciando pequenas modificações nos parâmetros, de forma isolada, na execução de análises de CFZ pó liofilizado para solução injetável, tais como: marca da coluna; vazão da fase móvel; marca da acetonitrila; proporção de solventes na fase móvel; volume da injeção; comprimento de onda de detecção e temperatura do laboratório. Os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os desvios padrão relativos foram inferiores a 1,12%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 42.

Tabela 42- Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para determinação de CFZ por CLAE

Variável	Faixa Investigada	CFZ ^a (mg)	CFZ ^a (%)	DPR ^b (%)
Marca da coluna	Zorbax Eclipse Plus Agilent® (250 x 4,6 mm) 5 µm	60,17	100,29	1,11
	Symmetry Waters® (250 x 4,6 mm) 5 µm	61,12	101,87	
Vazão da fase móvel (mL/min)	0,48	60,16	100,28	0,22
	0,50	60,17	100,29	
	0,52	60,39	100,66	
Marca da acetonitrila	J. T. Baker	60,05	100,09	0,30
	Tedia	60,31	100,52	
Proporção de fase móvel	62:38v/v	60,12	100,21	0,82
	60:40v/v	60,17	100,29	
	58:42v/v	61,00	101,68	
Volume da injeção (µL)	8	59,86	99,78	0,37
	10	60,17	100,29	
	12	60,30	100,51	
Comprimento de onda (nm)	269	60,64	101,07	0,46
	270	60,08	100,14	
	272	60,32	100,54	
Temperatura do laboratório (°C)	23	60,23	100,38	0,14
	25	60,17	100,29	
	27	60,06	100,11	

^aMédia de três determinações; ^bDPR= Desvio padrão relativo

Análise quantitativa

A robustez também foi avaliada pela matriz fatorial de Plackett-Burman, em que 15 experimentos foram realizados com alterações simultâneas, anteriormente apresentadas na Tabela 33. Os efeitos resultantes dos parâmetros alterados foram avaliados em comparação aos valores obtidos como referência de 0,96 para o teste 1 e 1,23 para o teste -1 (Equação 14). Nenhum efeito apresentou resultado significativo, indicando que o método proposto é robusto. Os teores encontrados nas condições normais e nas condições alteradas para cada fator são apresentados na Tabela 43.

Tabela 43- Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman

Fator	(1)	Teor (%) ^{a,b}	(-1)	Teor (%) ^{a,b}
Marca da coluna	A=Waters®	100,53–101,46= -0,93	A= Waters®	100,83 – 101,63 = -0,80
Vazão da fase móvel (mL/min)	B=0,52	101,21–100,63= 0,58	B= 0,48	101,30 – 101,15 = 0,15
Marca da acetoneitrila	C=Tedia	100,89–100,95= -0,06	C= Tedia	100,71 – 101,75 = -1,04
Proporção de fase móvel (%)	D=62:38	101,00–100,83= 0,17	D= 58:42	101,19 – 101,27 = -0,08
Volume da injeção (mL/min)	E=12	100,92–100,92= 0,00	E= 8	100,85 – 101,60 = -0,75
Comprimento de onda (nm)	F=272	100,71–101,13= -0,42	F= 268	101,52 – 100,94 = 0,58
Temperatura da sala (°C)	G=27	101,70–101,14= -0,56	G= 23	101,25 – 101,20 = 0,05

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

^bCritérios de referência calculados: 0,96 para o teste 1 e 1,23 para o teste -1

6.3.7 Discussão

Neste trabalho foi validado um método cromatográfico, com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção, preconizados em guias internacionais (FDA, 2004; ICH, 2005). Antes de validar o método, realizaram-se os testes de conformidade do sistema cromatográfico (*system suitability*) que são essenciais para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estejam aptos para a validação do método. Os dados obtidos na verificação da conformidade do sistema cromatográfico (Tabela 14) mostraram que o sistema apresentou-se eficiente para o desenvolvimento do método cromatográfico, sendo adequado para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura (FDA, 2004), que sugere que a assimetria do pico e o fator de alargamento devem ser ≤ 2 , o número de pratos > 2000 e o DPR para os parâmetros testados $< 2\%$. Portanto, o método proposto cumpre os requisitos preconizados na literatura oficial, podendo ser empregado para análise de CFZ na indústria farmacêutica.

Análise quantitativa

O tempo de corrida necessário para análise é de 3,6 min, proporcionando, desta maneira, uma rápida determinação do fármaco, que é um atributo fundamental para sua aplicabilidade do método no controle de qualidade na indústria farmacêutica.

O estudo da degradação forçada da amostra de cefazolina sódica foi determinado submetendo amostras de CFZ a condições de estresse básico, ácido, neutro, oxidativo e fotolítico, para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação de CFZ. A hidrólise básica, ácida, neutra e oxidativa foram realizadas em banho à temperatura de 60 °C. O fármaco em estudo mostrou que em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de cefazolina sódica, quando comparado ao pico do fármaco no momento de preparo. A amostra foi mais estável à hidrólise neutra, enquanto que as condições básica e ácida apresentaram decréscimo significativo da área do pico principal, sendo possível detectar picos adicionais, sendo que o máximo de degradação observada foi na condição ácida. As degradações em meio neutro e fotolítica foram mais lentas, mas apresentaram uma diminuição expressiva de 62% e 68%, respectivamente. A avaliação da degradação oxidativa ficou prejudicada com os parâmetros estabelecidos, pois o pico do peróxido de hidrogênio apresentou um grande pico característico, que coeluiu no mesmo tempo de retenção da cefazolina sódica, encobrindo o pico do fármaco, não sendo possível separá-los nas condições de trabalho propostas. No entanto, este estudo mostrou que o método possui adequada seletividade, visto que foi possível quantificar a cefazolina sódica mesmo na presença de seus produtos de degradação.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas, que foram construídas a partir de seis concentrações de padrões de CFZ. As áreas dos picos apresentadas nos cromatogramas foram plotadas em um gráfico *versus* a concentração de CFZ, a fim de se obter a curva analítica que apresentou um coeficiente de correlação significativo, mostrando-se linear na faixa de 30-80 µg/mL ($r = 0,9999$). O conteúdo de CFZ nas amostras analisadas foi de, 100,39%, e é consistente com os compêndios oficiais 95,0-102,0%. Análises estatísticas de variância (ANOVA) foram realizadas e os resultados apresentados apontaram que não há desvios significativos de linearidade e, portanto, o método é linear.

Tratamentos estatísticos também foram realizados para avaliação da precisão do método, sendo que a precisão interdia foi avaliada por análise de variância (ANOVA) e a precisão entre-analista foi avaliada teste *t* de Student. Os resultados igualmente mostraram não haver diferenças significativas entre as análises realizadas em diferentes dias e por diferentes analistas. Uma análise de precisão entre-analista por doseamento também foi considerada e os teores

Análise quantitativa

encontrados por cada analista foram de 100,12% (analista 1) e 98,49 (analista 2), com DPR entre eles de 1,17. Além disso, os valores de DPR referente às áreas dos picos cromatográficos obtidos nas análises de precisão intradia, interdia e entre-analista foram de 0,84%, 0,35% e 1,17%, respectivamente, sendo estes inferiores ao preconizado na literatura (menor ou igual a 2%), o que indica a precisão do método proposto (FDA, 2004; ICH, 2005).

Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) foram de 3,10 e 9,41 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade CFZ pó liofilizado para solução injetável na faixa linear estabelecida. A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação, com uma média de 100,37%.

A robustez foi comprovada por alterações dos parâmetros pré-selecionados para o método de modo isolado que confirmaram a robustez do método (Tabela 43) e simultaneamente pelo modelo de Plackett-Burman, em que as alterações dos parâmetros analíticos ocorrem simultaneamente (Tabela 33), que da mesma forma, não apresentou nenhum efeito considerado significativo em comparação com o valor calculado utilizando a Equação 14.

Método semelhante foi empregado com êxito recentemente por ALÉSSIO (2012) para quantificação de ceftriaxona sódica, uma cefalosporina de terceira geração. Neste trabalho foi utilizada como fase móvel acetonitrila: água (40:60 v/v), pH 7,0 ajustado com TEA, fase estacionária: Symmetry C₁₈ Waters (250 x 4,6 mm) 5 μm e obteve tempo de retenção de 2,6 min.

Atualmente o desenvolvimento de metodologias cromatográficas priorizando menor tempo de análise e que sejam economicamente viáveis tem ganhado destaque. O método proposto neste trabalho apresentou um tempo de retenção adequado para a análise na indústria, além de se obter uma diminuição do consumo de solventes orgânicos devido a um menor tempo de análise, sempre tendo a consciência da importância de não se gerar grandes quantias de resíduos tóxicos ao meio ambiente. O método desenvolvido apresenta uma fase móvel simples, em que o uso de solução tampão foi evitado. Dentre as desvantagens de se utilizar solução tampão, destacam-se: exigem preparo prévio à análise, pois seu armazenamento mesmo sob refrigeração pode ocasionar o aparecimento de fungos; são geralmente os responsáveis pelo aumento da pressão, propiciando entupimentos que podem comprometer a funcionalidade do equipamento e ainda, danificam as colunas cromatográficas diminuindo seu tempo de vida útil. Estes fatores representam um alto custo para a indústria farmacêutica.

O método cromatográfico proposto mostrou-se adequado e vantajoso apresentando simplicidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, limites de detecção e de quantificação

Análise quantitativa

satisfatórios, além de conformidade do sistema, portanto pode ser empregado para a análise quantitativa de cefazolina de sódica na indústria farmacêutica, contribuindo para melhorar o controle de qualidade e para assegurar a eficácia terapêutica.

ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

Análise comparativa dos métodos

7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para determinação de CFZ em pó liofilizado para solução injetável foi realizada análise estatística dos teores médios de CFZ obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA).

7.1 Resultados

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de CFZ em pó liofilizado para solução injetável, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 44.

Tabela 44- Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos três métodos validados usando espectrofotometria na região do ultravioleta, doseamento microbiológico por turbidimetria e CLAE

Amostra	Métodos		
	Ultravioleta	Turbidimétrico	CLAE
1	99,91	100,25	100,29
2	98,95	100,30	100,11
3	98,45	99,66	100,79
Teor médio	99,10	100,07	100,39
DPR^a	0,75	0,36	0,35

^aDPR= Desvio padrão relativo

A Tabela 45 mostra o resultado de ANOVA calculado, utilizando os valores experimentais obtidos do teor de CFZ em pó liofilizado para solução injetável, a partir dos métodos validados.

Tabela 45- Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de CFZ pó liofilizado para solução injetável, pelos métodos propostos

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamentos	2	2,7045	1,3522	5,05	5,14
Resíduo	6	1,6052	0,2675		
Total	8	4,3098			

7.2 Discussão

Os resultados obtidos através de ANOVA demonstram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para o nível de significância de 5%. Desta forma, os métodos validados são equivalentes e adequados para a determinação quantitativa do fármaco, ainda que cada método possua suas próprias características, podem ser intercambiáveis. Todos os métodos foram validados

Análise comparativa dos métodos

em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamentos oficiais. Os métodos espectrofotométricos são simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas não são específicos para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação na amostra. Os ensaios microbiológicos são importantes, pois fornecem informação sobre a potência de CFZ pó liofilizado para solução injetável, devendo ser aplicados em paralelo com métodos físicos, a fim de assegurar a eficácia terapêutica de antimicrobianos; entretanto, necessitam de maior tempo de execução. O CLAE é específico e apropriado para determinação de produtos de degradação e impurezas. Assim, os métodos mostraram ser apropriados para a quantificação da cefazolina sódica em amostras de pó liofilizado para solução injetável, podendo ser usados como alternativas para análises de controle de qualidade a fim de assegurar a potência e a qualidade dos produtos contendo CFZ. Apresentam ainda, vantagens em relação aos métodos oficiais que utilizam como fase móvel proporções de acetonitrila e solução fosfato de sódio com ácido cítrico, além de maior tempo de retenção, em torno de 6,4 a 8 minutos.

Este trabalho vem ressaltar a importância da validação de métodos analíticos para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, pois dados analíticos confiáveis são fundamentais para a eficácia terapêutica e segurança destes produtos, evitando que os pacientes consumam medicamentos com a qualidade comprometida.

DISCUSSÃO GERAL

8. Discussão Geral

Neste trabalho várias análises qualitativas foram realizadas, além do desenvolvimento e validação dos métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico turbidimétrico que foram selecionados para quantificação de CFZ em pó liofilizado para solução injetável. Os métodos escolhidos foram embasados em trabalhos anteriores realizados para outras cefalosporinas (TOZO, 2007; MORENO, 2007; VIEIRA, 2010; ALESSIO, 2012). Os vários trabalhos relacionados exaltam ainda mais a importância e repercussão deste estudo na obtenção de métodos simples, atuais e inovadores.

Os métodos analíticos são fundamentais para identificação e quantificação de CFZ pó liofilizado para solução injetável. Neste trabalho foi possível desenvolver e validar métodos analíticos priorizando a simplicidade de execução, tempo de análise e custo, buscando a obtenção de métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina para determinação do teor de CFZ pó liofilizado para solução injetável.

As análises qualitativas permitiram caracterizar o fármaco através de ensaios de ponto de fusão, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e infravermelho, que permitiram estabelecer bases para identificação de CFZ pó liofilizado para solução injetável e demonstraram resultados satisfatórios quando comparados com a substância química de referência.

Os métodos desenvolvidos e validados por espectrofotometria na região do ultravioleta, ensaio turbidimétrico e cromatografia líquida, forneceram resultados precisos, exatos e robustos, pois os parâmetros de precisão obtiveram baixos valores de DPR. Na exatidão, foi possível recuperar percentagens próximas a 100% e não apresentaram desvio significativo com as variações realizadas nos testes de robustez. Além disso, os métodos apresentaram linearidade com excelentes coeficientes de correlação e limites de detecção e de quantificação capazes de quantificar o fármaco.

O método microbiológico mostrou ser capaz de quantificar o fármaco em pó liofilizado para solução injetável através da sua atividade frente ao micro-organismo utilizado e apresentou parâmetros de validação adequados para determinação de potência de CFZ, tendo como uma das vantagens o menor tempo de realização quando comparado aos métodos por difusão em ágar (tempo de incubação de apenas 4 horas), podendo assim ser mais facilmente aplicável em controle de qualidade.

Discussão geral

Os métodos desenvolvidos no presente trabalho foram validados, segundo diretrizes estabelecidas por órgãos nacionais e internacionais, como ICH, ISO, ANVISA e INMETRO, que exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental para assegurar qualidade. Os resultados encontrados na validação estão de acordo com o preconizado para avaliação de fármacos em produtos farmacêuticos (ISO, 1999; BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; ICH 2005; INMETRO, 2011). Testes estatísticos como análise de variância (ANOVA) e teste *t* de Student foram empregados para melhor avaliação dos resultados dos métodos desenvolvidos. A comparação entre os métodos desenvolvidos para a determinação quantitativa de CFZ foi avaliada estatisticamente e não apresentou diferenças significativas.

Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho vêm corroborar cientificamente, estabelecendo bases de correlação físico-química e biológica, que são procedimentos importantes para aprimorar o controle de qualidade na produção de medicamentos seguros e apropriado para uso da população.

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

- ✓ Nas análises qualitativas, a CFZ foi caracterizada quanto ao seu aspecto físico; solubilidade; teor de umidade; faixa de fusão; pH; cromatografia em camada delgada; espectrofotometria nas regiões do infravermelho, ultravioleta e por CLAE.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise da CFZ injetável por espectrofotometria na região ultravioleta a 270 nm, utilizando como solvente água purificada, na faixa de concentração de 8 a 28 µg/mL, que demonstrou ser linear, preciso robusto e exato.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método microbiológico por turbidimetria, capaz de determinar a potência da cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável frente ao micro-organismo que foi utilizado e apresentou parâmetros de validação adequados.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise da CFZ injetável por CLAE a 270 nm, utilizando água: acetonitrila (60:40 v/v) pH 8 ajustado com TEA como fase móvel, na faixa de concentração de 30 a 80 µg/mL. O método demonstrou ser linear, preciso robusto e exato.
- ✓ A análise comparativa dos três métodos quantitativos mostrou que eles são apropriados para a quantificação da cefazolina sódica em amostras de pó liofilizado para solução injetável, podendo ser usados como alternativas para análises do controle de qualidade deste fármaco.
- ✓ Por fim, este trabalho contempla métodos desenvolvidos e validados que além de estabelecerem bases de correlação físico-química e biológica contribuem para aprimorar o controle de qualidade de CFZ em pó liofilizado para solução injetável.

TRABALHOS REALIZADOS

10. Trabalhos realizados

Durante o período de mestrado, os resultados referentes ao trabalho desenvolvido originaram 9 trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais e 3 artigos foram submetidos, sendo um aceito para publicação.

10.1 Trabalhos apresentados:

10.1.1. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Quality control – qualitative tests of cefazolin sodium. In: **II International Symposium on Drug Discovery**, realizado em outubro de 2011, na cidade de Araraquara-SP.

10.1.2. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. UV spectrophotometric profile of cefazolin sodium. In: **II International Symposium of Pharmaceutical Sciences**, realizado em novembro de 2011, na cidade de Natal – RN.

10.1.3. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. A new, safe and easy method of thin-layer chromatography for cefazolin sodium identification. In: **II International Symposium of Pharmaceutical Sciences**, realizado em novembro de 2011, na cidade de Natal – RN.

10.1.4. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Análise qualitativa de cefazolina sódica por espectrofotometria na região de infravermelho. In: **Congresso Farmacêutico da UNESP**, realizado em agosto de 2012, na cidade de Araraquara – SP.

10.1.5. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Stress degradation study on cefazolin sodium powder for injection and development of stability-indicating LC method. In: **Simpósio Internacional de Pós-graduação e Pesquisa - SINPOSPq**, realizado em setembro de 2012, na cidade de Ribeirão Preto - SP.

10.1.6. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development of stability-indicating thin layer chromatography to evaluation of cefazolin sodium powder for injection. In: **XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO**, realizado em outubro de 2012, na cidade de Florianópolis - SC.

Trabalhos realizados

10.1.7. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a liquid chromatography method for the determination of cefazolin sodium in pharmaceutical product. In: **XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO**, realizado em outubro de 2012, na cidade de Florianópolis – SC.

10.1.8. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a turbidimetric bioassay to determine the potency of cefazolin sodium for injection. In: **XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia - ALAM**, realizado em outubro de 2012, na cidade de Santos – SP.

10.1.9. PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Turbidimetric bioassay evaluation of cefazolin sodium power for injection stressed by photolytic degradation. In: **XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia - ALAM**, realizado em outubro de 2012, na cidade de Santos – SP.

10.2. Artigos

10.2.1. Artigos submetidos:

10.2.1.1. Validation of Analytical Methodology for Quantification of Cefazolin Sodium by Liquid Chromatography Revista: Current Pharmaceutical Analysis

Revista: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

10.2.1.2. Development and Validation of a Successful Microbiological Assay by Turbidimetry to Determine the Potency of Cefazolin Sodium in Lyophilized Powder for Injection Solution.

Revista: Talanta

10.2.2. Artigo Publicado:

10.2.2.1. Quantification of Cefazolin Sodium By UV-Spectrophotometry. *Physical Chemistry*, v.3, n.1, p.11-20, 2013.

10.2.2.2. Development of methods for qualitative analysis of cefazolin sodium raw material and pharmaceutical product. *Physical Chemistry*, v.3, n.2, p. xx, 2013).

REFERÊNCIAS

Referências

11. REFERÊNCIAS

- AHSMAN, M.J.; WILDSCHUT, E.D.; TIBBOEL, D.; MATHOT, R.A. Microanalysis of β -lactam antibiotics and vancomycin in plasma for pharmacokinetic studies in neonates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1, p.75-80, 2009.
- ALEKSEEV, V.D. Drug synthesis methods and manufacturing technology. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.44, n.1, p.16-26, 2010.
- ALÉSSIO, P.V. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis de ceftriaxona sódica**. Araraquara, 2012. 113 p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP].
- ALÉSSIO, P.V.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a successful microbiological agar assay for determination of ceftriaxone sodium in powder for injectable solution. **Pharmaceutics**, v.4, p.334-342, 2012.
- AL-MOMANI, I.F. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.25, p.751-757, 2001.
- AL-RAWITHI, S.; HUSSEIN, R.; RAINES, D.A.; ALSHOWAIER, I.; KURDI, W. Sensitive assay for the determination of cefazolin or ceftriaxone in plasma utilizing LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, p.281-286, 2000.
- AMIN, A.S.; SHAMA, S.A.; CHEM, M. Vanadophosphoric acid as a modified reagent for the spectrophotometric determination of certain cephalosporins and their dosage forms. **Monatshefte für Chemie**, v.131, p.313-319, 2000.
- ANNESLEY, T.; WILKERSON, K.; MATZ, K.; GIACHERIO, D. Simultaneous determination of penicillin and cephalosporin antibiotics in serum by gradient liquid chromatography. **Clinical Chemistry**, v.30, n.6, p.908-910, 1984.
- ANTUNEZ, C.; BLANCA-LOPEZ, N.; TORRES, M.J.; MAYORGA, C.; PEREZ-INESTROSA, E.; MONTAÑES, M.I.; FERNANDEZ, T.; BLANCA, M. Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, p.404-410, 2006.
- ARAYNE, M.S.; SULTANA, N.; BI-BI, Z. Simultaneous determination of cefazolin or ceftizoxime in presence of ascorbic acid from pharmaceutical formulation and human serum by RP-HPLC. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.1, p.56-61, 2007.
- AYAD, M.M.; SHALABY, A.A.; ABDELLATEF, H.E.; ELSAID, H.M. Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of certain cephalosporins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, n.6, p.975-983, 1999.
- BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P.; BARANOWSKI, J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. **Analytica Chimica Acta**, v.570, p.46-58, 2006.
- BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

Referências

- BAYOUMI, S.M.; VALLNER, J.T.; DIPIRO, J.T. Quantitation of cefazolin sodium in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmaceutics**, v.30, p.57-61, 1986.
- 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 (Tb^{3+}). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, p.1219-1225, 2003.
- BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.520, p.19-32, 2004.
- BERZAS, J.J.; GUIBERTEAU, C.; VILLASEÑOR, M.J.; RODRÍGUEZ, V. Development of a capillary gas chromatographic procedure for determining selective serotonin reuptake inhibitors: Validation study and experimental design to evaluate the robustness of method. **Analytica Chimica Acta**, v.519, p.219-230, 2004.
- BHUSHAN, R.; THIONGÓ, G.T. Separation of cephalosporins on thin silica gel layers impregnated with transition metal ions and by reversed-phase TLC. **Biomedical chromatography**, v.16, p.165-174, 2002.
- BÓLOS, J.; GALINDO, C.; GALLARDO, M.; PICO, R.A. Prediction of stability of cefazolin sodium in perfusion fluids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.40, p.175-177, 1987.
- BOMPADRE, S.; FERRANTE, L.; LEONE, L. On-line solid-phase extraction of cephalosporins. **Journal of Chromatography A**, v.812, p.191-196, 1998a.
- BOMPADRE, S.; LEONE, L.; FERRANTE, L.; ALO, F.; IOANNIDIS, G. Determination of cefazolin in human serum by high performance liquid chromatography with on-line solid phase extraction. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.21, n.3, p.417-426, 1998b.
- BONFILIO, R.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an UV-derivative spectrophotometric method for determination of glimepiride in tablets. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.22, n.2, p.292-299, 2011.
- BONFILIO, R.; TARLEY, C.R.T.; PEREIRA, G.R.; SALGADO, H.R.N.; ARAÚJO, M.B. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, v.80, p.236-241, 2009.
- BP. BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2010.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho 2003.
- BRISSON, A.M.; FOURTILLAN, J.B. Determination of cephalosporins in biological material by reversed-phase liquid column chromatography. **Journal of Chromatography**, v.223, p.393-399, 1981.
- BROTZU, G. Ricerche su di un nuovo antibiotico. *Labori dezz 'Istituto d'Igiene di Cagliari*, 1948.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: AMGH, 2012. 2079p.

Referências

- CARLIER, M.; STOVE, V.; ROBERTS, J.A.; VELDE, V.J.; WAELE, J.J.; ALAIN G. VERSTRAETE, A.G. Quantification of seven β -lactam antibiotics and two β -lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.40, n.5, p.416-422, 2012.
- CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. A validated stability-indicating LC method for orbifloxacin in the presence of degradation products. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, n.3, p.1-6, 2011.
- CAZEDEY, E.C.L.; PEREZ, D.P.; PEREZ, J.P.; SALGADO, H.R.N. LC Assay for ciprofloxacin hydrochloride ophthalmic solution. **Chromatographia Supplement**, v.69, p.S241-S244, 2009.
- CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. **Pharmaceutics**, v.3, p.572-581, 2011.
- CHADHA, R.; KASHID, N.; JAIN, D.V.S. Characterization and quantification of amorphous content in some selected parenteral cephalosporins by calorimetric method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.81, p.277-284, 2005.
- CHAN, C.Y.; CHAN, K.; FRENCH, G.L. Rapid high performance liquid chromatographic assay of cephalosporins in biological fluids. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.18, n.4, p.537-545, 1986.
- CHEMKOO Laudos do fornecedor chinês. Disponível em: <http://www.chemkoo.com/en/SearchProducts.aspx?keyword=cefazolin>. Acessado 27 de agosto de 2012.
- CHOMA, I.M. TLC Separation of cephalosporins: searching for better selectivity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, n.15, p. 2231-2244, 2007.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. 8. ed. Campinas: UNICAMP, 2006. 453p.
- CORRÊA, J.C.R.; REICHMAN, C.; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. **Química Nova**, v.35, n.3, p.530-534, 2012.
- CRUCQ, A.S.; SLEGGERS, C.; DERIDDER, V.; TILQUIN, B. Radiosensitivity study of cefazolin sodium. **Talanta**, v.52, p.873-877, 2000.
- DANZER, L.A. Liquid-chromatographic determination of cephalosporins and chloramphenicol in serum. **Clinical Chemistry**, v.29, n.5, p.856-858, 1983.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, v. 7, p.21-25, 1998.
- DEPESTEL, D.D.; BENNINGER, M.S.; DANZIGER, L.; LAPLANTE, K.L.; MAY, C.; LUSKIN, A.; PICHICHERO, M.; HADLEY, J.A. Cephalosporin use in treatment of patients with penicillin allergies. **Journal of the American Pharmacists Association**, v.48, p.530-540, 2008.
- DRUG BANK Open data drug & Drug target database. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/>. Acessado 27 de agosto de 2012.
- E.P. European Pharmacopoeia. 5. ed. Council of Europe, 2005. v.2, p.1220-1222.

Referências

- EL-DESOKY, H.S.; GHONEIM, E.M.; GHONEIM, M.M. Voltammetric behavior and assay of the antibiotic drug cefazolin sodium in bulk form and pharmaceutical formulation at a mercury electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, p.1051-1056, 2005.
- EL-SHABOURY, S.R.; SALEH, G.A. MOHAMED, F.A.; RAGEH, A.H. Analysis of cephalosporin antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.45, p.1-19, 2007.
- ELIZAROVA, T.E.; SHTYLEVA, S.V.; PLETENEVA, T.V. Using near-infrared spectrophotometry for the identification of pharmaceuticals and drugs. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.42, n.7, p.432-434, 2008.
- FAGERQUIST, C.K.; LIGHTFIELD, A.R. Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, p.660-671, 2003.
- FARAG, S.A. Simultaneous liquid chromatographic analysis of the β -lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil, cephalexin, ampicillin, and cephradine in solution. **Journal of AOAC International**, v.81, p.381-385, 1998.
- FARHADI, K.; GHADAMGAHI, S.; MALEKI, R.; ASGARI, F.S. Spectrophotometric determination of selected antibiotics using prussian blue reaction. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.49, n.6, p.993-997, 2002.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <http://abiquifi.org.br/legislacao/farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf>. Acesso em: 27 agosto 2012.
- FARMACOPEIA PORTUGUESA. 8. ed. Lisboa: Imprensa Nacional, 2005.
- FARTHING, C.; FARTHING, D.; BROPHY, D.F.; TERRI LARUS, T.; MAYNOR, L.; FAKHRY, I; GEHR, T.W.B. High-Performance liquid chromatographic determination of cefepime and cefazolin in human plasma and dialysate. **Chromatographia**, v.67, n.5/6, p.365-368, 2008.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2004.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analytical Procedures and Methods Validation**. 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso em: 15 março 2013.
- FIorentino, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a UV-spectrophotometric method for determination of flucloxacillin sodium in capsules. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, p.268-276, 2011.
- FIorentino, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of flucloxacillin sodium in capsules. **International Journal of Microbiology Research**, v.4, n.4, p.213-218, 2012.
- FURLANETTO, S.; MURA, P.; GRATTERI, P.; PINZAUTI, S. Stability prediction of cefazolin sodium and cephaloridine in solid state. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20, n.14, p.2299-2313, 1994.
- GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for determination of lomefloxacin in coated tablets. **Journal of AOAC International**, v.89, n.4, p.1077-1079, 2006.

Referências

- GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Validation of UV spectrophotometric method for determination of lomefloxacin in pharmaceutical dosage form. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.24, n.3, p.406-408, 2005.
- GOODMAN, E.J.; MORGAN, M.J.; JOHNSON, P.A.; NICHOLS, B.A.; DENK, N.; GOLD, B.B. Cephalosporins can be given to penicillin-allergic patients who do not exhibit an anaphylactic response. **Journal of Clinical Anesthesia**, v.13, p.561-564, 2001.
- GRAHAM, P.L. **Pharmaceutical Chemistry - An Introduction to Medicinal Chemistry**. London: British Library, 1995. p.201-202.
- GREENWOOD, D.; CHAN-TEOH, C. H.; O'GRADY, F. Activity of cefazolin against dense populations of enterobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.7, n.2, p.191-195, 1975.
- HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. Boca Ration: Interpharm/CRC, 2004. P. 18-21.
- ICH Q2 – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology (R1)**. ICH Steering Committee, Switzerland, 2005. Disponível em: http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf. Acesso em: 15 agosto 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. DOQ-CGCRE-008, revisão 04: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2011. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>. Acesso em 27 agosto 2012.
- ISO - International Standard Organization; **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**, ISO/IEC 17025, 1999.
- JACQUELINE, C.; TATTEVIN, P. Ceftaroline, nouvelle céphalosporine active sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline: données expérimentales et cliniques, perspectives thérapeutiques. **Journal des Anti-infectieux**, v.14, p.3-10, 2012.
- J.P. Japanese Pharmacopoeia. 16. ed. 2011 Disponível em: <http://www.pmda.go.jp/english/pharmacopoeia/pdf/jpdata/JP16eng.pdf> Acessado em 23 Jan. 2013.
- KALINKOVA, G.; OVCHAROVA, G.; GAGAUZOV, I.; KRESTEV, V.; PETROV, L. Comparative IR-spectral studies of different modifications of the antibiotic Cefazolin Na. **Journal of Molecular Structure**, v.219, p.329-334, 1990.
- KAMINSKI, J.J.; BODOR, N. Determination of penicillins and cephalosporins using 3-bromo 4,4-dimethyl-2-oxazolidinone. **International Journal of Pharmaceutics**, v.3, p.151-156, 1979.
- KARAGEORGOU, E. G.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of β -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v.35, p.1-9, 2012.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 654-661.
- KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p.3, 11, 12.

Referências

- KORDS, H.; POTEL, J.; VOLLKER, W.; WEISS, C. Pharmacokinetics and endometrial and tubal tissue penetration of cefalotin and cefazolin. **Journal of Obstetrician and Gynecologic**, v.6, p.29-33, 1976.
- KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988.
- KUSABA, T. Safety and efficacy of cefazolin sodium in the management of bacterial infection and in surgical prophylaxis. **Clinical Medicine: Therapeutics**, v.1, p.1607-1615, 2009.
- LALITHA, N.; SANJAY, P.P.N.; VYSHAK, M.G.; KADRI, U. Stability-indicating reverse phase HPLC method for the determination of cefazolin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.9, n.1, p.45-50, 2010.
- LIANG, D.; CHOW, D.; WHITE, C. High-performance liquid chromatographic assay of cefazolin in rat tissues. **Journal of Chromatography B**, v.656, p.460-465, 1994.
- LI, Y.; LU, J. Chemiluminescence flow-injection analysis of β -lactam antibiotics using the luminol-permanganate reaction. **Luminescence**, v. 21, p.251-255, 2006.
- LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. **Talanta**, v.82, p.918-922, 2010.
- LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Development of a validated stability-indicating LC assay and stress degradation studies of linezolid in tablets. **Chromatographia Supplement**, v.69, p.S129-S135, 2009.
- LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of bioassay UV-spectrophotometry and high performance liquid chromatographic determination of gatifloxacin in tablets. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1831-1835, 2008.
- LOPES, W.A. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670-673, 2004.
- MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in tablets. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.44, n.1, p.136-137, 1999.
- MARONA, H.R.N. **Esparfloxacino: Estudo químico-farmacêutico e caracterização de mutantes resistentes**. Porto Alegre, 2000. 456 p. [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul].
- MARTINEZ, L.G.; CAMPINS-FALCÓ, P.; SEVILLANO-CABEZA, A.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R. Improved solid phase extraction procedure for assay of cephalosporins in human urine samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.21, p.2191-2203, 1998.
- MARTINEZ, L.G.; FALCÓ, P.C.; CABEZA, A.S. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p.405-423, 2002.
- MAYER, B.X.; PETSCH, M.; TSCHERNKO, E.M.; MULLER, M. Strategies for the determination of cefazolin in plasma and microdialysis samples by short-end capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v.24, p.1215-1220, 2003.

Referências

- MEYER, V.R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 15. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2010. p.17.
- MOHAMED, F.A.; SALEH, G.A.; EL-SHABOURY, S.R.; RAGEH, A.H. Selective densitometric analysis of cephalosporins using Dragendorff's reagent. **Journal of Chromatography**, v.68, n.5/6, p.365-374, 2008.
- MOORE, C.M.; SATO, K.; KATSUMATA, Y. High-performance liquid chromatographic determination of cephalosporin antibiotics using 0.3 mm I.D. columns. **Journal of Chromatography A**, v.539, p.215-220, 1991.
- MORENO, A.H. **Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis contendo ceftazidima**. Araraquara, 2007. 233p. [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP].
- MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v.2, n.1, p.6-11, 2012a.
- MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Comparison of high performance liquid chromatography and three titrimetric methods for the determination of ceftazidime in pharmaceutical formulations. **Advances in Analytical Chemistry**, v.2, n.3, p.6-13, 2012b.
- MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Desenvolvimento de metodologia qualitativa para identificação de ceftazidima. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.3, p.165-173, 2010.
- MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Rapid and selective uv spectrophotometric method for the analysis of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 3, p.820-823, 2009.
- MORENO, A.H.; SILVA, M. F. C. SALGADO, H.R.N. Stability study of azithromycin in ophthalmic preparations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p.219-226, 2009.
- MORENO A.H.; SALGADO H.R.N. Development of a new high-performance liquid chromatographic method for determination of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v.91, n.4, p.739-743, 2008a.
- MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometric determination of ceftazidime in pharmaceutical preparations using neocuproin as a complexing agent. **Analytical Letters**, v.41, p.1-10, 2008b.
- MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **Journal of AOAC International**, v.90, n.5, p.1379-1382, 2007.
- NAHATA, M.C. Measurement of cefazolin in peritoneal dialysis fluid and plasma HPLC. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2285-2291, 1990.
- NORBY, S.R. Side effects of cephalosporins. **Drugs**, v.34, n.2, p.105-120, 1987.
- OGOREVC, B.; HUDNIK, V.; GOMISCEK, S.; SMYTH, M.R.; VOS, J.G. A spectroscopic and polarographic investigation of the complexation of cefazolin with copper (H) ions. **Inorganica Chimica Acta**, v.108, p.L3-L6, 1985.
- OGUCHI, T.; YONEMOCHI, E.; YAMAMOTO, K. Freeze-drying of drug-additive binary systems. IV. Effects of saccharide addition on the crystallization of cefazolin sodium in frozen aqueous solution. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v.70, p.113-116, 1995.

Referências

- OHMORI, T.; SUZUKI, A.; NIWA, T.; USHIKOSHI, H.; SHIRAI, K.; YOSHIDA, S.; OGURA, S.; ITOH, Y. Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.879, p.1038-1042, 2011.
- OMAR, M.A.; ABDELMAGEED, O.H.; TAMER Z.; ATTIA, T.Z. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins in pharmaceutical formulations. **International Journal of Analytical Chemistry**, v.2009, p.1-12, 2009.
- O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14th. ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck & Co., 2006.
- OPALCHENOVA, G.; KALINKOVA, G. N. Comparative study of antibacterial activity of cefazolin sodium and of its crystalline modifications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.189, p.235-240, 1999.
- PAPAZOVA, P.; BONTCHEV, P.R.; RACAROVA, M. New spectrophotometric method for determination of cephalosporin. **Talanta**, v.30, n.1, p.51-53, 1983.
- PASSONI, M.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a new and rapid HPLC for determination of lyophilized teicoplanin. **Analytical Methods**, v.4, n.6, p.1560-1564, 2011.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage learning, 2010. 700p.
- PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1190-1198, 2008.
- PICHICHERO, M.E. Use of selected cephalosporins in penicillin-allergic patients: a paradigm shift. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.57, p.13S-18S, 2007.
- PINTO, C.G.; PAVON, J.L.P.; CORDERO, B.M. Micellar liquid chromatography of zwitterions: retention mechanism of cephalosporins. **Analyst**, v.120, p.53-62, 1995.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- PIKAL, M.J.; LUKES, A.L.; LANG, J.E.; GAINES, K. Quantitative crystallinity determinations for β lactam antibiotics by solution calorimetry: correlations with stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.67, p.767-773, 1978.
- PIPET, A.; VEYRAC, G.; WESSEL, F.; JOLLIET, P.; MAGNAN, A.; DEMOLY, P.; BOUSQUET, P.J. A statement on cefazolin immediate hypersensitivity: data from a large database, and focus on the cross-reactivities. **Clinical Experimental Allergy**, v.41, p.1602-1608, 2011.
- PITKIN, D.; ACTOR, P.; HOLL, W.; POST, A.; WEISBACH, J.A. Semiautomated turbidimetric microbiological assay for determination of cefazolin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.5, n.3, p.223-227, 1974.
- PUFAL, E.; SYKUTERA, M.; SLIWKA, K. Determination of cephalosporin antibiotics in post-mortem material. **Zagadnien Nauk Sadowych**, v.41, p.37-51, 2000.

Referências

- RAGEH, A.H.; EL-SHABOURY, S.R.; SALEH, G.A.; MOHAMED, F.A. Spectrophotometric method for determination of certain cephalosporins using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl). **Natural Science**, v.2, n.8, p.828-840, 2010.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829p.
- RANI, A.S.; JIA, W.; FENGSHENG, Z.; SU, M.; KUMAR, A.K. A new approach to separate cephalosporin mixtures using electrophoretic affinity chromatography. **International Journal of Chemical Sciences and Applications**, v.2, n.1, p.116-122, 2011.
- REYGAERT, W.C. Ceftobiprole: An emerging therapeutic option for resistant and complicated infections. **Clinical Medicine Insights: Therapeutics**, v.3, p.57-66, 2011.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.
- SALEH, G.A.; EL-SHABOURY, S.R.; MOHAMED, F.A.; RAGEH, A.H. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins using oxidized quercetin reagent. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.73, p.946-954, 2009.
- SALEH, G.A.; ASKAL, H.F.; DARWISH, I.A.; EL-SHORBAGI, A.A. Spectroscopic analytical study for the charge-transfer complexation of certain cephalosporins with chloranilic acid. **Analytical Sciences**, v.19, p.281-287, 2003.
- SALEH, G.A.; ASKAL, H.F.; RADWAN, M.F.; OMAR, M.A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins. **Talanta**, v.54, p.1205-1215, 2001.
- SALEM, H.; ASKAL, H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck's salt. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p.347-354, 2002.
- SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O.; LUCCHESI, M.B.B. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p. 443-446, 2006.
- SALGADO, H.R.N.; MORENO, A.H.; GARG, S. LC-DAD Determination of fleroxacin in bulk and pharmaceutical dosage forms. **Chromatographia Supplement**, v.69, p. S237-S250, 2009.
- SALGADO, H.R.N.; MORENO, P.R.H.; BRAGA, A.L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Photodegradation of sparfloxacin and isolation of its degradation products by preparative HPLC. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.26, n.1, p.47-54, 2005.
- SALGADO, H.R.N.; OLIVEIRA, C.L.C.G. Development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of gatifloxacin in tablets. **Die Pharmazie**, v.60, n.4, p.263-264, 2005.
- SALGADO, H.R.N.; RONCARI, A.F.F. Microbiological assay for the determination of azithromycin in ophthalmic solutions. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v.40, n.6, p.544-549, 2006.

Referências

- SALGADO, H.R.N.; TOZO, G.C.G. Microbiological assay for cefoxitin sodium in dosage form. **Journal of AOAC International**, v.90, n.2, p.452-455, 2007.
- SAMANIDOU, V.F.; HAPESHI, E.A.; PAPADOYANNIS, I.N. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporins antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. **Journal of Chromatography**, v.788, p.147-158, 2003.
- SAMER, A.R.; RAJAA, H.; DALE, A.R.; IBRAHIM A.; WESAM, K. Sensitive assay for the determination of cefazolin or ceftriaxone in plasma utilizing LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, p.281-286, 2000.
- SCHLUTER, H. Reversed-Phase Chromatography. In: KASTNER, M. *Journal of Chromatography Library* (v.61) - **Protein Liquid Chromatography**. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1999. p. 147.
- SHINDE, V.M.; SHABADI, C.V. Simultaneous determination of cefazolin and cefotaxime in injections by reverse phase HPLC. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.60, p.313-315, 1998.
- SIGNS, S.A.; FILE, T.M.; TAN, J.S. High-pressure liquid chromatographic method for analysis of cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.26, n.5, p.652-655, 1984.
- SILVA, L.M. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade de tigeciclina em produto farmacêutico**. Araraquara, 2012a. 179 p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP].
- SILVA, L.M.; ALMEIDA, A.E.; SALGADO, H.R.N. Thermal analysis and validation of UV and visible spectrophotometric methods for the determination of new antibiotic tigecycline in pharmaceutical product. **Advances in Analytical Chemistry**, v.2, n.1, p.10-15, 2012b.
- SILVA, L.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Chromatographic Science**, v.0, p.1-8, 2012c.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.K.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490p.
- SINGH, D.K.; MAHESHWARI, G. Chromatographic studies of some cephalosporins on thin layers of silica gel G–zinc ferrocyanide. **Biomedical Chromatography**, v.24, p.1084-1088, 2010.
- SØRENSEN, L.K.; SNOR, L.K.; Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.145-151, 2000.
- SUM, H.; WEI, L.; ZUO, Y.; WU, Y. Effective separation and simultaneous detection of gatifloxacin, aminomethylbenzoic acid, cefazolin and cefminox in human urine by capillary zone electrophoresis. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v.8, n.4, p.1043-1051, 2011.
- SUN, Y.; TANG, Y.; YAO, H.; ZHENG, X. Potassium permanganate–glyoxal chemiluminescence system for flow injection analysis of cephalosporin antibiotics: cefalexin, cefadroxil, and cefazolin sodium in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v.64, p.156-159, 2004.
- SWEETMAN, S.C. Ed. **Martindale. The complete drug reference**. 36. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 3694p.

Referências

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. 14th ed. New York: Merck Co, 2006.

THONGPOON, C.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, 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. **Analytica Chimica Acta**, v.553, p.123-133, 2005.

TORTOLANI, G.; ROMAGNOLI, E. Chromatography of cephalosporins on DEAE-Sephadex. **Journal of Chromatography**, v.120, p.149-153, 1976.

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

TOZO, G.C.G. **Análise qualitativa e quantitativa de cefoxitina sódica em injetáveis: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo de estabilidade**. Araraquara, 2007. 224 p. [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP].

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

TSAI, T.H.; CHEN Y.F. Simultaneous determination of cefazolin in rat blood and brain by microdialysis and microbore liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v.14, p. 274-278, 2000.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33rd ed. Rockville: **The United States Pharmacopeial Convention**, 2010.

VANDAMME, E.J.; VOETS, J.P. Separation and detection of degradation products of penicillins and cephalosporins by means of thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, v.71, p.141-148, 1972.

VIEIRA, D.C.M. **Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade de cefuroxima sódica injetável**, Araraquara, 2010. 228 p. [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP]

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

WANG, G.; LIU, S.J.; UENG, S.W.N.; CHAN, E.C. The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v.273, p.203-204, 2004.

WENG, L.; LU, Y.; SHI, L.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; GUO, X.; XU, J. In situ investigation of drug diffusion in hydrogels by the refractive index method. **Analytical Chemistry**, v.76, p.2807-2812, 2004.

WEST-WARD PHARMACEUTICALS Laudos de análises de fornecedores, com sede em Eatontown, Nova Jersey, Disponível em:

<http://www.west-ward.com/images/files/material/Cefazolin%20MSDS%2012.08.09.pdf> Acesso em: 27 Agosto 2012.

Referências

WHITE, E.R.; CARROLL, M.A.; ZAREMBO, J.E.; BENDER, A.D. Reverse phase high speed liquid chromatography of antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, v.28, n.3, p.205-214, 1975.

WOLD, J.S. Rapid analysis of cefazolin in serum by high-pressure liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.11, n.1, p.105-109, 1977.

WOLD, J.S.; TURNIPSEED, S.A. The simultaneous quantitative determination of cephalothin and cefazolin in serum by high pressure liquid chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v.78, p.203-207, 1977.

YANG, J.H.; MA, Q.L.; WU, X.; SUN, L.M.; CAO, X.H. A new luminescence spectrometry for the determination of some β -lactamic antibiotics. **Analytical Letters**, v.32, p.471-480, 1999.

YEH, L.L.L.; CHI, C.L. Another look at differences in the susceptibility of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* to cephalothin and cefazolin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 521-524, 2001.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. The Association of Official Analytical Chemistry. v.33, Washington, DC, 1975.

ZAPPALA, A.F.; HOLL, W.W.; POST, A. **Cefazolin**. In: FLOREY, K. (Ed.). Analytical Profiles of Drug Substances. Nova York: Academic Press, 1975, p. 1-20.

ZHANG, X.; FENG, Y.; HU, C. Feasibility and extension of universal quantitative models for moisture content determination in beta-lactam powder injections by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v.630, p.131-140, 2008.