

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ESTUDO DE
DEGRADAÇÃO FORÇADA DE CEFALOTINA SÓDICA NA FORMA
FARMACÊUTICA PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL**

KAREN DE SOUZA RUGANI

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA-SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ESTUDO DE
DEGRADAÇÃO FORÇADA DE CEFALOTINA SÓDICA NA FORMA
FARMACÊUTICA PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL**

KAREN DE SOUZA RUGANI

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

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA-SP

2015

Ficha Catalográfica

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

R928d

Rugani, Karen de Souza

Desenvolvimento de método analítico para estudo de degradação forçada de cefalotina sódica na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável / Karen de Souza Rugani — Araraquara, 2015

146 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. Cefalotina. 2. Produtos de degradação. 3. Cromatografia líquida. 4. Indicativo de estabilidade I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*“... nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em
coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam.”*

I Coríntios 2.9

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois foi Ele
quem me capacitou. Dedico também à minha querida família,
toda minha gratidão pela imensurável compreensão,
incentivo, força, carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

É com imenso carinho que agradeço, sinceramente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a elaboração deste trabalho:

Primeiramente, agradeço a Deus, por abrir as portas e me capacitar para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amados pais, Milton e Paulina, por sempre me apoiarem e incentivarem em minhas decisões.

À minha irmã, Janaina, agradeço a amizade, o carinho e o incentivo de sempre.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado, pela maneira acolhedora que me recebeu, pela oportunidade de entrar para sua equipe, por fazer parte desse projeto, além da confiança, incentivo, paciência e dedicação. A você minha grande admiração e gratidão!

Agradeço ao gerente técnico da Bioagri Laboratórios, Edivan Tonhi, por ter permitido a realização do mestrado mesmo sendo colaboradora da empresa, e também pela ajuda, conselhos e fornecimento de material científico e conhecimento técnico que agregaram tanto valor neste trabalho.

Ao coordenador de desenvolvimento analítico da Bioagri Laboratórios, José Augusto Emeri, chefe e amigo, que sempre me apoiou na realização deste projeto, sua ajuda, contribuição e paciência foram fundamentais para que este sonho se tornasse realidade. Obrigada por tudo!

No meu caminho tive o prazer de conhecer e adotar como parte da minha família meus queridos colegas: Martina Borges, Cristiane Pissinato, Juliana Roque, Márcio Liberalle, Luiz Henrique, Camila Tot, Elen Moraes e Ariane Faé.

À Prof^a. Dr^a. Cristina Duarte Vianna e à Prof^a. Dr^a. Josilene Chaves Ruela por terem participado do meu exame de qualificação, colaborando com correções e sugestões para tornar este trabalho melhor.

Ao Prof. Dr. Adriano Antunes de Araújo e ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh, pelas correções e sugestões na participação na Comissão Examinadora da defesa da Dissertação.

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

A todos os professores da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), pela formação sólida e de qualidade.

Ao Laboratório Farmacêutico União Química, pela gentil doação das amostras de Cefalotil[®].

À Bioagri Laboratórios pela oportunidade de ter realizado este trabalho utilizando toda a estrutura da empresa, desde a utilização dos equipamentos, reagentes, solventes e padrões analíticos. Também agradeço pela parceria firmada com a UNESP e que permitiu a realização deste projeto.

RESUMO

A cefalotina (CET) é um antimicrobiano β -lactâmico semi-sintético, bactericida e representa o protótipo das cefalosporinas, pertencente à classe da primeira geração. As cefalosporinas apresentam um espectro de atividade mais amplo do que as penicilinas e são amplamente prescritas. Poucos métodos analíticos são descritos na literatura para a análise de CET, e ao nosso conhecimento, nenhum método rápido e indicativo de estabilidade por cromatografia líquida para este composto foi publicado anteriormente. Foi desenvolvido um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida em fase reversa para determinação quantitativa de CET, na presença de impurezas e produtos de degradação gerados a partir dos estudos de degradação forçada em amostras de pó liofilizado para injeção. O método desenvolvido é também aplicável para a determinação de substâncias relacionadas em matéria-prima e em formas farmacêuticas. A separação cromatográfica foi obtida com a coluna Agilent Eclipse XDB-Phenyl, de 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, em fase móvel composta por uma mistura das soluções A (tampão fosfato de amônio, pH 4,5) e B (acetonitrila), no modo de eluição gradiente. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min e o comprimento de onda 238 nm. O fármaco foi submetido a condições de estresse por hidrólise, oxidação, fotólise, umidade e degradação térmica. Obteve-se degradação considerável nas condições de hidrólise alcalina, ácida e estresse oxidativo. No método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a resolução entre CET e os seus potenciais produtos de degradação foi maior que 2,4; além disso, a pureza de pico de CET em todas as condições foi maior que 99%, demonstrando o poder indicativo de estabilidade do método. A impureza B (desacetilcefalotina) que é um metabólito menos ativo da CET foi identificada e apresentou formação significativa, especialmente na condição alcalina. Este método é capaz de detectar os produtos de degradação de CET a 0,05% em relação à concentração nominal do ensaio (500 μ g/mL), para um volume de injeção de 10 μ L. O intervalo de concentração obtido foi de 250 a 750 μ g/mL, a exatidão de 99,41%, teor de 99,72% e tempo de retenção médio foi de 14,8 minutos. O método por CLAE desenvolvido foi validado em relação à linearidade, exatidão, precisão, especificidade, limite de quantificação, limite de detecção e robustez, de acordo com as guias do ICH e com a legislação brasileira. Este método pode ser aplicado para avaliar a qualidade de amostras de cefalotina matéria-prima, produto acabado e para estudos de estabilidade.

Palavras-chave: cefalotina, cefalosporina, produtos de degradação, cromatografia líquida, indicativo de estabilidade, validação.

ABSTRACT

Cephalothin (CET) is a semi-synthetic β -lactam antimicrobial compound, bactericidal, and it represents the prototype of cephalosporins, which belongs to the first-generation class. Cephalosporins present a larger spectrum of activity than penicillins and they are widely prescribed. Few analytical methods are described in the literature for the analysis of CET and to our knowledge rapid stability-indicating liquid chromatography (LC) methods for this compound have not been published elsewhere. A stability-indicating gradient reversed phase liquid chromatography (RP-LC) method has been developed for the quantitative determination of CET, in the presence of its impurities and degradation products generated from forced degradation studies, in samples of lyophilized powder for injection. The developed method is also applicable for the related substances determination in bulk drugs and pharmaceutical forms. The chromatographic separation was achieved on an Agilent Eclipse XDB-Phenyl, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m column with mobile phase containing a gradient mixture of solutions A (aqueous ammonium phosphate buffer, pH 4.5) and B (acetonitrile) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 238 nm. The drug substance was subjected to stress conditions of hydrolysis, oxidation, photolysis, humidity and thermal degradation. Considerable degradation was found to occur in base, acid and oxidative stress conditions. In the developed high performance liquid chromatography (HPLC) method, the resolution between CET and its potential degradation products was found to be greater than 2.4, further, the peak purity of CET in all conditions were more than 99% proving the stability-indicating power of method. The less active metabolite of CET, desacetylcephalothin (impurity B), was identified and is showed significant formation especially in alkaline condition. This method is able to detect the degradation products of CET at a level of 0.05% with respect to test concentration of 500 μ g/mL for a 10 μ L injection volume. The concentration range obtained was 250 to 750 μ g/mL, accuracy of 99.41%, content of 99.72% and average retention time of 14.8 minutes. The HPLC method developed was validated with respect to linearity, accuracy, precision, specificity, limit of quantitation, limit of detection and robustness, according to ICH guidelines and Brazilian legislation. This method can be applicable to evaluate the quality of the drug substance, product samples as well as for stability studies of cephalothin.

Keywords: cephalothin, cephalosporin, degradation products, liquid chromatography, stability-indicating, validation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. Cefalosporinas	25
3.1.1 História	26
3.1.2. Química	27
3.1.3. Mecanismo de ação	28
3.1.4. Classificação das cefalosporinas	29
3.1.5. Resistência bacteriana a cefalosporinas.....	34
3.1.6. Cefalotina sódica	35
3.2. Aspectos gerais do fármaco	40
3.2.1. Descrição geral	40
3.2.2. Diluentes.....	42
3.3. Métodos analíticos	42
3.4. Controle de qualidade	50
3.4.1. Estabilidade farmacêutica	50
3.4.2. Degradação forçada.....	52
3.4.3. Validação de métodos analíticos.....	54
4. MATERIAL	60
4.1. Substância química de referência (SQR)	60
4.2. Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável	60
4.3. Reagentes.....	60
4.4. Equipamentos	61
5. MÉTODOS.....	61
5.1. Desenvolvimento do método analítico	61
5.2. Definição do método analítico	63

5.3. Estudo de degradação forçada	66
5.3.1. Condução do estudo	66
5.4. Validação do método	68
5.4.1. Adequação do sistema (<i>System Suitability</i>)	69
5.4.2. Linearidade	69
5.4.3. Precisão	69
5.4.4. Exatidão	70
5.4.5. Robustez	71
5.4.6. Especificidade e seletividade	71
5.4.7. Limite de detecção (LD)	72
5.4.8. Limite de quantificação (LQ)	72
6. RESULTADOS	74
6.1. Desenvolvimento de método analítico	74
6.2. Estudo de degradação forçada	77
6.2.1. Identificação da impureza B (desacetilcefalotina)	78
6.2.2. Condição normal (controle)	79
6.2.3. Condição de hidrólise ácida	81
6.2.4. Condição de hidrólise alcalina	83
6.2.5. Condição oxidativa	85
6.2.6. Condição de fotodegradação	87
6.2.7. Condição sob calor	88
6.2.8. Condição de umidade	90
6.2.9. Produtos de degradação	92
6.2.10. Espectros de absorção em 3D	98
6.3. Validação de método analítico	107
6.3.1. Adequação do sistema (<i>System Suitability</i>)	107
6.3.2. Linearidade	109
6.3.3. Precisão	112
6.3.4. Exatidão	113
6.3.5. Limite de detecção	114
6.3.6. Limite de quantificação	115

6.3.7. Seletividade/Especificidade.....	116
6.4. Estabilidade das soluções de cefalotina sódica SQR e amostra.....	118
7. DISCUSSÃO	120
8. CONCLUSÕES.....	128
9. PERSPECTIVAS.....	130
10. TRABALHOS REALIZADOS.....	132
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Antimicrobianos β -lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemos e inibidores da β -lactamase (ácido clavulânico e sulbactam).....	25
Figura 2	Estrutura do ácido 6-aminopenicilânico e do núcleo do ácido 7-aminocefalosporânico (núcleo cefêmico). A = anel diidrotiazínico; B = anel β -lactâmico.....	27
Figura 3	Cefalosporinas de primeira geração.....	30
Figura 4	Cefalosporinas de segunda geração.....	31
Figura 5	Cefalosporinas de terceira geração.....	32
Figura 6	Cefalosporinas de quarta geração.....	33
Figura 7	Cefalosporinas de quinta geração.....	34
Figura 8	Local de clivagem da ligação β -lactâmica.....	35
Figura 9	Estrutura química da cefalotina.....	36
Figura 10	Estrutura química da desacetilcefalotina (impureza B).....	38
Figura 11	Cromatograma de cefalotina sódica SQR obtido durante o desenvolvimento do método analítico. Fase móvel: tampão fosfato de potássio/metanol (80:20). Coluna: Agilent Eclipse XDB-C ₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m).....	74
Figura 12	Cromatograma de cefalotina sódica amostra (500 μ g/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).....	76
Figura 13	Cromatograma ampliado de cefalotina sódica amostra (500 μ g/mL) no método proposto.....	76
Figura 14	Cromatograma representativo do padrão de impureza B (desacetilcefalotina).....	79
Figura 15	Espectro de absorção da solução padrão de impureza B (desacetilcefalotina).....	79

Figura 16	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sem estresse (placebo controle). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	80
Figura 17	Espectro de absorção da amostra de cefalotina incluindo demonstrativo de pureza de pico.....	80
Figura 18	Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob hidrólise ácida (HCl 0,1 M a 60 °C, após 40 minutos). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	81
Figura 19	Cromatograma ampliado da amostra de cefalotina contemplando seus produtos de degradação sob condição de estresse ácida (HCl 0,1 M a 60 °C, após 40 minutos).....	82
Figura 20	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob hidrólise ácida (HCl 0,1 M a 60 °C, após 40 minutos). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	82
Figura 21	Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M em temperatura ambiente, após 5 min). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	83
Figura 22	Cromatograma ampliado da amostra de cefalotina contemplando seus produtos de degradação sob condição de estresse alcalina (NaOH 0,01 M em temperatura ambiente, após 5 minutos).....	84
Figura 23	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M em temperatura ambiente, após 5 min). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	84

Figura 24	Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob oxidação (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, 20 min). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	85
Figura 25	Cromatograma ampliado da amostra de cefalotina contemplando seus produtos de degradação sob condição de estresse oxidativo (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, após 20 minutos).....	86
Figura 26	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob oxidação (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, 20 minutos). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	86
Figura 27	Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada de exposição à luz (fotodegradação – UV/VIS a 25 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	87
Figura 28	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada de exposição à luz (fotodegradação – UV/VIS a 25 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	88
Figura 29	Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob calor (60 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	89
Figura 30	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob calor (60 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	89
Figura 31	Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob umidade (30 °C/75% UR, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).....	90

Figura 32	Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob umidade (30 °C/75% UR, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	91
Figura 33	Espectros de absorção dos produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise ácida (t_{RR} = tempo de retenção relativo).....	93
Figura 34	Espectros de absorção dos produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise alcalina (t_{RR} = tempo de retenção relativo).....	95
Figura 35	Espectros de absorção dos produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição oxidativa (t_{RR} = tempo de retenção relativo).....	97
Figura 36	Espectro 3D de cefalotina SQR.....	99
Figura 37	Espectro 3D do branco (água ultrapura).....	99
Figura 38	Espectro 3D da amostra controle de cefalotina.....	100
Figura 39	Espectro 3D do placebo controle.....	100
Figura 40	Espectro 3D da amostra de cefalotina após hidrólise ácida.....	101
Figura 41	Espectro 3D do placebo após hidrólise ácida.....	101
Figura 42	Espectro 3D da amostra de cefalotina após hidrólise alcalina.....	102
Figura 43	Espectro 3D do placebo após hidrólise alcalina.....	102
Figura 44	Espectro 3D da amostra de cefalotina após estresse oxidativo.....	103
Figura 45	Espectro 3D do placebo após estresse oxidativo.....	103
Figura 46	Espectro 3D da amostra de cefalotina sob fotodegradação.....	104
Figura 47	Espectro 3D do placebo sob fotodegradação.....	104
Figura 48	Espectro 3D da amostra de cefalotina após exposição ao calor.....	105
Figura 49	Espectro 3D do placebo após exposição ao calor.....	105
Figura 50	Espectro 3D da amostra de cefalotina após exposição à umidade.....	106

Figura 51	Espectro 3D do placebo após exposição à umidade.....	106
Figura 52	Cromatograma da solução padrão de cefalotina.....	107
Figura 53	Dados obtidos no cromatograma da primeira injeção da solução padrão de cefalotina na adequação do sistema.....	108
Figura 54	Curva analítica de cefalotina SQR obtida pelo método CLAE. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente), vazão de 1,0 mL/min. Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).....	111
Figura 55	Cromatograma representativo do LD para a cefalotina por CLAE.....	115
Figura 56	Cromatograma representativo do LQ para a cefalotina por CLAE.....	116
Figura 57	Cromatogramas realizados no estudo de seletividade do método CLAE frente à sobreposição de cefalotina sódica pó para injeção e placebo.....	117
Figura 58	Cromatograma representativo do branco (diluyente).....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Posologia usual para a cefalotina sódica.....	39
Tabela 2	Métodos para determinação de cefalotina em matriz biológica por CLAE.....	44
Tabela 3	Métodos para determinação de cefalotina em outras matrizes por CLAE.....	47
Tabela 4	Limites de notificação dos produtos de degradação formados durante o estudo de estabilidade de medicamentos.....	54
Tabela 5	Testes necessários para a validação do método analítico, de acordo com a finalidade.....	56
Tabela 6	Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento de método por CLAE para a cefalotina sódica.....	62
Tabela 7	Parâmetros estabelecidos para a determinação de cefalotina sódica no método indicador de estabilidade por CLAE.....	63
Tabela 8	Gradiente utilizado no método de cefalotina sódica por CLAE.....	64
Tabela 9	Preparo das soluções para o teste de recuperação.....	70
Tabela 10	Parâmetros analíticos alterados na robustez.....	71
Tabela 11	Produtos de degradação presentes na amostra de cefalotina sódica.....	77
Tabela 12	Porcentagem de degradação da cefalotina na amostra submetida às condições de degradação forçada.....	78
Tabela 13	Resumo dos resultados da degradação forçada para a amostra de cefalotina.....	91
Tabela 14	Produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise ácida.....	91
Tabela 15	Pureza de pico dos produtos de degradação formados na amostra submetida à hidrólise ácida.....	94
Tabela 16	Produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise alcalina.....	94

Tabela 17	Pureza de pico dos produtos de degradação formados na amostra submetida à hidrólise alcalina.....	96
Tabela 18	Produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição oxidativa.....	96
Tabela 19	Pureza de pico dos produtos de degradação formados na amostra submetida à oxidação.....	98
Tabela 20	Análise de adequação do sistema para o método por CLAE para análise de cefalotina sódica.....	109
Tabela 21	Valores das áreas referentes ao pico de CET SQR para a construção da curva analítica por CLAE.....	110
Tabela 22	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de CET SQR, utilizando o método por CLAE.....	111
Tabela 23	Precisão de CET no método indicativo de estabilidade por CLAE.....	112
Tabela 24	Recuperação obtida para a determinação de CET por CLAE.....	113
Tabela 25	Parâmetros avaliados na robustez do método analítico para determinação de CET por CLAE.....	114
Tabela 26	Áreas obtidas para o limite de detecção para CET.....	114
Tabela 27	Áreas obtidas para o limite de quantificação da cefalotina.....	115
Tabela 28	Estabilidade da solução de CET SQR e amostra após 24 horas em temperatura ambiente e refrigerada.....	118
Tabela 29	Estabilidade da solução de CET SQR e amostra em temperatura ambiente.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

7-ACA: ácido 7-aminocefalosporânico
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As: fator de assimetria
CAS: *Chemical Abstract Service*
CBM: Concentração bactericida mínima
CIM: Concentração inibitória mínima
CET: Cefalotina sódica
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
DAD: *Diode array detector*
DEG: produto de degradação
DPR: desvio padrão relativo
e.p.m.: erro padrão da média
FC: fator de cauda
FDA: *Food and Drug Administration*
IM: Intramuscular
ISO: *International Standard Organization*
IV: Intravenoso
k': Fator de capacidade
LD: Limite de detecção
LQ: Limite de quantificação
N: número de pratos
OMS: Organização Mundial da Saúde
r: coeficiente de correlação
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RE: Resolução
SQR: substância química de referência
t_R: tempo de retenção
t_{RR}: tempo de retenção relativo
UR: umidade relativa

UV: ultravioleta

VIS: visível

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos vêm sendo cada vez mais um motivo de preocupação e de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo em relação ao controle de qualidade. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para o controle de qualidade de medicamentos comercializados (PARISOTTO et al., 2005).

A segurança e a eficácia de produtos farmacêuticos são duas questões de importância fundamental na terapêutica medicamentosa. As impurezas presentes nos fármacos e produtos acabados podem apresentar efeitos farmacológicos e toxicológicos indesejáveis. O monitoramento e controle das impurezas de maneira eficaz auxiliam na garantia da qualidade e segurança de um medicamento (RAO; NAGARAJU, 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a estabilidade farmacêutica é descrita como a capacidade do medicamento em manter suas propriedades químicas, físicas e microbiológicas, dentro dos limites especificados, durante todo o seu prazo de validade (WHO, 1996).

Atualmente, a maioria das determinações de impurezas relacionadas é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que oferece a sensibilidade desejada para determinações em níveis muito baixos e com elevado grau de automação. Uma grande variedade de fases estacionárias e modos de operação de CLAE aplicam-se à determinação em diversas classes de fármacos. Em relação à análise de antimicrobianos, muitos dos métodos utilizados se baseiam nesta técnica (RAO; NAGARAJU, 2003), além do mais, as análises por CLAE tendem a ser mais rápidas que os métodos microbiológicos.

No desenvolvimento de métodos, os estudos de degradação forçada são realizados para demonstrar a especificidade do método, principalmente quando há pouca informação disponível sobre os potenciais produtos de degradação do fármaco em análise (REYNOLDS et al., 2002). A degradação forçada pode ser definida como uma degradação que é realizada no fármaco e no medicamento em condições mais severas do que as condições utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada. Fornece uma visão sobre vias de degradação e produtos de degradação do fármaco, colaborando também na elucidação da estrutura dos produtos de degradação (BLESSY et al., 2014).

A cefalotina sódica é classificada como um antimicrobiano cefalosporínico de primeira geração. As cefalosporinas atuam por inibição da síntese de parede celular bacteriana

e apresentam um espectro de atividade mais amplo que as penicilinas por serem mais estáveis a muitas β -lactamases bacterianas (SADER; JONES, 1992; KATZUNG, 2005). Esta é a classe de antimicrobianos β -lactâmicos mais amplamente prescrita e comercializada (WALSH, 2003).

A cefalotina foi a primeira cefalosporina disponível para uso clínico nos EUA e é mais ativa contra cocos Gram-positivos, incluindo estafilococos oxacilina-sensíveis e *Streptococcus* spp, além de possuir atividade moderada contra alguns bacilos Gram-negativos (SADER; JONES, 1992). É indicada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles (BRASIL, 2007).

Considerando a relevância das cefalosporinas na terapia medicamentosa, neste caso em especial a cefalotina sódica, assim como a importância de métodos indicativos de estabilidade para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, o objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para este fármaco na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável, já que, embora existam vários métodos analíticos descritos na literatura para a CET, não havia nenhum método indicativo de estabilidade.

A importância de se desenvolver métodos indicativos de estabilidade está relacionada ao fato de que nem todos os métodos de doseamento descritos nas monografias oficiais são adequados para a determinação da estabilidade, já que em alguns não se pode diferenciar o fármaco na presença de seus produtos de degradação, o que caracteriza uma falta de especificidade do método analítico quando utilizado para este fim. Sendo assim, o principal objetivo de um método indicativo de estabilidade é monitorar tanto o teor do fármaco quanto a formação de produtos de degradação no produto final durante os estudos de estabilidade, requisito necessário para o registro ou renovação de registro de medicamentos, e prestar-se também para o controle de qualidade.

A farmacopeia europeia (2011) descreve o doseamento e a determinação das substâncias relacionadas na matéria-prima cefalotina sódica por CLAE, porém, são utilizados dois métodos separados, um para o doseamento da cefalotina sódica, e o outro para a determinação das substâncias relacionadas, sendo que este último apresenta um longo tempo de corrida cromatográfica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar método analítico com degradação forçada (método indicativo de estabilidade) para o doseamento de cefalotina sódica em pó liofilizado para solução injetável por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o detector ultravioleta com arranjo de diodos (UV/DAD).

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método de análise de cefalotina sódica na presença de seus produtos de degradação em pó liofilizado para solução injetável por meio de CLAE.
- Caracterizar e estudar a degradação forçada para o ativo cefalotina sódica.
- Identificar e separar a principal impureza conhecida da CET (impureza B), um metabólito menos ativo, a desacetilcefalotina.
- Separar cromatograficamente todos os produtos de degradação da cefalotina.
- Quantificar, em área %, os produtos de degradação, por meio de sua área individual porcentual.

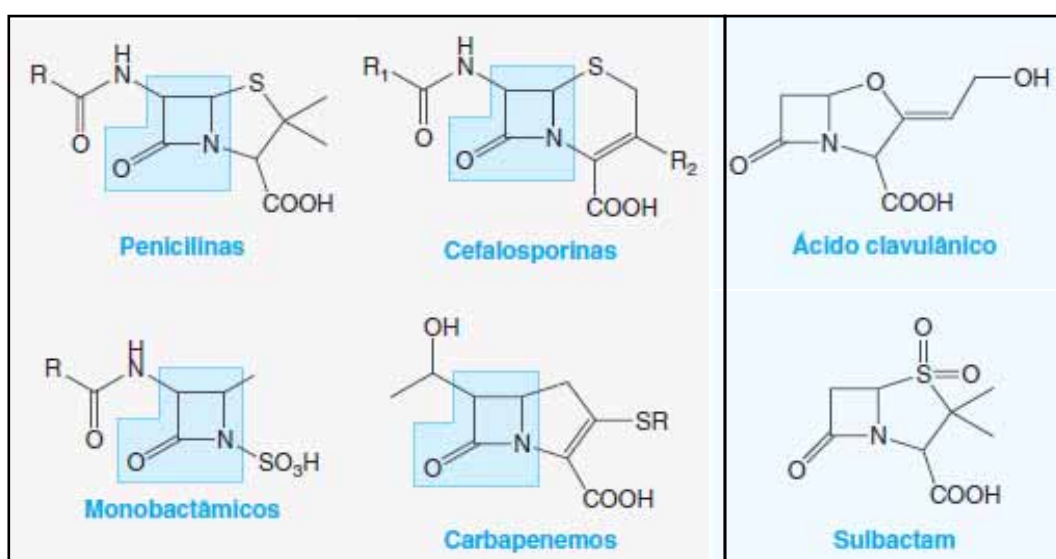
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cefalosporinas

As cefalosporinas são classificadas como antimicrobianos β -lactâmicos, juntamente com as penicilinas, cefamicinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases (RANG; DALE; RITTER, 2001; DeLUCIA et al., 2007). Os antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente prescritos, apresentam estrutura e mecanismo de ação comuns, e atuam inibindo a síntese de parede celular bacteriana (HARDMAN; LIMBIRD, 2003), são, portanto, antimicrobianos bactericidas (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2000). Na Figura 1, estão representados os antimicrobianos β -lactâmicos.

Figura 1 - Antimicrobianos β -lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemos e inibidores da β -lactamase (ácido clavulânico e sulbactam)



Fonte: GOLAN et al., 2012.

Segundo Katzung (2005), os antimicrobianos do grupo das cefalosporinas são frequentemente utilizados na medicina humana para tratamento de infecções causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Continuam sendo medicamentos de interesse, já que são seguros, ativos contra *Staphylococcus aureus* produtores de penicilinase (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2000), e podem ser usados como alternativa em pacientes

com alergias às penicilinas, não mediadas por IgE (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2000; DeLUCIA, 2007).

As cefalosporinas são semelhantes às penicilinas considerando-se os aspectos químicos, o mecanismo de ação e a toxicidade. Apresentam um espectro de atividade mais amplo que as penicilinas por serem mais estáveis a muitas β -lactamases bacterianas, porém não apresentam atividade contra enterococos e *Listeria monocytogenes* (HARDMAN; LIMBIRD, 2003; KATZUNG, 2005).

As cefalosporinas apresentam eficácia terapêutica tanto como agentes terapêuticos quanto profiláticos (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). São antimicrobianos eficazes no tratamento de muitas infecções no trato respiratório, dos ossos e da pele, sendo a primeira escolha para infecções causadas por *Klebsiella* (De LUCIA, 2007).

3.1.1 História

A descoberta das cefalosporinas teve seu início durante a Segunda Guerra Mundial, quando Giuseppe Brotzu, professor do Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari na Itália, pesquisava fungos semelhantes ao *Penicillium* que apresentassem capacidade de produzir substâncias antibacterianas (TAVARES, 1999).

A primeira fonte das cefalosporinas foi o fungo *Cephalosporinum acremonium*, isolado em 1948, no mar próximo a uma saída de esgoto na costa da Sardenha, e os filtrados não purificados destas culturas inibiam o crescimento do *S. aureus in vitro* e promoviam a cura de infecções estafilocócicas e da febre tifóide no homem (KALANT; ROSCHLAU, 1991; HARDMAN; LIMBIRD, 2003; DeLUCIA et al., 2007). Os trabalhos realizados com este fungo levaram à identificação de três antibióticos diferentes, denominados como cefalosporinas N, C e P. As cefalosporinas N e C são quimicamente relacionadas à penicilina e cefalosporina P é um antibiótico esteróide semelhante ao ácido fusídico (RANG; DALE; RITTER, 2001).

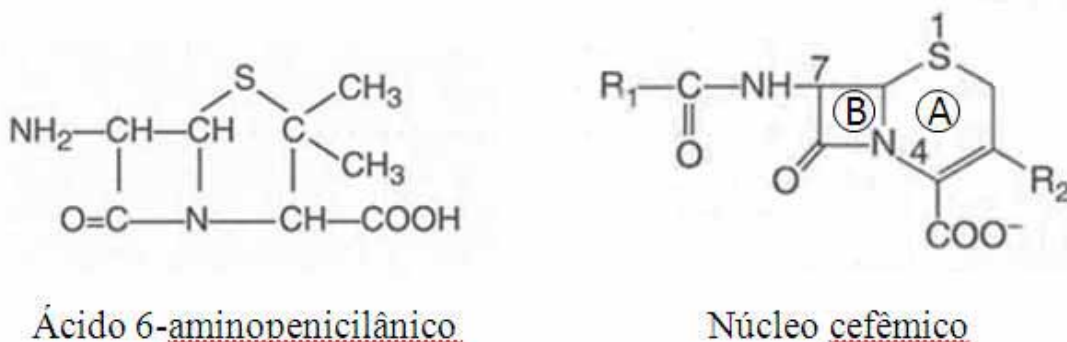
A cefalosporina C foi descoberta em 1953 por Newton e Abraham, e revelou-se um antibiótico com fraca ação antimicrobiana, porém de amplo espectro de ação e sem suscetibilidade à ação da penicilinase estafilocócica, mostrando-se como um agente completamente novo (TAVARES, 1999). A partir do isolamento do núcleo da cefalosporina C, o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), juntamente com acréscimos das cadeias laterais,

foram produzidas as cefalosporinas semi-sintéticas que apresentam atividade antibacteriana muito superior ao composto original (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

3.1.2 Química

A estrutura das cefalosporinas, assim como das penicilinas, possui um anel β -lactâmico contendo um anel de diidrotiazina com ácido d-alfa-aminoadípico (HEIM et al., 1984; BAYER et al., 1989; PATIL; JACOB, 2012). O ácido 7-aminocefalosporânico, núcleo das cefalosporinas, também conhecido como núcleo cefêmico, é semelhante, porém não idêntico ao ácido 6-aminopenicilânico, núcleo da penicilina (KALANT; ROSCHLAU, 1991; KATZUNG, 2005), representados na Figura 2. Assim como nas penicilinas, o anel β -lactâmico é o responsável nas cefalosporinas pela atividade antibacteriana, instabilidade em meio ácido, reações de hipersensibilidade e suscetibilidade à ação das β -lactamases (KALANT; ROSCHLAU, 1991).

Figura 2 - Estrutura do ácido 6-aminopenicilânico (penicilinas) e do núcleo do ácido 7-aminocefalosporânico ou núcleo cefêmico (cefalosporinas). A = anel diidrotiazínico; B = anel β -lactâmico



Fonte: adaptado de HARDMAN; LIMBIRD, 2003.

É notável que os grupos R_1 e R_2 sejam responsáveis pela diversidade das cefalosporinas e pela boa atividade terapêutica aliada a baixa toxicidade, já que a atividade antimicrobiana intrínseca das cefalosporinas naturais é conhecida como baixa (KATZUNG, 2005). São agentes hidrossolúveis, ocorrendo variação na sensibilidade às β -lactamases (RANG; DALE; RITTER, 2001). As cefalosporinas são antibióticos menos tóxicos e de

amplo espectro quando comparados à ação da ampicilina (HEIM et al., 1984; BAYER et al., 1989).

A presença do anel β -lactâmico intacto é essencial para a atividade antimicrobiana das cefalosporinas (JACOB; PATIL, 2012). De acordo com Tavares (1999), substituições realizadas na cadeia lateral ligada ao carbono 3 do anel diidrotiazínico são responsáveis pela alteração das propriedades farmacocinéticas, já as modificações no anel β -lactâmico, ou próximas ao anel, aumentam ou diminuem as resistências às β -lactamases e, por conseguinte, substituições feitas mais distantes do núcleo, na cadeia lateral ligada ao carbono 7, podem afetar as propriedades farmacológicas e antibacterianas.

3.1.3 Mecanismo de ação

As cefalosporinas atuam por inibição da síntese de parede celular bacteriana, a qual é indispensável para o desenvolvimento e crescimento normais nas bactérias. Um dos seus componentes é o peptidoglicano (mureína, mucopeptídio), sendo este o responsável pela estabilidade mecânica rígida da parede celular devido à sua estrutura entrelaçada com alto índice de ligação cruzada (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). As cefalosporinas e as penicilinas se ligam ao local ativo das enzimas transpeptidases, responsáveis pela transpeptidação, que efetuam as ligações cruzadas das cadeias peptídicas ligadas ao arcabouço do peptidoglicano, impedindo a formação destas ligações (KALANT; ROSCHLAU, 1991; RANG; DALE; RITTER, 2001; DeLUCIA, 2007; GOLAN et al., 2012), ocorre especificamente a inibição da ligação cruzada dos polímeros de mureína (GOLAN et al., 2012). A morte celular deve-se à inativação de um inibidor de enzimas autolíticas (autolisinas) na parede celular (RANG; DALE; RITTER, 2001). No entanto, as cefalosporinas e penicilinas são, via de regra, bactericidas somente para as bactérias em divisão ativa, ou seja, que estejam em crescimento ativo e sintetizando a parede celular (KATZUNG, 2005; GOLAN et al., 2012).

Em resumo, o mecanismo de ação das cefalosporinas, assim como das penicilinas, pode ser descrito pela interferência na síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana (RANG; DALE; RITTER, 2001).

3.1.4 Classificação das cefalosporinas

Com a evolução das cefalosporinas e o conhecimento de suas diversas propriedades, principalmente no que diz respeito ao espectro de atividade, esta classe de antimicrobianos foi dividida em cinco diferentes gerações (KALANT; ROSCHLAU, 1991). Geralmente, os compostos de primeira geração possuem melhor atividade contra micro-organismos Gram-positivos, enquanto os de gerações mais avançadas apresentam maior atividade contra os aeróbios Gram-negativos (KATZUNG, 2005; EL-SHABOURY et al., 2007) e diminuição da atividade antiestafilocócica (DeLUCIA, 2007).

De acordo com Patil e Jacob (2012), dados recentes mostram que mais de 20 cefalosporinas foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e novos agentes continuam a aparecer, visto que esta classe de antimicrobianos possui um excelente perfil de segurança e uma estrutura básica que permite numerosas modificações moleculares, resultando, portanto, em diversas substâncias com diferentes espectros de atividade antimicrobiana.

Deve-se ressaltar que as cefalosporinas, em geral, podem ser utilizadas em pacientes com alergia não potencialmente fatal às penicilinas. Todavia, as cefalosporinas podem causar reações de hipersensibilidade e devem ser evitadas em pacientes com hipersensibilidade conhecida a esses fármacos (GOLAN et al., 2012).

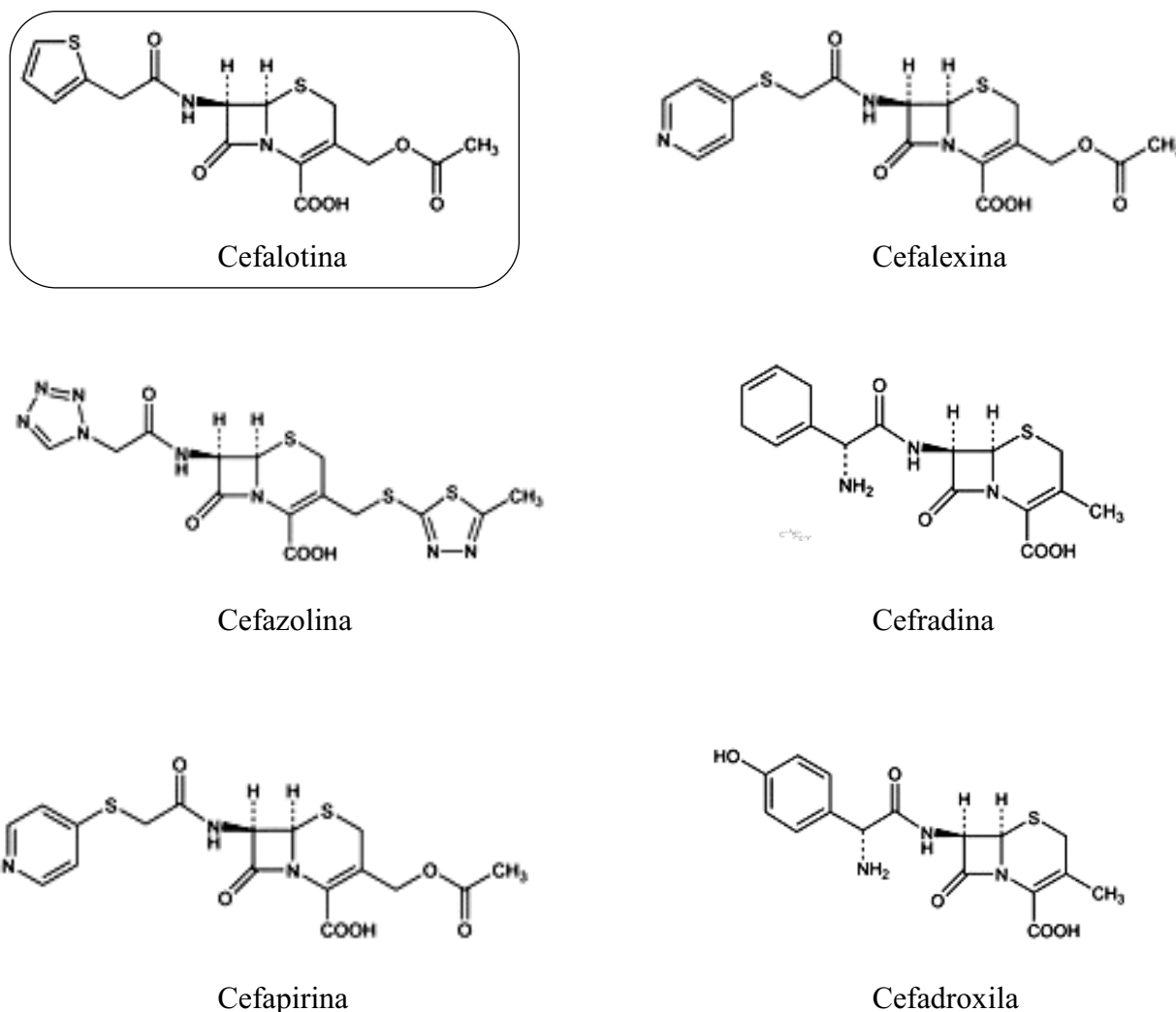
3.1.4.1 Cefalosporinas de primeira geração

As cefalosporinas de primeira geração são muito ativas contra pneumococos, estreptococos (exceto os enterococos) e estafilococos, porém não são ativas contra estafilococos resistentes à meticilina (KALANT; ROSCHLAU, 1991; HARDMAN; LIMBIRD, 2003; KATZUNG, 2005).

Segundo Hardman e Limbird (2003), as cefalosporinas de primeira geração apresentam atividade moderada contra as bactérias Gram-negativas, e são ativas contra a maioria dos anaeróbios de cavidade oral, exceto o grupo do *Bacteroides fragilis*. Apresentam atividade satisfatória contra *Moraxella catarrhalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Esses agentes mostram-se sensíveis a muitas β -lactamases, porém são resistentes à β -lactamase de *K. pneumoniae* codificada por cromossomo e à β -lactamase estafilocócica comum. Tanto a cefalexina quanto a cefazolina são utilizadas no tratamento de infecções da

pele dos tecidos moles; a cefazolina também é utilizada para profilaxia cirúrgica (GOLAN et al., 2012). As cefalosporinas de primeira geração estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Cefalosporinas de primeira geração (cefalotina, cefalexina, cefazolina, cefradina, cefapirina e cefadroxila).



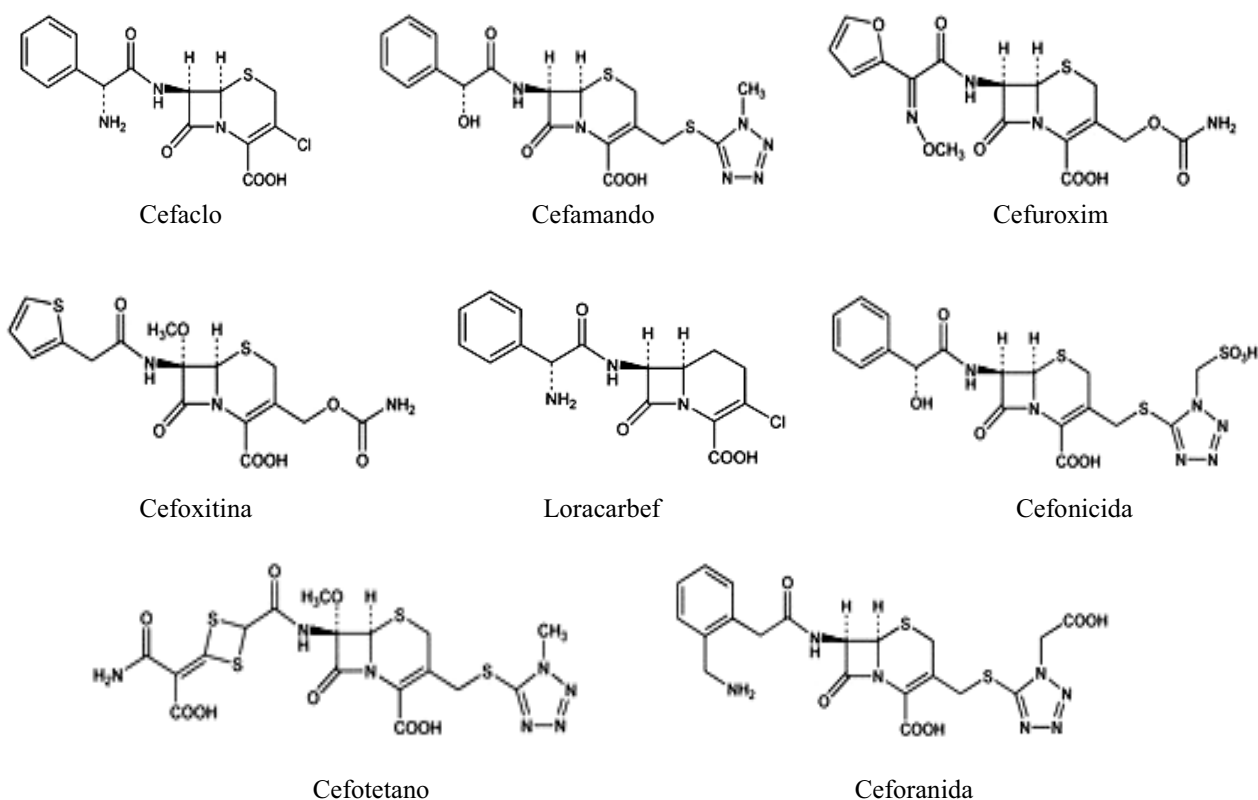
Fonte: MERCK, 2014.

3.1.4.2 Cefalosporinas de segunda geração

As cefalosporinas de segunda geração (Figura 4) apresentam maior resistência às β -lactamases que as cefalosporinas de primeira geração, no entanto, possuem um espectro de ação antimicrobiano mais amplo, cobrindo micro-organismos Gram-negativos (DeLUCIA, 2007). Não apresentam atividade anaerobicida, com exceção da cefoxitina. O principal uso clínico desta classe é em infecções respiratórias (FUCHS; WANNMACHER, 2012).

As cefalosporinas de segunda geração podem ser divididas em dois grupos: a cefuroxima, representante do primeiro grupo, possui atividade aumentada contra *H. influenzae* em comparação com as cefalosporinas de primeira geração; o cefotetano e a cefoxitina, representantes do segundo grupo, exibem atividade aumentada contra *Bacteroides*. Devido a estas características, a cefuroxima é frequentemente utilizada no tratamento da pneumonia, enquanto o cefotetano é prescrito no tratamento de infecções intra-abdominais e pélvicas (GOLAN et al., 2012).

Figura 4 - Cefalosporinas de segunda geração (cefaclor, cefamandol, cefuroxima, cefoxitina, loracarbef, cefonicida, cefotetano e ceforanida).



Fonte: MERCK, 2014.

3.1.4.3 Cefalosporinas de terceira geração

As cefalosporinas de terceira geração apresentam maior atividade contra bacilos Gram-negativos anaeróbios que as cefalosporinas de gerações anteriores. São amplamente utilizadas para o tratamento de meningites devido à sua excelente penetração no sistema nervoso central (diferentemente das gerações anteriores) e ação contra *Streptococcus*

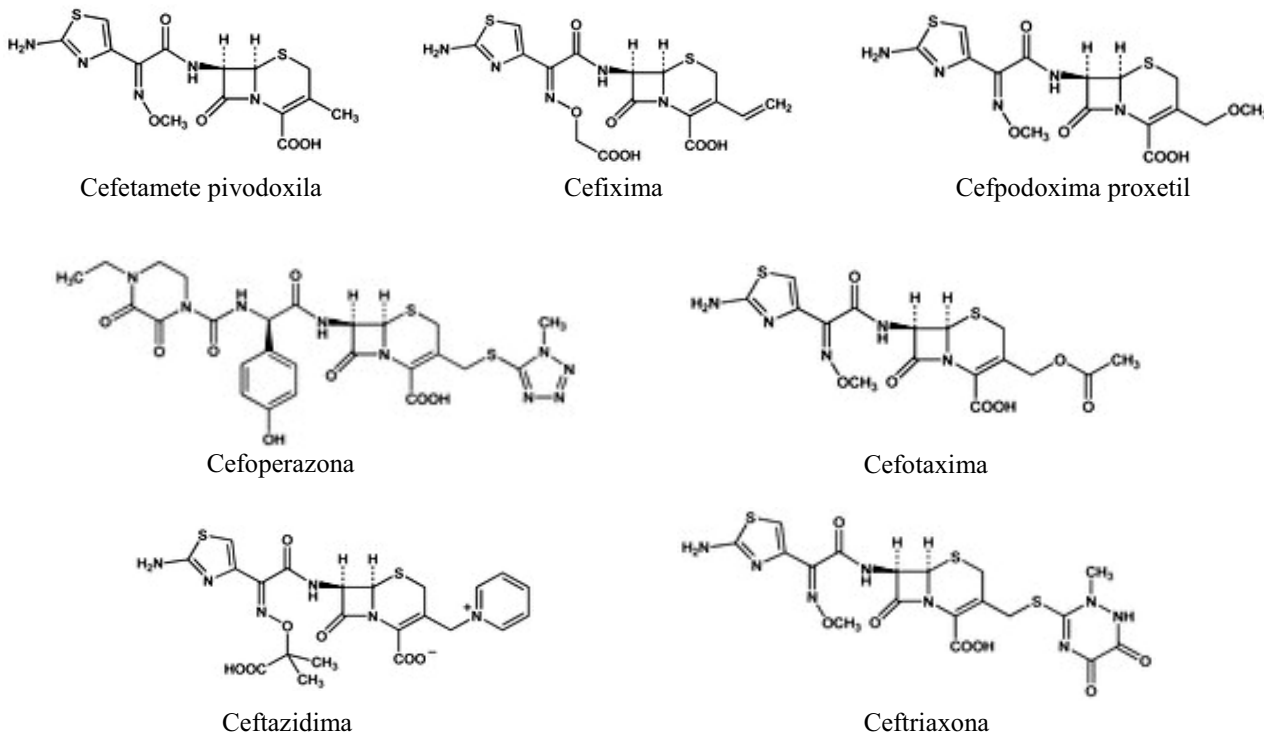
Karen de Souza Rugani

pneumoniae, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (DeLUCIA, 2007). Estão representadas na Figura 5 as cefalosporinas de terceira geração.

As cefalosporinas de terceira mostram-se altamente ativas contra Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Proteus* indol-positivo, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*). Os usos comuns incluem tratamento das infecções das vias respiratórias inferiores, infecção gonocócica não-complicada e endocardite (GOLAN et al., 2012). A ceftriaxona constitui atualmente a terapia de escolha para todas as formas de gonorreia (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

A ceftazidima tem seu espectro de ação diferente dos outros agentes pela sua atividade antipseudomonas significativa e atividade mínima contra micro-organismos Gram-positivos. É utilizada principalmente no tratamento de infecções bacterianas Gram-negativas hospitalares e infecções por *P. aeruginosa* (GOLAN et al. 2012). O uso excessivo pode provocar resistência bacteriana (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2000).

Figura 5 - Cefalosporinas de terceira geração (cefetamete pivodoxila, cefixima, cefpodoxima proxetil, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona).



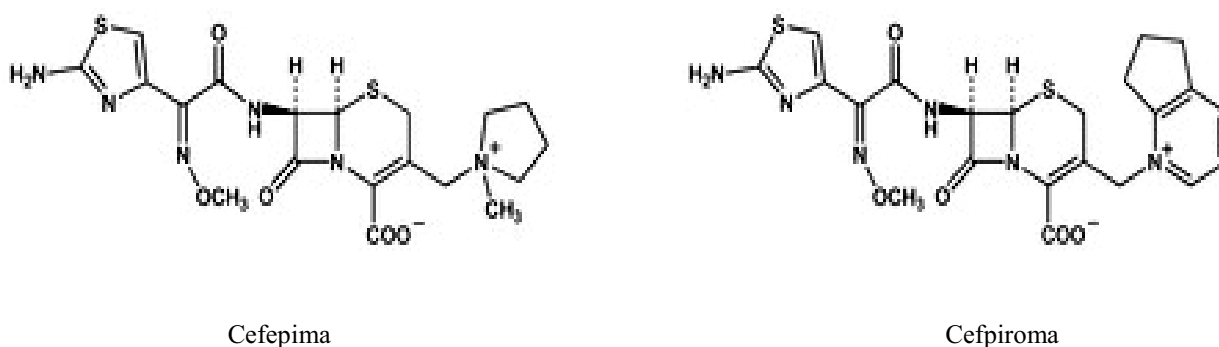
Fonte: MERCK, 2014.

3.1.4.4 Cefalosporinas de quarta geração

A cefepima é um exemplo de cefalosporina de quarta geração atualmente disponível, mostra-se altamente ativa contra Enterobacteriaceae, *Neisseria*, *H. influenzae* e contra micro-organismos Gram-positivos, além disso, também é ativa contra *P. aeruginosa*. A cefepima também é mais resistente às β -lactamases de *Enterobacter* codificadas por cromossomos do que as cefalosporinas de terceira geração (KATZUNG, 2005; GOLAN et al., 2012). Entretanto, ao contrário da ceftazidima (3ª geração), a cefepima não é aprovada para o tratamento da meningite devido a um efeito adverso incomum que consiste no desenvolvimento de auto-anticorpos contra antígenos eritrocitários, tipicamente sem hemólise significativa (GOLAN et al., 2012).

As cefalosporinas de quarta geração são indicadas para o tratamento de infecções hospitalares que apresentam resistência aos antimicrobianos por β -lactamases de espectro ampliado ou por β -lactamases induzidas por cromossomos (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). Estão representadas na Figura 6 as cefalosporinas de quarta geração.

Figura 6 - Cefalosporinas de quarta geração (cefepima e cefpiroma).



Fonte: MERCK, 2014.

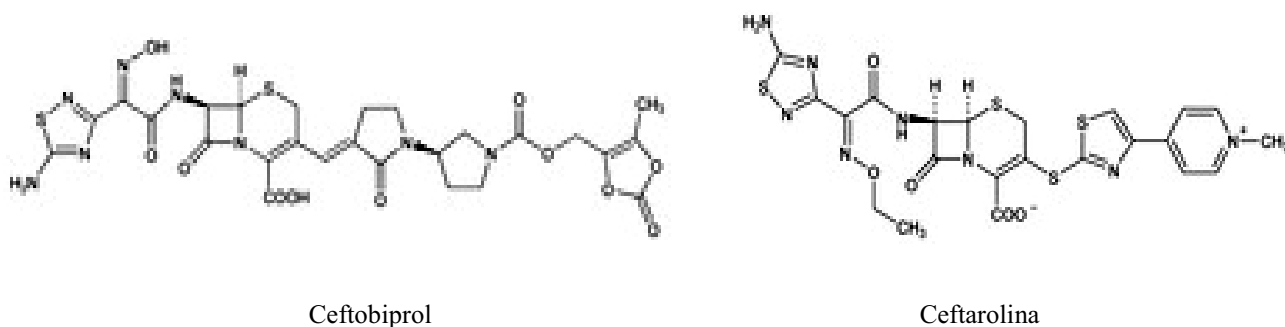
3.1.4.5 Cefalosporinas de quinta geração

As cefalosporinas de quinta geração são representadas pelos antimicrobianos ceftobiprol e ceftarolina (Figura 7). O ceftobiprol apresenta amplo espectro de ação e tem atividade contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. Seu uso foi

Karen de Souza Rugani

aprovado para tratamentos de infecções cutâneas, inclusive de pé diabético. A ceftarolina também possui espectro ampliado com atividade anti-MRSA, além de atividade contra *S. pneumoniae*, incluindo as resistentes às penicilinas (FUCHS; WANNMACHER, 2012).

Figura 7 - Cefalosporinas de quinta geração (ceftobiprol e ceftarolina).



Fonte: MERCK, 2014.

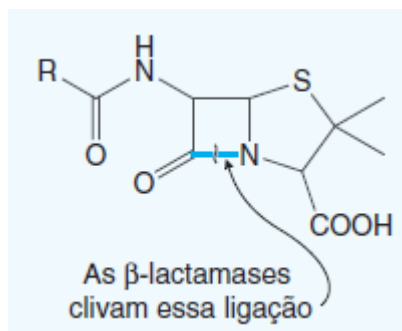
3.1.5 Resistência bacteriana a cefalosporinas

A resistência bacteriana a cefalosporinas pode estar relacionada a diversos fatores como: a incapacidade do antimicrobiano em atingir seus sítios de ação; a modificações nas proteínas de ligação da penicilina que são alvos das cefalosporinas, reduzindo-se a afinidade da ligação; e a β -lactamases (enzimas bacterianas) que inativam a cefalosporina por clivagem (hidrólise) do anel β -lactâmico, sendo este último o mais prevalente (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). Já foram identificadas mais de 100 β -lactamases distintas, e cada uma delas apresenta atividade contra determinado β -lactâmico ou grupo de β -lactâmicos (GOLAN et al., 2012). Na Figura 8, pode-se observar o local de clivagem da ligação β -lactâmica.

A resistência bacteriana aumentou devido à codificação das β -lactamases por plasmídios ou cromossomos, já que quase todas as bactérias Gram-negativas possuem um gene que codifica uma β -lactamase que é mais ativa na hidrólise das cefalosporinas do que nas penicilinas (RANG; DALE; RITTER, 2001; SWEETMAN, 2009). A codificação de β -lactamases por plasmídios possui elevada importância clínica, já que os plasmídios são transferidos por conjugação de uma bactéria para outra, e assim, a resistência conferida pelo plasmídio pode ser facilmente propagada através de uma população de bactérias, além disso, os plasmídios podem também disseminar a resistência de uma cepa de bactérias para outra. Algumas bactérias, como *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, podem produzir β -lactamases de

espectro ampliado, tornando-as resistentes à maioria dos β -lactâmicos, inclusive penicilinas, cefalosporinas e o monobactâmico aztreonam. Em outras bactérias, como espécies de *Enterobacter*, pode ocorrer a hiperexpressão de uma β -lactamase codificada por cromossomo, produzindo resistência igualmente ampla aos β -lactâmicos (GOLAN et al., 2012).

Figura 8 - Local de clivagem da ligação β -lactâmica.



Fonte: GOLAN et al., 2012.

A resistência bacteriana é cruzada entre a cefalotina e as outras cefalosporinas de primeira geração, podendo ocorrer também entre as cefalosporinas e a penicilina (TAVARES, 1999).

Determinadas cepas de bactérias podem ser inibidas pelas cefalosporinas ou penicilinas, porém não mortas, e nestes casos, a concentração bactericida mínima (CBM) é muito maior que a concentração inibitória mínima (CIM), fenômeno conhecido como tolerância (SWEETMAN, 2009).

A cefalotina apresenta CIM de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ ou menos para *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella*; e CIM em torno de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para *Klebsiella* e *Shigella* (TAVARES, 1999).

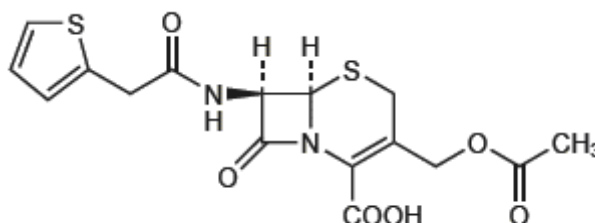
3.1.6 Cefalotina sódica

Como citado anteriormente, modificações nas cadeias laterais do ácido 7-aminocefalosporânico resultaram no desenvolvimento de antimicrobianos úteis, e o protótipo das cefalosporinas de primeira geração, foi a cefalotina, lançada por Eli Lilly em 1964 (PATIL; JACOB, 2012). Este antimicrobiano foi a primeira cefalosporina disponível para uso clínico nos EUA e é mais ativa contra cocos Gram-positivos, incluindo estafilococos oxacilina-sensíveis e *Streptococcus* spp e tem atividade moderada contra alguns bacilos

Karen de Souza Rugani

Gram-negativos (SADER; JONES, 1992). Foi desenvolvida para uso na medicina humana e veterinária (SWEETMAN, 2009) e sua estrutura química está ilustrada na Figura 9.

Figura 9 - Estrutura química da cefalotina.



Fonte: SWEETMAN, 2009.

A cefalotina é a cefalosporina de primeira geração mais resistente ao ataque da β -lactamase estafilocócica, sendo muito eficaz em infecções estafilocócicas graves como a endocardite (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). A cefalotina sódica é indicada no tratamento de infecções causadas por micro-organismos suscetíveis a cefalosporinas de primeira geração e para preservar o uso da cefazolina para quimioprofilaxia cirúrgica (BRASIL, 2010). Isso se dá ao fato da cefalotina ser a cefalosporina de primeira geração mais eficaz contra infecções estafilocócicas graves, sendo o seu uso mais recomendado no tratamento destas infecções e também porque a cefazolina apresenta concentração sérica mais prolongada (meia-vida plasmática de 6-8 horas) que a cefalotina (meia-vida plasmática de 4-6 horas), facilitando a sua utilização em profilaxia cirúrgica, sendo necessário menor número de doses (TAVARES, 1999; FUCHS, 2012).

Vasconcelos e colaboradores (2012) concluíram através de um estudo realizado com crianças hospitalizadas por celulite, que a cefalotina e a oxaciclina continuam a ser substâncias de escolha para o tratamento de celulite devido à sua eficácia clínica; a celulite é uma infecção bacteriana que está relacionada com a inflamação do tecido subcutâneo (STEVENS et al. 2005), e em geral, o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* são os agentes mais comuns da celulite infecciosa (HADZOVIC-CENGIC; SEJTARIJA-MEMISEVIC; KOLUDER-CIMIC, 2012).

3.1.6.1 Espectro de ação e aplicações clínicas

A cefalotina apresenta amplo espectro de ação, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias. Mostra atividade também contra bactérias anaeróbias, com exceção do micro-organismo *Bacteroides fragilis*. Em relação aos Gram-positivos, possui boa atividade contra estreptococos dos grupos A, B, C e G, mas não atuam contra enterococos. Apresenta ação contra pneumococos e estafilococos, inclusive contra os resistentes à penicilina (TAVARES, 1999).

Estudos *in vitro* demonstraram a suscetibilidade das seguintes cepas à cefalotina: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogens*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. (ANVISA, 2014).

As cepas de estafilococos meticilina-sensíveis apresentam resposta superior a cefalotina que à cefazolina, motivo pelo qual há maior indicação desta cefalosporina no tratamento de infecções estafilocócicas graves (NETO et al., 1994).

Preconiza-se a utilização de cefalotina no tratamento das infecções de pele e de tecidos moles (BRASIL, 2006); é indicada no tratamento de infecções pulmonares, cutâneas, abscessos causados por bactérias sensíveis (NETO et al., 1994), amigdalite, otite, faringite, sinusite, infecções respiratórias baixas, infecção articular e óssea, infecção gênito-urinária, endocardite e septicemia (BRASIL, 2001). Além disso, seu uso é indicado em infecções hospitalares causadas por micro-organismos suscetíveis ao espectro de uma cefalosporina de primeira geração (BRASIL, 2006).

3.1.6.2 Farmacocinética

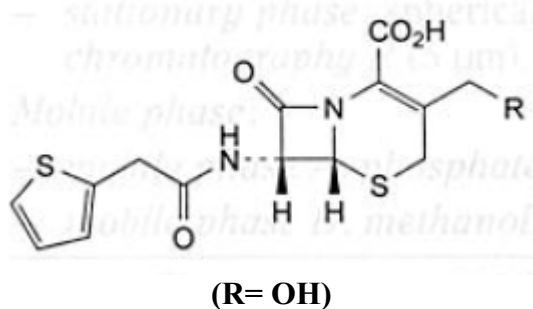
A cefalotina não é absorvida no trato gastrointestinal. Pode ser administrada por injeção intramuscular (IM), porém é muito dolorosa, sendo normalmente administrada pela via intravenosa (IV) (KALANT; ROSCHLAU, 1991; HARDMAN; LIMBIRD, 2003; SWEETMAN, 2009), sob a forma de sal sódico (SWEETMAN, 2009).

Após a administração de doses apropriadas (1000 mg por via IV), a cefalotina apresenta concentração sérica de 40 µg/mL a 60 µg/mL; ligação protéica de 60% a 70%; e meia-vida plasmática de 30 minutos (KALANT; ROSCHLAU, 1991). É amplamente distribuída nos tecidos e fluidos corporais, exceto no cérebro e líquido

cefalorraquidiano), onde as concentrações obtidas são baixas e imprevisíveis, mesmo na presença de inflamação (SWEETMAN, 2009; KOROLKOVAS, 2010). Devido a esta característica, não deve ser utilizada para o tratamento de meningite, assim como todas as cefalosporinas de primeira geração (KALANT; ROSCHLAU, 1991). A cefalotina atravessa a barreira placentária e baixas concentrações são detectadas no leite materno (SWEETMAN, 2009; KOROLKOVAS, 2010).

As cefalosporinas são excretadas primariamente pelos rins, portanto, é preciso atenção em pacientes portadores de insuficiência renal (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). Cerca de 20 a 30% da cefalotina é desacetilada rapidamente no fígado (SWEETMAN, 2009; KOROLKOVAS, 2010) e aproximadamente 60 a 70% da dose é excretada na urina pelos túbulos renais no prazo de 6 horas como cefalotina e seu metabólito menos ativo, a desacetilcefalotina (HARDMAN; LIMBIRD, 2003; SWEETMAN, 2009). A desacetilcefalotina possui potência antimicrobiana de 20 a 25% em relação à cefalotina (TAVARES, 1999), sua estrutura química está representada na Figura 10 e é denominada de impureza B (EP, 2011).

Figura 10 - Estrutura química da desacetilcefalotina (impureza B).



Fonte: EP, 2011.

3.1.6.3 Posologia

A dose para aplicação via IM profunda de cefalotina, em adultos, é de 500 mg a 1 g de 4 em 4 horas ou de 6 em 6 horas; em crianças, é de 80 a 160 mg/kg/dia em tomadas divididas. A aplicação por via IV em adultos é de 4 a 12 g por dia e administrado em infusão lenta (até 60 minutos) em tomadas divididas, cada 3 ou 6 horas; lactentes e crianças é de 80 a 160

mg/kg/dia em tomadas divididas, cada 4 a 6 horas (KOROLKOVAS, 2010). O resumo das posologias típicas da cefalotina está representado na Tabela 1.

Tabela 1 – Posologia usual para a cefalotina sódica

Pacientes	Indicação	Dose	Intervalo entre as doses (h)	Dose diária total (g)	Via de administração
Adultos e adolescentes	Pneumonia não complicada;	500 mg	6	2	IM ou IV
	Infecção no trato urinário; Furunculose com celulite; Outras infecções	0,5-2 g	4 – 6	2-8	IM ou IV
Crianças	Infecções bacterianas em geral	20-40 mg/kg	6	0,080 – 0,160	IM ou IV
		12-25 mg/kg	4	0,072 – 0,150	IM ou IV
Neonatos	Infecções por bactérias sensíveis	25 mg/kg	6	0,100	IV

3.1.6.4 Reações adversas

Observa-se frequentemente que os antimicrobianos β -lactâmicos de determinada classe exibem reação cruzada entre si, no entanto, a reação cruzada entre os β -lactâmicos de uma classe com os β -lactâmicos de outra classe é bem menos frequente (GOLAN et al., 2012).

As reações adversas mais comuns são: náuseas, vômitos, diarreia e exantema (GOLAN et al., 2012). Podem ainda ocorrer as seguintes reações: tromboflebite no local da administração; reações de hipersensibilidade, como erupções cutâneas, prurido, febre, artralgia, anafilaxia, síndrome de Stevens-Johnson; alterações hematológicas (trombocitopenia, neutropenia, leucocitose, agranulocitose, eosinofilia, anemia hemolítica e anemia aplástica); nefrite intersticial transitória; hiperatividade, nervosismo, distúrbios do sono, confusão, hipertonia e tonturas; anorexia, dor abdominal, flatulência e dispepsia;

candidíase vaginal, intestinal e oral; cefaleia; alterações de transaminases; icterícia transitória (BRASIL, 2001) e nefrotoxicidade (BRASIL, 2010).

3.1.6.5 Contra-indicações

É contra-indicado em pacientes com reações alérgicas às penicilinas e cefalosporinas (BRASIL, 2001) e nos casos de meningites, por não penetrar a barreira hematoencefálica (BRASIL, 2010).

3.1.6.6 Interações medicamentosas

O nível sérico de cefalotina é aumentado com a administração concomitante de probenicida e fenilbutazona. A associação com aminoglicosídeos, polimixinas, diuréticos furosemida e ácido etacrínico aumenta o risco de nefrotoxicidade (TAVARES, 1999), que também pode acontecer com a administração de colistina e vancomicina (BRASIL, 2001). Além disso, existe risco de hemorragia quando utilizado simultaneamente com anticoagulantes (BRASIL, 2001).

3.1.6.7 Precauções

A cefalotina não deve ser administrada em pacientes com hipersensibilidade a qualquer cefalosporina, e sua administração em pacientes sensíveis à penicilina deve ser realizada com muito cuidado, já que estudos imunológicos sugerem que até 20% destes pacientes podem também apresentar alergia a cefalosporinas. A administração em pacientes com insuficiência renal deverá ser realizada com precaução e a redução da dose pode ser necessária (SWEETMAN, 2009). Recomenda-se usar com cautela também nos casos de insuficiência hepática (BRASIL, 2010). O seu uso na gravidez deve ser restrito apenas quando claramente indicado (BRASIL, 2010; ANVISA, 2014).

3.2. Aspectos gerais do fármaco

3.2.1. Descrição geral

Nome genérico: Cefalotina sódica (CAS 58-71-9)

Nome químico: (6R,7R)-3-[(acetoxi)metil]-8-oxo-7-[(2-tienilacetil)amino]-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxilato de sódio.

Fórmula química: $C_{16}H_{15}N_2NaO_6S_2$

Massa molecular: 418,42 g/mol

Fórmula química da cefalotina: $C_{16}H_{16}N_2O_6S_2$

Massa molecular da cefalotina: 396,44 g/mol

Propriedades físico-químicas: A cefalotina sódica é um pó cristalino branco a quase branco (XU e TRISSEL, 2008; EP, 2011), apresenta ligeira solubilidade em álcool e solubilidade elevada em água (EP, 2011), e o valor de pKa (constante de dissociação) é 2,22 (XU e TRISSEL, 2008). Este fármaco funde na faixa de 204 °C a 205 °C e apresenta absorção máxima no UV em 236 nm (O'NEIL, 2006).

Categoria: Antimicrobiano

Classe: Cefalosporina de primeira geração

pH: Entre 4,5 a 7,0 em solução aquosa do fármaco contendo 250 mg/mL (EP, 2011; USP 36, 2013)

Comercialização no Brasil: A CET é comercializada no Brasil como: Keflin neutro[®] (medicamento referência), fabricado pela ABL; cefalotina sódica (medicamento genérico) pelos laboratórios EMS, Eurofarma, Teuto e AB Farmaquímico; e como medicamento similar, pelos laboratórios União Química (Cefalotil[®]) e Ariston (Cefariston[®]) (KOROLKOVAS, 2010).

Comercialização no mundo: A CET é comercializada nos países como: **Argentina:** Arecamin[®], Dasuglor[®], Keflin[®]; **Austrália:** Keflin Neutral[®]; **Cingapura:** Cefadin[®]; **Filipinas:** Fezef[®]; **Indonésia:** Cephation[®], Moraxine[®]; **México:** Cefelen[®], Ceftina[®], Falot[®], Keflin[®], Liroken[®], Lotin[®]; **Venezuela:** Celen[®] (SWEETMAN, 2009).

3.2.2. Diluentes

A cefalotina sódica 1 g deve ser reconstituída com 5 mL de água estéril para injeção para administração por via IM. Para administração por via IV direta, deve ser reconstituída com 10 mL de água estéril para injeção. Para infusão endovenosa, deve ser reconstituída em 100 mL de cloreto de sódio a 0,9%, glicose 5%, ringer lactato ou glicose 5% em solução de ringer lactato. A solução reconstituída apresenta-se incolor e possui estabilidade de 12 horas à temperatura ambiente (15 a 30 °C) ou de 96 horas sob refrigeração (2 a 8 °C) (ANVISA, 2014).

Considerando a importância do uso das cefalosporinas na terapêutica medicamentosa, cabe destacar que a análise desta classe de fármacos é de extrema relevância. A seguir são apresentadas algumas das técnicas e métodos utilizados para análise das cefalosporinas, e em especial, para a cefalotina sódica.

3.3. Métodos analíticos

A análise dos antimicrobianos cefalosporínicos é um grande desafio devido à sensibilidade e instabilidade em diferentes condições (PATIL e JACOB, 2012). Estudos anteriores demonstraram que as cefalosporinas são suscetíveis a degradação em soluções aquosas (SUGIOKA et al., 1990; IKEDA et al., 2008).

De acordo com Zaleswski e colaboradores (2013), métodos microbiológicos são tradicionalmente utilizados na determinação de cefalosporinas, no entanto, são muito demorados, já os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ao contrário das técnicas microbiológicas, são rápidos e específicos. A CLAE se destaca como a técnica mais utilizada para análises de matéria-prima e suas formulações (GILPIN; PACHLA, 2001).

Existem diversos métodos de análise de cefalosporinas descritos na literatura para o doseamento em matéria-prima e produto acabado. Entre estes podemos citar: titrimetria (MORENO; SALGADO, 2012a); cromatografia líquida de alta eficiência (SIGNS; FILE; TAN, 1984; PINTO; PAV'ON; CORDERO, 1995; MANNA; VALVO, 2004; SAMANIDOU; LOANNOU; PAPADOYANNIS, 2004; KAKUMANU; ARORA; BANSAL, 2006; MORENO; SALGADO, 2007a; LALITA et al., 2010; VIEIRA; SALGADO, 2011;

MORENO; SALGADO, 2012b; PEDROSO; SALGADO, 2014a); espectrofotometria na região ultravioleta (VADIA; PATEL; BHALARA, 2008; MORENO; SALGADO, 2009; VIEIRA; SALGADO, 2011; PEDROSO; SALGADO, 2013); espectrofotometria na região visível (AMIN; SHAMA; CHEM, 2001; SALEH et al., 2003; MORENO; SALGADO, 2008; SALEH et al., 2009); espectrofotometria na região infravermelho (MORENO; SALGADO, 2012c; TÓTOLI; SALGADO, 2012; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012a); difusão em ágar (MORENO; SALGADO, 2007b; ALÉSSIO; SALGADO, 2012; TOZO; SALGADO, 2007; VIEIRA; RICARTE; SALGADO, 2012b) e ensaio turbidimétrico (TÓTOLI; SALGADO, 2013; PEDROSO; SALGADO, 2014b).

Existem poucos métodos descritos na literatura para a cefalotina; alguns destes são: métodos desenvolvidos utilizando-se a técnica de CLAE para quantificação de cefalotina sódica (GUPTA; STEWART, 1980), análise de cefalotina e seus metabólitos em urina humana (BUHS et al., 1974), análise de cefalotina e seu metabólito desacetilcefalotina em soro e urina humanos (COOPER; ANDERS; MIRKIN, 1973), a determinação de cefalotina em plasma humano (MCWHINNEY et al., 2010), em sangue de ratos (CHANG et al., 2000), e em soro humano e de cães (NILSSON-EHLE et al., 1978). Khalfi e colaboradores (1998) descreveram um método por CLAE para cefalotina que avalia a compatibilidade da cefalotina e cefpiroma com bolsas de PVC. Walker e colaboradores (1992) avaliaram a estabilidade química da cefalotina em soluções de infusão também por CLAE.

Em relação aos compêndios oficiais, na Farmacopeia Europeia (EP, 2011) descreve-se o doseamento e a determinação das substâncias relacionadas na matéria-prima cefalotina sódica por CLAE, na Farmacopeia Americana (USP, 2013), relatam-se monografia para cefalotina sódica na matéria-prima e em produto farmacêutico injetável por CLAE, na Farmacopeia Brasileira (FB, 2010) descrevem-se dois métodos de doseamento para cefalotina sódica pó para solução injetável: por CLAE, nas mesmas condições cromatográficas descritas pela Farmacopeia Americana, e por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV).

Os métodos analíticos para determinação de CET por CLAE estão descritos nas Tabelas 2 e 3. Na Tabela 2 encontram-se os métodos avaliados em matriz biológica e na Tabela 3, os métodos para determinação em outras matrizes.

Tabela 2 – Métodos para determinação de cefalotina em matriz biológica por CLAE

Matriz biológica	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (μL)	Deteção (nm)	Tempo de retenção (min)	Referência
Sangue e urina humanos	^a	Cloreto de tetraheptilamônio	^a	^a	^a	^a	COOPER; ANDERS; MIRKIN, 1973
Urina humana	Zipax SAX DuPont [®] resina de troca iônica (100 x 0,3 cm)	Tampão acetato de sódio 0,25M, pH 5,0	0,82	74	UV 254	33,0	BUHS et al., 1974
Sangue	Phenyl Corasil (90 x 2 mm)	Metanol e acetato de amônio 0,2 M (10:90)	2,0	20	UV 254	^b	WOLD; TURNIPSEED, 1977
Sangue humano e canino	μBondapak C ₁₈ (300 x 4,6 mm)	Metanol e ácido acético 1% (4:6 v/v)	2,5	100	UV 254	9,9	NILSSON-EHLE, 1978
Sangue e urina	μBondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm, 10 μm)	Tampão acetato 0,01M pH 4,8 e metanol (85:15 v/v)	1,5	10-50	UV 240	8,0	BRISSON; FORTILLAN, 1981

Continua na próxima página

^aDado não disponível (acesso apenas ao abstract); ^bDado não fornecido

Tabela 2 (continuação) – Métodos para determinação de cefalotina em matriz biológica por CLAE

Matriz biológica	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção (nm)	Tempo de retenção (min)	Referência
Sangue e urina	Zorbax ODS (150 x 4,6 mm) Agilent®	Metanol e acetato de amônio 0,2% (40:60 v/v)	1,0	10	UV 254	12,0	SAKATA, 1980
Sangue	µBondapak C ₁₈ (300 x 4,0 mm, 10 µm)	Acetato de sódio 0,01M pH 5,2, acetonitrila e metanol (modo de eluição gradiente)	2,5	^b	UV 254	6,0	SIGNS; FILE; TAN, 1984
Sangue	Supelcosil C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 µm) - Supelco®	Metanol, acetonitrila, tampão fosfato 0,01M pH 7,0 (20:15:65) e tetrabutilamônio HSO ₄ 5 mM	1,0	10	UV 240	13,0	BOMPADRE; FERRANTE; LEONE, 1998
Sangue e tecido	µBondapak C ₁₈ (100 x 8 mm, 10 µm)	Acetonitrila, fosfato de potássio 5 mM e ácido acético (22:77,5:0,5 v/v/v)	2,0	180	UV 235	13,6	COX et al., 1998
Sangue de ratos	Microbore C ₁₈ (150 x 1,0 mm, 5 µm)	Metanol, acetonitrila e fosfato monossódico 100 mM pH 5,0 (20:20:60 v/v)	0,05	10	UV 254	6,0	CHANG et al., 2000
Plasma humano	X-Brigde C ₁₈ Waters® (30 x 4,6 mm, 2,5 µm)	Acetonitrila e tampão fosfato 100 mM, pH 3,0 (25:75 v/v)	1,0	10	UV 260	2,0	MCWHINNEY et al., 2010
Continua na próxima página							

Tabela 2 (continuação) – Métodos para determinação de cefalotina em matriz biológica por CLAE

Matriz biológica	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Deteção (nm)	Tempo de retenção (min)	Referência
Resíduos em solo	Zorbax SB-C ₁₈ (150 x 4,5 mm) Agilent®	Fosfato de potássio monobásico 10 mM, pH 4,8 e metanol (modo de eluição gradiente)	1,0	50	UV 240	^b	SUBBIAH et al., 2011
Plasma humano	X-Brigde C ₁₈ Waters® (30 x 4,6 mm, 2,5µm)	Acetonitrila e tampão fosfato 100 mM, pH 3,0 (25:75 v/v)	1,0	25	UV 260	2,1	BRISCOE et al., 2012

^bDado não fornecido

Tabela 3 – Métodos para determinação de cefalotina em outras matrizes por CLAE

Tipo de amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de Injeção (μL)	Deteção (nm)	Tempo de retenção (min)	Referência
Disco de antibiótico	Cromegabond C ₁₈ de fase ligada (300 x 4,6 mm, 10 μm)	Acetonitrila e fosfato de sódio 0,01 M, pH 5,0 ajustado com hidróxido de sódio (15:85 v/v)	^b	^b	^b	25,0	HAGEL; WAYSEK; CORT, 1979
Amostra	Phenyl μBondapak Waters (300 x 4,0 mm)	Metanol e acetato de amônio 0,01 M (30:70 v/v)	2,2	20	UV 254	^b	GUPTA; STEWART, 1980
Matéria-prima e produto acabado	μBondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm, 10 μm)	Metanol, água, ácido acético (30:70:0,1 v/v/v)	1,0	20	UV 254	30	TING, 1988
Solução	OmniPac PCX-500 Dionex (250 x 4 mm)	Acetonitrila e ácido perclórico, modo de eluição gradiente	1,0	^b	UV 254	11,0	SLINGSBY; REY, 1990
Solução de infusão	ODS C ₁₈ (250 x 4,2 mm, 5 μm)	Acetonitrila e fosfato de potássio monobásico 0,05 M (20:80 v/v)	2,0	15	UV 254	6,0	WALKER; PATON; OREOPOULOS, 1992

Continua na próxima página

^bDado não fornecido

Tabela 3 (continuação) – Métodos para determinação de cefalotina em outras matrizes por CLAE

Tipo de amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de Injeção (μL)	Deteção (nm)	Tempo de retenção (min)	Referência
Solução	μBondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm)	Acetonitrila e acetato de amônio 10 mM (22:78 v/v)	1,5	10-20	UV 240	^b	TERASAKI; NOUDA; TSUJI, 1992
Misturas de reação	Microsorb C ₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)	Acetonitrila e octanosulfonato de sódio 5,5 mM + citrato trissódico, pH 3 ajustado com ácido clorídrico (28:72 v/v)	1,0	20	UV 245	7,2	LUNN; et al., 1994
Solução	Spheri 5 ODS-224 (220 x 4,6 mm)	Dodecil sulfato de sódio 100 mM pH 3,0	1,0	10	UV 260	4,5	PINTO; PAVÓN; CORDERO, 1995
Bolsas de PVC	Hypersil C ₁₈ ODS (150 x 4,6 mm, 5 μm)	Acetonitrila e tampão trietilamina 0,2% pH 4,0, ajustado com ácido acético (18:82 v/v)	1,5	20	UV 240	5,2	KHALFI et al., 1998
Mistura de reação	Amino (250 x 5,0 mm)	Ácido fórmico, metanol e água (0,5:0,5:99 v/v/v)	1,0	^b	UV 254	12,0	GAURAV; KUNDU; KUNDU, 2007

Continua na próxima página

^bDado não fornecido

Tabela 3 (continuação) – Métodos para determinação de cefalotina em outras matrizes por CLAE

Tipo de amostra	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL/min)	Volume de Injeção (μL)	Deteção (nm)	Tempo de retenção (min)	Referência
Pó para solução injetável	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)	acetato de sódio, ácido acético, acetonitrila e etanol (790:0,6:150:70 v/v/v/v), pH 5,9	1,5	10	UV 254	^b	Farmacopeia Brasileira, 2010
Matéria-prima e pó para injeção	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)	acetato de sódio, ácido acético, acetonitrila e etanol (790:0,6:150:70 v/v/v/v), pH 5,9	1,0	20	UV 254	^b	USP 36, 2013
Matéria-prima	C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)	fosfato de potássio pH 2,5 e acetonitrila (elução no modo gradiente)	1,0	20	UV 220	26,0	EP, 2011; BP, 2013

^bDado não fornecido

3.4. Controle de qualidade

No controle de qualidade de produtos farmacêuticos, a identificação e a quantificação da substância ativa e suas impurezas são muito importantes devido a razões de garantia de segurança e eficácia (ICH, 2003). Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e eficazes para serem utilizados no controle de qualidade dos medicamentos comercializados é de extrema importância e tem por objetivo fornecer informações quanto à natureza e à composição dos materiais em análise (LA ROCA et al., 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo a técnica analítica mais desenvolvida e empregada nos últimos anos em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, e em muitos outros campos da ciência, inclusive em órgãos governamentais (MALDANER; JARDIM, 2009). De acordo com Rao e Nagaraju (2003), a CLAE está bem estabelecida como uma ferramenta eficaz no controle de qualidade de matérias-primas e formulações. Além disso, os métodos por CLAE ganharam popularidade nos estudos de estabilidade, devido à sua alta resolução, capacidade, sensibilidade e especificidade (VAUCHER et al., 2009).

As impurezas e os potenciais produtos de degradação que possivelmente estejam presentes nos medicamentos podem alterar as suas propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas (ICH, 2003). Embora o uso de medicamentos esteja sempre em equilíbrio entre riscos e benefícios, o mesmo não é verdade para as impurezas nos fármacos, pois apresentam apenas o risco (JACOBSON-KRAM; MCGOVERN, 2007).

3.4.1. Estabilidade farmacêutica

A estabilidade farmacêutica demonstra a capacidade de uma formulação em manter suas características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas, características estas ligadas diretamente à segurança clínica (GENNARO, 2000). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de vários fatores ambientais, tais como temperatura, luz e umidade. Além disso, outros fatores relacionados ao próprio produto estão envolvidos: propriedades físicas e químicas dos princípios ativos e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua

composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Monitorar a estabilidade dos medicamentos é uma maneira bem eficaz para avaliar, prever e prevenir problemas relacionados à qualidade do produto durante todo o seu prazo de validade. A segurança e a eficácia também podem ser previstas nos estudos de estabilidade, através da observação na formação de produtos de degradação, que ocasionará, por exemplo, perda de atividade terapêutica ou toxicidade (CARVALHO et al., 2005).

As consequências potenciais da instabilidade nos produtos farmacêuticos incluem principalmente a perda do princípio ativo e a formação de produtos de degradação tóxicos. No geral, considera-se que qualquer produto que contenha menos que 90% do teor rotulado do fármaco como sendo de qualidade inaceitável e atenção especial deve ser dada aos produtos de degradação, devido à quantidade que poderá se formar durante a vida de prateleira do produto farmacêutico (CARSTENSEN; RHODES, 2007).

3.4.1.1 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade são testes realizados nos produtos farmacêuticos com o objetivo prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade. São divididos em estudos de estabilidade acelerada e estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005), testes esses exigidos para o registro de novos medicamentos.

O estudo de estabilidade acelerado foi projetado para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições forçadas de armazenamento, no caso do produto em questão ser um sólido, a condição do estudo deve ser de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ (no Brasil) por um período total de 6 meses. Estes dados aliados aos derivados dos estudos de longa duração podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para verificar o impacto de curtas exposições, que podem ocorrer durante o transporte.

O estudo de estabilidade de longa duração foi projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante o prazo de validade esperado, e a condição do estudo para este produto deve ser de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ (no Brasil) por um período de 24 meses. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de

armazenamento. Dentre os testes que estão incluídos na estabilidade acelerada e de longa duração estão incluídos o doseamento do fármaco e a quantificação de produtos de degradação (BRASIL, 2005).

Ensaio de estabilidade acelerada e de longa duração podem então utilizar os métodos indicativos de estabilidade de uma forma mais formal e definitiva para gerar informação específica e quantitativa relacionada com a formação de produtos de degradação. Os produtos de degradação formados em condições de estresse podem ou não ser relevantes para as condições de armazenamento atual do fármaco e/ou para a degradação química do medicamento (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

3.4.2. Degradação forçada

O estudo de degradação forçada é um passo essencial no projeto de um programa regulatório de estabilidade para os fármacos e medicamentos, e foi formalizado como uma exigência regulamentar pelo ICH Q1A (SINGH et al., 2013).

O teste de estresse (degradação forçada) é definido como um teste de estabilidade realizado com o fármaco e produto acabado submetidos a condições que excedam àquelas utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada (KLICK et al., 2005). Os estudos de degradação forçada podem auxiliar no desenvolvimento farmacêutico, bem como em áreas de desenvolvimento de formulações, produção e acondicionamento, em que o conhecimento do comportamento químico da substância ativa na formulação pode ser usado como ferramenta para melhorar o produto final (REYNOLDS et al., 2002).

Os estudos de degradação forçada são realizados também para facilitar o desenvolvimento de metodologias analíticas, para se obter uma melhor compreensão da estabilidade da substância ativa e do produto, e para fornecer informações sobre as vias de degradação e formação de produtos de degradação que podem se formar durante o tempo de armazenamento do produto (REYNOLDS et al., 2002; ALSANTE et al., 2007; VAUCHER et al., 2009). De acordo com o ICH Q1A-R2 (2003), os testes de estresse (degradação forçada) realizados com o fármaco podem ajudar a identificar os prováveis produtos de degradação e também a validar a capacidade do procedimento analítico utilizado em ser um método indicativo de estabilidade.

A degradação forçada é uma ferramenta necessária para demonstrar a especificidade de métodos indicativos de estabilidade (BLESSY et al., 2014). A maioria das empresas farmacêuticas utiliza a CLAE com detecção por UV como escolha principal para conduzir os estudos de degradação forçada (ALSANTE; MARTIN; BAERTSCHI, 2003).

3.4.2.1 Condução dos estudos de degradação forçada

As condições de degradação forçada utilizadas são mais severas do que as do teste de estabilidade acelerada, tais como a temperatura (50 °C ou 60 °C), umidade relativa do ar ($\geq 75\%$), hidrólise em pH alto e baixo, oxidação e fotólise (ICH, 2003; ICH, 2005). O teste de fotoestabilidade deve ser parte integrante dos testes de degradação forçada (ICH, 1996).

Visto que nenhum conjunto específico de condições é aplicável a todos os produtos e substâncias medicamentosas e os guias das agências regulatórias não especificam como as condições devem ser realizadas, o estudo requer que o analista use de bom senso (BLESSY et al., 2014).

Várias abordagens são avaliadas na literatura em como se conduzir os estudos de degradação forçada, e há uma pequena variação no que se diz respeito à porcentagem de degradação. Alguns autores sugerem que a faixa ideal de degradação do princípio ativo é de 5-20%, de modo a provocar a degradação do fármaco, mas não tão intensa a ponto de gerar produtos de degradação secundários (REYNOLDS et al., 2002; ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2014). A Anvisa, conforme a consulta pública nº 11 de 23 de janeiro de 2012, estabelece parâmetros para a notificação, identificação e quantificação de produtos de degradação em medicamentos e destaca que os testes devem promover uma degradação de pequena extensão, que fique em torno de 10 a 30% (BRASIL, 2012). No entanto, recentemente foi publicada a RDC nº 58 de 20 de dezembro de 2013, que estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento. Segundo esta resolução, os testes devem promover uma degradação superior a 10% e inferior à porcentagem que levaria à degradação completa da amostra (BRASIL, 2013).

A falta de consenso sobre a porcentagem adequada de estresse do fármaco foi confirmada por um estudo comparativo no qual foram solicitadas informações sobre o projeto,

procedimentos e organização para conduzir os testes de degradação forçada de 20 empresas, já que muitas empresas farmacêuticas têm suas políticas tais como procedimentos operacionais padrão ou diretrizes internas para testes de estresse (ALSANTE; MARTIN; BAERTSCHI, 2003).

De acordo com o ICH Q3B (2006), o limite de quantificação do método deverá ser menor ou igual ao limite de notificação para produtos de degradação. O limite de notificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado no estudo de estabilidade (BRASIL, 2013). Os limites de notificação dos produtos de degradação formados durante o estudo de estabilidade do medicamento devem seguir os critérios especificados na Tabela 4 (BRASIL, 2013; ICH, 2006).

Tabela 4 – Limites de notificação dos produtos de degradação formados durante o estudo de estabilidade de medicamentos

Dose máxima diária ¹	Limites ²
≤ 1 g	0,1 %
> 1 g	0,05 %

1: quantidade máxima da insumo farmacêutico ativo administrada por dia

2: limites dos produtos de degradação expressos em porcentagem do insumo farmacêutico ativo

Segundo a Anvisa, os resultados destes ensaios devem ser utilizados para o desenvolvimento de metodologia de análise de produtos de degradação formados e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento, que deve contemplar a verificação da pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo e análise da perda de teor do ativo em relação à formação de possíveis produtos de degradação (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013). A pureza cromatográfica do pico é a comprovação de que não há nenhum interferente no pico cromatográfico do insumo farmacêutico ativo (BRASIL, 2013).

3.4.3. Validação de metodologia analítica

A validação dos procedimentos analíticos é imprescindível não apenas para fins de regulamentação, mas também para a sua aplicação eficaz e confiável em longo prazo

(ERMER; PLOSS, 2005). É um requisito básico para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados para todas as aplicações analíticas (ERMER; MILLER, 2005). A validação faz parte da garantia da qualidade e tem por objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para a proposta pretendida (ICH, 1996), e para cujos procedimentos incluídos nas normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidas pela FDA dos Estados Unidos, e aplicadas nas indústrias farmacêuticas, devendo, portanto, seguir as boas práticas de laboratório (BPL) (SHABIR, 2003).

A finalidade da validação é, portanto, demonstrar se o método é apropriado ou não para a determinação pretendida (BRASIL; 2003, ARAÚJO, 2009), ou seja, qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

A introdução de novos métodos exige a completa validação, com o intuito de comprovar a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação. O desenvolvimento de metodologias que permitam quantificar as substâncias ativas na presença de seus produtos de degradação ou de degradações oriundas dos excipientes presentes na formulação é fundamental para o controle de qualidade destes produtos tanto no âmbito da indústria farmacêutica nacional quanto internacional.

A Anvisa publicou em 29 de maio de 2003, a resolução nº 899, que determina aspectos relacionados à validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003). Para a validação de novos métodos analíticos, uma série de parâmetros podem ser exigidos, dependendo da finalidade pretendida do método, que são: precisão, exatidão, especificidade linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (FDA, 2000; ERMER, 2001, BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP 36, 2013). A adequação do sistema é outro parâmetro que pode ser utilizado na validação de métodos analíticos (FDA, 1994; ICH, 2005; USP 36, 2013), porém outras características devem ser consideradas, tais como: a disponibilidade de equipamentos, rapidez, custo reduzido e simplicidade.

Os métodos podem ser divididos em quatro categorias, de acordo com a finalidade pretendida (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013):

- **Categoria I** – Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

- **Categoria II** – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
- **Categoria III** – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do insumo farmacêutico ativo).
- **Categoria IV** – Testes de identificação.

Para cada categoria listada, um conjunto de testes é exigido, como relacionado na Tabela 5.

Tabela 5 - Testes necessários para a validação do método analítico, de acordo com a sua finalidade

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

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária

Fonte: BRASIL, 2003.

Os parâmetros da validação estão descritos abaixo (BRASIL, 2003):

- **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 uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
- **Intervalo:** o intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método.
- **Precisão:** a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.
 - ❖ **Repetibilidade (precisão intracorrida):** grau de concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada, por exemplo, por, no mínimo, seis determinações a 100% da concentração do teste.
 - ❖ **Precisão intermediária (precisão intercorrida):** grau de concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
 - ❖ **Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial):** concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias.
- **Limite de detecção:** é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.
- **Limite de quantificação:** É a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de

degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra.

- **Exatidão:** A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Existem diversas maneiras de se calcular a exatidão, dependendo do objetivo da análise, por exemplo, na forma farmacêutica: análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo enriquecido); nos casos em que todos os componentes do medicamento são desconhecidos, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.
- **Robustez:** A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso de rotina.

Considerando ainda outro parâmetro analítico que pode ser avaliado como parte integrante na validação (ICH, 2005), a adequação do sistema deve ser verificada em métodos por cromatografia à gas e a líquido. Atualmente, resolução, pratos teóricos, fator de cauda e desvio padrão relativo também devem ser calculados (USP 36, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL

4.1. Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência (SQR) utilizada neste trabalho foi a cefalotina sódica (identificada pelo lote SLBG0252V, com pureza declarada de 99,2%, Sigma-Aldrich®). Também foi utilizado o padrão de impureza B (*Cephalotin for impurity B identification*) da Farmacopeia Europeia, lote: 1, ambos adquiridos comercialmente.

4.2. Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável

Foram utilizadas amostras comerciais de CET na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável Cefalotil®, em frasco ampola contendo 1 g da substância ativa. As amostras foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório Farmacêutico União Química, de lote 1303576, com validade até 02/2015. Possui na sua formulação bicarbonato de sódio como excipiente.

4.3. Reagentes

Foram utilizados os solventes e/ou soluções: água, ácido clorídrico 0,01 M a 0,1 M, hidróxido de sódio 0,01 M a 0,1 M e peróxido de hidrogênio 3 %. Os solventes orgânicos testados na cromatografia líquida de alta eficiência foram: acetonitrila, metanol e etanol grau CLAE, além de soluções tampão fosfato de potássio, fosfato de amônio, fosfato de sódio, acetato de amônio, acetato de sódio, trietilamina e ácido acético.

Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água ultrapura obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, EUA). A acetonitrila utilizada na preparação da fase móvel possui grau cromatográfico (Merck, Germany). Utilizou-se ácido fosfórico (Merck, Germany) no preparo da solução a 10% para ajuste do pH da fase móvel. O sal fosfato de amônio bibásico utilizado foi adquirido da Synth (Brasil).

A solução tampão utilizada como fase móvel foi filtrada em membrana de celulose regenerada 0,45 µm (Sartorius, Germany) e submetida à degaseificação em banho de ultrassom (Unique, SP, Brasil) sob pressão reduzida, por 5 minutos, e a acetonitrila também

foi desgaseificada por 5 minutos no ultrassom sob pressão reduzida. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Millipore, EUA) antes de serem injetadas.

4.4. Equipamentos

Em CLAE foi utilizado o equipamento cromatógrafo a líquido, modelo 1200, da marca Agilent[®], composto de bomba quaternária G1311A, injetor automático de alta performance G1329A, desgaseificador G1322A, *cooler* para as amostras G1330b, termostatizador para a coluna G1316A e detector de arranjo de diodos (UV-DAD) G1315A. Para a aquisição dos dados foi utilizado o *software* operacional ChemStation (Agilent[®]). As colunas Eclipse-XDB C₁₈, Eclipse-XDB C₈, Eclipse-XDB Phenyl e Eclipse Ciano (4,6 x 250 mm, 5 µm), da marca Agilent[®], foram utilizadas durante o desenvolvimento do método analítico.

A substância química de referência e a amostra foram pesadas em balança analítica (precisão de 0,00001g, Mettler, modelo Excellence XS 205 DU). Os demais produtos foram pesados em balança analítica, Shimadzu AY220. As soluções preparadas foram sonicadas em aparelho ultrassom Unique, modelo Ultrasonic Cleaner. Para ajuste do pH da solução tampão foi utilizado o peagômetro digital, Thermo, modelo Orion 3 star.

Para o estudo de degradação forçada foram utilizados os equipamentos: Câmara de fotoestabilidade (Nova Ética, modelo 424/CF), estufa de secagem (Tecnal, modelo TE 393/2) e câmara climática (Mecalor, modelo ECL12LAR-URC).

5. MÉTODOS

5.1. Desenvolvimento do método analítico

Ensaio preliminares foram realizados com o objetivo de se obter condições cromatográficas adequadas para a quantificação da cefalotina sódica na forma farmacêutica pó para injeção, bem como a separação de suas impurezas e produtos de degradação, redução de assimetria e pureza de pico.

Baseando-se no requisito necessário o para limite de notificação de produtos de degradação (ICH, 2006; BRASIL, 2013), o método para a determinação de cefalotina sódica deve contemplar um limite de quantificação (LQ) de pelo menos 0,05%, já que a dose diária administrada de cefalotina sódica pode ultrapassar 1g, conforme visto na Tabela 4. Assim

Karen de Souza Rugani

sendo, os produtos de degradação que porventura se formarem podem ser quantificados em área % acima ou igual a este valor.

Na Tabela 6, apresentam-se as condições cromatográficas que foram testadas no desenvolvimento do método analítico. Após a estabilização do sistema, foram injetadas as soluções padrão e amostra, previamente filtradas em membranas com poro de 0,45 μm e 25 mm de diâmetro.

Tabela 6 – Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento de método por CLAE para a cefalotina sódica

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Tampão fosfato de potássio, acetonitrila e/ou metanol (isocrático e gradiente)
	Tampão fosfato de amônio, acetonitrila e/ou metanol (isocrático e gradiente)
	Ácido acético 0,1% + trietilamina 0,1% e acetonitrila (isocrático e gradiente)
	Trietilamina 0,1% e acetonitrila (isocrático e gradiente)
Coluna Cromatográfica	Eclipse XDB C ₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 μm)
	Eclipse XDB C ₈ (4,6 x 250 mm, 5 μm)
	Eclipse XDB Phenyl (4,6 x 250 mm, 5 μm)
	Eclipse CN (4,6 x 250 mm, 5 μm)
Comprimento de onda	Determinado por varredura
Vazão	0,8 mL/min
	1,0 mL/min
	1,2 mL/min
Volume de injeção	10,0 μL
	20,0 μL
Temperatura	30, 35 e 40 °C $\pm$ 1 °C

5.2. Definição do método analítico

A partir dos estudos preliminares, nos quais foram testadas diferentes condições analíticas, juntamente com dados obtidos sobre o estudo de degradação forçada da cefalotina sódica, estabeleceram-se os parâmetros para a definição do método analítico ideal por CLAE. As condições finais escolhidas estão apresentadas na Tabela 7, e o gradiente utilizado descrito na Tabela 8.

Tabela 7 – Parâmetros estabelecidos para a determinação de cefalotina sódica no método indicativo de estabilidade por CLAE

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Fase A: Tampão fosfato de amônio 20 mM, pH 4,5 Fase B: Acetonitrila (eluição por gradiente*)
Coluna analítica	Eclipse XDB-Phenyl (250 × 4,6 mm, 5 µm) - Agilent®
Deteção	238 nm
Vazão de fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Temperatura da coluna	35°C
Tempo de retenção	± 14,8 minutos

*ver dados na Tabela 8

Tabela 8 – Condições de eluição em gradiente utilizado no método para determinação de cefalotina sódica por CLAE

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,0	90	10
2,0	90	10
15,0	70	30
15,1	90	10
30,0	90	10

A eluição por gradiente linear foi utilizada.

5.2.1. Preparo de fase móvel

A fase móvel A (tampão fosfato de amônio 20 mM, pH 4,5) foi preparada pesando-se e solubilizando-se 2,72 g de fosfato de amônio bibásico em 1000 mL de água ultrapura. Ajustou-se o pH para 4,5 com solução de ácido fosfórico 10% e filtrou-se em membrana filtrante de celulose com poro de 0,45 µm e desgaseificou-se em banho ultrassônico por 5 min sob vácuo. A fase móvel B (acetonitrila) foi desgaseificada em banho ultrassônico por 5 min sob vácuo.

5.2.2. Obtenção da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica, pesaram-se 33,31 mg de cefalotina sódica SQR (o equivalente a 31,5 mg de cefalotina) em balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com água ultrapura, obtendo-se uma concentração teórica de 1250 µg/mL. Foram transferidas alíquotas da solução padrão de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água, desta forma obtiveram-se 5 concentrações finais, contemplando uma faixa de 50 a 150% da concentração teórica: 250; 375; 500; 625 e 750 µg/mL. Cada concentração foi preparada em triplicata.

5.2.3. Determinação de cefalotina sódica em pó liofilizado para solução injetável

5.2.3.1 Preparo da solução de cefalotina sódica SQR

Em balão volumétrico com capacidade para 20 mL foram pesados o equivalente a 10 mg de cefalotina; solubilizou-se e completou-se o volume com água ultrapura para obtenção da concentração de 500 µg/mL. Filtrou-se antes das injeções e a solução foi mantida no *cooler* do cromatógrafo a líquido a 5 °C.

5.2.3.2 Preparo da solução de cefalotina sódica amostra

Um *pool* com o conteúdo de 20 frascos de amostra de CET, de peso médio de 1,09 g, foi preparado. A partir deste *pool* de amostra, foi pesado o equivalente a 10 mg de cefalotina em balão volumétrico de 20 mL. O volume foi completado com água ultrapura. As soluções foram preparadas em seis réplicas, as quais foram submetidas à filtração antes das injeções. A solução amostra foi mantida em *cooler* do cromatógrafo a líquido a 5°C.

5.2.3.3 Estabilidade das soluções de cefalotina sódica SQR e amostra

Verificou-se a estabilidade da solução de cefalotina sódica SQR e da solução amostra após 24 horas, em temperatura ambiente e a 5° C. Após a obtenção dos resultados, também foi avaliada a estabilidade destas soluções em 2, 4, 6 e 8 horas em temperatura ambiente.

5.2.3.4 Cálculo do teor de cefalotina sódica na amostra

A concentração de cefalotina sódica na amostra foi calculada pela Equação 1 e o seu teor porcentual foi calculado pela Equação 2.

$$Ca = Aa \times \frac{Csqr}{Asqr} \quad \text{Equação 1}$$

$$Ca\% = Ca \times \frac{100}{Ct}$$

Equação 2

Em que:

Ca = concentração da amostra (µg/mL)

Ca% = concentração porcentual da amostra

Csqr = Concentração da substância química de referência (µg/mL)

Aa = Área obtida no cromatograma da amostra

Asqr = Área obtida no cromatograma da substância química de referência

Ct = concentração teórica de cefalotina sódica na amostra (µg/mL)

5.3. Estudo de degradação forçada

5.3.1. Condução do estudo

O estudo de degradação forçada foi realizado avaliando-se a amostra de cefalotina sódica em pó para solução injetável em concentrações de 500 µg/mL submetidas às condições de estresse: hidrólise ácida e alcalina, oxidação, calor, umidade e luz. As concentrações das soluções de degradação utilizadas foram determinadas de forma a se obter preferencialmente uma faixa de degradação do ativo de 10 a 30% em comparação com a concentração inicial. A exposição à luz foi realizada em câmara de fotoestabilidade, sob lâmpada UV e fluorescente.

Foram integrados os picos cromatográficos de produtos de degradação com áreas maiores ou iguais ao limite de quantificação determinado pelo método. Os produtos de degradação identificados pelo tempo de retenção relativo (t_{RR}) foram expressos em área %. Considerou-se estável a amostra que em até 10 dias não apresentou degradação significativa, ou seja, superior a 2%.

As amostras e placebos foram preparados sob as mesmas condições de estresse. A pureza cromatográfica das amostras citadas acima foi avaliada através do teste de pureza do pico da substância ativa, utilizando-se como ferramenta o *software* do equipamento. Foram aceitos os índices de pureza de pico acima ou igual a 980 (98% de pureza).

5.3.1.1 Placebo

Foi preparado o placebo com o único excipiente presente na amostra de cefalotina sódica em pó para injeção, que é o bicarbonato de sódio. Considerando a informação contida na bula do produto, cada 1,06 g de cefalotina são tamponados com 30 mg de bicarbonato de sódio. Preparou-se então uma solução estoque em água ultrapura, na concentração de 150 µg/mL de bicarbonato de sódio. Depois, para cada preparo que seja necessário de placebo, realizou-se a diluição de 2 mL em balão volumétrico de 20 mL com água ultrapura.

5.3.1.2 Amostra controle

A amostra foi preparada conforme item 5.2.3.2, sem ser submetida a nenhuma condição de degradação forçada (amostra controle), para servir de comparativo às demais condições de estresse.

5.3.1.3 Degradação por hidrólise ácida e alcalina

A amostra foi preparada separadamente com HCl 0,1 M e NaOH 0,01 M. A solução ácida foi mantida à temperatura de 60 °C por 40 minutos e a solução alcalina em temperatura ambiente por 5 minutos. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz. As soluções ácida e alcalina foram neutralizadas com NaOH 0,1 M e HCl 0,01 M, respectivamente, e então diluídas com água ultrapura.

5.3.1.4 Degradação oxidativa

A degradação oxidativa foi preparada com solução de H₂O₂ 3% e mantida sob temperatura ambiente por 20 minutos, protegida da luz. Depois a solução foi diluída com água ultrapura.

5.3.1.5 Degradação fotoquímica

A fotodegradação foi realizada expondo-se a amostra em pó de cefalotina sódica (a amostra foi acondicionada em placa de vidro aberta) em câmara de fotoestabilidade calibrada

e equipada com fonte de luz de branca fluorescente fria similar à ISO 10977 (1993) e lâmpada ultravioleta (UV) com espectro distribuído entre 320 a 400 nm e emissão de energia máxima entre 350 e 370 nm, por um período total de 10 dias, mantidas a 25 °C. Amostras também foram analisadas nos tempos de 3 e 6 dias. A iluminação usada não foi inferior a 1,2 milhões de lux.hora (Vis), nem a 200 Watt h/m² (UV), controlados por luxímetro calibrado. A amostra depois de exposta foi então dissolvida e diluída com água ultrapura. A fonte de luz utilizada está de acordo com a preconizada no guia do ICH Q1B (ICH, 1996).

5.3.1.6 Degradação térmica

A amostra de cefalotina em pó foi aquecida a 60 °C por 10 dias, mantida em estufa, ao abrigo da luz para o estudo da degradação por calor. Também foi analisada em 3 e 6 dias. Após o período de exposição, a amostra foi solubilizada e diluída em água ultrapura.

5.3.1.7 Degradação por umidade

A amostra em pó de cefalotina foi mantida em câmara climática a 30° C/75% UR por 10 dias para o estudo de degradação por umidade. A amostra também foi analisada após 3 e 7 dias. Após o tempo de exposição, a amostra foi solubilizada e diluída em água ultrapura.

5.3.1.8 Preparo do padrão de identificação da impureza B

Uma solução padrão contendo 220 µg/mL de cefalotina impureza B (desacetilcefalotina) foi preparada em água ultrapura e analisada no estudo de degradação forçada, com o intuito de identificar esta impureza dentre os produtos de degradação formados.

5.4. Validação do método

O método desenvolvido foi validado seguindo a avaliação dos seguintes parâmetros: adequação do sistema, linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, limites de detecção e de quantificação, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 36, 2013).

5.4.1. Adequação do sistema (*System Suitability*)

Preparou-se uma solução de CET SQR, na concentração nominal de 100% do método (500 µg/mL), e injetou-se seis vezes. O desvio padrão relativo entre as injeções foi calculado. A partir destas injeções, avaliaram-se os seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_R), área do pico, número de pratos (N) e os fatores de cauda (T), de assimetria (A_S) e de retenção (k'). Além disso, foram calculados e analisados os valores de DPR% para cada um deles. Todos os valores foram fornecidos pelo *software* ChemStation (Agilent®).

5.4.2. Linearidade

A linearidade do método proposto foi verificada pela análise da equação da reta da curva analítica obtida pelo estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA. A curva analítica foi preparada a partir de uma solução-estoque de CET SQR na concentração de 1250 µg/mL em água ultrapura; transferiram-se alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água ultrapura. As concentrações de trabalho obtidas foram: 250; 375; 500; 625 e 750 µg/mL.

5.4.3. Precisão

A precisão foi testada através da execução das etapas de repetibilidade e precisão intermediária. Foram realizados ensaios de determinação de teor do fármaco no produto, com no mínimo seis determinações em cada dia, em dias diferentes e com analistas diferentes.

5.4.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi realizada pela determinação do teor na amostra de CET através de seis preparos de amostra no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo porcentual (DPR%) entre as determinações foi avaliado.

5.4.3.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através da determinação do teor na amostra de CET através de seis preparos, porém realizados por um segundo analista e em dia diferente do da repetibilidade, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

5.4.4. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. Foram preparados três níveis de concentração para a recuperação. Cada concentração foi preparada em triplicata. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9 - Preparo das soluções para o teste de recuperação de CET pelo método CLAE

	CET amostra (1250 µg/mL) (mL)	CET SQR (1250 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)¹
Amostra	4,0	-	250,0
R1	4,0	2,0	375,0
R2	4,0	4,0	500,0
R3	4,0	6,0	625,0
Padrão	-	4,0	250,0

¹ Balão volumétrico de 20 mL

A porcentagem de recuperação (R%) da CET foi calculada através da Equação 3:

$$R\% = \left[\frac{(Cf - Ca)}{Cp} \right] \times 100$$

Equação 3

Na qual:

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

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

Cp = concentração teórica da substância química de referência adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

5.4.5. Robustez

Foram realizados doseamentos da cefalotina na amostra de pó para solução injetável após a variação dos parâmetros analíticos. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao desvio padrão relativo, comparando-as com as condições normais de trabalho. Os parâmetros alterados estão indicados na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros analíticos alterados na robustez

Parâmetros	Condições alteradas
Vazão da fase móvel	$\pm 0,1 \text{ mL/min}$
Temperatura da coluna	$\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Composição inicial da fase móvel solução tampão:acetonitrila	$\pm 2\%$
pH da fase móvel (tampão)	$\pm 0,1$

5.4.6. Especificidade e seletividade

A seletividade do método proposto foi avaliada por meio do percentual de resposta relacionando-se o sinal obtido para a substância ativa na ausência dos excipientes (SQR) e o seu sinal na presença dos excipientes (produto de referência). Injetaram-se uma solução placebo e o branco do diluente (água) para verificar se possuíam alguma interferência na resposta do método.

A especificidade foi avaliada através dos resultados obtidos no estudo de degradação forçada utilizando-se amostras submetidas a condições de estresse tais como: luz, calor,

umidade, hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidação, como já descrito no item 5.3.1. Como ferramenta adicional no auxílio da verificação da especificidade, foram extraídos os espectros de absorção em 3D das amostras e placebos. Através dos espectros tridimensionais é possível verificar se existem outros picos cromatográficos em comprimentos de onda diferentes daquele selecionado para o método.

5.4.7. Limite de detecção (LD)

Considerando que o método analítico empregado neste estudo foi por CLAE, a estimativa do limite de detecção foi realizada pela relação de três vezes o ruído da linha de base. Este cálculo foi realizado pelo *software* do equipamento cromatógrafo a líquido.

5.4.8. Limite de quantificação (LQ)

O LQ foi determinado por meio do ruído, considerando aquela concentração que produziu relação sinal-ruído de 10:1. Este cálculo foi realizado através do *software* do cromatógrafo a líquido.

RESULTADOS

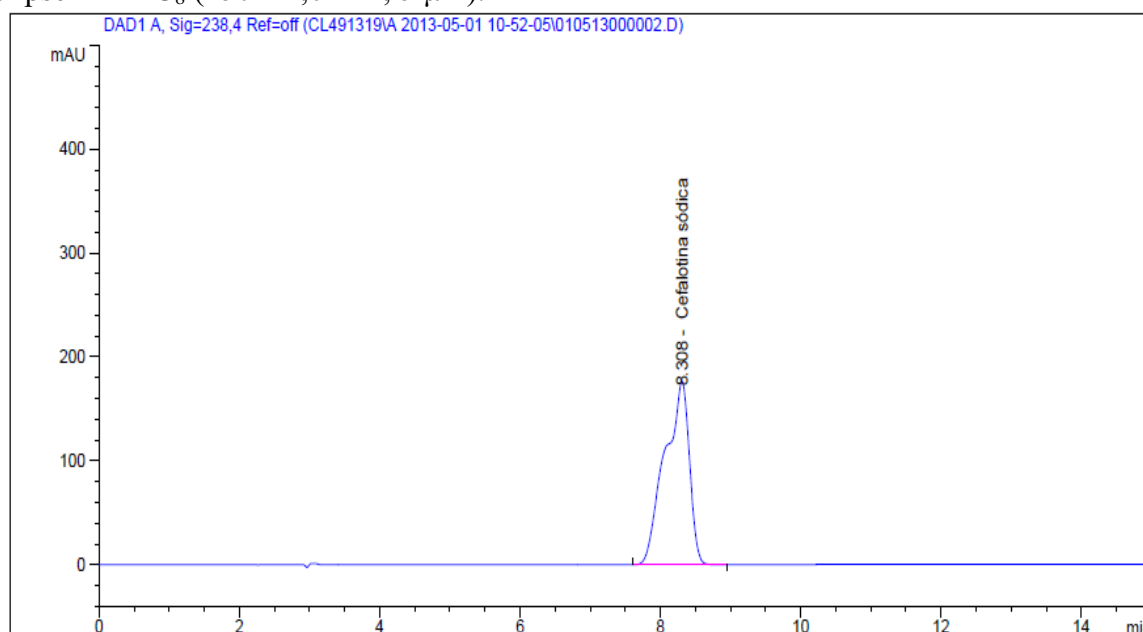
6. RESULTADOS

6.1. Desenvolvimento de método analítico

Considerando as condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento do método analítico (Tabela 6), algumas observações podem ser pontuadas:

- Com a utilização das colunas Agilent Eclipse XDB-C₁₈ e Eclipse XDB-C₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) e tampão fosfato de potássio/acetonitrila 80:20 (v/v) como fase móvel, o pico de cefalotina apresentou-se com fator de cauda elevado (1,95 e 1,88, respectivamente). Entretanto, na substituição de acetonitrila por metanol, mantendo-se a coluna Eclipse XDB-C₈, observou-se a deformação do pico do ativo, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Cromatograma de cefalotina sódica SQR obtido durante o desenvolvimento do método analítico. Fase móvel: tampão fosfato de potássio/metanol (80:20). Coluna: Agilent Eclipse XDB-C₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm).



- O uso da coluna Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm) levou à melhora na simetria do pico de cefalotina. Testou-se, então, o tampão fosfato de potássio e os solventes acetonitrila, metanol e etanol. O teste, utilizando acetonitrila, apresentou melhor fator de cauda que os demais solventes.

- Usando a mesma coluna, várias fases móveis contendo trietilamina foram testadas, o que demonstrou uma melhora considerável no fator de cauda, porém provocou interferência na linha de base e na pureza do pico da cefalotina.
- A condição, utilizando-se tampão fosfato de potássio 30 mM pH 4,5 e acetonitrila, na proporção 80:20 (v/v), ao se realizar a injeção na concentração de 500 µg/mL de CET, apresentou fator de cauda muito alto (1,90).
- O teste utilizando-se o tampão fosfato de amônio e acetonitrila como solvente solucionou o problema do fator de cauda elevado. Foram então feitos vários testes e ajustes, utilizando-se diversas proporções de fase móvel, variação no pH do tampão, gradientes, diferentes temperaturas da coluna e variação na vazão da fase móvel, até que o método apresentou sua melhor performance, com valores de fator de cauda aceitáveis, e a separação de um produto de degradação que se forma na condição de hidrólise alcalina muito próximo ao pico de cefalotina em valor de resolução superior a 2.
- Para o estudo de degradação forçada, testes foram realizados com amostras submetidas às diferentes condições de estresse, variando-se tanto a concentração das soluções de HCl, NaOH e H₂O₂, quanto o tempo de exposição. Inicialmente, utilizaram-se soluções mais concentradas, mantendo a exposição por um período de 24 horas. Depois, de acordo com a porcentagem de degradação obtida de CET, foram realizados ajustes nas concentrações das soluções e no tempo de exposição com o objetivo de se atingir a faixa de 10 a 30%. Tempos menores de exposição foram necessários nas condições de hidrólise ácida e básica e no estresse oxidativo, e tempos maiores foram utilizados nas demais condições de exposição ao calor, umidade e fotodegradação.

As Figuras 12 e 13 apresentam o cromatograma típico obtido da amostra pelo método proposto e o cromatograma ampliado da amostra, utilizando a coluna analítica Agilent Eclipse

XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m), vazão de 1,0 mL/min e fase móvel constituída por tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5 e acetonitrila no modo gradiente.

Figura 12 - Cromatograma de cefalotina sódica amostra (500 μ g/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

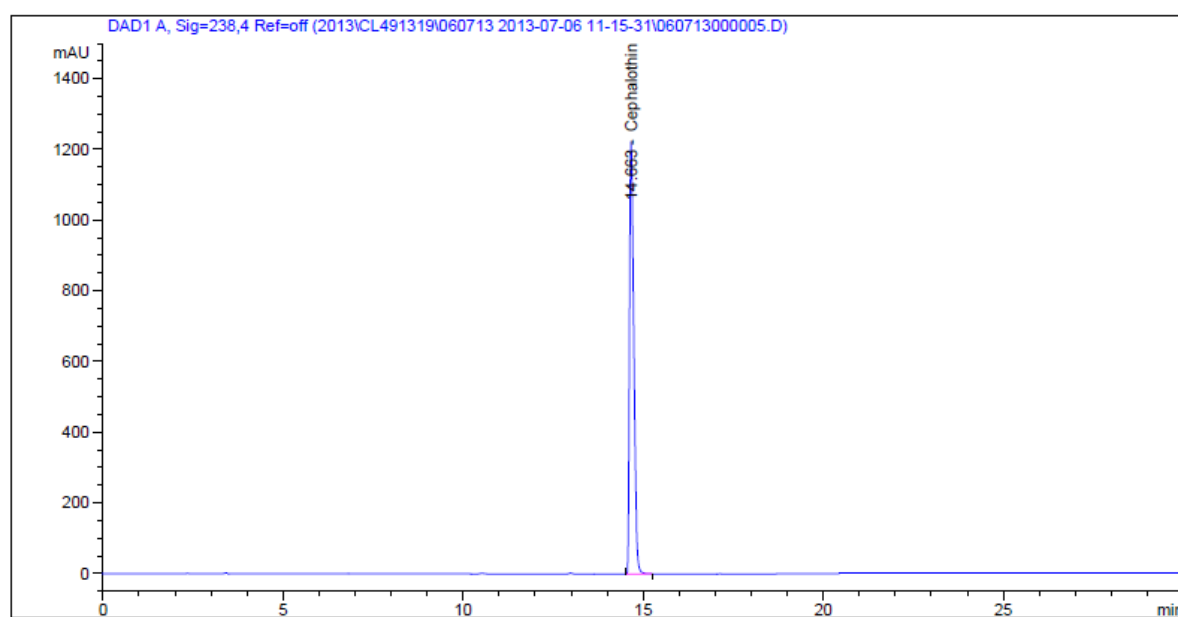
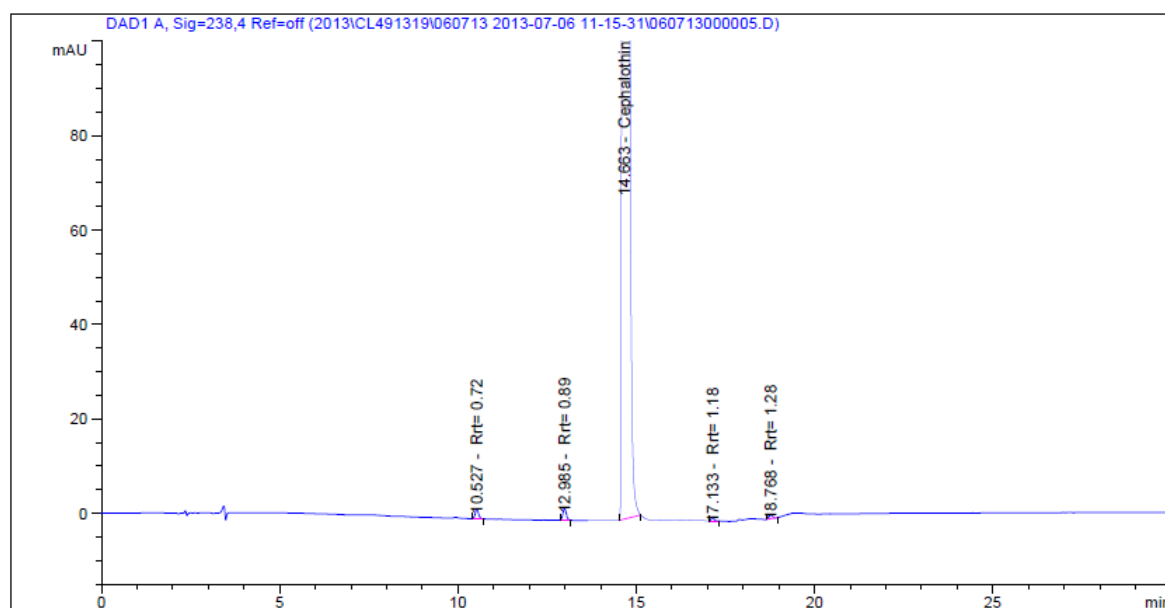


Figura 13 - Cromatograma ampliado de cefalotina sódica amostra (500 μ g/mL) no método proposto.



No cromatograma ampliado da amostra de CET foi possível observar a presença de outros picos cromatográficos, possíveis produtos de degradação que já estavam presentes na amostra, antes da realização dos testes de degradação forçada. Na Tabela 11 está demonstrada a concentração em área % destes produtos.

Tabela 11 – Produtos de degradação presentes na amostra de cefalotina sódica

Tempo de retenção, t_R (min)	t_{RR}	Área (%)
10,53	0,72 (impureza B)	0,14
12,99	0,89	0,17
17,13	1,18	0,04
18,77	1,28	0,05

t_{RR} : tempo de retenção relativo

6.2. Estudo de degradação forçada

A especificidade do método foi avaliada através da injeção de soluções de amostra a 500 µg/mL e do placebo submetidos às condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotolítico, calor e umidade). O tempo total de corrida cromatográfica foi duas vezes o tempo de retenção do pico da cefalotina, para garantir a eluição de todos os possíveis produtos de degradação.

A degradação foi observada apenas nas condições de hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidação. Nas condições de fotoestabilidade, calor e umidade, a amostra de cefalotina mostrou-se estável, já que não ocorreu degradação em um período total de 10 dias. A pureza de pico foi avaliada em todas as condições testadas o que confirmou a especificidade do método ao comprovar que o pico de cefalotina é puro e homogêneo. A porcentagem de degradação em cada condição de estresse está apresentada na Tabela 12.

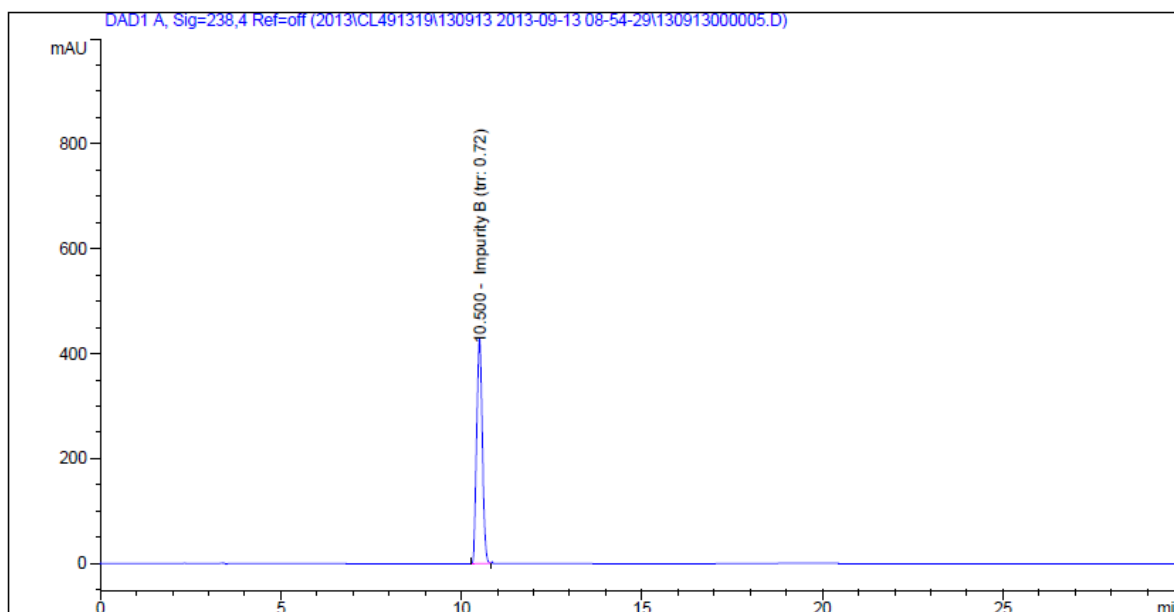
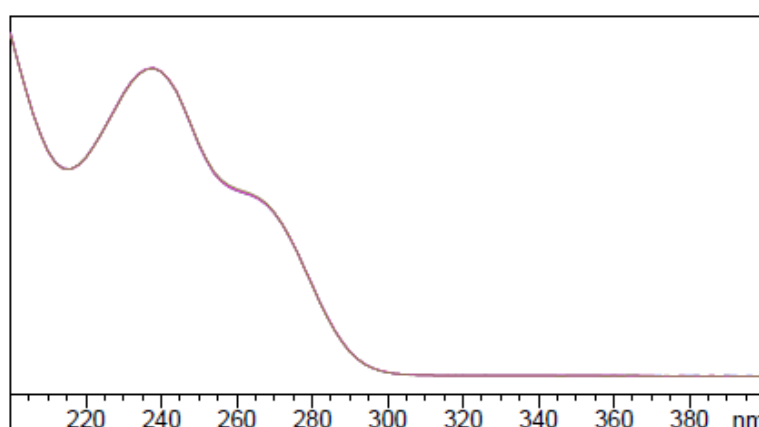
Tabela 12 – Porcentagem de degradação da cefalotinana amostra submetida às condições de degradação forçada

Amostra / Condição de estresse	Teor mg/g	Teor (%)	Degradação (%)
Controle (sem estresse)	1001,88	100,19	--
Hidrólise ácida (HCl 0,1 M – 40 minutos)	840,57	84,06	16,10
Hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M – 5 minutos)	852,39	85,24	14,92
Oxidação (H ₂ O ₂ 3% - 20 minutos)	799,15	79,91	20,24
Fotodegradação (UV/VIS – 3 dias)	1003,98	100,40	*
Fotodegradação (UV/VIS – 6 dias)	998,69	99,87	*
Fotodegradação (UV/VIS – 10 dias)	1000,87	100,09	*
Calor (60° C - 3 dias)	1001,20	100,12	*
Calor (60° C - 6 dias)	1009,66	100,97	*
Calor (60° C - 10 dias)	1010,04	101,00	*
Umidade (30 °C/ 75% UR – 3 dias)	1002,67	100,27	*
Umidade (30 °C/ 75% UR – 7 dias)	1013,47	101,35	*
Umidade (30 °C/ 75% UR – 10 dias)	1015,12	101,51	*

* < DPR

6.2.1. Identificação da impureza B (desacetilcefalotina)

A impureza B (desacetilcefalotina) identificada por análise comparativa com a solução padrão de referência, apresentou tempo de retenção aproximadamente de 10,5 minutos e tempo de retenção relativo (t_{RR}) de 0,72, como pode ser observado no cromatograma da Figura 14. O seu espectro de absorção está representado na Figura 15.

Figura 14 - Cromatograma representativo do padrão de impureza B (desacetilcefalotina).**Figura 15** - Espectro de absorção da solução padrão de impureza B (desacetilcefalotina).

A seguir estão representados os cromatogramas das amostras de cefalotina e dos placebos sob as diversas condições de estresse realizadas, além do espectro de absorção da cefalotina na amostra.

6.2.2. Condição normal (controle)

Os cromatogramas da amostra de cefalotina e do placebo sem nenhuma condição de estresse (amostra e placebo controle) e o espectro de absorção da amostra podem ser observados nas Figuras 12, 16 e 17.

Figura 16 - Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sem estresse (placebo controle). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

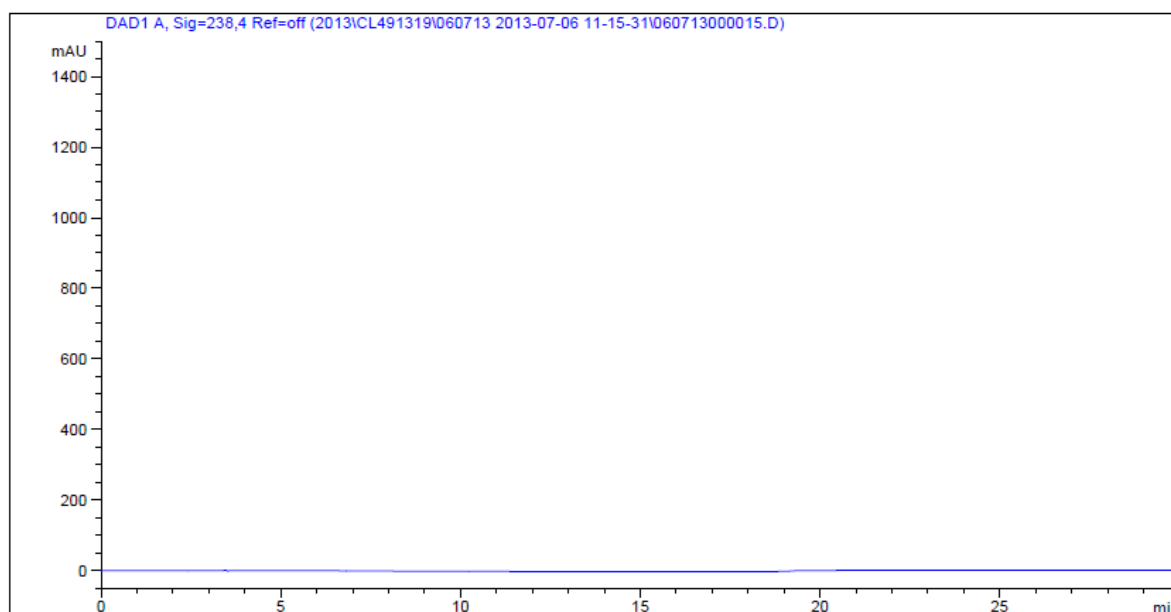
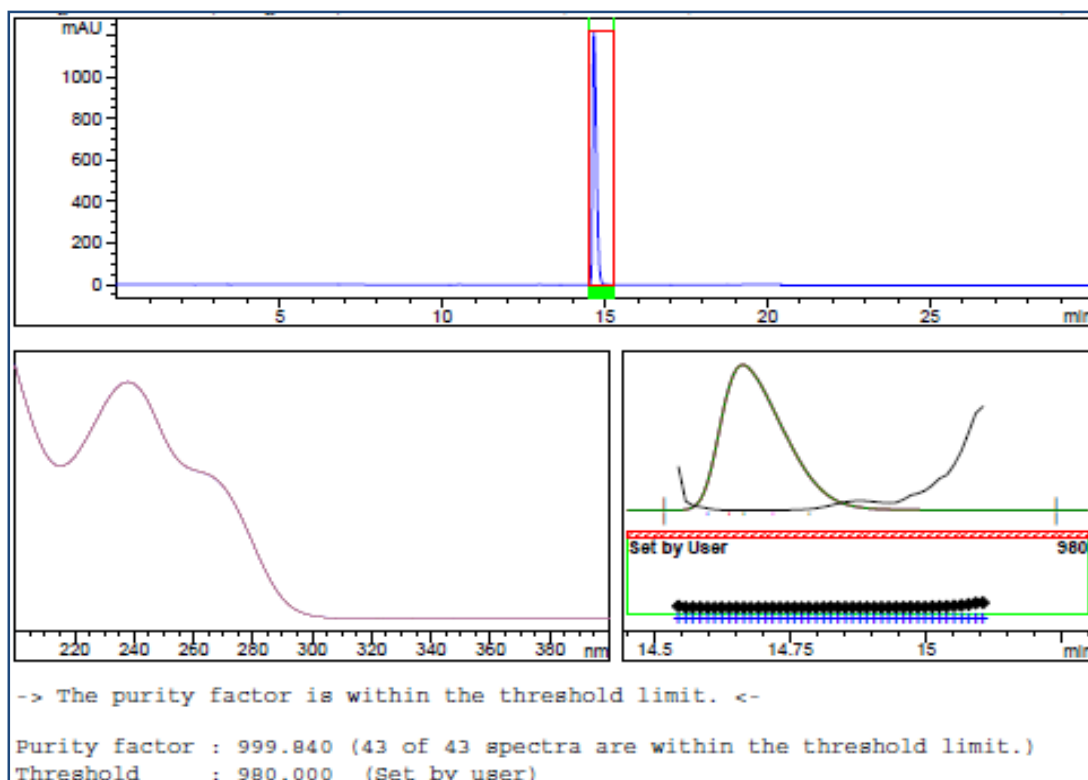


Figura 17 - Espectro de absorção da amostra de cefalotina incluindo demonstrativo de pureza de pico.



6.2.3. Condição de hidrólise ácida

Os cromatogramas da amostra de cefalotina, da amostra ampliada contemplando seus produtos de degradação e do placebo submetidos à hidrólise ácida (HCl 0,1 M a 60 °C, após 40 minutos) podem ser observados nas Figuras 18, 18 e 20. O espectro de absorção é semelhante ao observado na Figura 17. Houve formação de sete produtos de degradação, inclusive a impureza B.

Figura 18 - Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob hidrólise ácida (HCl 0,1 M a 60 °C, após 40 minutos). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).

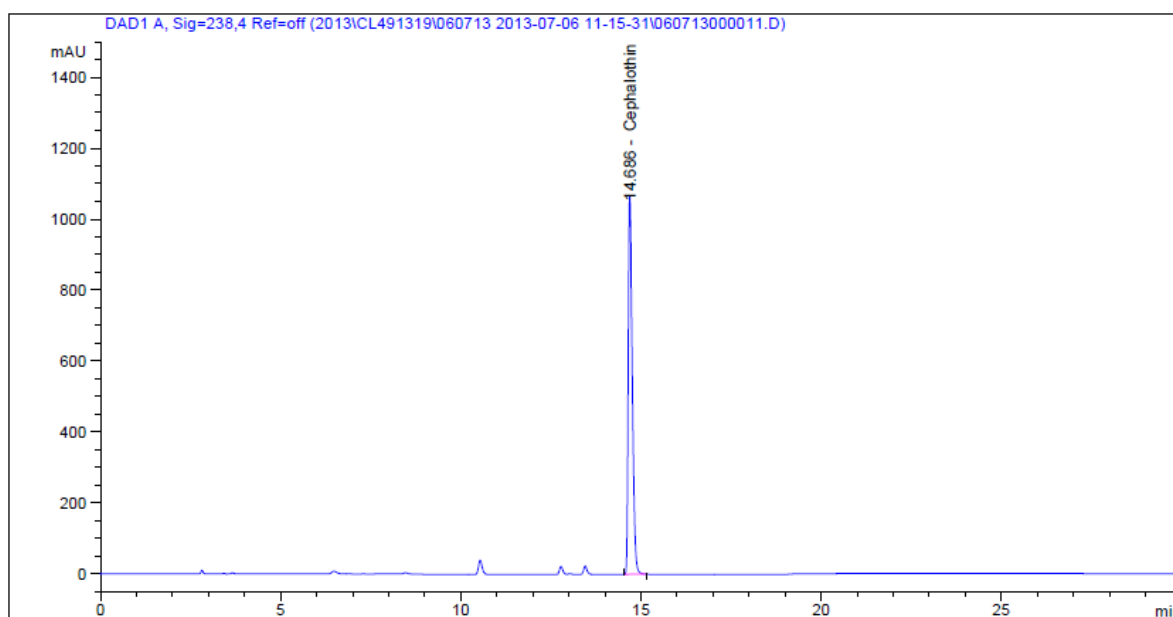


Figura 19 - Cromatograma ampliado da amostra de cefalotina contemplando seus produtos de degradação sob condição de estresse ácido (HCl 0,1 M a 60 °C, após 40 minutos).

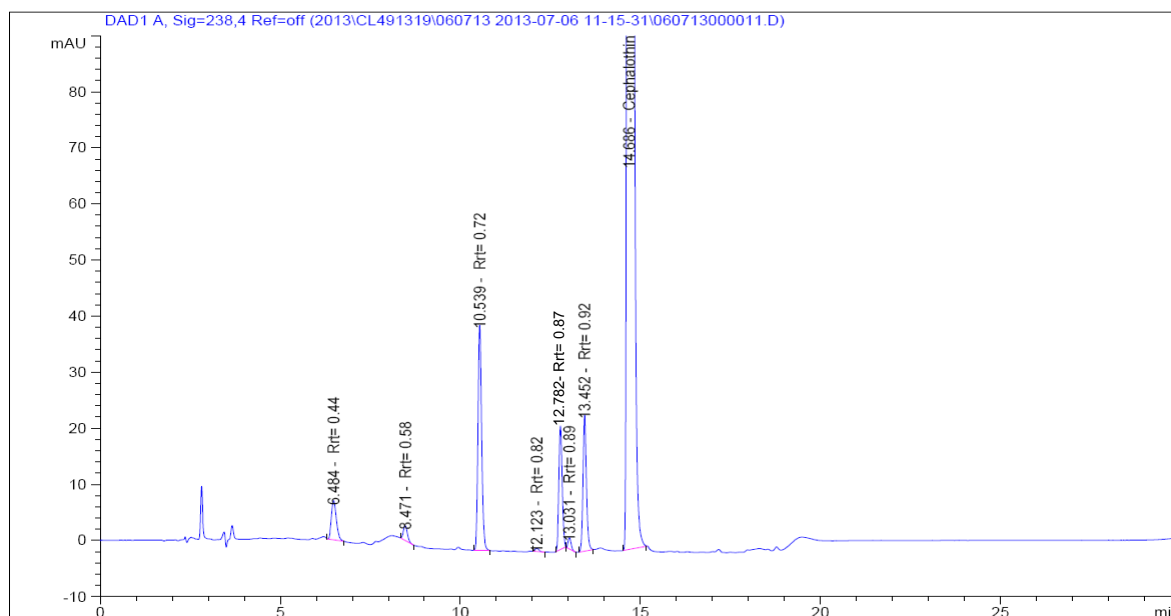
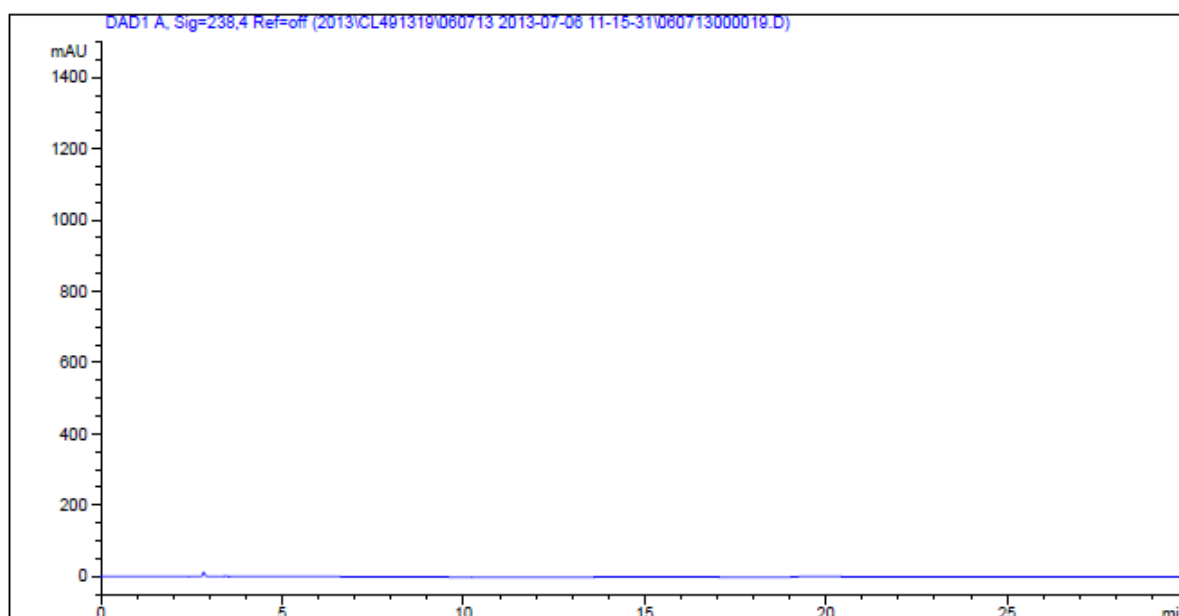


Figura 20 - Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob hidrólise ácida (HCl 0,1M a 60°C, após 40 minutos). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).



6.2.4. Condição de hidrólise alcalina

Os cromatogramas da amostra de cefalotina, da amostra contemplando seus produtos de degradação e do placebo submetidos à hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M em temperatura ambiente, após 5 minutos) podem ser observados nas Figuras 21, 22 e 23. O espectro de absorção é semelhante ao observado na Figura 17. Houve formação de oito produtos de degradação, inclusive a impureza B.

Figura 21 - Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M em temperatura ambiente, após 5 min). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).

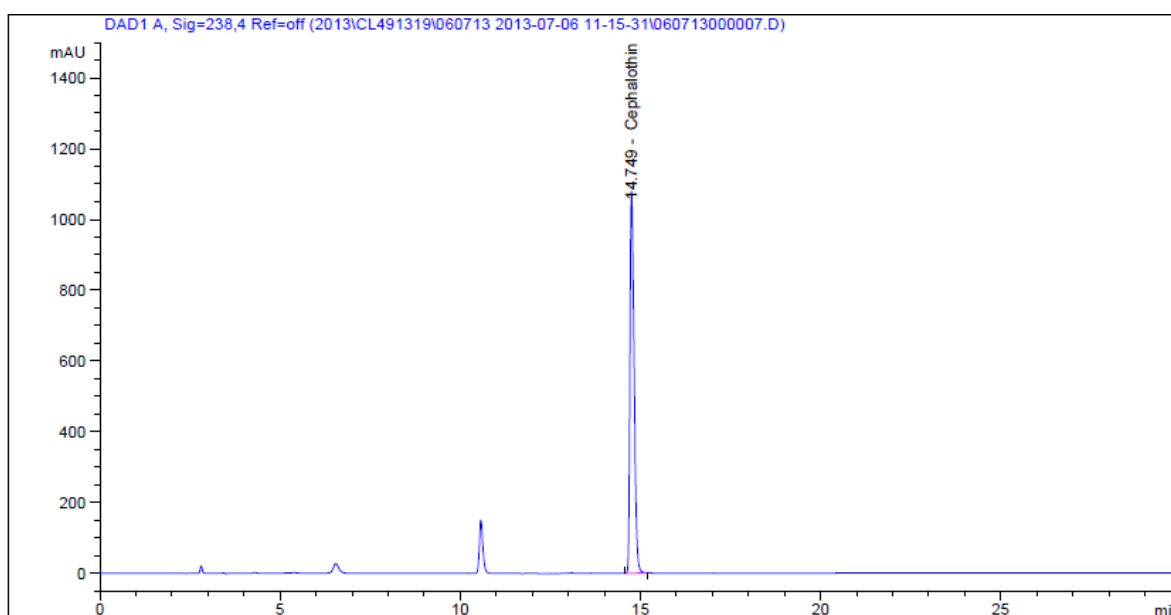


Figura 22 - Cromatograma ampliado da amostra de cefalotina contemplando seus produtos de degradação sob condição de estresse alcalina (NaOH 0,01 M em temperatura ambiente, após 5 minutos).

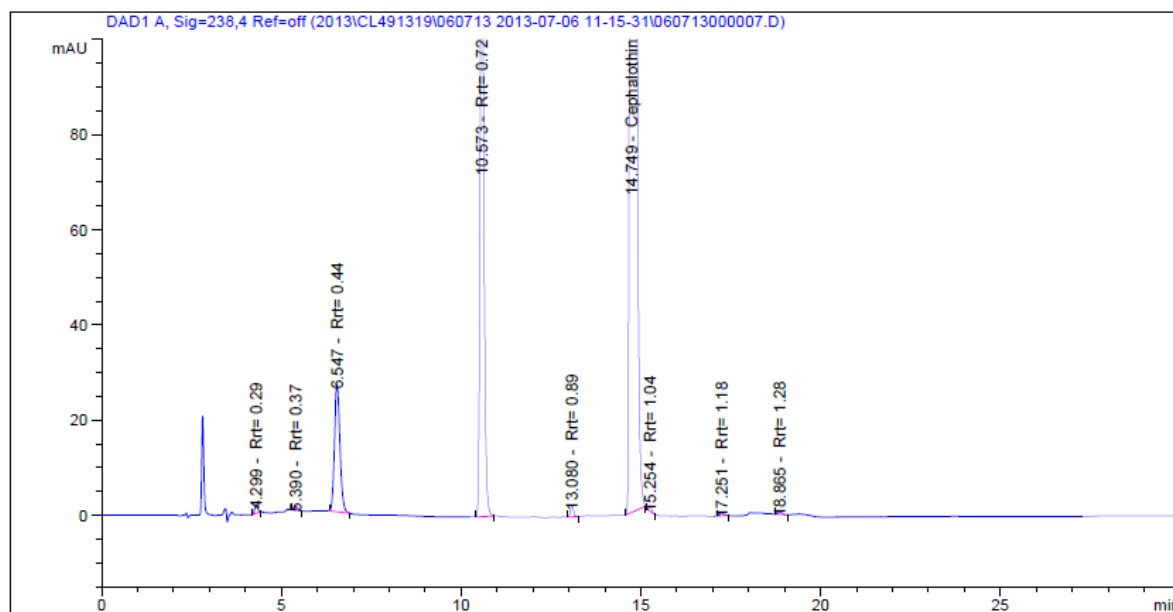
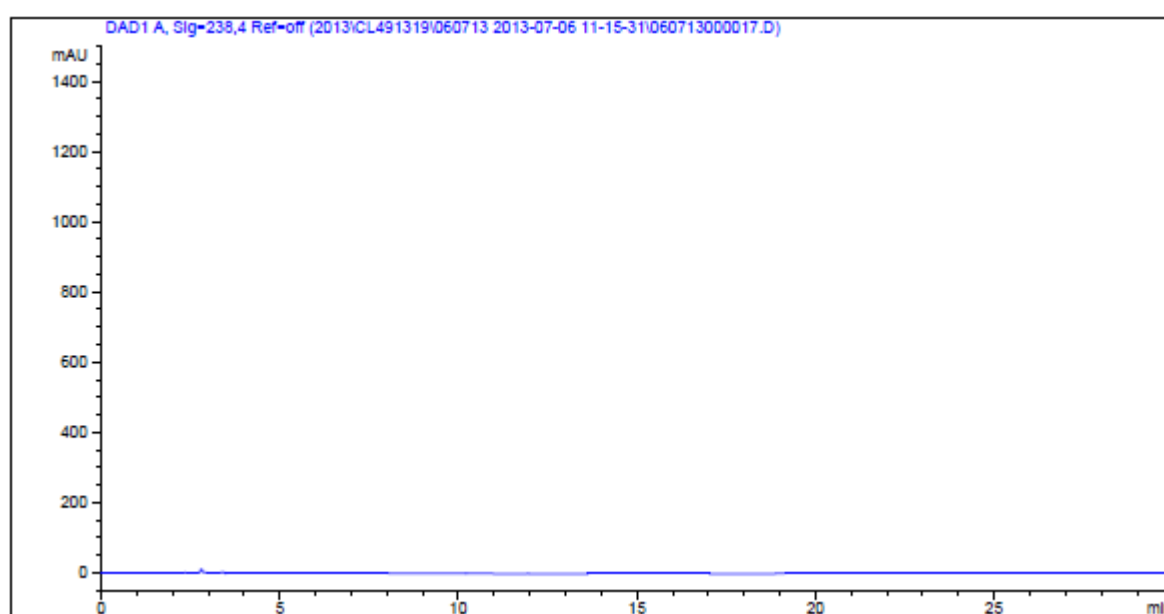


Figura 23 - Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob hidrólise alcalina (NaOH 0,01M em temperatura ambiente, após 5 min). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).



6.2.5. Condição oxidativa

Os cromatogramas da amostra de cefalotina, da amostra contemplando seus produtos de degradação e do placebo submetidos ao estresse oxidativo (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, 20 min) podem ser observados nas Figuras 24, 25 e 26. O espectro de absorção é semelhante ao observado na Figura 17. Houve formação de nove produtos de degradação, inclusive a impureza B.

Figura 24 - Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob oxidação (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, 20 min). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).

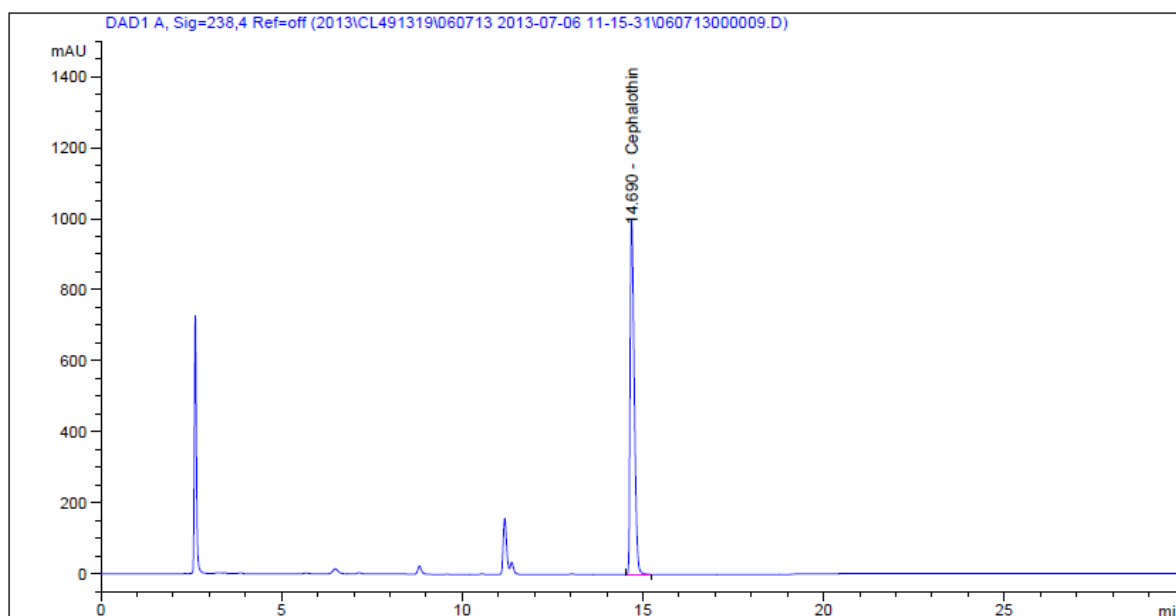


Figura 25 - Cromatograma ampliado da amostra de cefalotina contemplando seus produtos de degradação sob condição de estresse oxidativo (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, após 20 minutos).

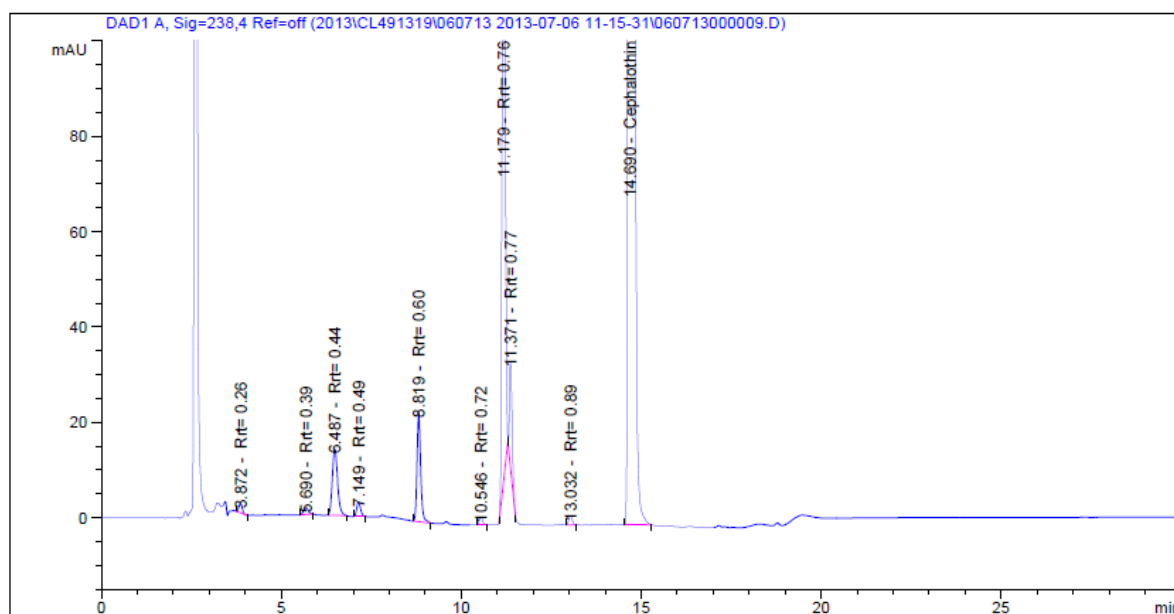
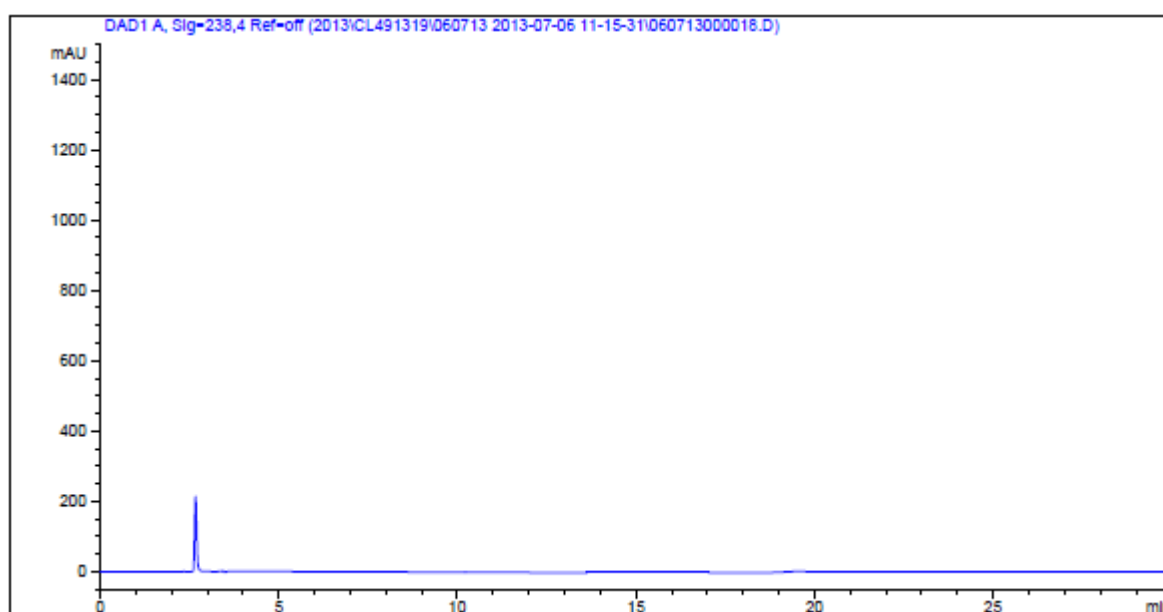


Figura 26- Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob oxidação (H_2O_2 3% em temperatura ambiente, 20 minutos). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μm).



6.2.6. Condição de fotodegradação

Na exposição à luz (câmara de fotoestabilidade – lâmpada UV/VIS a 25 °C) a amostra foi preparada após 3 dias, 6 dias e 10 dias de exposição, na qual demonstrou-se estável depois deste período, já que não ocorreu degradação da CET superior a 2%. Considerando este resultado, apenas os cromatogramas referentes ao tempo final (10 dias) da amostra e do placebo estão representados nas Figuras 27 e 28. O espectro de absorção é semelhante ao observado na Figura 17.

Figura 27 - Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada de exposição à luz (fotodegradação – UV/VIS a 25 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).

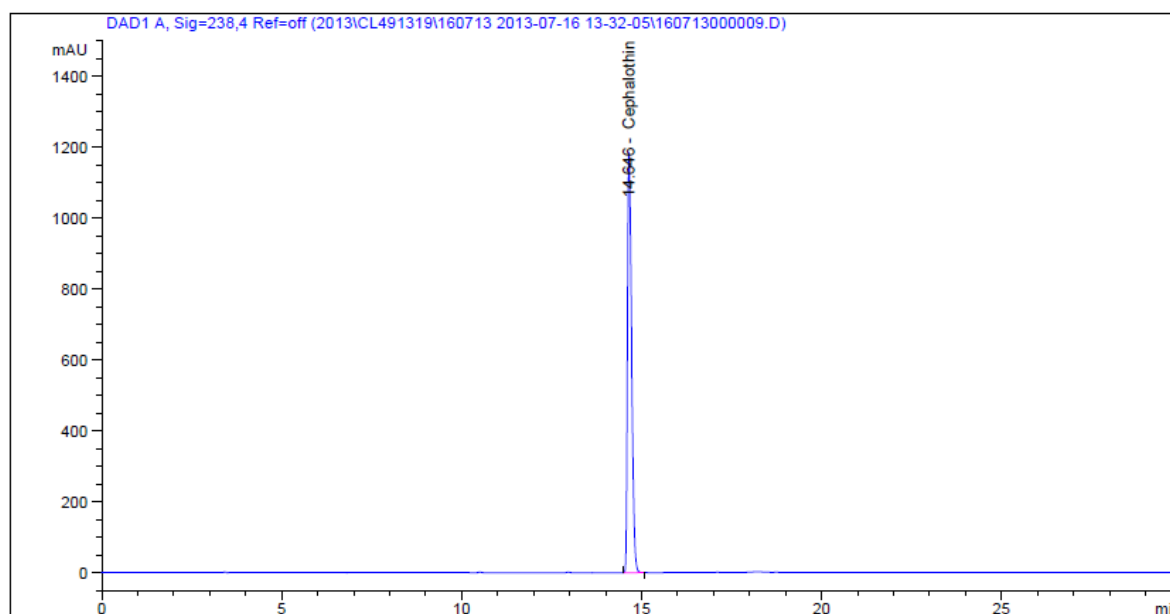
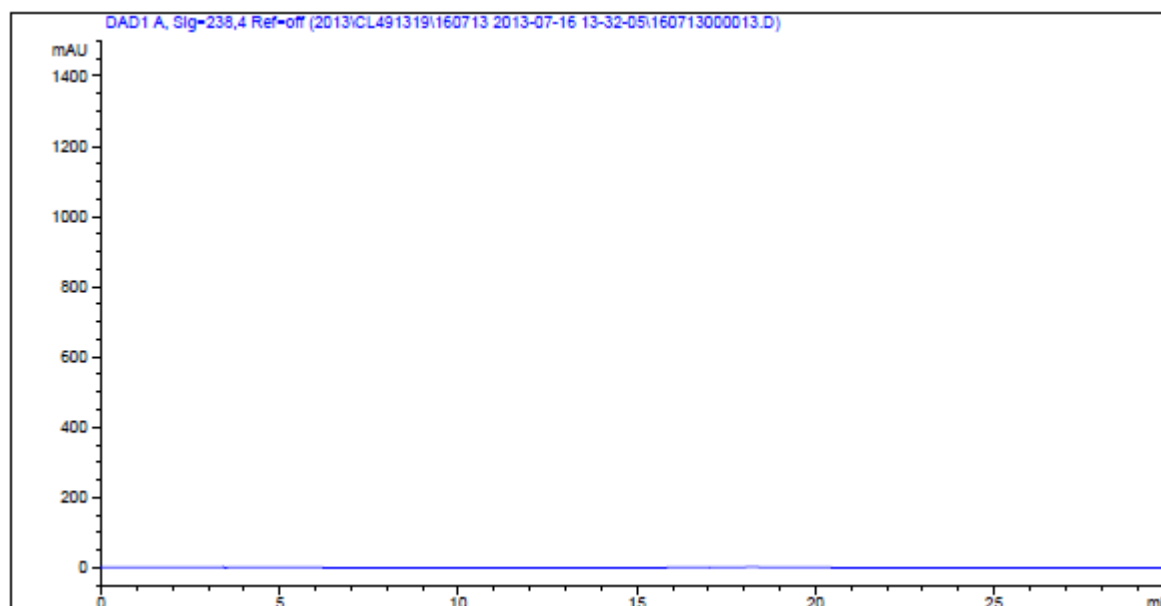


Figura 28 - Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada de exposição à luz (fotodegradação – UV/VIS a 25 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).



6.2.7. Condição sob calor

Na condição sob calor (estufa a seco, 60 °C), a amostra foi preparada após 3 dias, 6 dias e 10 dias de exposição e demonstrou-se estável, já que não ocorreu degradação da CET superior a 2%. Considerando este resultado, apenas os cromatogramas referentes ao tempo final (10 dias) da amostra e do placebo estão representados nas Figuras 29 e 30. O espectro de absorção é semelhante ao observado na Figura 17.

Figura 29 - Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob calor (60 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).

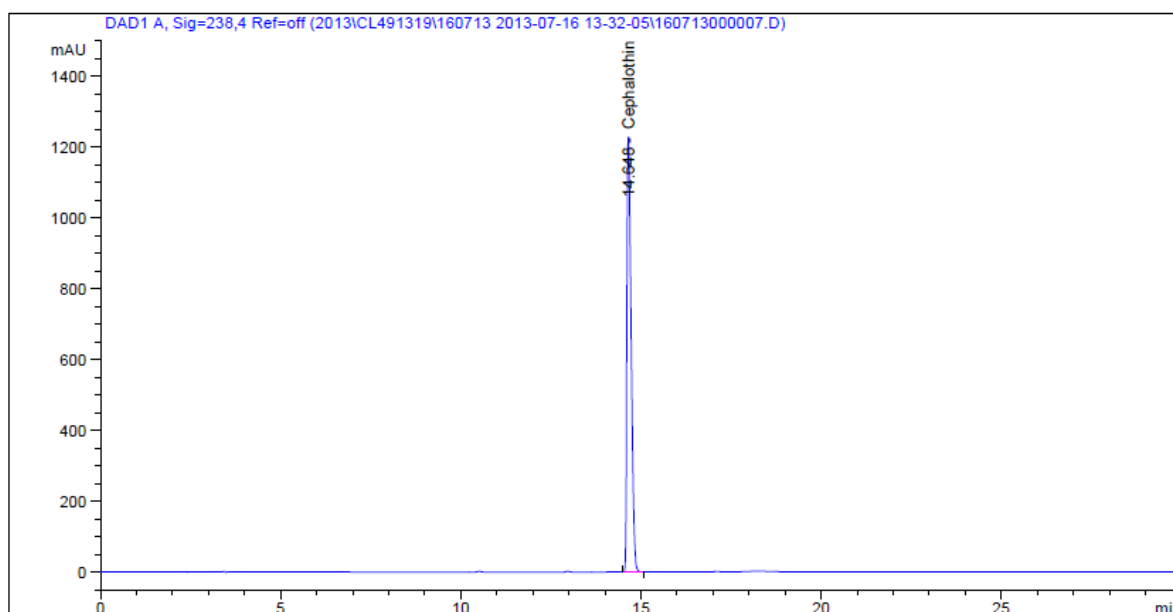
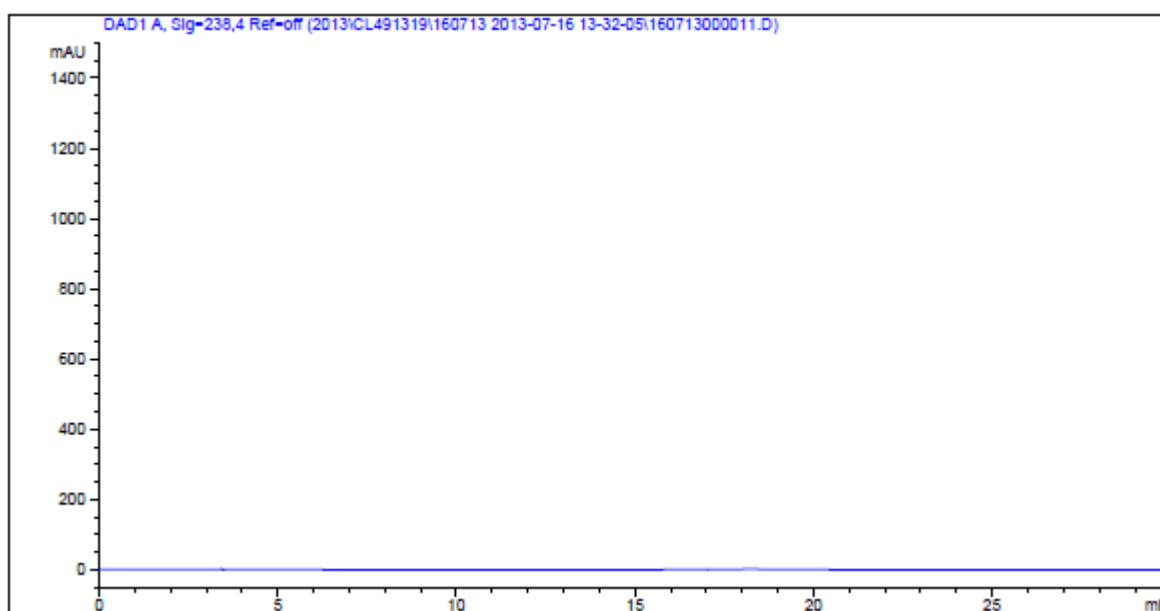


Figura 30 - Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob calor (60 °C, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).



6.2.8. Condição de umidade

Na condição sob umidade (câmara de estabilidade a 30 °C e 75% UR), a amostra foi preparada após 3 dias, 7 dias e 10 dias de exposição, na qual demonstrou-se estável depois deste período, já que não apresentou degradação de CET superior a 2%. Considerando estes dados, apenas os cromatogramas referentes ao tempo final (10 dias) da amostra e do placebo estão representados nas Figuras 31 e 32. O espectro de absorção é semelhante ao observado na Figura 17.

Figura 31 - Cromatograma representativo da amostra de cefalotina no estudo de degradação forçada sob umidade (30 °C/75% UR, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).

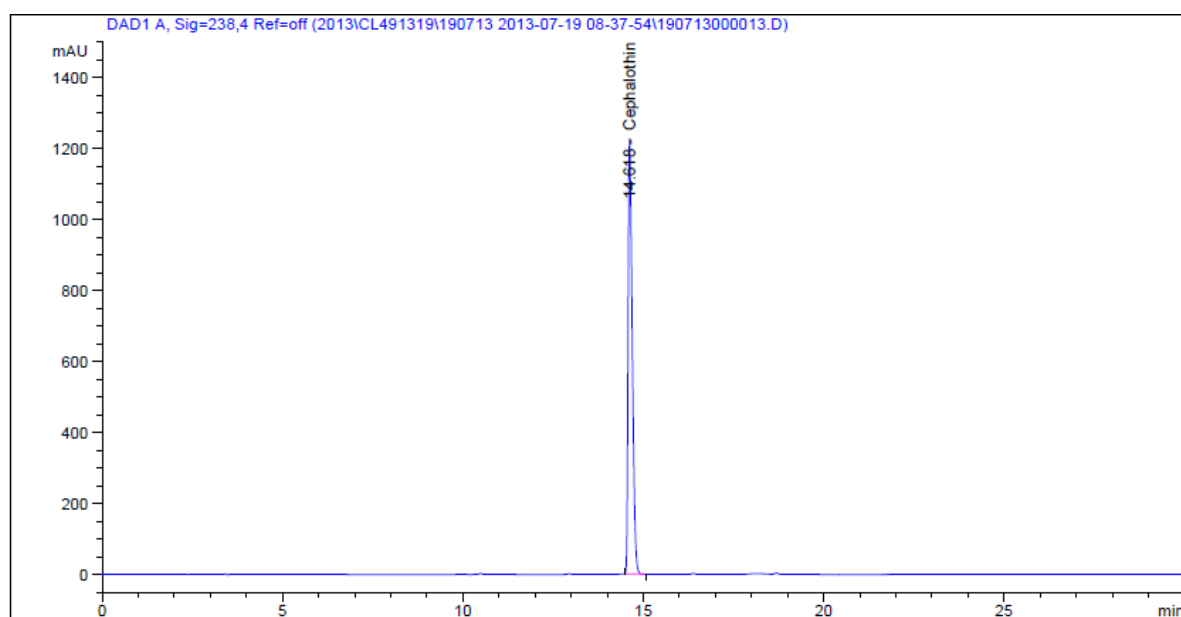
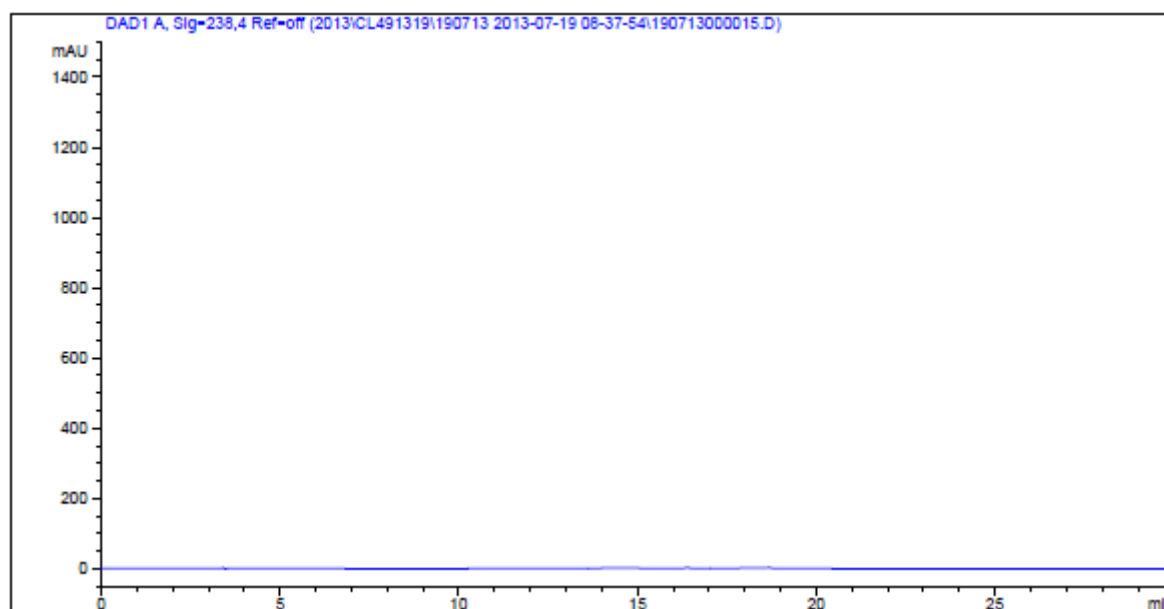


Figura 32 - Cromatograma representativo do placebo no estudo de degradação forçada sob umidade (30 °C/75% UR, 10 dias). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).



Um resumo com as condições finais de degradação forçada para a cefalotina na amostra, juntamente com os dados de degradação em porcentagem e pureza do pico estão detalhados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resumo dos resultados da degradação forçada sob as condições de estresse realizadas para a amostra de cefalotina

Condição de estresse	Tempo	% Degradação	% Pureza do pico de CET
Hidrólise ácida (HCl 0,1 M, 60 °C)	40 minutos	16,10	99,92
Hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M, 60 °C)	5 minutos	14,92	99,91
Oxidação (H ₂ O ₂ 3%, temp. ambiente)	20 minutos	20,24	99,98
Fotodegradação (UV/VIS)	10 dias	*	99,98
Calor (60 °C)	10 dias	*	99,98
Umidade (30 °C/75% UR)	10 dias	*	99,91

* < DPR

6.2.9. Produtos de degradação

Considerando que apareceram picos de produtos de degradação nos cromatogramas das amostras submetidas ao estresse (hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidativa), inclusive a impureza B, o método proposto tem uma excelente seletividade, já que a resolução entre a CET e os outros compostos apresentou resolução mínima de 2,4. No total foram encontrados 18 produtos de degradação, os quais foram quantificados em área % e extraídos os seus espectros de absorção.

Na Tabela 14 estão indicados os sete produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada de CET na condição de estresse hidrólise ácida, sua quantificação em área % e os valores obtidos de resolução entre os picos cromatográficos.

Tabela 14 – Produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise ácida

Tempo de retenção, t_R (min)	t_{RR}	Área (%)	Resolução, R_s
6,48	0,44	0,73	-
8,47	0,58	0,23	8,9
10,54	0,72 (impureza B)	3,05	10,9
12,12	0,82	0,04	8,4
12,78	0,87	1,54	3,6
13,03	0,89	0,13	1,6
13,45	0,92	1,80	2,6
14,69	Cefalotina	-	6,5

t_{RR} : tempo de retenção relativo

Na Figura 33 estão detalhados os espectros de absorção de cada produto de degradação formado sob a condição de hidrólise ácida. Os valores de pureza de pico dos produtos de degradação, comprovando que a análise destes compostos no produto final também é específica e seletiva, podem ser visualizados na Tabela 15.

Figura 33 - Espectros de absorção dos produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise ácida (t_{RR} = tempo de retenção relativo).

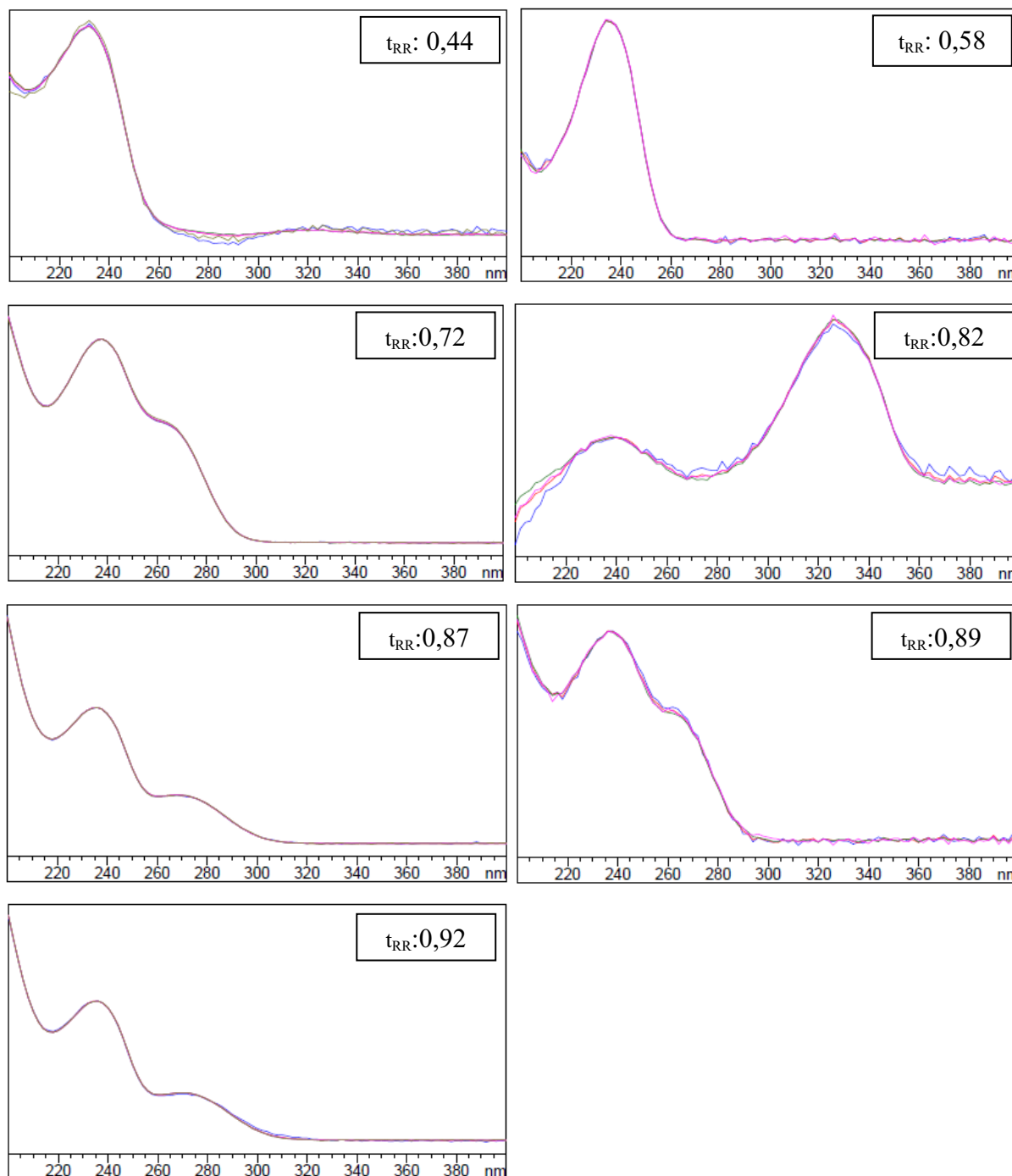


Tabela 15 – Pureza de pico dos produtos de degradação formados na amostra submetida à hidrólise ácida

t_{RR}	Pureza de pico (%)
0,44	99,89
0,58	99,96
0,72 (impureza B)	99,98
0,82	99,51
0,87	99,96
0,89	99,95
0,92	99,94

t_{RR} : tempo de retenção relativo

Na Tabela 16 estão indicados os oito produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada de CET sob hidrólise alcalina, sua quantificação em área % e os valores obtidos de resolução entre os picos cromatográficos.

Tabela 16 – Produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise alcalina

Tempo de retenção, t_R (min)	t_{RR}	Área (%)	Resolução, R_s
4,30	0,29	0,11	-
5,39	0,37	0,06	6,3
6,55	0,44	2,86	5,1
10,57	0,72 (impureza B)	10,49	17,8
13,08	0,89	0,16	14,5
14,75	Cefalotina	-	8,9
15,25	1,04	0,05	2,4
17,25	1,18	0,05	10,1
18,87	1,28	0,04	8,5

t_{RR} : tempo de retenção relativo

Na Figura 34 estão detalhados os espectros de absorção de cada produto de degradação formado sob hidrólise alcalina. Os valores de pureza de pico dos produtos de degradação podem ser visualizados na Tabela 17.

Figura 34 - Espectros de absorção dos produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição hidrólise alcalina (t_{RR} = tempo de retenção relativo).

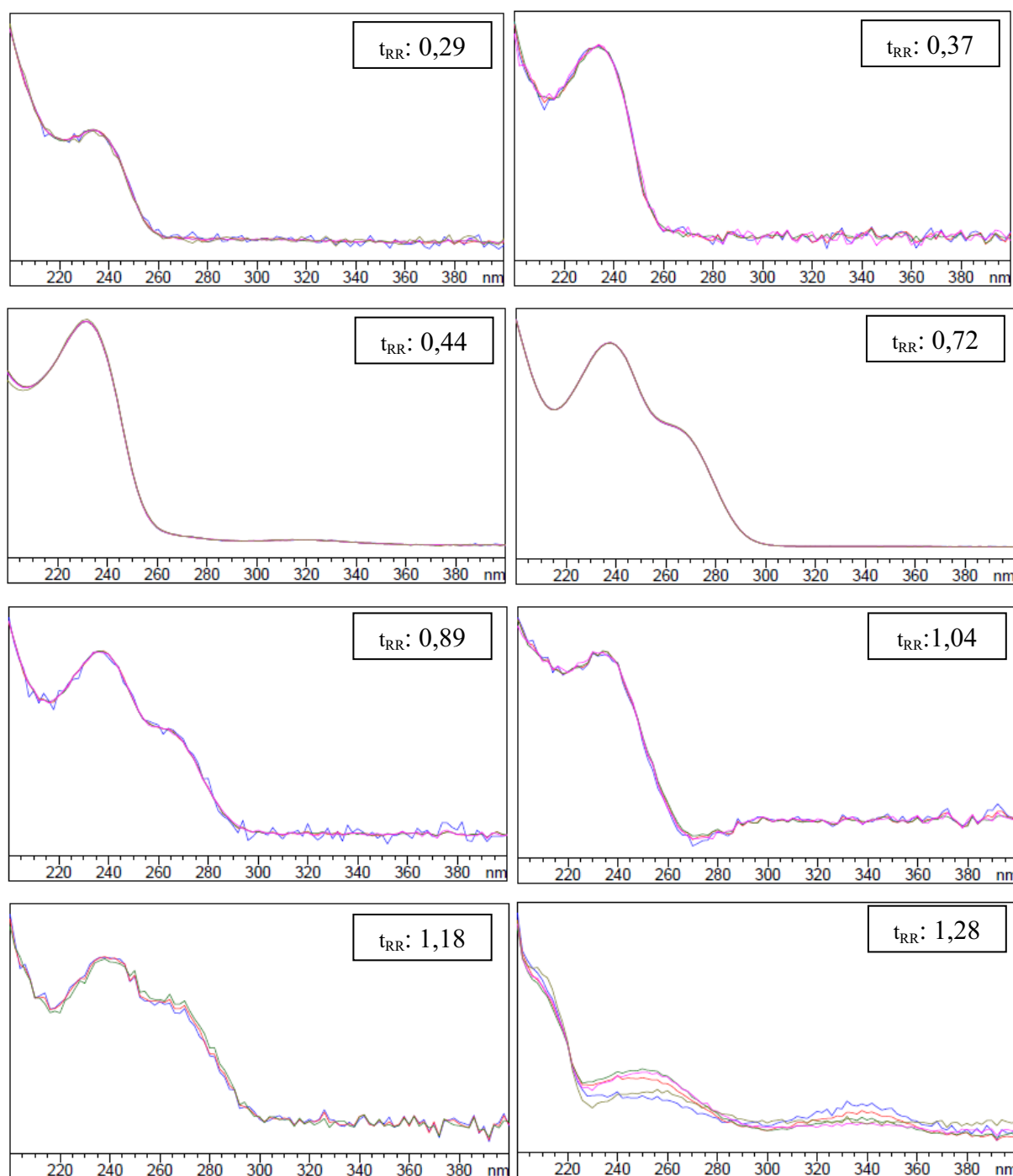


Tabela 17 – Pureza de pico dos produtos de degradação formados na amostra submetida à hidrólise alcalina

t_{RR}	Pureza de pico (%)
0,29	99,01
0,37	99,88
0,44	99,84
0,72 (impureza B)	99,94
0,89	99,92
1,04	99,89
1,18	99,70
1,28	98,09

t_{RR} : tempo de retenção relativo

Na Tabela 18 estão indicados os nove produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada de CET na condição de estresse oxidativo, sua quantificação em área % e os valores obtidos de resolução entre os picos cromatográficos.

Tabela 18 – Produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição oxidativa

t_R (min)	t_{RR}	Área (%)	Resolução, R_s
3,87	0,26	0,13	-
5,69	0,39	0,13	8,8
6,49	0,44	1,54	3,2
7,15	0,49	0,25	2,9
8,82	0,60	1,80	9,0
10,55	0,72 (impureza B)	0,12	9,8
11,18	0,76	9,50	3,8
11,37	0,77	1,26	1,3
13,03	0,89	0,14	10,8
14,69	Cefalotina	-	8,9

t_R : tempo de retenção; t_{RR} : tempo de retenção relativo

Na Figura 35 estão detalhados os espectros de absorção de cada produto de degradação formado sob estresse oxidativo. Os valores de pureza de pico dos produtos de degradação podem ser visualizados na Tabela 19.

Karen de Souza Rugani

Figura 35 - Espectros de absorção dos produtos de degradação formados durante o estudo de degradação forçada – Condição oxidativa (t_{RR} = tempo de retenção relativo).

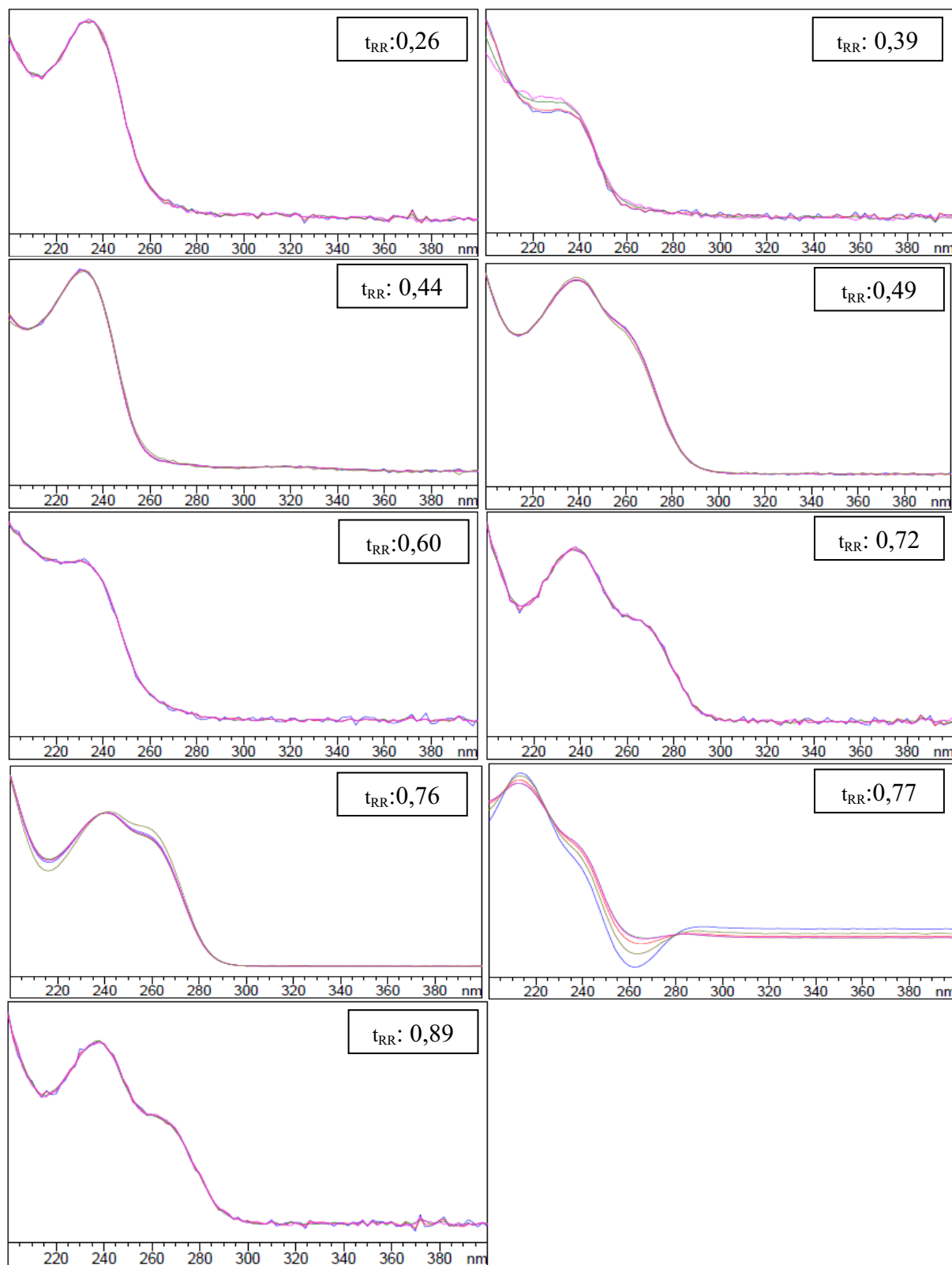


Tabela 19 – Pureza de pico dos produtos de degradação formados na amostra submetida à oxidação

t_{RR}	Pureza de pico (%)
0,26	99,97
0,39	99,67
0,44	99,96
0,49	99,97
0,60	99,96
0,72 (impureza B)	99,96
0,76	99,76
0,77	99,16
0,89	99,97

T_{RR} : Tempo de retenção relativo

6.2.10. Espectros de absorção em 3D

Foram extraídos os espectros de absorção em 3D do padrão de CET, do branco (água ultrapura), das amostras de cefalotina e dos respectivos placebos, ambos submetidos à degradação forçada, conforme observado nas Figuras 36 a 51. É possível observar que não ocorreu a formação de nenhum pico cromatográfico diferente dos listados neste estudo, mesmo com a variação do comprimento de onda.

Figura 36 - Espectro 3D de cefalotina SQR. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

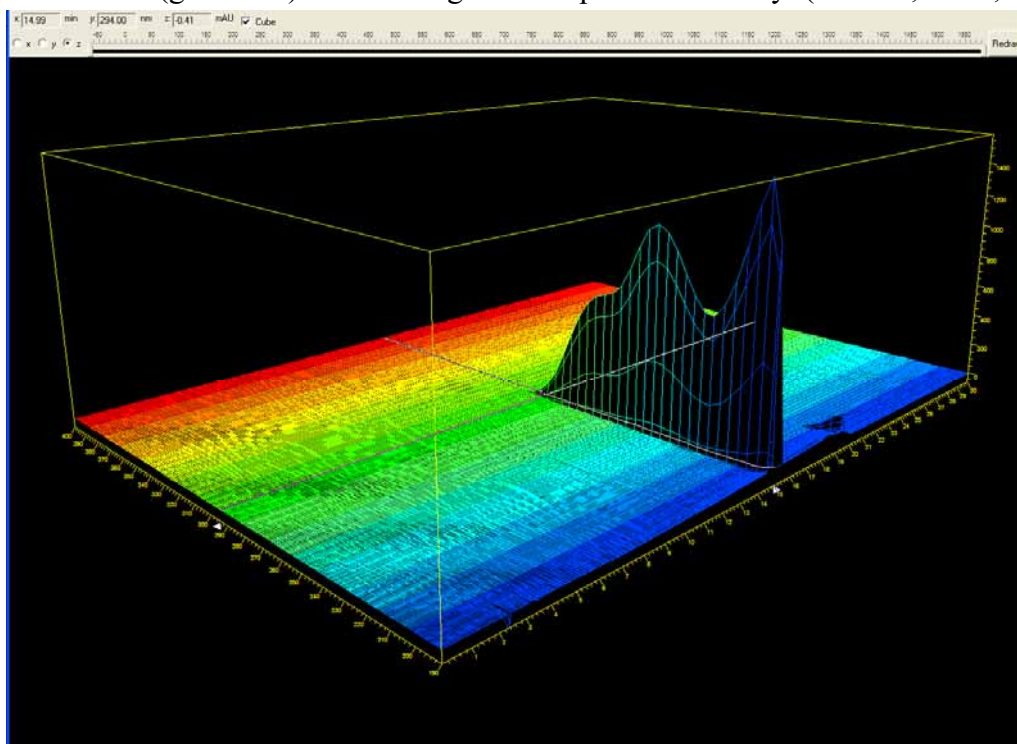


Figura 37 - Espectro 3D do branco (água purificada). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

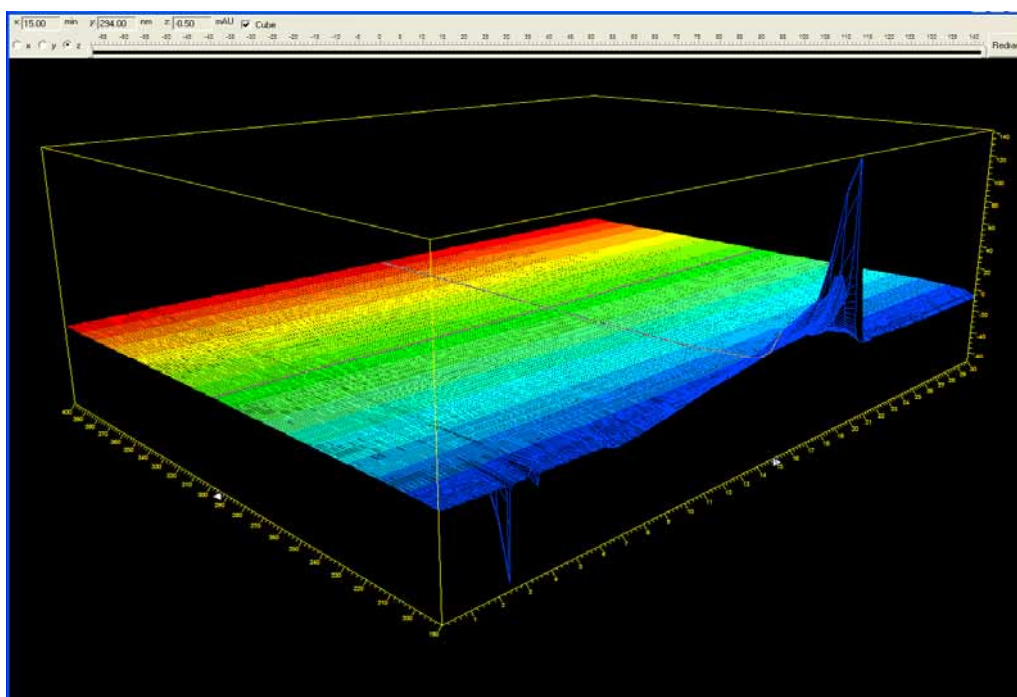


Figura 38 - Espectro 3D da amostra controle de cefalotina. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

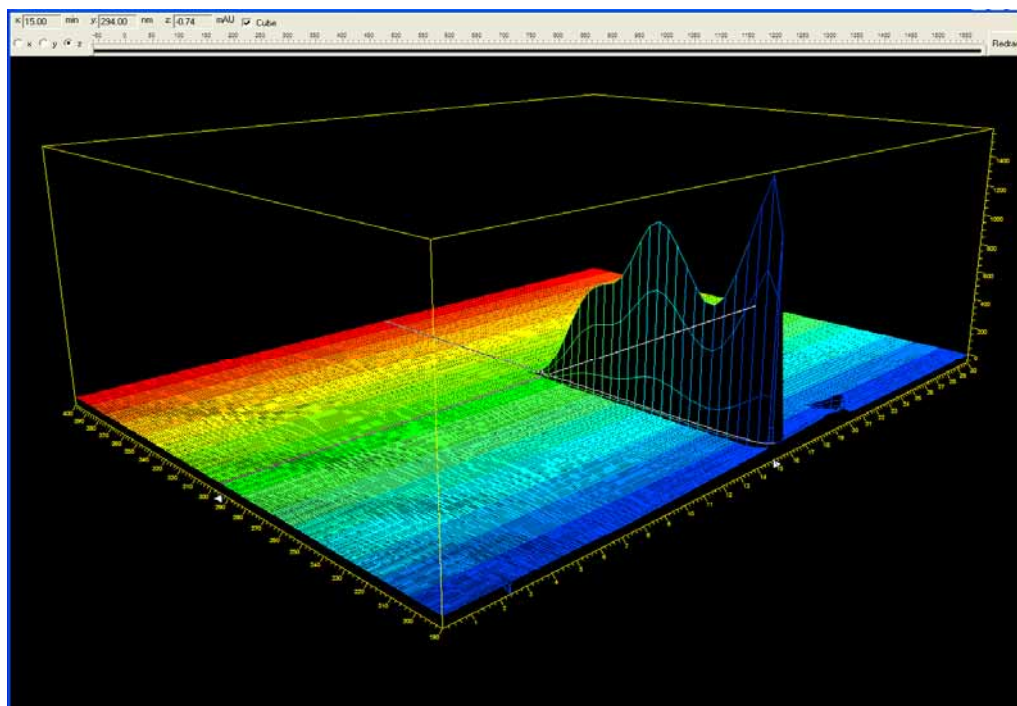


Figura 39- Espectro 3D do placebo controle. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

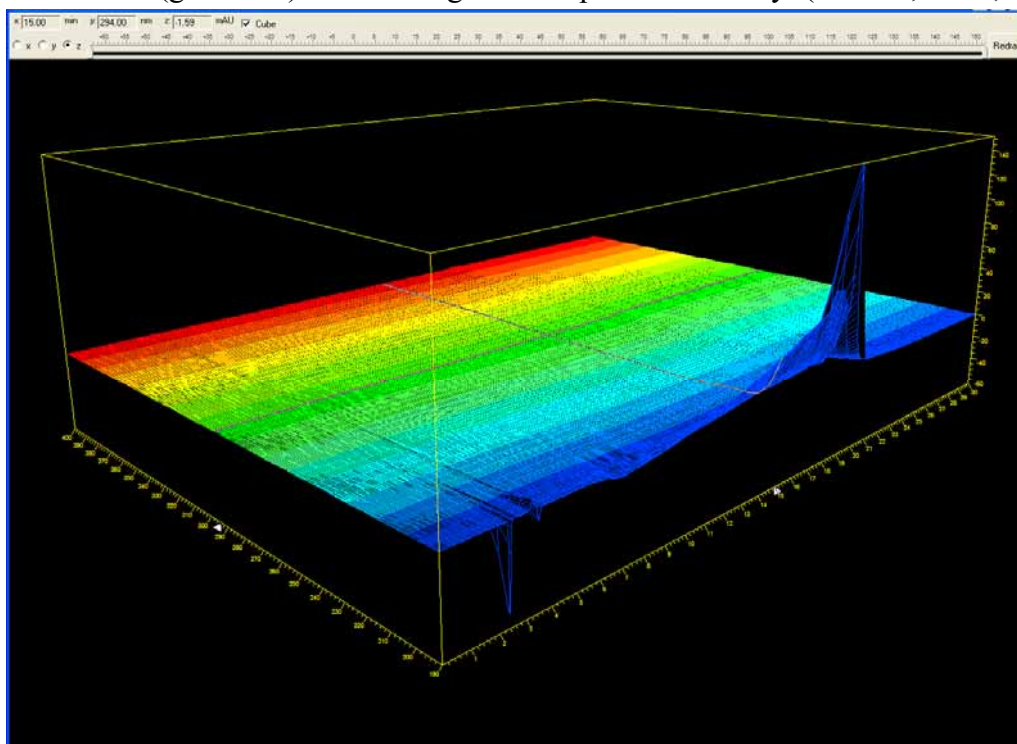


Figura 40 - Espectro 3D da amostra de cefalotina após hidrólise ácida. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

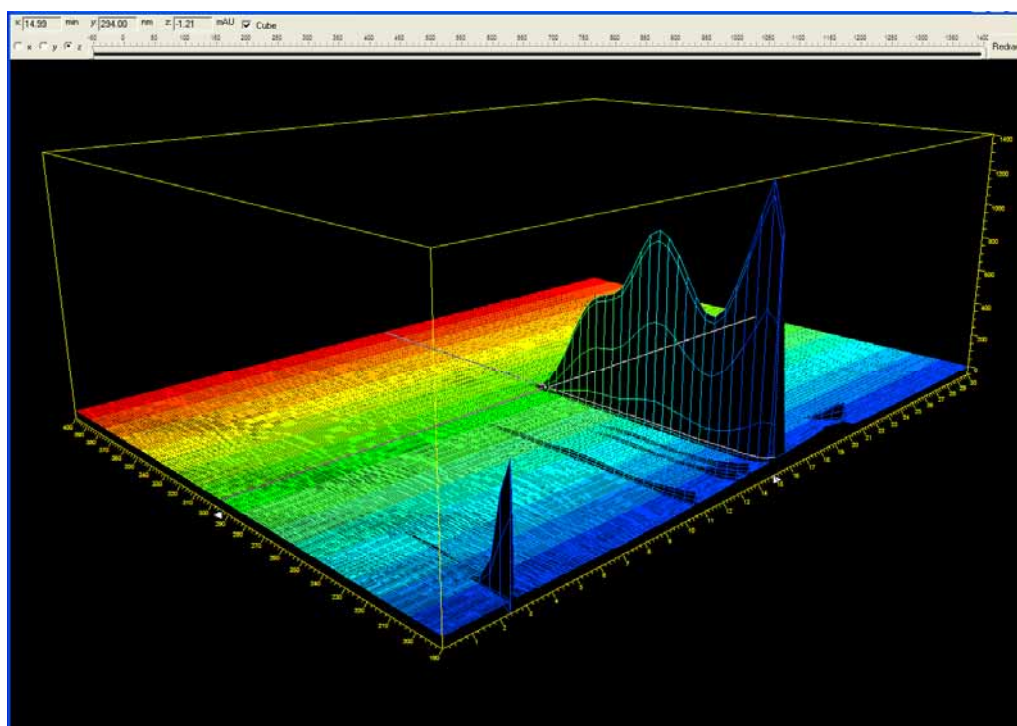


Figura 41 - Espectro 3D do placebo após hidrólise ácida. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

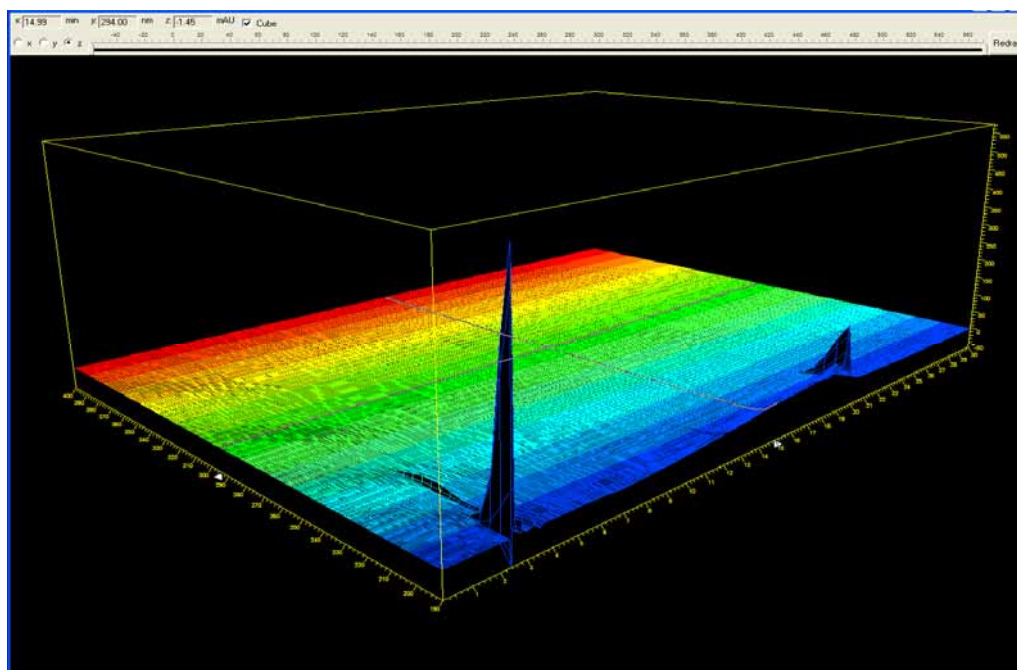


Figura 42 - Espectro 3D da amostra de cefalotina após hidrólise alcalina. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

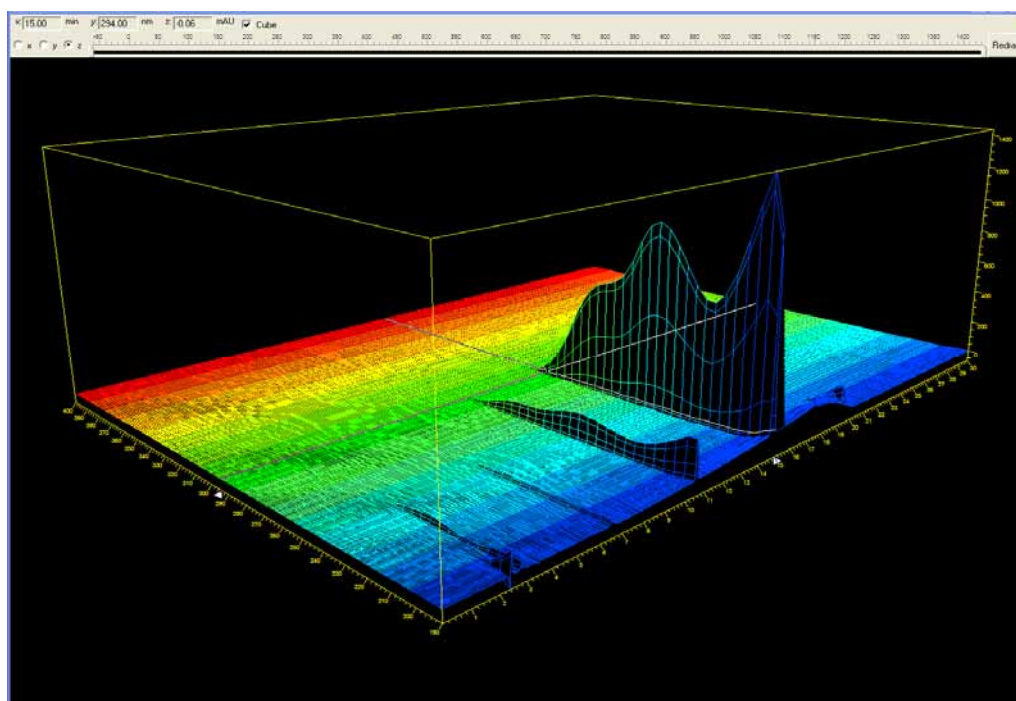


Figura 43 - Espectro 3D do placebo após hidrólise alcalina. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

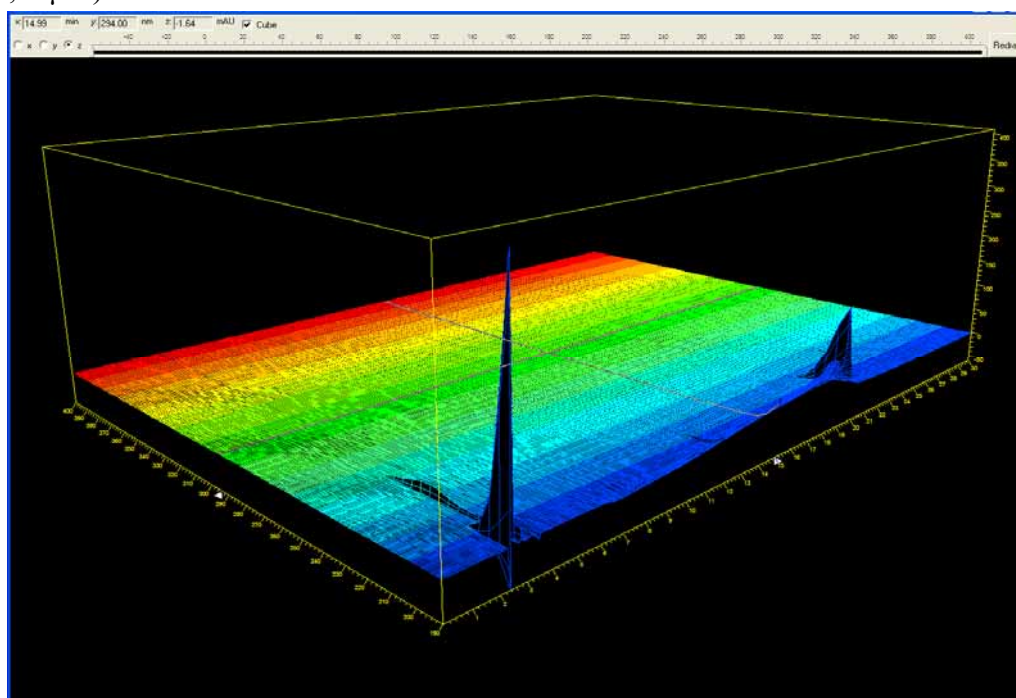


Figura 44 - Espectro 3D da amostra de cefalotina após estresse oxidativo. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

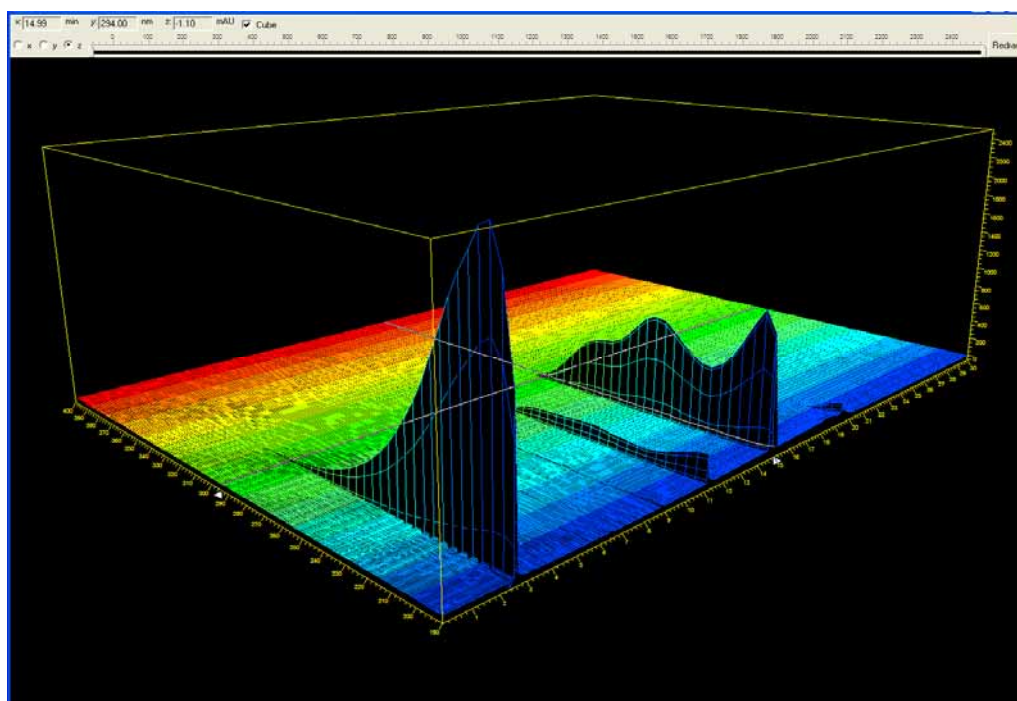


Figura 45 - Espectro 3D do placebo após estresse oxidativo. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

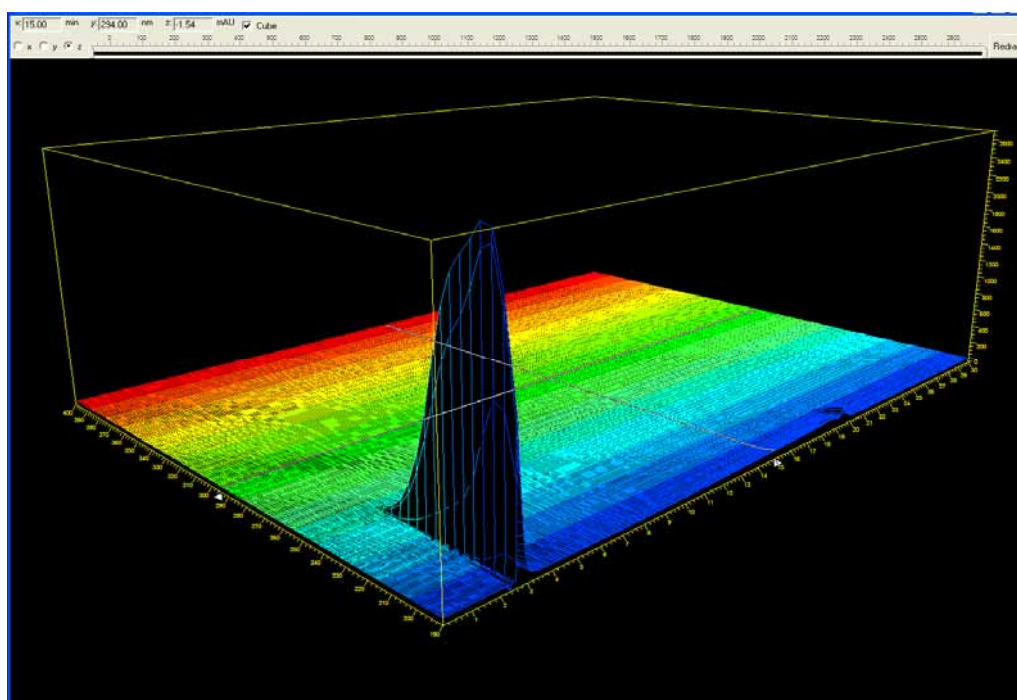


Figura 46 - Espectro 3D da amostra de cefalotina sob fotodegradação. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

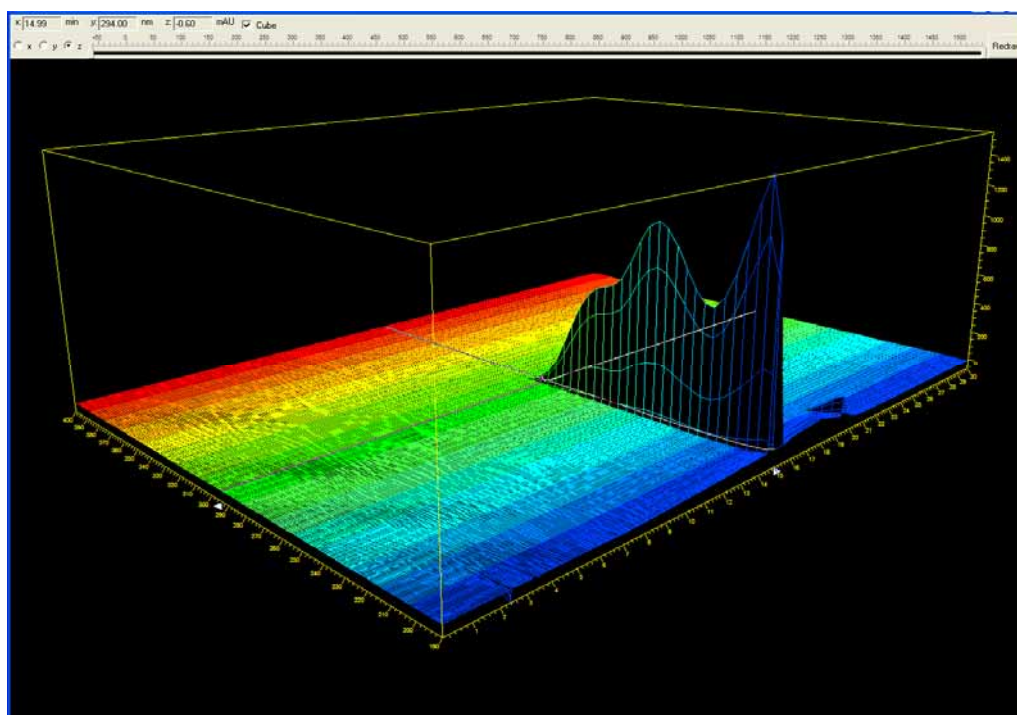


Figura 47 - Espectro 3D do placebo sob fotodegradação. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

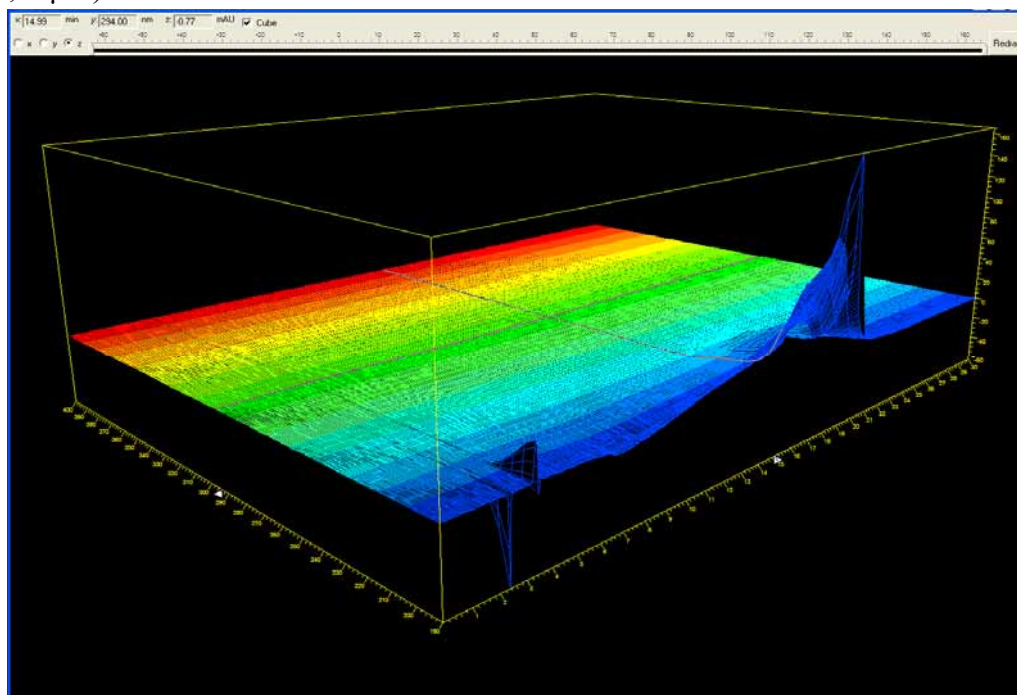


Figura 48 - Espectro 3D da amostra de cefalotina após exposição ao calor. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

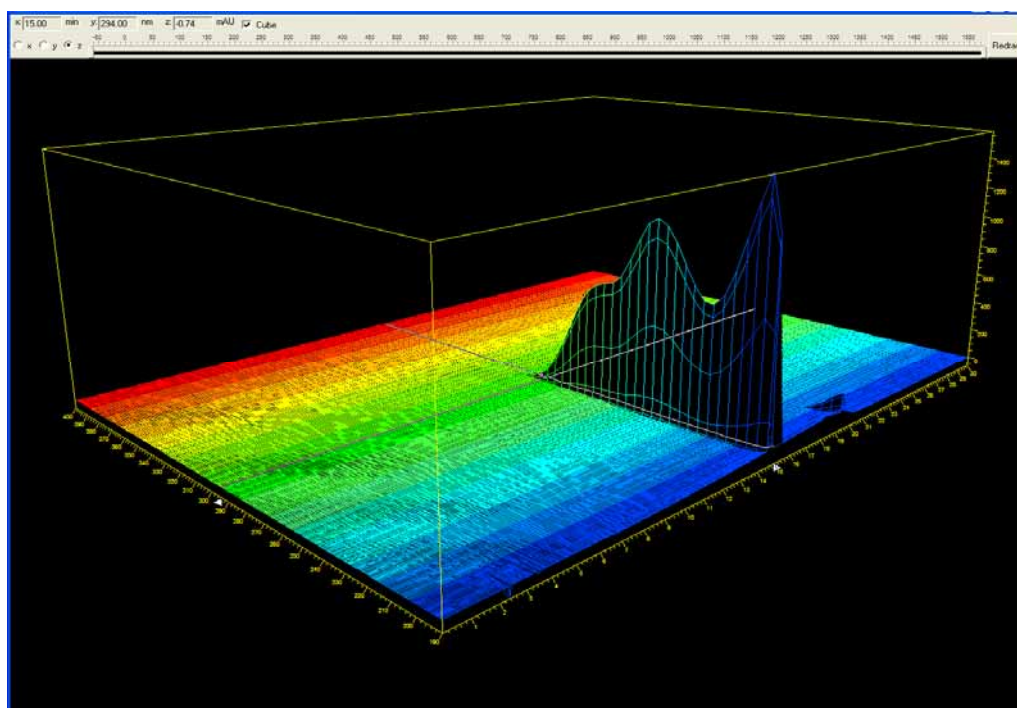


Figura 49 - Espectro 3D do placebo após exposição ao calor. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

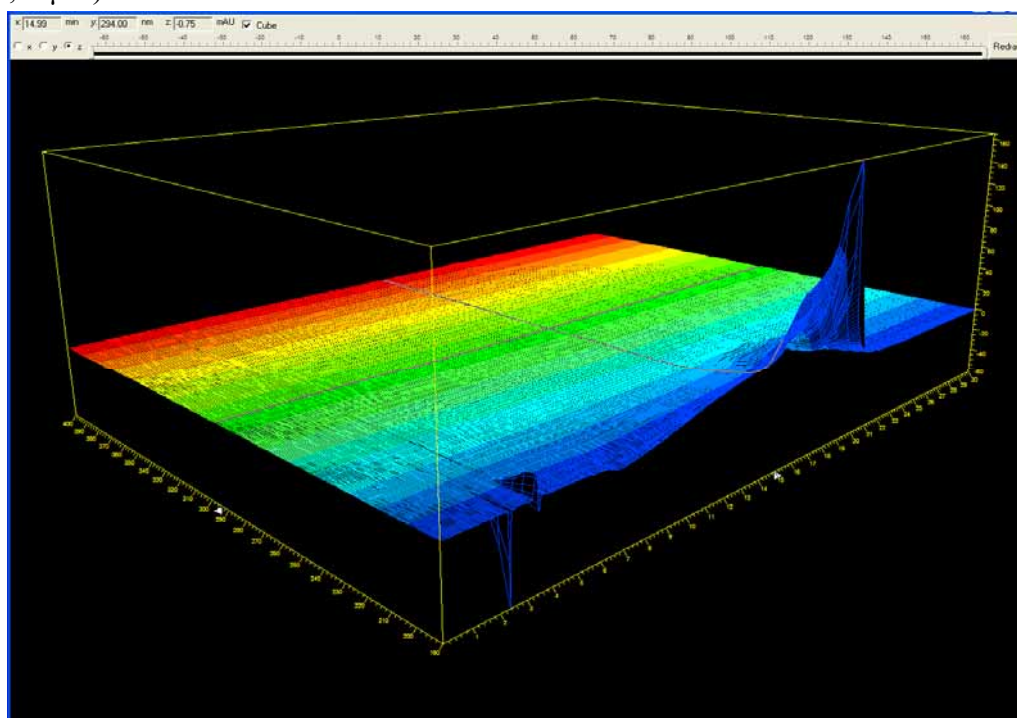


Figura 50 - Espectro 3D da amostra de cefalotina após exposição à umidade. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

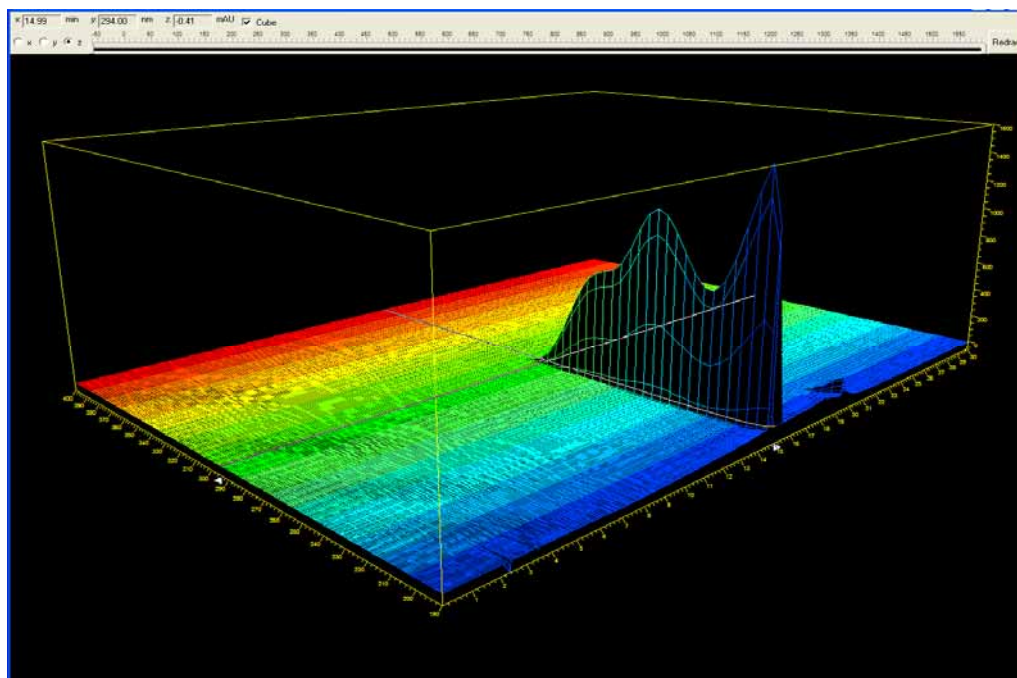
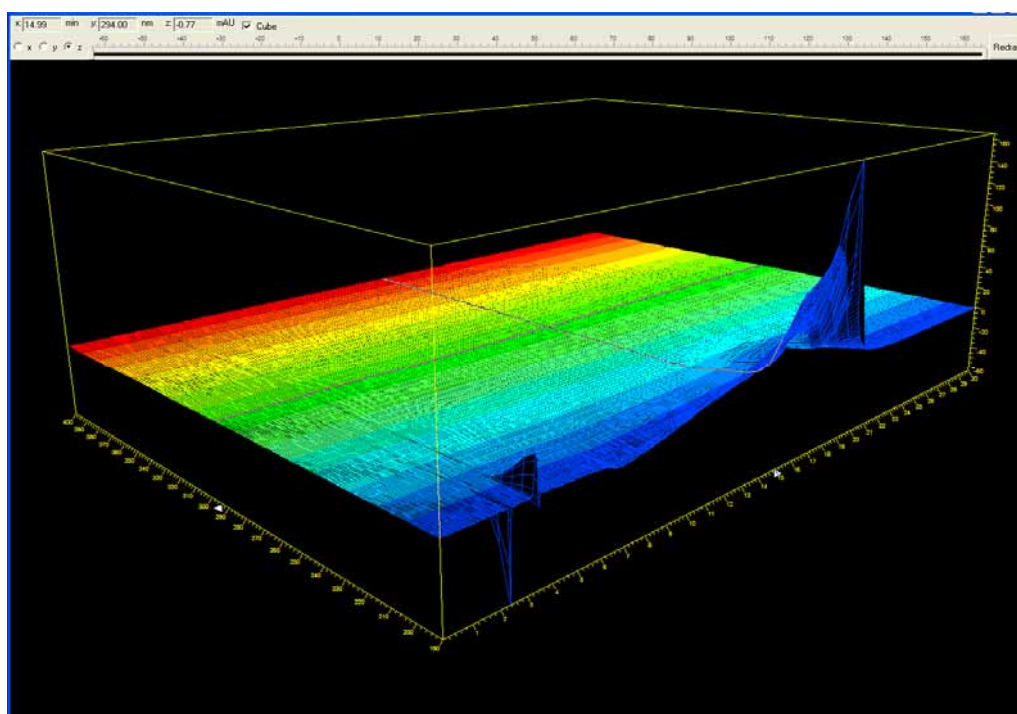


Figura 51 - Espectro 3D do placebo após exposição à umidade. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente). Coluna: Agilent Eclipse XCB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m).



6.3. Validação de método analítico

6.3.1. Adequação do sistema (*System Suitability*)

Os parâmetros avaliados na adequação do sistema foram: fator de cauda (T), fator de retenção (k'), pratos teóricos (N), tempo de retenção (t_R), fator de assimetria (A_S) e desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas obtidas do pico de cefalotina das 6 injeções da solução padrão a 500 $\mu\text{g/mL}$ (concentração nominal equivalente a 100%). O cromatograma representativo do padrão de cefalotina está ilustrado na Figura 52. Os resultados da adequação do sistema estão detalhados na Tabela 20 e na Figura 53 podem ser observados os dados fornecidos pelo *software* do equipamento cromatógrafo a líquido para a primeira injeção da solução padrão de cefalotina.

Figura 52 - Cromatograma da solução padrão de cefalotina.

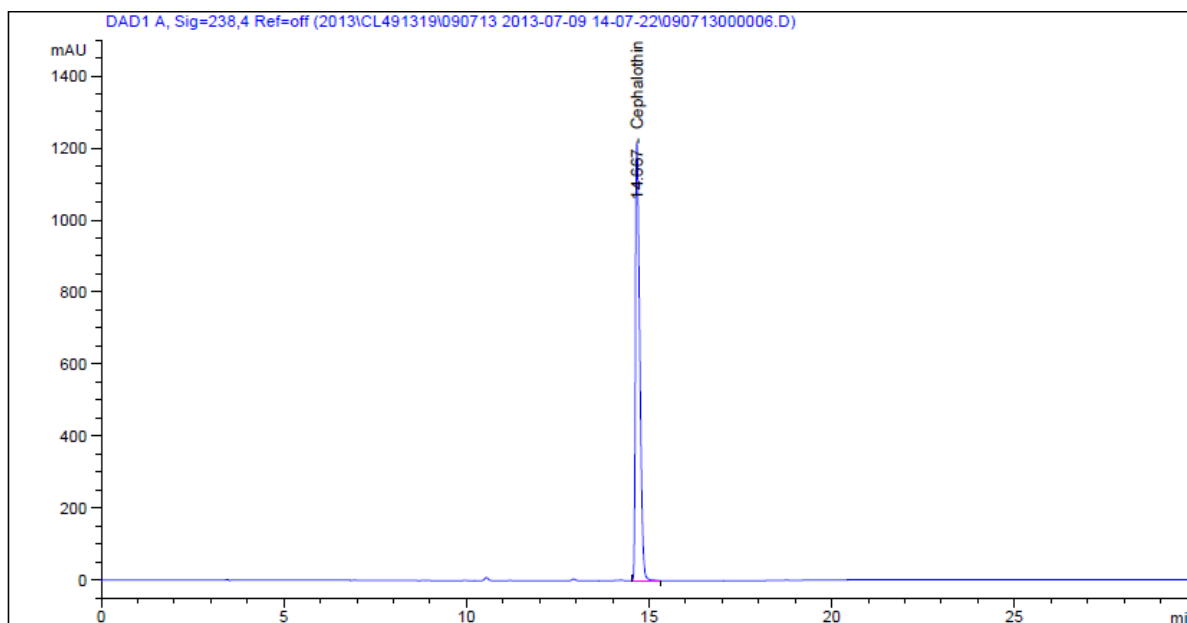


Figura 53 – Dados obtidos no cromatograma da primeira injeção da solução padrão de cefalotina na adequação do sistema.

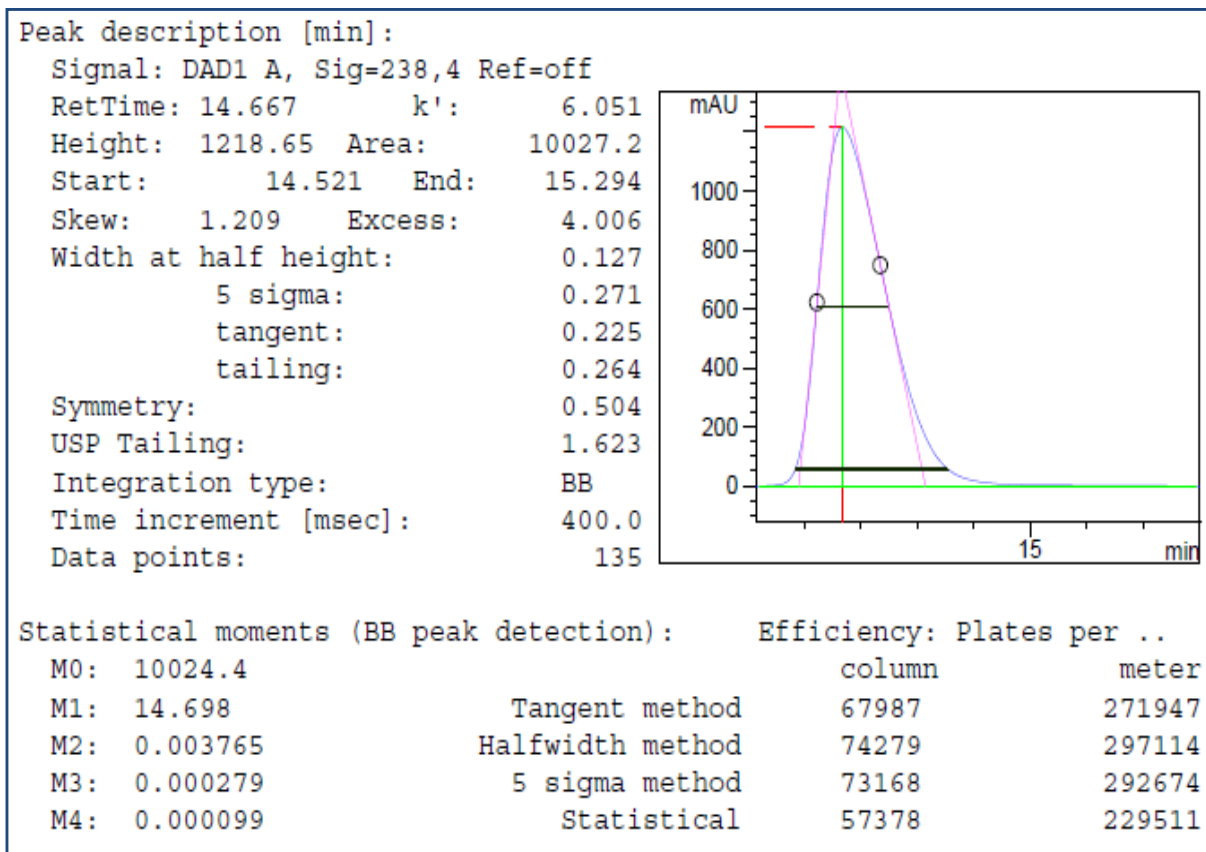


Tabela 20 – Análise de adequação do sistema para o método por CLAE para análise de cefalotina sódica

Injeção	Tempo de retenção (min) t_R	Área	Fator de cauda T	Número de pratos N	Fator de retenção k'	Fator de assimetria A_s
1	14,67	10027,6	1,62	67987	6,05	0,50
2	14,58	10115,7	1,62	68468	6,10	0,51
3	14,84	10219,7	1,63	69828	6,13	0,51
4	14,85	10192,5	1,61	69447	6,14	0,50
5	14,80	10151,5	1,62	69887	6,12	0,51
6	14,75	10079,1	1,63	69806	6,09	0,50
Média	14,75	10131,0	1,62	69237	6,11	0,51
DPR (%)	0,72	0,71	0,46	1,17	0,54	1,08

Os resultados comprovam a adequação do sistema, com valores de fator de cauda inferior a 2, números de pratos superior a 2000, fator de retenção superior a 2, e DPR entre as injeções menor que 2% (WOOD, 1999; SHABIR, 2003).

6.3.2. Linearidade

A linearidade para a cefalotina foi avaliada na faixa de concentração de 250 a 750 µg/mL. Os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de cefalotina sódica SQR estão apresentados na Tabela 21. A equação da reta $y=19,61310x + 32,46989$ e os coeficientes de determinação (r^2): 0,99998 e de correlação (r): 0,99999 foram obtidos. Foi realizada análise estatística através do cálculo da ANOVA.

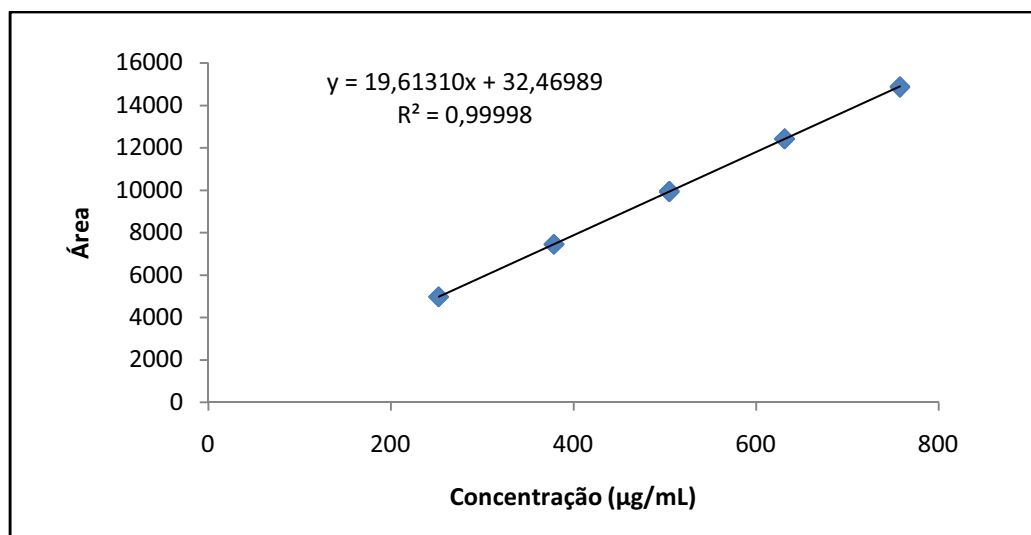
Tabela 21 - Valores de áreas referentes ao pico de CET SQR para a construção da curva analítica de CLAE

Concentração (µg/mL)	Área	Área média ± e.p.m. ¹	DPR ² (%)
250	4987,19	4979,76 ± 6,62	0,13
	4977,61		
	4974,49		
375	7460,96	7455,58 ± 7,27	0,10
	7447,31		
	7458,47		
500	9962,43	9944,51 ± 17,41	0,18
	9927,67		
	9943,43		
625	12430,60	12428,80 ± 8,64	0,07
	12419,40		
	12436,40		
750	14898,20	14873,23 ± 24,28	0,16
	14849,70		
	14871,80		

¹ e.p.m.: erro padrão da média² DPR: desvio padrão relativo

A curva analítica foi obtida por meio de um gráfico plotado no Excel, conforme ilustrado na Figura 54.

Figura 54 - Curva analítica de cefalotina SQR obtida pelo método CLAE. Fase móvel: tampão fosfato de amônio 20 mM pH 4,5:acetonitrila (gradiente), vazão de 1,0 mL/min. Coluna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm).



A ANOVA foi calculada para os dados da curva analítica de CET SQR e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de CET SQR, utilizando o método por CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	183921500,84	45980375,21	216087,90*	3,48
Regressão linear	1	183919607,25	183919607,25	864342,70*	4,96
Desvio da linearidade	3	1893,60	631,20	2,97	3,71
Resíduo	10	2127,86	212,79	-	-
Total	14	183923628,70	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$

A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos, com intervalo de confiança de 95%.

6.3.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada através da análise da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade do método foi avaliada por seis determinações do teor na amostra a 500 µg/mL. A precisão intermediária foi realizada por um segundo analista e em dia diferente da repetibilidade. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR percentuais, para a repetibilidade o valor obtido foi de 0,55% e para a precisão intermediária foi de 0,64%, confirmando a precisão do método. Todos os dados estão demonstrados na Tabela 23.

Tabela 23 – Precisão para CET no método indicativo de estabilidade por CLAE

Amostra	Teor (%)	Teor médio (%)	DPR (%)
Repetibilidade			
1	99,83	100,07	0,55
2	100,76		
3	99,18		
4	99,95		
5	100,41		
6	100,29		
Precisão Intermediária			
1	99,14	99,38	0,55
2	99,16		
3	99,16		
4	98,98		
5	99,34		
6	100,46		
DPR médio			0,64
DPR = desvio padrão relativo			

6.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da recuperação, realizando-se a adição de padrão em três níveis de concentração diferentes (75%, 100% e 125%), em triplicata, como descrito nas Tabelas 4 e 5. Os resultados de porcentagem de recuperação e DPR (%) foram respectivamente, 99,41% e 0,54%, e estão detalhados na Tabela 24.

Tabela 24 – Recuperação obtida para a determinação de CET por CLAE

	CET SQR adicionada (µg/mL)	CET SQR encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)¹	Recuperação média (%)	DPR² (%)
R1	123,15	123,07	99,93		
R2	246,30	243,50	98,86	99,41	0,54
R3	369,46	367,44	99,45		

¹ Valor médio de três replicatas

² DPR= Desvio padrão relativo

6.3.4.1 Robustez

Os parâmetros como vazão, proporção de fase móvel, temperatura da coluna e pH da solução tampão foram alterados no método analítico. A robustez do método proposto foi demonstrada, uma vez que não foram observadas variações significativas, comprovadas pelos valores de DPR obtidos inferiores a 0,38%. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 – Parâmetros avaliados na robustez do método analítico para determinação de CET por CLAE

Parâmetros	Teor CET (%)	DPR (%)
Vazão de fase móvel 0,9 mL/min	99,34	0,15
Vazão de fase móvel 1,1 mL/min	99,64	0,36
Temperatura da coluna 25 °C	99,53	0,28
Temperatura da coluna 35 °C	99,66	0,37
Fase móvel – 92:08 (tampão:acetonitrila)	99,42	0,20
Fase móvel – 88:12 (tampão:acetonitrila)	99,52	0,28
pH fase móvel 4,4	99,63	0,20
pH fase móvel 4,6	99,80	0,07

DPR = desvio padrão relativo

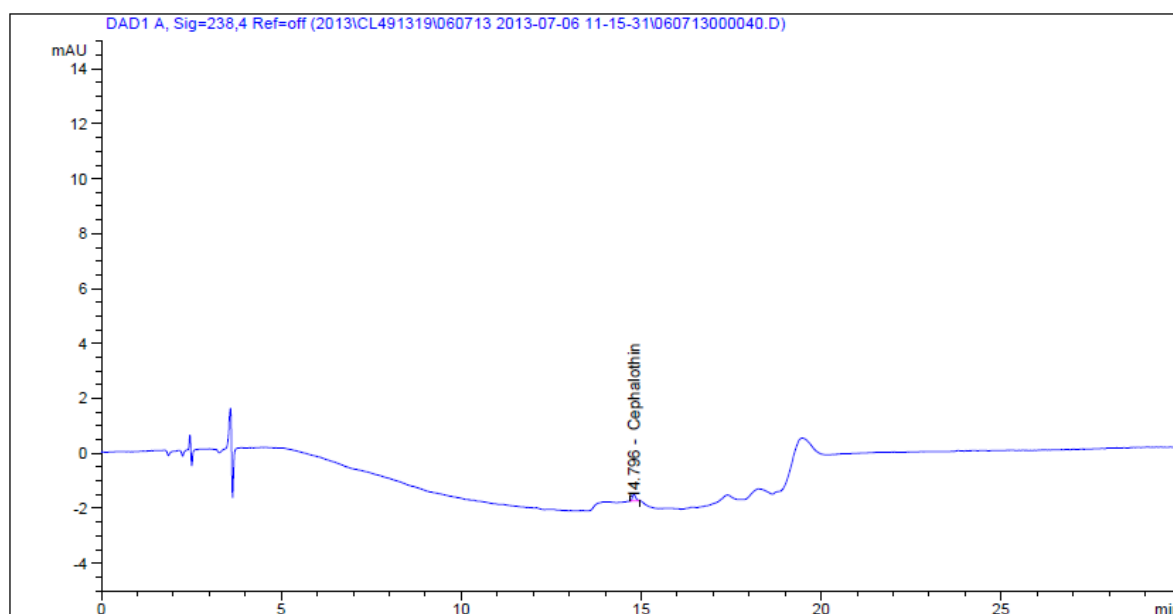
6.3.5. Limite de detecção

Os resultados experimentais obtidos (n=5) do LD para a cefalotina estão representados na Tabela 26 e o valor obtido foi de 0,0760 µg/mL, equivalente a 0,015% da concentração nominal do método. A relação sinal-ruído foi calculada automaticamente pelo *software* do equipamento, e o valor obtido foi superior a 3:1. O cromatograma representativo está demonstrado na Figura 55.

Tabela 26 - Áreas obtidas para o limite de detecção para CET

Concentração (%)	Área	Área média	DPR ¹ (%)
0,015	1,55917	1,59904	2,42
	1,64733		
	1,56544		
	1,59378		
	1,62950		

¹DPR = desvio padrão relativo

Figura 55 - Cromatograma representativo do LD para a cefalotina por CLAE.

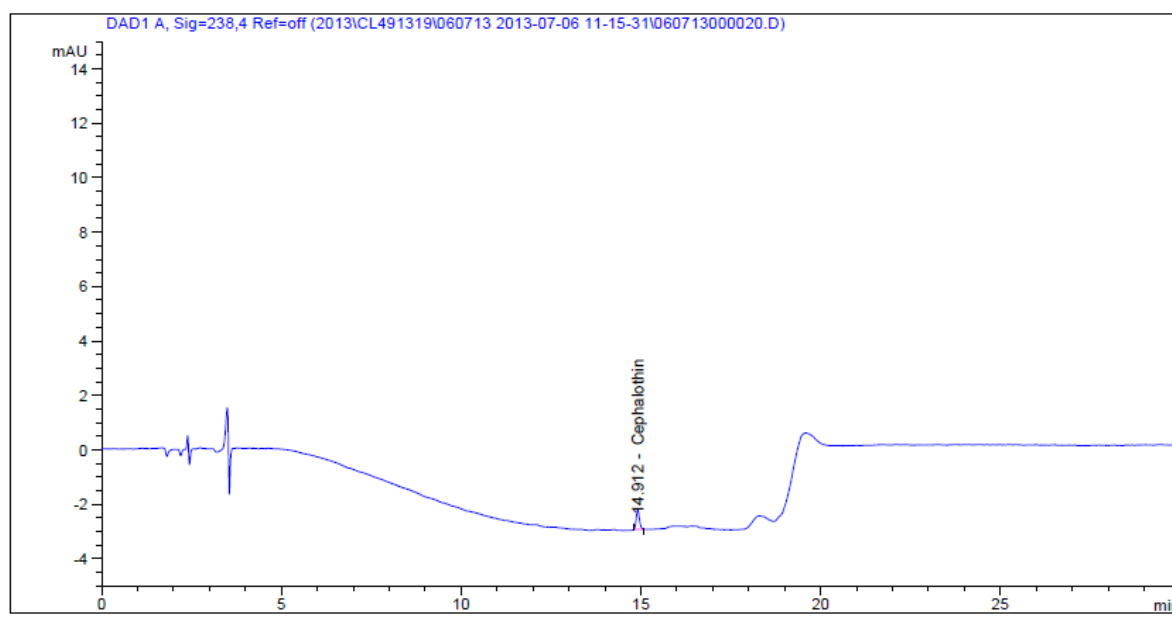
6.3.6. Limite de quantificação

Os resultados experimentais obtidos (n=5) do LQ para a cefalotina estão representados na Tabela 27 e o valor obtido foi de 0,2532 µg/mL, equivalente a 0,05% da concentração nominal do método. A relação sinal-ruído foi calculada automaticamente pelo *software* do equipamento e o valor obtido foi superior a 10:1. O cromatograma representativo está demonstrado na Figura 56.

Tabela 27 - Áreas obtidas para o limite de quantificação da cefalotina

Concentração (%)	Área	Área média	DPR ¹ (%)
0,05	4,68049	4,56926	1,78
	4,50896		
	4,53711		
	4,62796		
	4,49180		

¹DPR= desvio padrão relativo

Figura 56 - Cromatograma representativo do LQ para a cefalotina por CLAE.

6.3.7. Seletividade/Especificidade

Na determinação da especificidade do método proposto, o estudo da degradação forçada da amostra de cefalotina sódica em pó para solução injetável foi realizado para verificar a sua capacidade discriminativa frente aos produtos de degradação, isto é, ser indicativo de estabilidade. Os resultados foram apresentados no item 6.2.

A seletividade foi comprovada ao se verificar a inexistência de picos interferentes no placebo e no diluente da amostra. Na Figura 57 é possível visualizar a sobreposição dos cromatogramas do placebo e da amostra de cefalotina, enquanto que na Figura 58 o cromatograma referente ao branco do diluente utilizado (água purificada) está representado.

Figura 57 – Cromatogramas realizados no estudo de seletividade do método CLAE frente à sobreposição de cefalotina sódica pó para injeção e placebo.

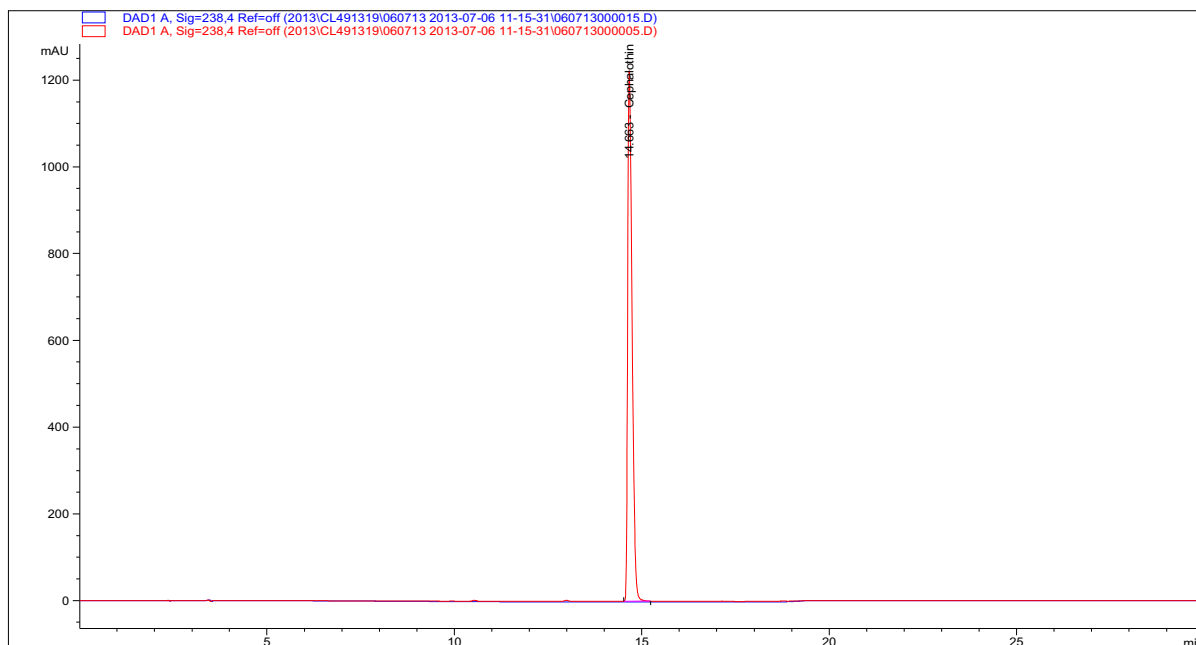
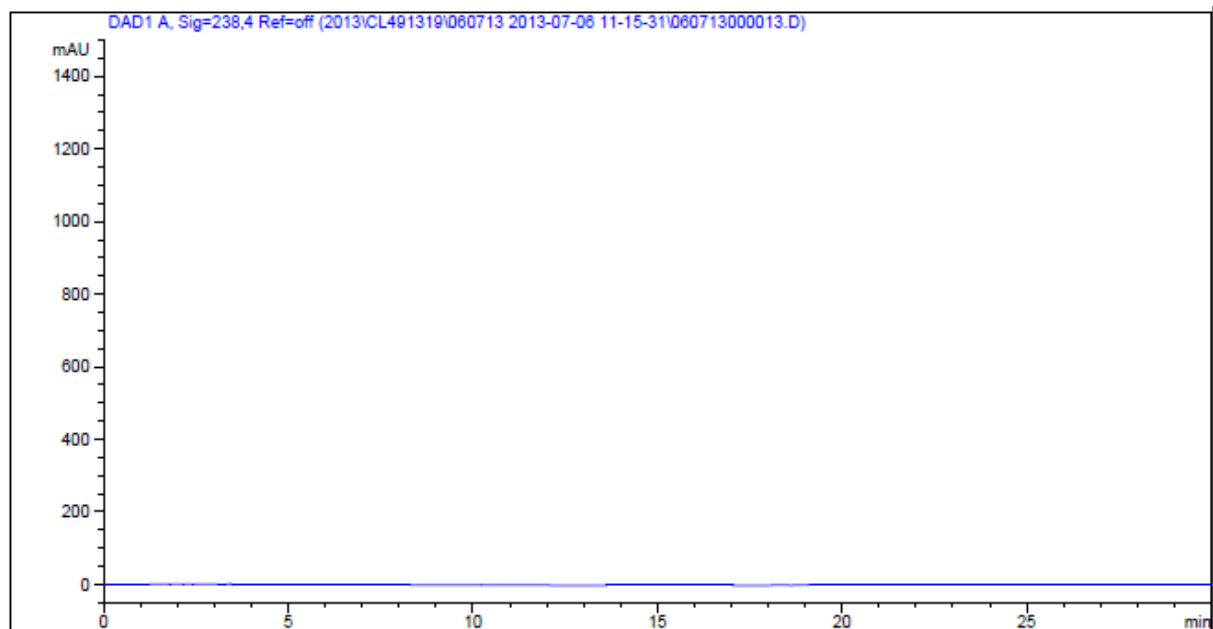


Figura 58 - Cromatograma representativo do branco (diluyente).



6.4. Estabilidade das soluções de cefalotina sódica SQR e amostra

Na Tabela 28 estão descritos os resultados para o teste de estabilidade das soluções padrão (SQR) e amostra de CET após 24 horas. As soluções mostraram-se estáveis por 24 horas quando mantidas em *cooler* a 5 °C, porém sob temperatura ambiente foi observada a degradação.

Tabela 28 - Estabilidade da solução de CET SQR e amostra após 24 horas em temperatura ambiente e refrigerada

Temperatura 5 °C	Degradação (%)	Temperatura ambiente	Degradação (%)
Solução SQR	0,77	Solução SQR	7,60
Solução amostra	0,53	Solução amostra	7,73

Como as soluções SQR e amostra não foram estáveis após 24 horas em temperatura ambiente, determinou-se o tempo máximo de estabilidade, em horas, destas soluções. Os resultados estão descritos na Tabela 29. A solução SQR e a solução amostra mostraram-se estáveis por 6 horas.

Tabela 29 - Estabilidade da solução de CET SQR e amostra em temperatura ambiente

Solução SQR		Solução Amostra	
Tempo (h)	Degradação (%)	Tempo (h)	Degradação (%)
2	0,06	2	0,21
4	0,63	4	0,49
6	1,84	6	1,50
8	2,85	8	2,81

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A produção de medicamentos seguindo as regulamentações sanitárias no que tange segurança, eficácia e qualidade é um desafio constante a ser realizado pelas indústrias farmacêuticas e o controle de qualidade fornece ferramentas para se avaliar a qualidade do produto final. Os estudos de estabilidade têm importância fundamental neste contexto, considerando que pode vir a ocorrer formação de produtos de degradação ao longo de estudo de estabilidade, no entanto, estes estudos devem ser conduzidos utilizando-se métodos analíticos adequados que forneçam resultados mais confiáveis.

De acordo com o FDA (1987) os métodos indicativos de estabilidade são procedimentos analíticos quantitativos baseados nas características estruturais, químicas ou biológicas e nas propriedades de cada ingrediente ativo de um medicamento; e que distinguirá cada fármaco de seus produtos de degradação de tal modo que o conteúdo deste possa ser cuidadosamente medido.

A Anvisa, a partir da publicação da RDC nº 58 de dezembro de 2013, inicia a regulamentação para a verificação de produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade dos medicamentos (BRASIL, 2013). Este fato justifica novas pesquisas nessa área para o desenvolvimento de método analítico submetido à degradação forçada para a cefalotina sódica. Foi verificado que mesmo havendo diversos métodos analíticos descritos na literatura para este fármaco, não havia um método indicativo de estabilidade para o medicamento em questão. Além do mais, o desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de antimicrobianos já faz parte das atividades do grupo de pesquisa no qual este trabalho foi desenvolvido.

Neste estudo, foi desenvolvido um método indicativo de estabilidade por CLAE, com a finalidade de separar a cefalotina de seus possíveis produtos de degradação, inclusive da impureza B, seu metabólito menos ativo, que foi devidamente identificado frente o padrão de referência. Este método foi então desenvolvido para a determinação quantitativa de cefalotina e para a quantificação em área % dos produtos de degradação nas amostras provenientes de estudos de estabilidade, a fim de monitorar tanto a perda do princípio ativo quanto a formação dos produtos de degradação durante o prazo de validade do medicamento no produto acabado.

A CLAE é uma das técnicas de separação mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, a crescente utilização desta técnica se deve ao fato dela permitir determinações

quantitativas com boa sensibilidade e por possibilitar a separação de compostos não-voláteis e instáveis termicamente, com destaque no ramo da indústria farmacêutica, além de muitos outros campos da ciência (TONHI et al., 2002). Além disso, a CLAE é um importante membro da família de técnicas de separação, já que consegue separar misturas com grande número de compostos similares (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006) e se destaca ainda por apresentar algumas propriedades importantes como: alto poder de resolução e alta velocidade de separação, além de permitir análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna.

Na cromatografia em fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel mais fraca é a água, a força então é ajustada por adição de solvente orgânico polar. A fase estacionária exerce um papel fundamental na retenção e na seletividade (OHANNESIAN; STREETER, 2002).

Portanto, a escolha desta técnica no presente estudo se justifica então pelo fato de que um método ideal deve ser capaz de quantificar precisamente o composto de origem bem como todos os seus produtos de degradação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011). Dentre os métodos indicativos de estabilidade, a técnica mais prevalente é CLAE em fase reversa, que conta com 85% ou mais de aplicações farmacêuticas em geral (CARSTENSEN; RHODES, 2007).

Durante o desenvolvimento do método analítico, diferentes fases estacionárias tais como C18, C8, fenil e ciano, bem como diferentes composições de fases móveis foram testadas (tampão fosfato de potássio, trietilamina a 0,1% (v/v), trietilamina a 0,1% + ácido acético a 0,1 (v/v), acetonitrila, metanol e etanol), até a otimização do método proposto. A otimização do método foi realizada para permitir que o pico cromatográfico da cefalosporina estudada fosse simétrico, puro e com resolução satisfatória em relação a seus produtos de degradação. A utilização da eluição por gradiente no método proposto permitiu essa maior simetria dos picos cromatográficos, assim como a melhor resolução e menor fator de cauda.

A maior preocupação neste tipo de estudo é a separação bem sucedida de todos os produtos de degradação do fármaco e um do outro, ou seja, o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (BAKSHI; SINGH, 2002). Por isso, a preferência deve ser dada a um método seletivo, com ênfase na pureza de pico (SINGH et al., 2013).

É importante lembrar que o teste de estresse é de natureza preditiva, ou seja, oposto à definitiva (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011). Os produtos de degradação gerados a

partir de estudos de degradação forçada são potenciais produtos de degradação que podem ou não ser formados sob as correspondentes condições de armazenamento, porém auxiliam no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (BLESSY et al., 2014).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado (ANVISA, 2003; ICH, 2005). Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. É um parâmetro que deve ser determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas (ANVISA, 2003; ICH, 2005). O método desenvolvido e validado para a determinação de CET demonstrou excelente sensibilidade, observada pelos baixos valores de LD e LQ obtidos (0,076 µg/mL e 0,2532 µg/mL, respectivamente), o que corresponde a 0,015% e 0,05% da concentração nominal do método, já que um método indicativo de estabilidade deve apresentar um limite de quantificação que seja igual ou menor que o limite de notificação para produtos de degradação, lembrando que um dos objetivos deste tipo de método é monitorar os produtos de degradação formados durante o estudo de estabilidade.

O limite de notificação para produtos de degradação do medicamento cefalotina sódica em pó liofilizado para injeção foi baseado na diretriz da ANVISA e do ICH Q3B (ICH, 2006; BRASIL, 2013), sendo que o valor obtido foi de 0,05%, sendo assim, qualquer produto de degradação acima ou igual a 0,05% deverá ser reportado nos estudos de estabilidade.

O principal objetivo de estudos de degradação forçada é produzir efetivamente amostras contendo produtos de degradação representativos e reais (KAZAKEVICH; LOBRUTO, 2007). Os produtos de degradação que se formam sob uma variedade de condições devem ser identificados e as vias de degradação estabelecidas (SINGH; BAKSHI, 2000). Assim, as amostras foram submetidas a condições de estresse como hidrólise ácida e alcalina, oxidação, fotolítica, calor e umidade, para se observar o comportamento do fármaco frente a diversas condições. A degradação pode ser observada nas condições de hidrólise ácida e alcalina e na oxidação. Sob as demais condições, a cefalosporina estudada demonstrou-se estável.

Ao se realizar o estudo de degradação forçada, deve-se atentar para a faixa de decomposição a qual submetemos a amostra, pois o estresse excessivo pode destruir compostos importantes ou gerar compostos irrelevantes, e por outro lado, o estresse de

pequena extensão pode deixar de produzir produtos de degradação importantes (KAZAKEVICH; LOBRUTO, 2007). Os valores de decomposição que devem ser atingidos ainda apresentam algumas variações na literatura. O fato é que se deve utilizar de bom senso para produzir degradação suficiente para permitir o aparecimento de produtos de degradação, porém não deve ser tão intensa a ponto de provocar a decomposição de produtos de degradação. A indicação desta porcentagem na literatura pode variar entre 5 a 20% (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011), de 10 a 30% (BRASIL, 2012), ou de acordo com a resolução RDC nº 58, deverá ser superior a 10% e não degradar completamente da amostra (BRASIL, 2013).

Por meio dos estudos de degradação realizados em meio ácido (HCl 0,1 M, 60 °C), meio alcalino (NaOH 0,01 M, temperatura ambiente) e em meio oxidativo (H₂O₂ 3%, temperatura ambiente) obtiveram-se degradação da molécula de cefalotina em 16,10%, 14,92% e 20,24%, respectivamente, após 40 minutos, 5 minutos e 20 minutos de exposição. Ficou evidenciado que a cefalotina é extremamente sensível à hidrólise alcalina, considerando que o tempo de exposição foi acentuadamente curto e ainda em temperatura ambiente.

Nas condições de exposição à luz (UV/VIS), calor (60 °C) e umidade (30 °C, 75% UR), o fármaco cefalotina manteve-se estável mesmo após 10 dias de exposição, apresentando variação de teor de 0,10%, 0,81% e 1,32%, respectivamente.

Outra premissa de um método indicativo de estabilidade por CLAE é que os potenciais produtos de degradação gerados devem apresentar boa resolução cromatográfica em relação ao pico do insumo farmacêutico ativo (KAZAKEVICH; LOBRUTO, 2007). No total, foram encontrados 18 produtos de degradação, incluindo a impureza B, que apresentou formação expressiva durante a hidrólise alcalina. Na condição de hidrólise ácida, hidrólise alcalina e estresse oxidativo foram encontrados, respectivamente, 7, 8 e 9 produtos de degradação. A resolução mínima apresentada neste método entre um produto de degradação e a cefalotina foi de 2,4, valor encontrado entre o produto de degradação de tempo de retenção relativo igual a 1,04; observado na condição de hidrólise alcalina.

Todos os 18 produtos de degradação encontrados foram quantificados em área % em relação ao insumo farmacêutico ativo, além de ter seus espectros de absorção demonstrados. O teste de pureza de pico também foi realizado, demonstrando que todos os picos encontrados apresentaram-se puros e homogêneos. A impureza B foi identificada dentre os produtos de

degradação, com tempo de retenção relativo de 0,72. Esta impureza foi encontrada em todas as três condições nas quais ocorreu degradação da cefalotina.

O tempo de corrida total da análise foi definido em o dobro do tempo de retenção do princípio ativo, de maneira a evitar que possíveis produtos de degradação formados não fossem eluídos na mesma corrida cromatográfica, e garantir que o método pudesse detectá-los.

A especificidade e a seletividade avaliam a capacidade que o método possui em medir um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Segundo a ICH (1996), a especificidade é a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de outros componentes que possam estar presentes. A especificidade do método foi devidamente comprovada ao se realizar a separação cromatográfica do fármaco cefalotina na presença de seus produtos de degradação, impurezas e excipientes, e também, ao demonstrar a pureza do pico do ativo e de todos os seus produtos de degradação. Todos os espectros de absorção obtidos nas condições de degradação, com os valores de pureza de pico foram demonstrados. Além disso, espectros em 3D também foram extraídos, o que facilitou ainda mais a averiguação da especificidade do método.

A demonstração da capacidade de quantificação de um método analítico é de grande importância para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Consequentemente, antes de o método analítico ser implementado para uso de rotina, este deve primeiro ser validado para demonstrar que é adequado à sua finalidade (ROZET et al., 2007).

O método indicativo de estabilidade desenvolvido para a cefalotina sódica foi completamente validado de acordo com as resoluções vigentes de órgãos internacionais (ICH) e nacionais (ANVISA e INMETRO) mostrando resultados satisfatórios para todos os parâmetros de validação analisados. O método apresentou-se sensível, preciso, exato, linear, robusto, específico e apropriado para a separação de cefalotina na presença dos seus produtos de degradação.

Através da adequação do sistema (*system suitability*) assegurou-se que os parâmetros cromatográficos estavam conformes para a validação do método. Os resultados obtidos para DPR ($< 2\%$ entre as injeções, valores de fator de cauda e de assimetria do pico (< 2), o número de pratos (> 2000) e o fator de capacidade (> 2) mostraram-se apropriados. Estes

dados comprovaram que o método atende aos requisitos preconizados em literatura oficial (USP, 2013).

A linearidade avalia a capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A linearidade foi verificada, mostrando-se que o método é linear na faixa de 250 a 750 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,99999. A análise estatística comprovou que existe regressão linear nos dados obtidos e que não existe desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas, no intervalo de confiança de 95%. O conteúdo de CET obtido nas amostras analisadas foi de 99,72%, dentro dos valores especificados por compêndios oficiais de 90,0 a 115,0 %.

A precisão de um método analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas (ICH, 2005). Na avaliação da precisão do método, os resultados encontrados foram de 100,07% (repetibilidade) e de 99,38% (precisão intermediária), com valores de DPR de 0,55% e 0,64%, respectivamente, comprovando a precisão do método.

A exatidão de um método analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). A exatidão do método foi determinada com excelência pelo teste de recuperação de padrões, que forneceu como resultado médio de 99,41%. Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL, 2003).

Por fim, a robustez do método foi comprovada por valores abaixo de 0,38% de DPR em todas as alterações cromatográficas intencionais realizadas: vazão de fase móvel, proporção de fase móvel, pH do tampão e temperatura da coluna. A robustez de um método analítico verifica a capacidade deste em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso rotineiro (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Assim, o método indicativo de estabilidade para CET desenvolvido e validado por CLAE é simples e pode ser utilizado com confiança para análise de amostras de estabilidade, assim como na determinação de teor de amostras de rotina para controle de qualidade. Além disso, o método pode ser uma ferramenta muito importante para investigar a estabilidade química da cefalotina sódica. O método desenvolvido apresentou algumas vantagens em

comparação com o método oficial para análise de cefalotina sódica descrito na Farmacopeia Europeia, como o tempo de corrida cromatográfica inferior para se determinar os produtos de degradação (10 minutos a menos), e também a economia de tempo de análise e de preparo, já que na Farmacopeia Europeia são descritos dois métodos diferentes de análise: um para a determinação do teor de cefalotina e outro para determinação de substâncias relacionadas, o que neste estudo foi realizado simultaneamente num mesmo método.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- O método proposto foi desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o detector UV/DAD, para determinação de cefalotina sódica na forma farmacêutica pó liofilizado para injeção.

- Foi realizado o estudo de degradação forçada para a CET e a separação de todos os 18 possíveis produtos de degradação do insumo farmacêutico ativo.

- Os produtos de degradação formados nas condições de hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidação foram identificados por meio de seus tempos de retenção relativo e quantificados em função da área %.

- O teste de pureza de pico foi realizado, comprovando a especificidade do método.

- A impureza B (desacetilcefalotina) foi devidamente identificada frente a um padrão SQR.

- Todos os espectros de absorção dos produtos de degradação foram apresentados comparativamente à CET.

- O método validado é aplicável para o doseamento de rotina da cefalotina no produto acabado, em estudos de estabilidade de longa duração e de estabilidade acelerada, e para quantificação em área % de substâncias relacionadas/impurezas.

PERSPECTIVAS

9. PERSPECTIVAS

É importante destacar que as transformações no mundo atual, além de rápidas, atuam praticamente de forma simultânea em todos os segmentos da indústria farmacêutica. Diante deste cenário, muitas mudanças são adotadas e exigidas por órgãos reguladores. Isto vem ao encontro das necessidades da produção de materiais com maior qualidade e segurança. Este conceito deve ser dirigido tanto nas atividades rotineiras internas na empresa como para a face externa, fazendo com que exista uma antecipação às mudanças impostas.

Este fato exige que o mercado se module rapidamente e que encontre maneiras de sobrevivência e de adaptação. As empresas farmacêuticas devem buscar por métodos que qualifiquem bem o produto, que consigam quantificar adequadamente aquilo a que se propõem e que preservem o profissional e o meio ambiente.

Assim sendo, aspectos como a flexibilidade, a inovação e o dinamismo, tanto dos futuros profissionais como das organizações, levarão a patamares diferenciados e à otimização de conquistas atingidas no momento.

Este trabalho teve como enfoque o estudo de degradação forçada da cefalotina sódica e a verificação dos produtos de degradação formados. Desta forma, a caracterização e o isolamento de produtos de degradação poderão ser realizados, bem como o estabelecimento de uma nova plataforma de estudos de estabilidade contemplando também tempo de validade das soluções utilizadas, a fim de minimizar os gastos no preparo de soluções, o tempo de técnicos e o descarte de materiais, objetivando o desenvolvimento de tecnologia inovadora e dinâmica focada na análise de rotina em larga escala dos produtos farmacêuticos.

TRABALHOS REALIZADOS

10. Trabalhos realizados**10.1. Artigo publicado**

10.1.1. RUGANI, K.S.; SALGADO, H.R.N. Stability-indicating LC method for the determination of cephalothin in lyophilized powder for injection. **Analytical Methods**, v.6, p.4437-4445, 2014. DOI: 10.1039/C3AY42049C.

10.2. Trabalho apresentado

10.2.1. RUGANI, K.S.; SALGADO, H.R.N. Stability-indicating LC method for the determination of cephalothin in injectable form. *In*: 10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DRUG ANALYSIS & 25TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, realizado na cidade de Liège na Bélgica, no período de 22 a 25 de junho de 2014. PQ26, p.263.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALSANTE, K. M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S.W. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical Technology**, v.27, n.2, p.60-72, 2003.

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.29–37, 2007.

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.

ANVISA. Bulário Eletrônico. **KEFLIN®** Antibióticos do Brasil (ABL). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5443032014&pIdAnexo=2114105. Acesso em: 29 nov 2014.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2224-2234, 2009.

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

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.28, p.1011–1040, 2002.

BAYER, T.; ZHOU, W.; HOLZHAUER, K.; SCHÜGERL, K. Investigations of cephalosporin C production in an airlift tower loop reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.26-33, 1989.

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

BOMPADRE, S.; FERRANTE, L.; LEONE, L. On-line solid phase extraction of cephalosporins. **Journal of Chromatography A**, v.812, p. 191-196, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de medicamentos genéricos. Medicamentos genéricos 15/10/2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/guia_genericos.PDF. Acesso em: 06 de dezembro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Relações de Medicamentos Essenciais – Rename**. 5.ed. Brasília, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rename2006.pdf>. Acesso em 13 de dezembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2010. Rename 2010**. 2.ed. Brasília, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/FTN_2010.pdf. Acesso em: 14 de dezembro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta pública nº 11, de 23 de janeiro de 2012. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos**. Acesso em 10 de dezembro de 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/042a338049f229df96d7bfaa19e2217c/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%B0+11+GGMED.pdf?MOD=AJPERES>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Brasília, 23 de dezembro de 2013.

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

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.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2013.

BUHS, R.P.; MAXIM, T.E.; ALLEN, N.; JACOB, T.A.; WOLF, F.J. Analysis of cefoxitin, cephalothin and their deacylated metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.99, p.609-618, 1974.

CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. **Drug stability – principles and practices**. 3.ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

CARVALHO, J.P.; SANTOS, A.S.S.; SA, A.S.; TEIXEIRA, C.S.; NOGUEIRA, M.S. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Fármacos e Medicamentos**, v.34, n.6, p.22-27, 2005.

CHANG, Y.L.; CHEN, Y.F.; CHEN, C.F.; TSAI, T.H. Determination of unbound cephalothin in rat blood by on-line microdialysis and microbore liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.742, p.125-130, 2000.

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

COOPER, M.J.; ANDERS, M.W.; MIRKIN, B.L. Ion-pair extraction and high-speed liquid chromatography of cephalothin and deacetylcephalothin in human serum and urine. **Drug Metabolism and Disposition**, v.1, n.5, p.659-662, 1973.

COX, S.K.; BURNETT, J.D.; HUSS, B.T.; FRAZIER, D. Determination of cefoxitin in serum and tissue. **Journal of Chromatography B**, v.705, p.145-148, 1998.

DeLUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACI, M.; AVELLAR, M. C.W. **Farmacologia Integrada**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011. v. 2, p.1603-1604.

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

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 24, p.755-767, 2001.

ERMER, J.; MILLER, J.H.M. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis - A Guide to Best Practice**. Weinheim: Wiley-Vch, 2005.

ERMER, J.; PLOSS, H.J. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.37, p.859-870, 2005.

FARMACOPEIA brasileira. 5.ed. Brasília:Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FDA - Food and Drug Administration. **A guideline for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics**, Center for Drugs and Biologics, FDA, Department of Health and Human Services, 1987.

FDA - Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FDA - Food and Drug Administration. Guidance for Industry: **Analytical Procedures and Methods Validation**. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, 2000.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

GAURAV, K.; KUNDU, K.; KUNDU, S. Microbial production of 7-aminocephalosporanic acid and new generation cephalosporins (cephalothin) by different processing strategies. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v.35, p.345–358, 2007.

GENNARO, A.R. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2000.

GILPIN, R.K.; PACHLA, L.A. Pharmaceuticals and Related Drugs. **Analytical Chemistry**, v.73, n.12, p.2805-2816, 2001.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN Jr., A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.P. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

GUPTA, V.D., STEWART, K.R. Quantitation of carbenicillin disodium, cefazolin sodium, cephalothin sodium, nafcillin sodium, and ticarcillin disodium by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.69, p.1264-167, 1980.

HADZOVIC-CENGIC, M.; SEJTARIJA-MEMISEVIC, A.; KOLUDER-CIMIC, N. Cellulitis: epidemiological and clinical characteristics. **Medical Archives**, v.66, n.3, p. 51-53, 2012.

HAGEL, R.B.; WAYSEK, E.H.; CORT, W.M. High-pressure liquid chromatography analysis of antibiotic susceptibility disks. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.16, n.3, p.372-277, 1979.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.

HEIM, J.; SHEN, Y.Q.; WOLFE, S.; DEMAINE, A.L. Regulation of isopenicillin N synthetase by carbon source during the fermentation of *Cephalosporium acremonium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.232-236, 1984.

ICH. Stability testing: Photostability of new drug substances and products, Q1B. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, IFPMA, Geneva, 1996.

ICH. Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, IFPMA, Geneva, 2003.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, IFPMA, Geneva, 2005.

ICH, Impurities in New Drug Products, Q3B (R2). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, IFPMA, Geneva, 2006.

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

IKEDA, Y.; BAN, J.; ISHIKAWA, T.; HASHIGUCHI, S.; URAYAMA, S.; HORIBE, H. Stability and stabilization studies of TAK-599 (ceftaroline fosamil), a novel *N*-phosphono type prodrug of anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin T-91825. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.56, n.10, p.1406-1411, 2008.

JACOBSON-KRAM, D.; MCGOVERN, T. Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 38–42, 2007.

KAKAMANU, V.K.; ARORA, V.K.; BANSAL, A.K. Development and validation of isomer specific RP-HPLC method for quantification of cefpodoxime proxetil. **Journal of Chromatography B**, v.835, p.16-20, 2006.

KALANT, H.; ROSCHLAU, W.H.E. **Princípios de farmacologia médica.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.448-450.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists.** New Jersey: Wiley-Interscience, 2007.

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

KLICK, S.; MUISELLAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.; SOMSEN, G.W; JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, v.29, n.2, p.48-66, 2005.

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.

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

LUNN, G.; RHODES, S.W. SANSONE, E.B.; SCHUMUFF, N.R. Photolytic destruction and polymeric resin decontamination of aqueous solutions of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83, p.1289-1293, 1994.

LUNN, G. **HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2000. v.2.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p.214-222, 2009.

MANNA, L.; VALVO, L. Development and validation of a fast reversed-phase ion-pairing liquid chromatographic method for simultaneous determination of eight cephalosporin antibiotics in pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v.60, p. 645-649, 2004.

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

MERCK Index *Online*. Disponível em: <https://rsc.org/merck-index/>, acesso em: 16 de dezembro de 2014.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of HPLC method for determination of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v.90, n.6, p.739-743, 2007a.

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

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

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.; 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, 2012a.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Stability study and degradation kinetics of ceftazidime in pharmaceutical preparations. **Advances in Analytical Chemistry**, v.2, n.1, p.1-5, 2012b.

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

NETO, V.A.; LEVI, G.C.; LEVI, H.V; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. **Antibióticos na prática médica**. 4.ed. São Paulo: Roca, 1994.

NILSSON-EHLE, I.; YOSHIKAWA, T.T.; SCHOTZ, M.C.; GUZE, L.B. Quantitation of antibiotics by high-pressure liquid chromatography: cephalothin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.13, n.2, p.221-227, 1978.

OHANNESIAN, L.; STREETER, A.J. **Handbook of Pharmaceutical Analysis**. New York: Marcel Dekker, 2002.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14th. ed. Whitehouse Station, 2006, p.328.

PARISOTTO, G.; SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, p. 499-505, 2005.

PATIL, P.N.; JACOB, S. HPLC Analysis of cephalosporins and study of different analytical parameters. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, n.1, p.1-14, 2012.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of cefazolin sodium in pharmaceutical dosage forms by UV-spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, v.3, n.1, p.11-20, 2013.

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

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

PINTO, C.G; PAV'ON, J.L.P.; CORDERO, B.M. Micellar liquid chromatography of zwitterions: retention mechanism of cephalosporins. **Analyst**, v.120, p.53-62, 1995.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAO, R.N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, p.335-377, 2003.

REESE, R.E.; BETTS, R.F.; GUMUSTOP, B. **Manual de Antibióticos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 434-471.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v.26, n.2, p. 48-56, 2002.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p.111-125, 2007.

SADER, H.S.; JONES, R.N. Historical overview of the cephalosporin spectrum: four generations of structural evolution. **Antimicrobial Newsletter**, v.8, p.75-84, 1992.

SAKATA, Y. The pharmacokinetic studies of cephalothin, cefazolin and cefmetazole in the neonates and the premature babies. **Kurume Medical Journal**, v.27, p.275-298, 1980.

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 choranic acid. **Analytical Sciences**, v.19, p.281-287, 2003.

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.956-954, 2009.

SAMANIDOU, V.F.; LOANNOU, A.S.; PAPODOYANNIS, I.N. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction—a comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. **Journal of Chromatography B**, v.809, n.1, p.175-182, 2004.

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

SIGNS, S.A.; FILE, T.M.; TAN, J.S. High-pressure liquid chromatographic method for analysis of cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.26, n.5, p.652-655, 1984.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, v.4, p.1-14, 2000.

SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N.; SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical Chemistry**, v.49, p. 71-88, 2013.

SLINGSBY, R.W. REY, M. Determination of pharmaceuticals by multi-phase chromatography: Combined reversed phase and ion exchange in one column. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p. 107-134, 1990.

STEVENS, D.L.; BISNO, A.L.; CHAMBERS, H.F.; EVERETT, E.D.; DELLINGER, P.; GOLDSTEIN, E.J.C.; GORBACH, S.L.; HIRSCHMANN, J.V.; KAPLAN, E.L.; MONTROYA, J.G.; WADE, J.C. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, n.10, p.1373-1406, 2005.

SUGIOKA, T.; ASANO, T.; CHIKARAISHI, Y.; SUZUKI, E.; SANO, A.; KURIKI, T.; SHIROTSUKA, M.; SAITO, K. Stability and degradation pattern of cefpirome (HR 810) in aqueous solution. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n.7, p-1998-2002, 1990.

SUBBIAH, M.; MITCHELL, S.M.; ULLMAN, J.L.; CALL, D.R. β -Lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin, and tetracycline are neutralized. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.20, p.7255-7260, 2011.

SWEETMAN, S.C. **Martindale: the complete drug reference**. 36. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p.219-220.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TERASAKI, T.; NOUDA, H.; TSUJI, A. Selective analysis of mutual displacement effects at the primary binding to human serum albumin. **Journal of Pharmacobio-dynamics**, v. 15, p.91-97, 1992.

TING, S. Reverse-phase liquid chromatographic analysis of cephalosporins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.71, p.1123-1130, 1988.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v.25, n.4, p.616-623, 2002.

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, p.103-108, 2012.

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

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

USP 36. The United States Pharmacopeia. Rockville, USP Convention, 2013.

VADIA, N.H.; PATEL, V.; BHALARA, H.N. Spectrophotometric determination of cefetamet pivoxil hydrochloride and pitavastatin calcium in tablet dosage form. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v.70, n.5, p.649-651, 2008.

VASCONCELLOS, A.G.; LEAL, R.D.; SILVANY-NETO, A.; NASCIMENTO-CARVALHO, C.M. Oxacilin or cefalotin treatment of hospitalized children with cellulitis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 65, p. 7-12, 2012.

VAUCHER, L.C.; PAIM, C.S.; LANGE, A.D.; SCHAPOVAL, E.E.S. LC method for telithromycin in tablets: A stability-indicating assay. **International Journal Pharmaceutics**, v.366, p.82-87, 2009.

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.

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

VIEIRA, D.C.M.; RICARTE, P.C.; SALGADO, H.R.N. Validation of microbiological assay for determination of cefuroxime in injectable preparations. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.31, n.5, p.746-750, 2012b.

WALSH, C. **Antibiotic actions, origins, resistance**. Washington: AMS Press, 2003.

WHO. International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Annex 5, **WHO Technical Report Series**. 863, 1996.

WOOD, R. How to validated analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, p.624-632, 1999.

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

XU, Q.A.; TRISSEL, L.A. **Stability-indicating HPLC methods for drug analysis**. 3.ed. Washington: Pharmaceutical Press, 2008. p.168-170.

ZALEWSKI, P.; CIELECKA-PIONTEC, J.; GARBACKI, P.; JELINSKA, A.; KARAZNIEWICZ-LADA, M. Stability-indicating HPLC method for determination of cefcapene pivoxil. **Chromatographia**, v.76, p.387-391, 2013.