

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

***ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE***  
***PREPARAÇÕES INJETÁVEIS CONTENDO***  
***CEFTAZIDIMA***

**ANDRÉIA DE HARO MORENO**

**Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**

**ARARAQUARA – SP**

**2007**

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

***ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE***  
***PREPARAÇÕES INJETÁVEIS CONTENDO***  
***CEFTAZIDIMA***

**ANDRÉIA DE HARO MORENO**

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

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**

**ARARAQUARA – SP**

**2007**

### **Ficha Catalográfica**

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

M843a Moreno, Andréia de Haro  
Análise químico-farmacêutica de preparações injetáveis contendo ceftazidima. / Andréia de Haro Moreno. – Araraquara, 2007.  
207 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Validação de métodos analíticos. 2. Cefalosporinas. 3. Ceftazidima. 4. Medicamentos (Controle de qualidade). I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient.. II. Título.

**CDD: 615.1901**

**CAPES: 40300005**

ANDRÉIA DE HARO MORENO

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES  
INJETÁVEIS CONTENDO CEFTAZIDIMA**

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**  
Orientador e Presidente

---

**Profa. Dra. Ana Maria Bergold**  
1º Examinador

---

**Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida**  
2º Examinador

---

**Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca**  
3º Examinador

---

**Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira**  
4º Examinador

Aprovado em 06 de dezembro de 2007.

## Epígrafe

Tão bom viver dia a dia...  
A vida assim, jamais cansa...

Viver tão só de momentos  
Como estas nuvens no céu...

E só ganhar, toda a vida,  
Inexperiência... esperança...

E a rosa louca dos ventos  
Preso à copa do chapéu.

Nunca dê um nome a um rio:  
Sempre é outro rio a passar.

Nada jamais continua,  
Tudo vai recomeçar!

E sem nenhuma lembrança  
Das outras vezes perdidas,  
Atiro a rosa do sonho  
Nas tuas mãos distraídas...

*Canção do dia de sempre*  
Mário Quintana

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, pelo dom precioso da vida. Devemos tudo Àquele que nos deu sabedoria para descobrirmos nossa vocação, força para superarmos os obstáculos, tornando um sonho realidade. “A Tua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e eu sinto que, em meu gesto, existe o Teu gesto e em minha voz, a Tua voz” (Vinícios de Moraes).*

*Aos meus queridos e amados pais, razão do meu existir, pelo constante apoio, confiança e carinho em todos os momentos e circunstâncias. Foram inúmeros os dias em que não nos vimos durante o desenvolvimento deste trabalho, mas sei que estivemos juntos em alma, pois somos um só ser.*

*Ao meu querido amigo Glauco Ortega Fernandez, que participou direta e indiretamente da realização desse trabalho. Para mim, você será sempre uma continuação da minha família.*

*À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pela excelente orientação, dedicação, confiança e amizade. Meu eterno agradecimento a quem soube ser, ao mesmo tempo, orientadora, companheira e amiga, ensinando que o segredo para a realização dos nossos objetivos consiste em atitude, perseverança e fé.*

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

*Aos demais professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, com os quais no decorrer do curso pude conviver e aprender e aos amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, com os quais foi maravilhoso conviver e aos funcionários da UNESP.*

*À Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda pela gentil doação dos medicamentos e substância de referência analisados neste trabalho.*

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

*A todos que me apoiaram, ajudaram e me fizeram acreditar na realização desse grande sonho.*

## RESUMO

A ceftazidima é uma cefalosporina semi-sintética de terceira geração com grande atividade antibacteriana, muito usada no tratamento de infecções bacterianas frequentes, incluindo espécies de *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa* e foi considerada fármaco de escolha para infecções graves causadas por espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Haemophylus*. Entre elas, infecções biliares, ósseas e nas articulações, fibrose cística (infecções do trato respiratório), endoftalmites, infecções em pacientes imunodeprimidos (neutropênicos), meningite, peritonite, pneumonia, septicemia, infecções da pele (queimaduras e ulcerações) e infecções do trato urinário. As propriedades favoráveis da ceftazidima são penetração eficiente na parede celular bacteriana, resistência à degradação enzimática pelas bactérias, amplo espectro de atividade, toxicidade muito baixa, extensa penetração nos tecidos, estabilidade metabólica e baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas. A ceftazidima é de administração injetável como sal sódico ou em solução com arginina, sendo amplamente distribuída nos tecidos e fluidos; ela atravessa a placenta e é distribuída no leite materno. A penetração no humor aquoso do olho é relativamente boa após administração sistêmica de ceftazidima. Há algumas evidências de que concentrações suficientes para terapia de infecções oculares causadas por microrganismos gram-positivos ou gram-negativos podem ser obtidas após administração sistêmica. Apesar de a ceftazidima ser bem estudada no que se refere à atividade terapêutica e comercialização, há somente um método oficial farmacopéico para sua quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. Este trabalho apresenta procedimentos para a quantificação de ceftazidima em pó para solução injetável por acidimetria, iodometria, volumetria em meio não-aquoso, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria (UV, visível e infravermelho) e ensaio microbiológico, fornecendo resultados precisos e exatos, conforme pode ser verificado na análise estatística dos métodos. A degradação do fármaco foi seguida de diminuição de sua atividade antimicrobiana, indicando que o fármaco deve ser armazenado protegido da luz e temperatura após sua preparação.

Palavras-chave: validação de métodos analíticos; cefalosporinas; ceftazidima; controle de qualidade.

## ABSTRACT

Ceftazidime is a semisynthetic cephalosporin of the third generation with high antibacterial activity, widely used in the treatment of commonly-occurring bacterial infections, including indole-positive *Proteus* species and *Pseudomonas aeruginosa* and have been considered to be the drugs of choice for serious infections caused by *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* and *Haemophilus* species. They include biliary-tract infections, bone and joint infections, cystic fibrosis (respiratory-tract infections), endophthalmitis, infections in immunocompromised patients (neutropenic patients), meningitis, peritonitis, pneumonia, septicaemia, skin infections (including burns, ulceration) and urinary-tract infections. The favorable properties of ceftazidime include efficient penetration of the bacterial cell wall, resistance to bacterial enzyme degradation, a broad spectrum of activity, very low toxicity, extensive tissue penetration, metabolic stability, and a low degree of serum protein binding. Ceftazidime is administered by injection as the sodium salt or in solution with arginine and is widely distributed in body tissues and fluids; it crosses the placenta and is distributed into breast milk. Penetration into the aqueous humor of the eye is relatively good after systemic administration of ceftazidime. There is some evidence that concentrations sufficient for therapy of ocular infections due to gram-positive and certain gram-negative microorganisms can be achieved after systemic administration. Although ceftazidime has been studied in terms of therapeutic activity and commercialized, there is only one official pharmacopoeial monograph on its quantification by high performance liquid chromatography. This work reports the procedures for the quantification of ceftazidime in powder for injection by acidimetry, iodometry, nonaqueous titration, high performance liquid chromatography, spectrophotometry (UV, visible and infrared) and microbiological assay, providing precise and accurate results, which could be verified by statistical methods. The degradation of the drug was followed by a decrease on its antimicrobial activity, showing the drug must be stored protected of the light and temperature after its preparation.

Keywords: validation of analytical methods; cephalosporin; ceftazidime; quality control.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1 Cefalosporinas .....	6
2.2 Estabilidade de fármacos .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1 Descrição.....	24
3.1.1 Substância química de referência .....	24
3.1.2 Forma farmacêutica .....	24
3.2 Análise qualitativa .....	25
3.2.1 Características físicas .....	25
3.2.2 Solubilidade .....	25
3.2.3 Determinação da faixa de fusão .....	25
3.2.4 Determinação de umidade .....	26
3.2.5 Resíduo por incineração .....	26
3.2.6 Espectrofotometria na região do ultravioleta .....	26
3.2.7 Espectrofotometria na região do infravermelho .....	27
3.2.8 Análise térmica .....	27
3.2.9 Reações de identificação .....	27
3.2.9.1 Caracterização de cefalosporinas .....	28
3.2.9.2 Caracterização de piridina .....	29
3.2.10 Cromatografia em camada delgada .....	32
3.3 Análise quantitativa .....	33
3.3.1 Método de análise microbiológica .....	33
3.3.1.1 Procedimentos preliminares .....	33
3.3.1.2 Padronização do método .....	35
3.3.1.3 Preparo das soluções de ceftazidima substância de referência .....	35
3.3.1.4 Preparo das soluções de ceftazidima na forma farmacêutica .....	36
3.3.1.5 Material .....	36
3.3.1.6 Preparo do inóculo .....	36
3.3.1.7 Ensaio .....	37

3.3.1.8 Curva analítica .....	37
3.3.1.9 Cálculo da potência do medicamento .....	37
3.3.1.10 Teste de recuperação .....	38
3.3.1.10.1 Preparo das soluções .....	38
3.3.1.10.2 Cálculo do teste de recuperação .....	39
3.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta .....	40
3.3.2.1 Realização da curva de Ringbom .....	40
3.3.2.2 Obtenção da curva analítica .....	41
3.3.2.3 Determinação de ceftazidima no medicamento .....	41
3.3.2.3.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência .....	41
3.3.2.3.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra .....	41
3.3.2.4 Cálculos .....	42
3.3.2.5 Teste de recuperação .....	43
3.3.2.5.1 Preparo das soluções .....	43
3.3.2.5.2 Cálculo do teste de recuperação .....	43
3.3.3 Espectrofotometria na região do visível .....	44
3.3.3.1 Metodologia empregando bromocianogênio e anilina .....	44
3.3.3.1.1 Realização da curva de Ringbom .....	44
3.3.3.1.2 Obtenção da curva analítica .....	45
3.3.3.1.3 Determinação de ceftazidima no medicamento .....	45
3.3.3.1.3.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência .....	45
3.3.3.1.3.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra .....	45
3.3.3.1.4 Cálculos .....	46
3.3.3.1.5 Teste de recuperação .....	47
3.3.3.1.5.1 Preparo das soluções .....	47
3.3.3.1.5.2 Cálculo do teste de recuperação .....	48
3.3.3.2 Metodologia empregando neocuproína como agente complexante .....	48
3.3.3.2.1 Realização da curva de Ringbom .....	48
3.3.3.2.2 Obtenção da curva analítica .....	49
3.3.3.2.3 Determinação de ceftazidima no medicamento .....	50
3.3.3.2.3.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência .....	50
3.3.3.2.3.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra .....	50
3.3.3.2.4 Cálculos .....	51

3.3.3.2.5	Teste de recuperação .....	52
3.3.3.2.5.1	Preparo das soluções .....	52
3.3.3.2.5.2	Cálculo do teste de recuperação .....	52
3.3.4	Espectrofotometria na região do infravermelho .....	53
3.3.4.1	Obtenção da curva analítica .....	53
3.3.4.2	Determinação de ceftazidima no medicamento .....	54
3.3.4.2.1	Preparo das pastilhas de ceftazidima substância de referência .....	54
3.3.4.2.2	Preparo das pastilhas de ceftazidima amostra .....	54
3.3.4.3	Cálculos .....	54
3.3.4.4	Teste de recuperação .....	55
3.3.4.4.1	Preparo das pastilhas .....	55
3.3.4.4.2	Cálculo do teste de recuperação .....	55
3.3.5	Acidimetria .....	56
3.3.5.1	Preparo das soluções .....	56
3.3.5.2	Determinação de ceftazidima no medicamento .....	57
3.3.5.3	Cálculos .....	57
3.3.5.4	Teste de recuperação .....	58
3.3.5.4.1	Preparo das soluções .....	58
3.3.5.4.2	Cálculo do teste de recuperação .....	59
3.3.6	Volumetria em meio não-aquoso .....	59
3.3.6.1	Preparo das soluções .....	59
3.3.6.2	Determinação de ceftazidima no medicamento .....	60
3.3.6.3	Cálculos .....	60
3.3.6.4	Teste de recuperação .....	61
3.3.6.4.1	Preparo das soluções .....	61
3.3.6.4.2	Cálculo do teste de recuperação .....	61
3.3.7	Iodometria .....	62
3.3.7.1	Preparo das soluções .....	62
3.3.7.2	Determinação de ceftazidima no medicamento .....	63
3.3.7.3	Cálculos .....	64
3.3.7.4	Teste de recuperação .....	64
3.3.7.4.1	Preparo das soluções .....	64
3.3.7.4.2	Cálculo do teste de recuperação .....	65

3.3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	66
3.3.8.1 Obtenção da curva analítica .....	67
3.3.8.2 Determinação de ceftazidima no medicamento .....	67
3.3.8.2.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência .....	67
3.3.8.2.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra .....	67
3.3.8.3 Cálculos .....	68
3.3.8.4 Teste de recuperação .....	69
3.3.8.4.1 Preparo das soluções .....	69
3.3.8.4.2 Cálculo do teste de recuperação .....	69
3.4 Estabilidade .....	70
3.4.1 Avaliação do fator luz .....	70
3.4.1.1 Escolha da fonte de radiação .....	70
3.4.1.2 Exposição da amostra à luz.....	70
3.4.1.3 Coleta das amostras .....	71
3.4.1.4 Avaliação da fotoestabilidade .....	71
3.4.2 Avaliação do fator temperatura .....	71
3.4.2.1 Exposição da amostra ao calor .....	71
3.4.2.2 Coleta das amostras .....	72
3.4.2.3 Avaliação da estabilidade térmica .....	72
3.4.3 Avaliação do fator radiação .....	72
3.4.3.1 Escolha da fonte de radiação .....	72
3.4.3.2 Exposição da amostra à radiação.....	72
3.4.3.3 Coleta das amostras .....	73
3.4.3.4 Avaliação da estabilidade frente à radiação .....	73
3.4.4 Preparo das amostras para quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta .....	73
3.4.4.1 Amostras sólidas (pó para solução injetável) .....	73
3.4.4.2 Amostras líquidas (solução aquosa 1000 µg/mL) .....	74
3.4.5 Preparo das amostras para quantificação por CLAE .....	74
3.4.5.1 Amostras sólidas (pó para solução injetável) .....	74
3.4.5.2 Amostras líquidas (solução aquosa 1000 µg/mL) .....	74
3.4.6 Preparo das amostras para quantificação por ensaio microbiológico .....	75

3.4.6.1 Amostras sólidas (pó para solução injetável) .....	75
3.4.6.2 Amostras líquidas (solução aquosa 1000 µg/mL) .....	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
4.1 Análise qualitativa .....	76
4.1.1 Características físicas .....	76
4.1.2 Solubilidade .....	76
4.1.3 Determinação da faixa de fusão .....	77
4.1.4 Determinação de umidade .....	78
4.1.5 Resíduo por incineração .....	80
4.1.6 Espectrofotometria na região do ultravioleta .....	81
4.1.7 Espectrofotometria na região do infravermelho .....	82
4.1.8 Análise térmica .....	84
4.1.9 Reações de identificação .....	87
4.1.9.1 Caracterização de cefalosporinas .....	87
4.1.9.2 Caracterização de piridina .....	88
4.1.10 Cromatografia em camada delgada .....	89
4.2 Análise quantitativa .....	90
4.2.1 Método de análise microbiológica .....	90
4.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta .....	99
4.2.3 Espectrofotometria na região do visível .....	108
4.2.3.1 Metodologia empregando bromocianogênio e anilina .....	109
4.2.3.2 Metodologia empregando neocuproína como agente complexante .....	116
4.2.4 Espectrofotometria na região do infravermelho .....	125
4.2.5 Acidimetria .....	131
4.2.6 Volumetria em meio não-aquoso .....	135
4.2.7 Iodometria .....	139
4.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	144
4.2.9 Análise comparativa dos métodos propostos .....	150
4.3 Estabilidade .....	153
5 CONCLUSÕES .....	185
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	187

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Núcleo cefêmico .....	7
<b>Figura 2.</b> Biossíntese do peptidoglicano. ....	10
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da ceftazidima. ....	11
<b>Figura 4.</b> Espectro na região do ultravioleta de ceftazidima substância de referência a 10 µg/mL em água (A), metanol (B), HCl 0,1 M (C) e NaOH 0,1 M (D).....	81
<b>Figura 5.</b> Espectro de absorção na região do ultravioleta de ceftazidima substância de referência (A) e pó para solução injetável (B) a 10 µg/mL em água destilada.....	82
<b>Figura 6.</b> Espectro na região de infravermelho de ceftazidima substância de referência em pastilhas de KBr. ....	83
<b>Figura 7.</b> Espectro na região de infravermelho de ceftazidima pó para solução injetável em pastilhas de KBr. ....	83
<b>Figura 8.</b> Curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de ceftazidima substância de referência sob atmosfera dinâmica de ar. ....	85
<b>Figura 9.</b> Curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de ceftazidima substância de referência sob atmosfera de nitrogênio. ....	85
<b>Figura 10.</b> Curva de análise térmica diferencial (DSC) da ceftazidima substância de referência (A) e ceftazidima pó para solução injetável (B). ....	86
<b>Figura 11.</b> Espectro da região visível de 450 a 475 nm da solução aquosa de ceftazidima substância de referência. ....	88
<b>Figura 12.</b> Representação gráfica da curva analítica de ceftazidima através do ensaio	

microbiológico – método da difusão em ágar – cilindros em placas.....	93
<b>Figura 13.</b> Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P <sub>1</sub> (100,0 µg/mL); P <sub>2</sub> (200,0 µg/mL); P <sub>3</sub> (400,0 µg/mL) e A <sub>1</sub> (100,0 µg/mL); A <sub>2</sub> (200,0 µg/mL); A <sub>3</sub> (400,0 µg/mL).....	94
<b>Figura 14.</b> Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta para solução de ceftazidima substância de referência de 0,5 a 3,0 µg /mL.....	102
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm.....	105
<b>Figura 16.</b> Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para solução de ceftazidima substância de referência de 0,5 a 80,0 µg /mL.....	111
<b>Figura 17.</b> Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm. ....	113
<b>Figura 18.</b> Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para solução de ceftazidima substância de referência de 15,0 a 40,0 µg /mL.....	118
<b>Figura 19.</b> Curva de absorção de soluções aquosas de ceftazidima/Cu(II)/neocuproína.....	121
<b>Figura 20.</b> Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm. ....	121
<b>Figura 21.</b> Representação gráfica da curva analítica de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	127
<b>Figura 22.</b> Hidrólise do anel β-lactâmico em penicilinas e cefalosporinas.....	140
<b>Figura 23.</b> Representação gráfica da curva de calibração da solução de ceftazidima em concentrações de 50 a 300 µg/mL através de CLAE.....	147

<b>Figura 24.</b> Cromatogramas obtidos por CLAE para ceftazidima substância de referência (A) e ceftazidima pó para solução injetável.....	149
<b>Figura 25.</b> Cromatograma obtido para piridina em solução aquosa 400 mg/mL .....	154
<b>Figura 26.</b> Cromatograma obtido para piridina a 400 µg/mL e ceftazidima a 200 µg/mL (soluções aquosas) .....	154
<b>Figura 27.</b> Cromatogramas obtidos para ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, durante 1 dia (A), 2 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D), 21 dias (E) e 28 dias (F) .....	163
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas obtidos para ceftazidima pó para solução injetável exposta à temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 1 dia (A), 2 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D), 21 dias (E) e 28 dias (F) .....	164
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas obtidos para ceftazidima pó para solução injetável exposta à radiação UV, durante 1 dia (A), 2 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D), 21 dias (E) e 28 dias (F) ..	165
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas obtidos para ceftazidima solução aquosa exposta à luz, durante 24 horas (A: controle; B: 6 h; C: 12 h e D: 24 h) .....	175
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas obtidos para ceftazidima solução aquosa exposta à temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 24 horas (A: controle; B: 6 h; C: 12 h e D: 24 h) .....	176
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas obtidos para ceftazidima solução aquosa exposta à radiação UV, durante 24 horas (A: controle; B: 6 h; C: 12 h e D: 24 h) .....	177
<b>Figura 33.</b> Representação gráfica dos teores de ceftazidima obtidos após exposição à luz por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias .....	180
<b>Figura 34.</b> Representação gráfica dos teores de ceftazidima obtidos após exposição à temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio	



microbiológico (B) por um período de 28 dias ..... 181

**Figura 35.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima obtidos após exposição à radiação UV por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias ..... 181

**Figura 36.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima solução aquosa obtidos após exposição à luz por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas ..... 182

**Figura 37.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima solução aquosa obtidos após exposição à temperatura de  $42 \pm 2^\circ\text{C}$  por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas ..... 183

**Figura 38.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima solução aquosa obtidos após exposição à radiação UV por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas ..... 183

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros utilizados para a avaliação de ceftazidima por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas.....	34
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros fixados na padronização de ceftazidima no ensaio microbiológico– método de difusão em ágar – cilindros em placa. ....	35
<b>Tabela 3.</b> Condições cromatográficas utilizadas na adequação de método por CLAE.....	66
<b>Tabela 4.</b> Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade para determinações feitas à temperatura de 25°C (FARMACOPÉIA Brasileira 1988).....	76
<b>Tabela 5.</b> Solubilidade da ceftazidima substância de referência em diferentes solventes a 25°C. ....	77
<b>Tabela 6.</b> Valores de faixa de fusão obtidos para ceftazidima substância de referência.....	78
<b>Tabela 7.</b> Teor de umidade da ceftazidima substância de referência determinado pelo método gravimétrico.....	79
<b>Tabela 8.</b> Resíduo por incineração obtido para ceftazidima substância de referência determinado pelo método gravimétrico. ....	80
<b>Tabela 9.</b> Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de ceftazidima pelo ensaio microbiológico através do método difusão em ágar – técnica cilindros em placas. ....	92
<b>Tabela 10.</b> Valores experimentais obtidos para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável (1000 mg de ceftazidima) através do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placas. ....	95
<b>Tabela 11.</b> Análise da variância dos dados obtidos do doseamento de ceftazidima pelo	

ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa. ....	96
<b>Tabela 12.</b> Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de ceftazidima no doseamento microbiológico método de difusão em ágar – cilindros em placas. ....	97
<b>Tabela 13.</b> Valores experimentais do teste de recuperação obtidos em amostras de ceftazidima pó para solução injetável, através do ensaio microbiológico, método de difusão em ágar – cilindros em placas. ....	98
<b>Tabela 14.</b> Obtenção da curva de Ringbom de ceftazidima através de espectrofotometria no ultravioleta a 255,5 nm. ....	101
<b>Tabela 15.</b> Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no ultravioleta a 255,5 nm. ....	103
<b>Tabela 16.</b> Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm. ....	104
<b>Tabela 17.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 255,5 nm. ....	106
<b>Tabela 18.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm. ....	107
<b>Tabela 19.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm. ....	107
<b>Tabela 20.</b> Obtenção da curva de Ringbom de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 465 nm. ....	110
<b>Tabela 21.</b> Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no	

visível a 465 nm. ....	111
<b>Tabela 22.</b> Absorbâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através do método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm. ....	112
<b>Tabela 23.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região de visível a 465 nm.....	114
<b>Tabela 24.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm.....	115
<b>Tabela 25.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm. ....	115
<b>Tabela 26.</b> Obtenção da curva de Ringbom de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 454 nm. ....	117
<b>Tabela 27.</b> Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 454 nm. ....	119
<b>Tabela 28.</b> Absorbâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através do método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm.....	120
<b>Tabela 29.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região de visível a 454 nm.....	122
<b>Tabela 30.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm.....	123
<b>Tabela 31.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm. ....	123

<b>Tabela 32.</b> Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no infravermelho. ....	126
<b>Tabela 33.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	128
<b>Tabela 34.</b> Preparação das pastilhas para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	129
<b>Tabela 35.</b> Teste de recuperação de ceftazidima substância de referência adicionada à ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do infravermelho. ....	129
<b>Tabela 36.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método acidimétrico. ....	132
<b>Tabela 37.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método acidimétrico. ....	133
<b>Tabela 38.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método acidimétrico. ....	133
<b>Tabela 39.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método volumétrico em meio não-aquoso. ....	136
<b>Tabela 40.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método volumétrico em meio não-aquoso. ....	137
<b>Tabela 41.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método volumétrico em meio não-aquoso. ....	138

<b>Tabela 42.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método iodométrico. ....	141
<b>Tabela 43.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método iodométrico. ....	142
<b>Tabela 44.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método iodométrico. ....	143
<b>Tabela 45.</b> Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através de CLAE. ....	146
<b>Tabela 46.</b> Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima através de CLAE. ....	147
<b>Tabela 47.</b> Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método CLAE.....	148
<b>Tabela 48.</b> Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método CLAE .....	148
<b>Tabela 49.</b> Valores médios experimentais obtidos para a determinação quantitativa de ceftazidima na forma farmacêutica pó para solução injetável, pelos métodos avaliados.....	151
<b>Tabela 50.</b> Análise da variância dos resultados obtidos para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável pelos métodos propostos. ....	151
<b>Tabela 51.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm)..	156
<b>Tabela 52.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, através do método de ensaio microbiológico. ....	157

<b>Tabela 53.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à temperatura, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm). .....	158
<b>Tabela 54.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à temperatura, através do método de ensaio microbiológico.....	159
<b>Tabela 55.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à radiação, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm). .....	160
<b>Tabela 56.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à radiação, através do método de ensaio microbiológico. ....	161
<b>Tabela 57.</b> Teores médios de ceftazidima pó para solução injetável (amostra sólida), obtidos na avaliação da degradação pela luz, pelos diferentes métodos. ....	166
<b>Tabela 58.</b> Teores médios de ceftazidima pó para solução injetável (amostra sólida), obtidos na avaliação da degradação pela temperatura, pelos diferentes métodos. ....	167
<b>Tabela 59.</b> Teores médios de ceftazidima pó para solução injetável (amostra sólida), obtidos na avaliação da degradação pela radiação, pelos diferentes métodos. ....	167
<b>Tabela 60.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à luz, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm). ....	169
<b>Tabela 61.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à luz, através do método de ensaio microbiológico. ....	170
<b>Tabela 62.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à temperatura, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm)...	171
<b>Tabela 63.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à	

temperatura, através do método de ensaio microbiológico. ....	172
<b>Tabela 64.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à radiação, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm). ....	173
<b>Tabela 65.</b> Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à radiação, através do método de ensaio microbiológico. ....	174
<b>Tabela 66.</b> Teores médios de ceftazidima em solução, obtidos na avaliação da degradação pela luz, pelos diferentes métodos. ....	178
<b>Tabela 67.</b> Teores médios de ceftazidima em solução, obtidos na avaliação da degradação pela temperatura, pelos diferentes métodos. ....	178
<b>Tabela 68.</b> Teores médios de ceftazidima em solução, obtidos na avaliação da degradação pela radiação, pelos diferentes métodos. ....	179



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC -	American Type Culture Collection
CAS -	Chemical Abstracts Service
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
BHI -	Brain-heart Infusion Agar
DSC -	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA -	Análise Térmica Diferencial
HPLC -	High Performance Liquid Chromatography
PP -	Polipropileno
PVC -	Cloreto de Polivinila
R -	Reagente
SI -	Solução Indicadora
SR -	Solução Reagente
TG -	Termogravimetria
TSA -	Tryptic Soy Agar

---

# INTRODUÇÃO

---

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

As cefalosporinas representam um importante grupo de antimicrobianos na medicina atual e têm recebido muita atenção clínica em virtude de sua eficácia no tratamento de diversas infecções, tais como otites, pneumonia, faringites, infecções urinárias, de pele, ossos e oportunistas, septicemia além do uso profilático no pós-operatório (SILVA, 2002).

A ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração, semi-sintética, bactericida, resistente à maioria das  $\beta$ -lactamases. É ativa contra extensa variedade de microrganismos Gram-negativos, mostrando eficácia contra alguns Gram-positivos, incluindo cepas resistentes à gentamicina e a outros aminoglicosídeos. Possui, ainda, excelente ação contra *Pseudomonas aeruginosa* (OH et al., 2003).

A ceftazidima é comercializada no Brasil na forma de pó para solução injetável pelo nome de Ceftazidon® pelo Laboratório Ariston; Cetaz® pelo Laboratório União Química; Fortaz® pelo Laboratório Glaxo Wellcome; Betanex® pelo Laboratório Biochimica; Ceftazidima® pelo Laboratório Bergamo; Kefadim® pelo Laboratório Eli Lilly do Brasil e Tazidem® pelo Laboratório Eurofarma (PEREIRA, 2002).

Vários métodos analíticos têm sido propostos para análise das cefalosporinas em fluidos biológicos e preparações farmacêuticas. Dentre eles, podem ser citados a cromatografia líquida de alta eficiência (LAKINGS; WOZNIAK, 1984; FABRE et al., 1985; PHELPS et al., 1986; FALKOWSKI; SILBER, 1987; MARUNAKA; MATSUSHIMA; MANIWA, 1987; DEMOTES-MAINARD et al., 1988; SCIACCHITANO; MOPPER; SPECCHIO, 1994; OKAMOTO et al., 1996; PÉHOURCQ; JARRY, 1998; CAUSON, 2000; SORENSEN; SNOR, 2000; BAFELTOWSKA et al., 2002; JOHNSON; ALLANSON; JOSHI, 2002; SHARMA; CHAWLA; PANCHAGNULA, 2002; NASCIMENTO et al., 2003; SAMANIDOU et al., 2003; ZAJAC et al., 2003; ZIVANOVIC et al., 2004), a espectrofotometria (GRANNEMAN; SENNELLO, 1982; ABDEL-KHALEK; MAHROUS, 1984; FOGG; ABDALLA, 1985; ISSOPOULOS, 1988, 1989; NAVARRO; LAS PARRAS; GARCIA, 1991; ZUHRI et al., 1994; AYAD et al., 1999; EL-WALILY et al., 2000; AL-MOMANI, 2001; MOHAMED, 2001; MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; SALEM; ASKAL, 2002; SALEM; SALEH, 2002; EL-MAMMLI, 2003; MORELLI, 1988, 2003;

AMIN; RAGAB, 2004), a polarografia (SENGUN; ULAS; FEDAI, 1985; REDDY; REDDY, 1997), a titrimetria (FOGG; ABADÍA; HENRIQUES, 1982), a fluorimetria (KORANY; EL-SAYED; GALA, 1989; ALY; HEFNAWY; BELAL, 1996; YANG et al., 1996), a eletroforese capilar (NICKERSON; CUNNINGHAM; SCYPINSKI, 1995; CASTANHEDA; JULIEN; FABRA, 1996; MRESTANI et al., 1997; GASPAR; ANDRASI; KARDOS, 2002) e a voltametria (EL-MAALI; ALI; GHANDOUR, 1994; ALTINOZ et al., 1994; OKKAN et al., 2000).

Apesar de ser altamente estudada e pesquisada no que concerne à atividade antimicrobiana, farmacocinética e farmacodinâmica, quanto à determinação de ceftazidima, há poucas metodologias de análise padronizadas em compêndios oficiais e em periódicos de circulação internacional; dentre eles, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (MYERS; BLUMER, 1983; RÓDENAS et al., 1997; GUITTON et al., 1998) e a fluorimetria (FARREL; ROWELL; CUMMING, 1995). As metodologias descritas em farmacopéias para a determinação de ceftazidima são representadas pela cromatografia líquida de alta eficiência (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005; USP 29, 2006). Pesquisas envolvendo métodos analíticos, são de fundamental importância e altamente relevantes para otimizar sua análise na indústria e garantir a qualidade do produto já comercializado.

O presente trabalho tem como objetivos gerais o desenvolvimento e validação de metodologias de análise para a ceftazidima, baseado em métodos gerais de análise para cefalosporinas, utilizando reações específicas para o fármaco de acordo com suas características estruturais e determinar o(s) fator(es) capazes de alterar a estabilidade química de ceftazidima na forma sólida (pó para solução injetável) e em solução, conforme descrito e enumerado abaixo:

- 1- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de espectrofotometria na região de ultravioleta.
- 2- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de espectrofotometria na região de infravermelho.
- 3- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de espectrofotometria na região do visível.

- 5- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de volumetria em meio não-aquoso.
- 6- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de cromatografia líquida de alta eficiência.
- 7- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise microbiológica de ceftazidima através de método de difusão em ágar (cilindros em placa).
- 8- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de acidimetria.
- 9- Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de ceftazidima através de iodometria.
- 10- Realização de testes de estabilidade de ceftazidima na forma sólida (pó para solução injetável) e em solução (soluções aquosas) a fim de verificar possíveis degradações desta cefalosporina frente a condições e fatores especiais, tais como luz, temperatura e radiação.

---

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2.1 Cefalosporinas

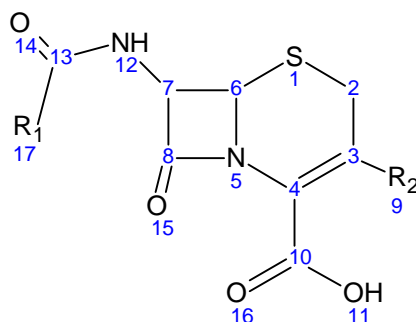
As cefalosporinas são agentes antimicrobianos resistentes às  $\beta$ -lactamases. São utilizadas particularmente no tratamento de infecções bacterianas de diversos tipos e também para o tratamento de infecções cujos agentes antimicrobianos apresentam grande resistência ou em pacientes alérgicos à penicilina (NEU, 1988; PICHICHERO, 2007). Dentre os seus diversos usos, destacam-se os tratamentos de infecções causadas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, tais como septicemia, endocardites bacterianas, osteomielites, pneumonias estafilocócicas, otite média, suspeita de bacteremia, infecções hospitalares e infecções graves, entre outros (RIBEIRO FILHO, 2000; WOOTEN; PANWALKER, 2001; STEWART et al., 2006; BASKARAN et al., 2007; BRENT et al., 2007; EAGYE et al., 2007; FRANCO-VIDAL et al., 2007; NGUYEN et al., 2007; RAJA, 2007).

A primeira fonte das cefalosporinas, o *Cephalosporium acremonium*, foi isolado em 1948 por Brotzu, do mar próximo a uma saída de esgoto na costa da Sardenha. Constatou-se que os filtrados não-purificados de culturas desse fungo inibiam o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* e tratavam as infecções estafilocócicas e a febre tifóide nos seres humanos. Verificou-se que os líquidos das culturas nos quais o fungo da Sardenha era cultivado continham três antibióticos distintos, que foram denominados cefalosporina P, N e C. Com o isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C, o ácido 7-aminocefalosporânico, e com o acréscimo de cadeias laterais, tornou-se possível produzir compostos semi-sintéticos com atividade antibacteriana muito maior que a da substância original (JAWETZ, 1995; SILVA, 2002; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

A cefalosporina C contém uma cadeia lateral derivada do ácido D- $\alpha$ -aminoadípico, que é condensado com um sistema de anel diidrotiazina  $\beta$ -lactâmico (ácido 7-aminocefalosporânico). Os compostos que contêm ácido 7-aminocefalosporânico são relativamente estáveis em ácido diluído e altamente resistentes à penicilinase, independentemente da natureza de suas cadeias laterais e da sua afinidade com a enzima (SERTIÉ; BASILE; SILVA, 1989).

A cefalosporina C pode ser hidrolisada em meio ácido originando o ácido 7-aminocefalosporânico. Subseqüentemente, esse composto foi modificado pelo acréscimo de

diferentes cadeias laterais para criar toda uma família de antibióticos da cefalosporina. Parece que as modificações efetuadas na posição 7 do anel  $\beta$ -lactâmico estão associadas à alteração da atividade antibacteriana, enquanto as substituições na posição 3 do anel diidrotiazina estão associados a alterações no metabolismo e nas propriedades farmacocinéticas dos fármacos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2001). A Figura 1 representa a estrutura do núcleo cefêmico das cefalosporinas.



**Figura 1.** Núcleo cefêmico.

As cefamicinas são semelhantes às cefalosporinas, mas contêm um grupo metoxi na posição 7 do anel  $\beta$ -lactâmico do núcleo de ácido 7-aminocefalosporânico (HARDMAN; LIMBIRD, 2003; ROLINSON; GEDDES, 2007).

O crescimento explosivo das cefalosporinas durante a última década desafiou os eventos mais lembrados do passado e estabeleceu um sistema de classificação muito apropriado, descrito por Jawetz (1995), Montgomery (2000), Silva (2002) e Hardman e Limbird (2006), a classificação por gerações, que baseia-se nas características gerais da atividade antimicrobiana.

As cefalosporinas de **primeira geração**, representadas pela cefalotina e cefazolina, têm boa atividade contra bactérias Gram-positivas e atividade relativamente moderada contra microrganismos Gram-negativos. A maioria dos cocos Gram-positivos (exceto enterococos, *S. aureus* resistente à meticilina e *Streptococcus epidermidis*) é sensível. Os anaeróbios da cavidade oral são, em sua maioria, sensíveis, porém o grupo do *Bacteroides fragilis* é resistente. A atividade contra *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* é satisfatória.



As cefalosporinas de **segunda geração** exibem uma atividade ligeiramente aumentada contra os microrganismos Gram-negativos, mas são menos ativas do que os agentes de terceira geração. Um subgrupo de agentes de segunda geração (cefotetana, cefotetano e cefmetazol) também é ativo contra o grupo do *B. fragilis*.

As cefalosporinas de **terceira geração** são, em geral, menos ativas que as de primeira geração contra cocos Gram-positivos, mas são muito mais ativas contra as enterobactérias, incluindo as cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase. Um subgrupo de agentes de terceira geração (ceftazidima e cefoperazona) também exibe atividade contra *P. aeruginosa*, porém é menos ativo do que outros agentes de terceira geração contra cocos Gram-positivos.

As cefalosporinas de **quarta geração**, como a cefepima, têm espectro ampliado de atividade em comparação com as de terceira geração e exibem maior estabilidade à hidrólise por  $\beta$ -lactamases mediadas por plasmídeos e cromossomos. Os agentes de quarta geração podem ter utilidade terapêutica particular no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos aeróbios resistentes às cefalosporinas de terceira geração.

A resistência das cefalosporinas pode estar relacionada com a incapacidade do antibiótico de atingir seus locais de ação; a alterações nas proteínas de ligação (PBP) que são alvos das cefalosporinas, de modo que os antibióticos ligam-se com menor afinidade; ou a enzimas bacterianas ( $\beta$ -lactamases) capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico e inativar a cefalosporina. O mecanismo de resistência mais prevalente às cefalosporinas consiste na destruição desses agentes por hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico. Entretanto, as cefalosporinas têm sensibilidade variável às  $\beta$ -lactamases: entre os agentes de primeira geração, a cefazolina é mais sensível à hidrólise pela  $\beta$ -lactamase do *S. aureus* do que a cefalotina. A cefoxitina, a cefuroxima e as cefalosporinas de terceira geração são mais resistentes à hidrólise pelas  $\beta$ -lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas do que as de primeira geração. As cefalosporinas de terceira geração são sensíveis à hidrólise por  $\beta$ -lactamases induzíveis e codificadas por cromossomos (tipo I). As cefalosporinas de quarta geração, como a cefepima, são indutores fracos das  $\beta$ -lactamases do tipo I e são menos sensíveis à hidrólise por  $\beta$ -lactamases do tipo I do que os agentes de terceira geração (JONES; VARNAM, 2002; GHELDRE et al., 2003; JAMIESON et al., 2003; OH et al., 2003; KIMURA et al., 2004; BABIC et al., 2006; KIRATISIN et al., 2007; PERILLI et al., 2007; PLASENCIA et al., 2007; STRATEVA et al., 2007).

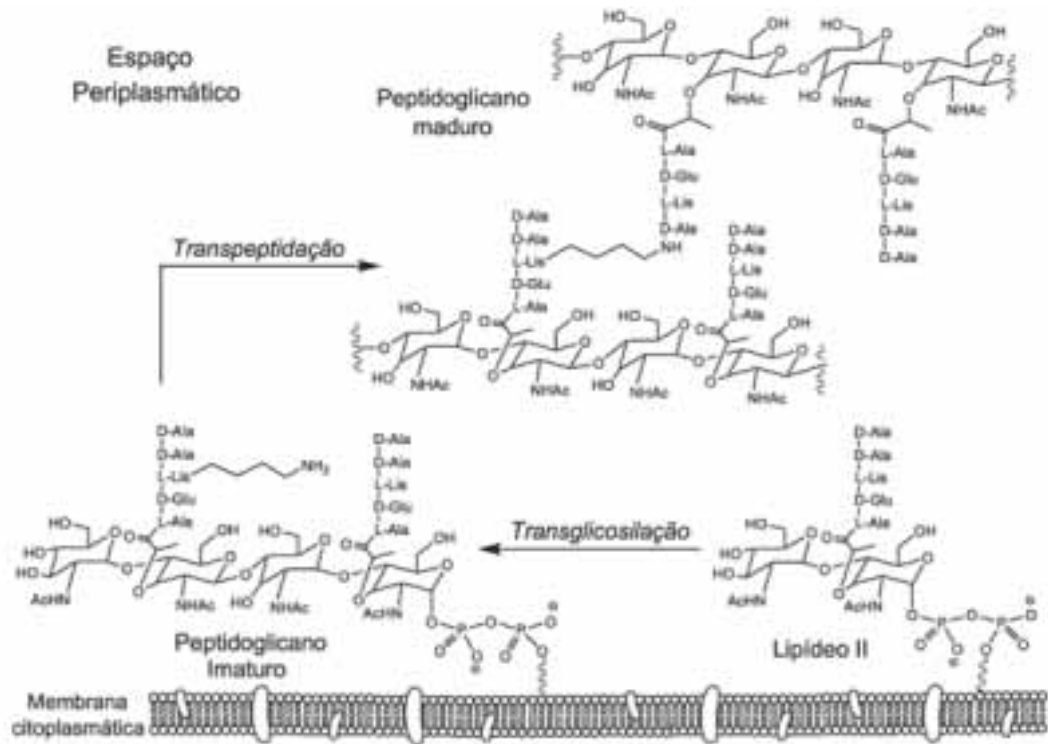
Quanto ao mecanismo de ação, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm a capacidade de matar as bactérias sensíveis. A parede celular das bactérias é essencial para o seu crescimento e desenvolvimento normais. O peptidoglicano é um componente heteropolimérico da parede celular, que proporciona estabilidade mecânica rígida em virtude da sua estrutura entrelaçada com alto índice de ligação cruzada. Nos microrganismos Gram-positivos, a parede celular tem uma espessura constituída de 50-100 moléculas, ao passo que, nas bactérias Gram-negativas, a espessura é constituída apenas de uma ou duas moléculas. O peptidoglicano é constituído de cadeias de glicano, que consistem em filamentos lineares de 2 aminoaçúcares alternados (*N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico) com ligações cruzadas estabelecidas por cadeias peptídicas (RANG et al., 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2006; MARTINDALE, 2006).

A biossíntese do peptidoglicano descrita por Hardman e Limbird (2006) implica cerca de 30 enzimas bacterianas e pode ser dividida em três estágios. O primeiro, que consiste na formação do precursor, ocorre no citoplasma. O produto, o difosfato de uridina (UDP)-acetilmuramil-pentapeptídeo, acumula-se na célula quando os estágios subseqüentes da síntese são inibidos. A última reação na síntese desse composto consiste no acréscimo de um dipeptídeo, D-alanil-D-alanina. A síntese do dipeptídeo implica racemização prévia da L-alanina e condensação catalisada pela D-alanil-D-alanina sintetase. A D-ciclosserina é um análogo estrutural da D-alanina, que atua como inibidor competitivo da racemase e da sintetase.

Durante as reações do segundo estágio, ocorre ligação do UDP-acetilmuramil-pentapeptídeo e da UDP-acetilglicosamina (com liberação dos nucleotídeos de uridina) para formar um longo polímero.

O terceiro e último estágio implica o término da ligação cruzada. Essa etapa é efetuada através de uma reação de transpeptidação que ocorre fora da membrana celular. A própria transpeptidase está ligada à membrana. O resíduo de glicina terminal da fonte de pentaglicina liga-se ao quarto resíduo do pentapeptídeo (D-alanina), liberando o quinto resíduo (também D-alanina). Essa última etapa na síntese de peptidoglicano é inibida pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e por antibióticos glicopeptídicos, como a vancomicina. Estereomodelos revelam que a configuração da penicilina é muito semelhante à da D-alanil-D-alanina. A transpeptidase é provavelmente acilada pela penicilina, ou seja, forma-se aparentemente uma

enzima peniciloil, com clivagem da ligação  $-\text{CO}-\text{N}-$  do anel  $\beta$ -lactâmico. A biossíntese do peptidoglicano está representada na Figura 2.



**Figura 2.** Biossíntese do peptidoglicano.

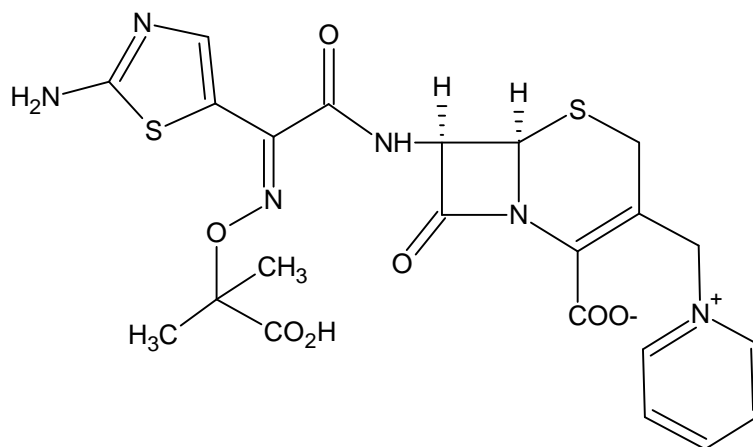
Fonte: [www.scielo.br/img/revistas/qn/v29n4/30269e1.gif](http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v29n4/30269e1.gif)

As cefalosporinas são excretadas primariamente pelos rins; por conseguinte, é preciso modificar a posologia em pacientes com insuficiência renal. Várias cefalosporinas penetram no líquido cefalorraquidiano em concentração suficiente para serem úteis no tratamento da meningite. Atravessam a placenta e são detectadas em altas concentrações nos líquidos sinovial e pericárdico. A penetração no humor aquoso do olho é relativamente boa após a administração sistêmica de agentes de terceira geração, enquanto a penetração no humor vítreo é precária (SILVA, 2002; NICHOLS, 2004; MARTINDALE, 2006).

Os níveis séricos obtidos após a administração parenteral são elevados e prolongados. Concentrações terapêuticamente ativas são detectadas no soro, mesmo 8 a 12 horas após a administração intramuscular ou endovenosa (SILVA, 2002).

A ceftazidima é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico semi-sintético de amplo espectro para administração parenteral. É o (6R,7R)-7-[[*(Z)*-2-amino-4-tiazolil]-2-[(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-8-oxo-3-[(1-piridínio)metil]-5-tia-1-azabicyclo [4.2.0]-2-octeno-2-carboxilato penta-hidratado.

A fórmula empírica é  $C_{22}H_{32}N_6O_{12}S_2$ , com peso molecular de 636,6 g/mol e encontra-se descrita em algumas farmacopéias e outras fontes oficiais, tais como Farmacopéia Portuguesa (2002), British Pharmacopoeia (2005), Martindale (2006), The Merk Index (2006) e USP 29 (2006). A estrutura química da ceftazidima está representada na Figura 3.



**Figura 3.** Estrutura química da ceftazidima (CAS 78558-82-8).

A ceftazidima pode ser administrada por via intravenosa ou intramuscular profunda e encontra-se disponível em forma de pó anidro, que contém ceftazidima juntamente com carbonato de sódio, que, após reconstituição, forma-se ceftazidima sódica e libera-se dióxido de carbono. Existe uma formulação alternativa, a ceftazidima com arginina, para evitar os problemas derivados da efervescência (MARTINDALE, 2006).

A ceftazidima não é metabolizada no organismo, sendo excretada pela urina sob a forma ativa, através da filtração glomerular. Atravessa a placenta rapidamente e é excretada no leite materno. Na ausência de inflamação a ceftazidima não atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica. Todavia, na vigência de inflamação das meninges, são atingidos níveis terapêuticos de 4 a 20 mg/L ou mais, no líquido cefalorraquidiano (MOUTON et al., 1997; ADAMIS et al., 2004; ISLA et al., 2007; SADER et al., 2007).

A meia-vida plasmática é de 2 horas (NICHOLS, 2004) e o fármaco não é metabolizado, sendo excretado inalterado através da urina em cerca de 24 horas (CONIL et al., 2007).

Possui ação bactericida, exercendo seu efeito pela inibição das enzimas responsáveis pela síntese da parede celular, sendo utilizada no tratamento de diversas doenças, como infecções das vias biliares, ósseas, articulares, respiratórias, urinárias, fibrose cística, endoftalmite, meningite, peritonite e septicemia, além de infecções da pele como queimaduras, ulceração ou gangrena e em pacientes imunodeprimidos ou neutropênicos (COHEN, 2006; CAVALLO et al., 2007; CLARIDGE et al., 2007; MARTIN, 2007; MAYBAUER et al., 2007; ROBERTS et al., 2007). Também é utilizada na profilaxia de infecções cirúrgicas (MARTINDALE, 2006).

Uma ampla faixa de microrganismos Gram-negativos é susceptível à ceftazidima *in vitro*, incluindo *Pseudomonas*, enterobactérias e aqueles resistentes à gentamicina e outros aminoglicosídeos, sendo também ativa contra microrganismos Gram-positivos (JAMIESON et al., 2003; BETHEL et al., 2004; KODYM et al., 2006; HUANG et al., 2007; MAIQUES et al., 2007; MOUTON et al., 2007). Além disso, é dotada de elevada atividade *in vitro*, com estreita faixa de concentração inibitória mínima para a maioria dos microrganismos sensíveis. Abaixo, encontram-se alguns microrganismos sensíveis à ceftazidima:

**Gram-negativos aeróbios:** *Citrobacter freundii* e *Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* sp.

**Gram-positivos aeróbios:** *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*.

**Anaeróbios:** *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter* sp, *Clostridium difficile*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptococcus* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Providencia rettgeri*, *Salmonella* spp, *Shigella* sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica*.

**Outros:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp.

Quanto às interações medicamentosas, foi relatado nefrotoxicidade após a administração concomitante de cefalosporinas com antibióticos aminoglicosídeos ou diuréticos potentes como a furosemida. A função renal deve ser cuidadosamente monitorada devido ao potencial nefrotóxico e ototóxico dos antibióticos aminoglicosídeos, especialmente se forem necessárias altas doses de aminoglicosídeos ou se a terapia for prolongada. Se houver a necessidade de administração concomitante de cloranfenicol deve ser considerada a possibilidade de antagonismo (SILVA, 2002; ADAMIS et al., 2004; MARTINDALE, 2006).

A experiência clínica mostrou que a ceftazidima é, de uma forma geral, bem tolerada. As reações adversas são pouco frequentes, incluindo flebite ou tromboflebite após administração endovenosa, dor e/ou inflamação após a administração intramuscular, erupção maculopapular, febre, prurido e, mais raramente, angiedema e anafilaxia (broncoespasmo e/ou hipotensão), diarreia, náusea, vômito, dor abdominal e mais raramente inflamação bucal ou colites, candidíase, vaginites, cefaléia, tontura, parestesia e sensação de gosto desagradável. Têm sido relatados casos de seqüela neurológica, como tremor, mioclonia, convulsões e encefalopatias em pacientes com disfunção renal. As alterações laboratoriais (transitórias) incluem eosinofilia, teste de Coombs positivo (sem hemólise), trombocitose e elevação discreta de uma ou mais das enzimas hepáticas. A exemplo das demais cefalosporinas podem ser observados ocasionalmente aumentos transitórios da uréia sanguínea e no nitrogênio ureico e/ou na creatinina sérica (MOUTON et al., 1997; SILVA, 2002; MARTINDALE, 2006).

## **2.2 Estabilidade de fármacos**

A maioria dos fármacos está sujeita a alguma forma de decomposição química, particularmente em formulações líquidas. Uma das conseqüências da degradação é que preparações medicamentosas envelhecidas não apresentam mais a atividade desejada. Além disso, elas podem também exibir manifestações físicas de decomposição como descoloração que freqüentemente segue a fotodegradação ou, mais seriamente, porém não muito freqüente, podem conter produtos de decomposição prejudiciais.

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser definida como a capacidade de determinada formulação, num recipiente específico (sistema fechado) manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. A estabilidade também pode ser definida como o período a partir da data de fabricação e empacotamento da formulação até que a sua atividade química e biológica não seja menor que um nível predeterminado de potência rotulada e suas propriedades físicas não tenham mudado apreciavelmente e de forma deletérica (VADAS, 2004).

Garantias de que o produto empacotado estará estável pela sua vida de prateleira precisa vir de um acúmulo de dados válidos sobre o fármaco em sua bula, incluindo parâmetros seletivos que, tomados em conjunto, formam o perfil de estabilidade. Embora existam exceções, 90% das potências descritas em rótulos geralmente são reconhecidas como o nível mínimo de potência aceitável (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Para prever o tempo de estocagem (validade) de um fármaco deve-se, principalmente, entender a cinética do processo de sua decomposição. Estas reações podem ser classificadas em várias “ordens” e calcula-se a constante de velocidade para uma reação, quando submetida a uma série de condições ambientais.

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

Condições elevadas de estresse aumentam a deterioração do produto e, portanto, reduzem o tempo necessário para o teste. Isso permite que mais dados sejam coletados em um tempo curto, o que, por sua vez, permite que formulações não satisfatórias sejam eliminadas nas etapas iniciais de um estudo, reduzindo, assim, o tempo necessário para que um produto de sucesso seja lançado no mercado.

Além disso, a comercialização do produto industrializado implica em transporte por longas distâncias, muitas vezes em condições climáticas variadas, e tempo de armazenamento maior, fatores importantes que podem interferir na estabilidade de um fármaco. Mesmo fármacos estáveis quando sujeitos a simples técnicas de manipulação podem sofrer transformações quando alta tecnologia é utilizada.

Assim, torna-se necessário o estudo da estabilidade das preparações farmacêuticas em todas as suas formas de apresentação, para que se possa garantir a identidade, pureza, inocuidade, potência e eficácia do produto até o momento de sua utilização e estabelecer por quanto tempo, desde o momento de sua produção essas características podem ser mantidas (NUDELMAN, 1975).

Segundo Ansel, Popovich e Allen (2000), pode-se avaliar cinco tipos de estabilidade:

**Estabilidade química:** cada componente contido na preparação, ativo ou não, permanece inalterado quimicamente, mantendo sua integridade e potência rotulada, dentro dos limites especificados.

**Estabilidade física:** as propriedades físicas originais, como aspecto, cor, odor, sabor, uniformidade, solubilidade, são mantidas por um tempo determinado.

**Estabilidade microbiológica:** manutenção da esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano, mantida de acordo com requerimentos especificados e aplicação do produto. Os agentes antimicrobianos que estão presentes mantêm sua efetividade dentro dos limites especificados.

**Estabilidade terapêutica:** o efeito terapêutico ou farmacodinâmico permanece inalterado dentro do período de vida útil.

**Estabilidade toxicológica:** não ocorre nenhum aumento significativo da toxicidade.

Muitos fatores afetam a estabilidade do produto farmacêutico, incluindo a interação potencial entre os componentes ativos e inativos, o processo de fabricação, a forma farmacêutica, o recipiente de armazenamento e as condições do ambiente encontradas durante o transporte, armazenamento e manipulação, além do tempo entre a fabricação e o uso (GIL; BATISTA FILHO, 2005).



O estudo da influência do pH na velocidade de degradação em formulações líquidas é um dos parâmetros mais importantes e também o mais investigado. Se a velocidade de hidrólise de um fármaco é medida em pH diferentes, usando para isto uma série de soluções tampões adequadas, pode-se determinar o perfil da relação pH/velocidade através da construção de um gráfico empregando as constantes de velocidade de hidrólise em função do pH (VADAS, 2004). Entretanto, além da estabilidade, outros fatores dependem do pH, entre eles, a solubilidade e a biodisponibilidade; assim, o uso de tampões deve respeitar, além dos aspectos citados, a biocompatibilidade com a via de administração (GIL; BATISTA FILHO, 2005).

O aumento da temperatura normalmente causa um aumento significativo na velocidade de hidrólise de fármacos em solução, fato considerado um efeito positivo nos estudos experimentais de estabilidade de fármacos, conduzidos a temperaturas altas (60 ou 80°C), porque a velocidade de hidrólise sendo maior, pode ser medida mais facilmente (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). A temperatura acelera todos os tipos de reações químicas, podendo também causar evaporação e, conseqüentemente, concentração ou sedimentação do fármaco no medicamento. Em contrapartida, oscilações de temperatura podem ainda viabilizar mudanças de retículo cristalino decorrentes de polimorfismo (GIL; BATISTA FILHO, 2005). De modo geral, a velocidade da reação de degradação de um fármaco duplica ou triplica para cada 10°C de aumento da temperatura (FERREIRA, 2002).

Outro fator relacionado com a estabilidade de fármacos em preparações farmacêuticas é a força iônica. Frequentemente necessita-se adicionar eletrólitos nas soluções para controlar, por exemplo, sua tonicidade (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Dessa forma, é preciso observar os efeitos que eles possam ter sobre a estabilidade, seja por incompatibilidade física (floculação por interferência no potencial zeta nas suspensões) seja por incompatibilidade química (reações de precipitação ou catálise).

O solvente também pode interferir na estabilidade, uma vez que muitos fármacos são susceptíveis à hidrólise e podem ser estabilizados na formulação, quando possível, em soluções não-aquosas. A razão pela qual a mudança para solvente não-aquoso é freqüentemente bem-sucedida em reduzir a hidrólise é explicada em termos da constante dielétrica (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Os solventes mais comumente utilizados são etanol, glicerol ou propilenoglicol (FERREIRA, 2002). Deve-se, entretanto, avaliar a biocompatibilidade sempre que recorrer a essas alternativas (GIL; BATISTA FILHO, 2005).

O oxigênio molecular, uma vez que está envolvido em muitos esquemas de oxidação, pode ser usado para verificar se um fármaco está sujeito à degradação oxidativa. Isso pode ser feito estocando soluções do fármaco em ampolas contendo oxigênio e, então, comparar a sua velocidade de decomposição com soluções semelhantes do fármaco estocadas sob nitrogênio ou dióxido de carbono (NUDELMAN, 1975).

A presença de tensoativos em formas micelares tem um efeito modificador na velocidade de hidrólise de fármacos. A grandeza do efeito depende da diferença na constante de velocidade, quando o fármaco está em solução aquosa e solubilizado dentro da micela, e também da extensão da solubilidade (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Por sua vez, havendo compatibilidade química, a velocidade de degradação de um fármaco pode aumentar ou diminuir caso este se dissolva dentro da micela. A extensão dessa proteção depende da polaridade do fármaco, ou seja, quanto mais lipofílico, maior a probabilidade deste se concentrar no centro da micela.

A adsorção da umidade afeta a estabilidade dos fármacos, principalmente os higroscópicos ou que, decompondo, resultam em compostos higroscópicos. É importante minimizar o acesso à umidade durante a manufatura e a estocagem de fármacos, sendo que a seleção da embalagem correta pode contribuir para minimizar este acesso (PUGH, 2005). Em formulações líquidas, os efeitos deletéricos da água podem ser reduzidos, substituindo-a total ou parcialmente por veículos não-aquosos compatíveis e em formulações sólidas sua ação pode ser minimizada pelo controle da umidade relativa no ambiente de produção, da utilização de dessecantes na embalagem ou a seleção da embalagem (KITAMURA et al., 1990).

A luz também está relacionada com a degradação de muitos fármacos susceptíveis à fotodecomposição, uma vez que a luz pode prover a energia necessária para uma reação de degradação. Os efeitos da luz podem ser minimizados acondicionando-se o produto em embalagens foto-resistentes, tais como vidro ou plástico âmbar, plástico escuro, embalagem de alumínio, entre outros (TONNESEN, 2001).

Embora de uma forma bem menos pronunciada, os excipientes também podem afetar a degradação de fármacos, principalmente pelo aumento do conteúdo da umidade na preparação, e o efeito da umidade na estabilidade do fármaco depende do seu grau de interação com a mesma (KALINKOVA, 1999). Há relativamente pouco tempo que se

conhece a importância dos diluentes, lubrificantes, aglutinantes e desintegrantes sobre a estabilidade dos comprimidos, assim como a influência dos excipientes considerados inertes sobre a estabilidade de outras formas farmacêuticas: soluções, emulsões e pomadas. Foi comprovado que esses “componentes inertes” podem acelerar a degradação química do princípio ativo, causando modificações em suas características farmacotécnicas, como tempo de desagregação, tempo de dissolução, friabilidade, dureza; podem influenciar de outra forma a biodisponibilidade do medicamento modificando suas possibilidades de absorção, ou provocando mudanças organolépticas indesejáveis (NUDELMAN, 1975).

Existem vários mecanismos de degradação das moléculas dos fármacos, todavia os processos de instabilidade mais comuns são por hidrólise, oxidação, decomposição, pirólise, fotólise, interações, efeitos de substituintes, entre outros. Além disso, os processos degradativos também podem ocorrer devido ao meio de reação, ou seja, as reações podem ser em fase homogênea (fase gasosa, em solução ou estado sólido) ou em fase heterogênea (gás-líquido, líquidos imiscíveis, gás-sólido, líquido-sólido, mistura de sólidos) (NUDELMAN, 1975). Embora muitos desses processos possam ser observados através de mudanças de coloração, formação de precipitados e evolução de gases, a maioria das incompatibilidades químicas resultantes de interações que promovem alterações ou rearranjos moleculares não são visivelmente observáveis (GIL; BATISTA FILHO, 2005).

A hidrólise é um processo de solvólise no qual a molécula de uma substância interage com moléculas de água, degradando-a; envolve o ataque pela água das ligações lábeis de moléculas do fármaco dissolvidas, resultando em mudanças moleculares (THOMPSON, 2006).

O processo hidrolítico é provavelmente a causa mais importante e freqüente de degradação de fármacos, devido ao grande número de fármacos com grupamentos funcionais susceptíveis, principalmente ésteres e amidas. Obviamente, o volume de água presente pode exercer um efeito profundo na taxa de uma reação de hidrólise, freqüentemente catalisada por íons hidrogênio ou hidroxila (VADAS, 2004).

A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações farmacêuticas são reações em cadeia que procedem bem lentamente sob a influência do oxigênio molecular, embora traços de metais pesados como os íons cúprico, crômico, ferroso e férrico podem catalisar

reações de oxidação (LACHMAN; DE LUCA; AKERS, 2001). A oxidação pode ser inibida por antioxidantes, chamados catalisadores negativos; são muito eficazes na estabilização de produtos que sofrem uma reação em cadeia mediada por radicais livres. Essas substâncias podem sofrer degradação preferencial ou agir como inibidores de cadeias de radicais livres devido a apresentarem um potencial de oxidação menor que o ingrediente ativo (THOMPSON, 2006). Substâncias fenólicas, aminas aromáticas e esteróides estão entre os fármacos mais susceptíveis de sofrerem hidrólise.

A fotodegradação é a catálise pela luz de reações de degradação tais como a oxidação ou a hidrólise (TONNESEN, 2001). A captação de luz por uma molécula produz sua ativação a partir da qual a molécula ativada pode emitir energia de frequência diferente da recebida (fluorescência ou fosforescência) ou ainda provocar a decomposição das moléculas (fotólise).

As reações de fotodegradação dependem da intensidade e do comprimento de onda da luz; quanto maior a intensidade e o comprimento de onda, maior será a velocidade e o grau de fotodegradação; portanto, a luz ultravioleta é mais deletéria que a luz visível (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; DE LUCA; AKERS, 2001).

Os compostos mais sensíveis a radiações são aqueles que apresentam grupos cromóforos como nitro, nitroso, cetona, sulfona, dupla ou tríplice ligação. A sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número desses cromóforos na molécula e, especialmente, se estiverem conjugados, permitindo a interação entre os elétrons livres. As reações catalisadas por radiações envolvem rupturas de ligações, oxidações, isomerizações, polimerizações, rearranjos e racemizações (NUDELMAN, 1975).

A racemização pode ser definida como a ação ou processo de modificar um composto opticamente ativo para um composto racêmico ou mistura opticamente inativa das correspondentes formas dextrógira e levógira (VADAS, 2004). Se a molécula do fármaco possui somente um centro quiral, o processo de racemização direciona para a formação de uma mistura 50:50 dos dois isômeros. Caso exista mais de um centro quiral na molécula, um isômero pode ser favorecido mais do que o outro (THOMPSON, 2006).

A polimerização é o processo pelo qual duas ou mais moléculas idênticas se combinam para formar uma molécula complexa. Tais substâncias poliméricas mostram-se com capacidade altamente antigênica em animais e são consideradas participantes no

desenvolvimento de reações alérgicas (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Este processo ocorre durante o armazenamento e soluções aquosas concentradas de amino-penicilinas.

A administração da ceftazidima é realizada por infusão ou injeção intravenosa. As soluções para infusão são preparadas e estocadas, devendo por isso ser estimada a estabilidade do princípio ativo quanto ao tipo de solvente, temperatura, concentração do fármaco, tempo de estocagem e tipo de frasco (ARSENE et al., 2002).

Frascos de vidro são os de preferência, mas frascos de cloreto de polivinila (PVC) e polipropileno (PP) também são extremamente utilizados. O cloreto de polivinila forma cloreto de hidrogênio e dioxinas quando incinerados e muitos fármacos são incompatíveis com o cloreto de polivinila devido aos fenômenos de adsorção sofridos por eles (ARSENE et al., 2002).

Segundo os autores, a piridina, produto de degradação da ceftazidima, aparece em concentrações consideradas elevadas quando o fármaco é estocado em frascos de cloreto de polivinila e de polipropileno, mas não em frascos de vidro (ARSENE et al., 2002).

Assim, torna-se extremamente importante investigar a possível presença ou formação de compostos de degradação ou possíveis fenômenos de inativação do fármaco através de estudos de estabilidade das formulações.

Na revisão bibliográfica sobre a estabilidade da ceftazidima ou de fármacos com estruturas químicas semelhantes, encontram-se alguns trabalhos, sendo a maioria realizada com o produto acabado e visando verificar possíveis incompatibilidades em misturas de diferentes formulações.

A fotoestabilidade da ceftazidima foi objeto de estudo de alguns autores. Strom, Fox e Ward (1992) verificaram a estabilidade de soluções contendo ceftazidima submetidas à luz fluorescente em temperaturas de 4°C e 24°C durante 24, 72 e 168 horas. As soluções mantiveram-se estáveis por 4 horas em temperatura ambiente e 8 horas no refrigerador. Inagaki e colaboradores (1992) também verificaram a estabilidade de soluções de ceftazidima frente à exposição à luz fluorescente em temperatura de 24°C, e o fármaco foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência imediatamente e após 1, 2 e 4 horas de exposição. O fármaco mostrou-se estável num período máximo de 4 horas de exposição.

A estabilidade da ceftazidima em solução em diferentes temperaturas foi verificada por vários autores (MARBLE; BOSSO; TOWNSEND, 1986; PENNELL; ALLINGTON; CHANDLER, 1991; RIVERS; WEBSTER, 1995; CHOI; JOHNSON; JACOBSON, 1997; HALL et al., 1997). As amostras foram posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e mostraram-se estáveis por um período médio de 24 horas em temperatura ambiente (24°C). Manduru e colaboradores (1996) e Roger, Arruda e Haverstick (1996) estudaram a estabilidade das soluções em temperatura de 37°C, posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo um período médio de estabilidade de 2 horas. Porém, quando armazenadas a 4°C, mantiveram-se estáveis por até 12 dias.

Bosso, Prince e Fox (1994) e Mason, Johnson e O'Brien (1992) estudaram a estabilidade de soluções de ceftazidima em função de diferentes valores de pH. A literatura sugere que a degradação é mínima na faixa de pH de 4,5 a 6,5 (AZHOU; NOTARI, 1995) e os autores determinaram o fármaco nas soluções, o qual mostrou-se estável num período de 8 a 16 horas.

Arsène e colaboradores (2002) compararam a degradação da ceftazidima em solução em embalagens plásticas e de vidro em diferentes condições de temperatura e tempo de exposição. O fármaco mostrou-se estável por mais tempo em embalagens de vidro, porém a degradação observada em embalagens plásticas de polipropileno (PP) e cloreto de polivinila (PVC) foi considerável ( $2,6 \pm 0,2\%$ ;  $2,1 \pm 0,1\%$  e estatisticamente insignificante para piridina adsorvida, respectivamente, em frascos de PVC e PP).

Messerschmidt (1990) estudou a estabilidade de ceftazidima em pó (formulação extemporânea para injetáveis) armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz. Os resultados mostraram a degradação do fármaco, sugerindo que as preparações sejam diluídas imediatamente antes do uso. Richardson, Woodford e Andrews (1981) propuseram um intervalo de estabilidade de 6 a 24 horas para a estabilidade da preparação pó para solução injetável quando armazenada em temperatura de 25°C.

Os requisitos para o estudo de estabilidade e constituição da data de validade são apresentadas nas *Current Good Manufacturing Practices*, na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) e nas diretrizes do FDA.

No Brasil, segue a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que dispõe sobre o Guia para a Realização de Estudos de

Estabilidade (BRASIL, 2005). O objetivo comum desses guias é fornecer as bases e diretrizes para planejamento correto de protocolos de estudos de estabilidade e determinação de prazo de validade.

Segundo a referida resolução, **prazo de validade** é a data-limite para utilização de um produto farmacêutico definida pelo fabricante, com base nos seus respectivos testes de estabilidade, mantidas as condições de armazenamento e transporte estabelecidos. Já **teste de estabilidade** é um conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagens e condições de armazenamento especificadas.

Os pontos abordados no guia de estudos de estabilidade incluem plano de amostragem, condições experimentais ou ambientais, como estudo de estabilidade acelerado, de longa duração e de acompanhamento, além do estudo de fotoestabilidade, frequência dos testes, tolerância nas condições de armazenamento e normas para elaboração do relatório de estabilidade.

Segundo a mesma resolução, o prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração de acordo com parâmetros definidos, como forma farmacêutica, condições de armazenamento e embalagem. As embalagens de material impermeável não são submetidas a condições de umidade relativa elevada (somente as semi-permeáveis) e as temperaturas de exposição são determinadas de acordo com as condições de armazenamento de cada produto farmacêutico.

---

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---



### 3.1 Descrição

Nome genérico: ceftazidima (CAS 78558-82-8).

Nome químico: (6*R*,7*R*)-7-[[*Z*]-2-amino-4-tiazolil]-2-[(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-8-oxo-3-[(1-piridínio)metil]-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]-2-octeno-2-carboxilato pentahidratado.

Fórmula química: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O

Massa molecular: 636,65 g/mol

Propriedades físico-químicas: pó cristalino, branco ou quase branco, pouco solúvel na água e no metanol e praticamente insolúvel na acetona e no álcool; dissolve-se em soluções ácidas e alcalinas (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2005; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2000; THE MERCK INDEX, 2006; USP 29, 2006).

Categoria: antimicrobiano

Classe: cefalosporina

pKa: 1,9; 2,7 e 4,1 (ARSÈNE et al., 2002)

Nomes comerciais no Brasil: Ceftazidon®, Fortum®, Fortaz®, Kefadin®, Betanex®, Ceftazidima®, Cetaz®, Taziden®.

#### 3.1.1 Substância química de referência

Foi utilizada ceftazidima, substância de referência, com teor estimado em 99,98% e identificada pelo número de lote 03073321, gentilmente fornecida pelo Laboratório Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil).

#### 3.1.2 Forma farmacêutica

Foi utilizado ceftazidima pó para solução injetável, equivalente a 1000 mg de ceftazidima para 10 mL de solução diluente, sob o número do lote 8652A com o nome

comercial de Ceftazidon®, gentilmente fornecida pela Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil).

### **3.2 Análise qualitativa**

#### **3.2.1 Características físicas**

A ceftazidima substância de referência descrita no item 3.1.1 foi avaliada visualmente em relação ao aspecto, cor e odor.

#### **3.2.2 Solubilidade**

Transferiram-se 25,0 mg de ceftazidima substância de referência para tubos de ensaio acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, sob agitação até completa solubilização. O ensaio foi realizado a 25°C e a solubilidade indicada de acordo com o descrito na Farm. Bras. (1988). Os solventes utilizados foram: acetato de etila, acetona, ácido clorídrico 0,1 M, água, clorofórmio, diclorometano, etanol absoluto, etanol 96%, hidróxido de sódio 0,1 M, isopropanol, metanol, 1-propanol e toluol. Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

#### **3.2.3 Determinação da faixa de fusão**

A faixa de fusão foi determinado na substância de referência, descrita no item 3.1.1, utilizando equipamento automático STUART Cientific SMP1 (Staffordshire, UK). A amostra, previamente dessecada, foi colocada em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram introduzidos horizontalmente no equipamento. Foi possível realizar a determinação simultânea utilizando-se até três capilares.

### 3.2.4 Determinação de umidade

A ceftazidima substância de referência foi exatamente pesada em pesa-filtros previamente tarados e dessecados em estufa NOVA ÉTICA Modelo 400/5ND (São Paulo, Brasil) durante 3 horas a 60°C a vácuo, com pressão não excedendo 5 mm de mercúrio. Antes da pesagem os pesa-filtros foram dispostos em dessecador contendo sílica-gel como substância dessecante até atingirem a temperatura ambiente. O processo foi repetido até peso constante e a perda em peso foi calculada em porcentagem. As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se cerca de 500 mg em cada determinação, conforme procedimento preconizado na monografia do fármaco (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2000; USP 29, 2006) e para substâncias antibióticas, Método 1, da Farmacopéia Brasileira (1988).

### 3.2.5 Resíduo pela incineração

A substância de referência foi exatamente pesada em cadinhos de porcelana previamente tarados e dessecados em forno mufla COEL LW modelo 2000 (São Paulo, Brazil) a 800°C. Antes da pesagem os cadinhos foram dispostos em dessecador para atingirem a temperatura ambiente. O processo foi repetido até peso constante e o resíduo calculado em porcentagem. As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se cerca de 1,0 g de amostra em cada determinação.

### 3.2.6 Espectrofotometria na região ultravioleta

Os espectros de absorção na região ultravioleta foram obtidos na região entre 200 a 400 nm com auxílio de Espectrofotômetro UV-Vis JAS.CO modelo 7800 (Columbia, USA), empregando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A substância de referência e a amostra foram solubilizadas em diversos solventes, todos de grau analítico, na concentração de 10 µg /mL descritos a seguir: água, metanol, hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M.

### 3.2.7 Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho

Os espectros foram obtidos com auxílio de espectrofotômetro SHIMADZU FTIR, modelo 3000 (Columbia, USA), pesando 10 mg de ceftazidima substância de referência e quantidade equivalente de ceftazidima no medicamento (pó para solução injetável) em pastilhas de 250 mg de brometo de potássio dessecado.

### 3.2.8 Análise térmica

As medidas de DSC (Differential Scanning Calorimetry) foram realizadas em cadinhos de alumínio, taxa de aquecimento 10°C/min e fluxo de N<sub>2</sub>. O equipamento utilizado foi DSC/DTA, modelo 2910 (Maryland, DC). As curvas TG (Termogravimetry) e DTA (Differential Thermal Analysis) foram obtidas através de análise térmica simultânea (SDT Q600), da TA Instruments (Maryland, DC), no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

A faixa de temperatura utilizada foi de 0 a 800 °C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90 mL/min) e de nitrogênio (vazão de 90 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min e massa de amostra (ceftazidima) de aproximadamente 5 mg. A amostra foi acondicionada em cadinho de alumínio hermeticamente fechado, e como substância de referência foi utilizado Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

### 3.2.9 Reações de identificação

Considerando a estrutura química da ceftazidima, representada na Figura 3, foram realizadas reações para caracterização estrutural do fármaco, principalmente para identificação do anel β-lactâmico (cefalosporina) e da piridina. Porém, uma das etapas preliminares para os procedimentos analíticos é a degradação hidrolítica do antimicrobiano (MARTÍNEZ; FALCÓ, CABEZA, 2002).

O ensaio de degradação consiste na hidrólise ácida ou alcalina do fármaco quando uma solução aquosa do mesmo é aquecida até ebulição durante cerca de 20 minutos, em meio

ácido ou alcalino. Para tanto, foram pesados 20 mg do fármaco e dissolvidos com 10 mL de solução de ácido sulfúrico 4,5 M. A solução foi aquecida até a ebulição em banho-maria durante 20 minutos. Após, arrefeceu-se e neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio 6,0 M e o volume foi completado com água destilada em um frasco de 100 mL (MARTÍNEZ; FALCÓ, CABEZA, 2002).

### 3.2.9.1 Caracterização de cefalosporinas

A literatura destaca vários métodos para determinação de cefalosporinas e outros compostos  $\beta$ -lactâmicos baseados na complexação do reagente com o fármaco, originando compostos coloridos que podem ser determinados visível ou espectrofotometricamente, como as reações com cloridrato de hidroxilamina, ninidrina, vanadato de amônio, molibdato de amônio, ácido fosfomolibdico, 2-nitrofenilhidrazina, imidazol, acetilacetonafomaldeído, nitrato de cobalto, cromotrope 2B, sulfato de cério e amônio, íons ferro (III), íons cobre (II), ácido pícrico, 2-dinitrofenol, *p*-nitrofenol, fenilhidrazina e outros (MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002; NAVARRO, LAS PARRAS; GARCIA, 1991; ZUHRI et al., 1994).

Foram selecionadas três reações de caracterização de cefalosporinas: ensaio com íons ferro (III), com íons cobre (II) e com molibdato de amônio.

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico.

*Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,8 M:* foram adicionados 48 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> R em 1,0 L de água destilada.

*Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 % (v/v):* juntou-se 1 parte de ácido sulfúrico R em 3 partes de água destilada, sob resfriamento e com as devidas proteções individuais.

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

*Solução de Ferro (III) 0,01 M:* foram pesados 4,040 g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O em 1,0 L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,8 M.

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

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

*Solução de o-fenantrolina 0,02 M*: foram dissolvidos 3,965 g de *o*-fenantrolina em 1,0 L de solução tampão citrato pH 4,2.

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

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

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

Na reação com molibdato de amônio, em 10 mL das soluções da substância de referência e da amostra degradadas, conforme discutido anteriormente, foram adicionados 1 mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 % (v/v) e 5 mL da solução de molibdato de amônio 2 %. Procedeu-se ao aquecimento em banho-maria termostatizado durante 30 minutos. Após, arrefeceu-se e verificou-se o desenvolvimento da coloração produzida.

Na reação com íons cobre (II), foram adicionados 1 mL de solução de cloreto de cobre 0,005 M e 1 mL de solução de neocuproína 0,01 M a soluções de ceftazidima a 30 mg/mL preparadas em tampão citrato pH = 4,2. Procedeu-se ao aquecimento em banho-maria durante 10 minutos e arrefeceu-se.

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

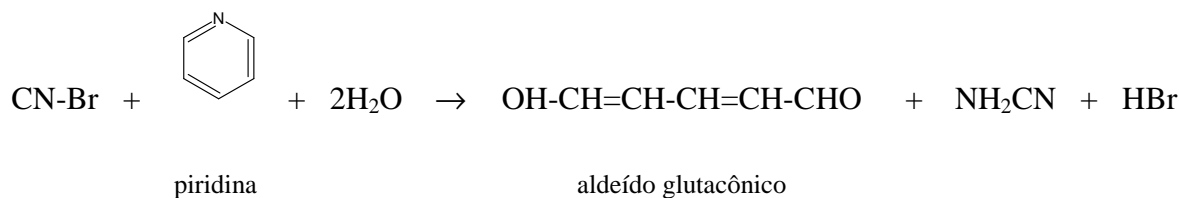
### **3.2.9.2 Caracterização de piridina**

Dentre as cefalosporinas comercializadas, a ceftazidima apresenta em sua estrutura química uma molécula de piridina, conforme verificado na Figura 3. Reações específicas de determinação de piridina tornam o ensaio de identificação de ceftazidima seletivo quando

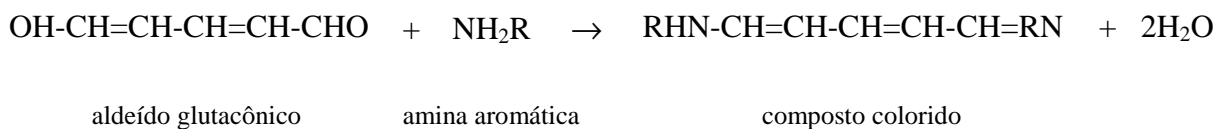
comparado com as demais cefalosporinas, uma vez que praticamente todas respondem aos ensaios gerais de identificação (MARTÍNEZ; FALCÓ; CABEZA, 2002).

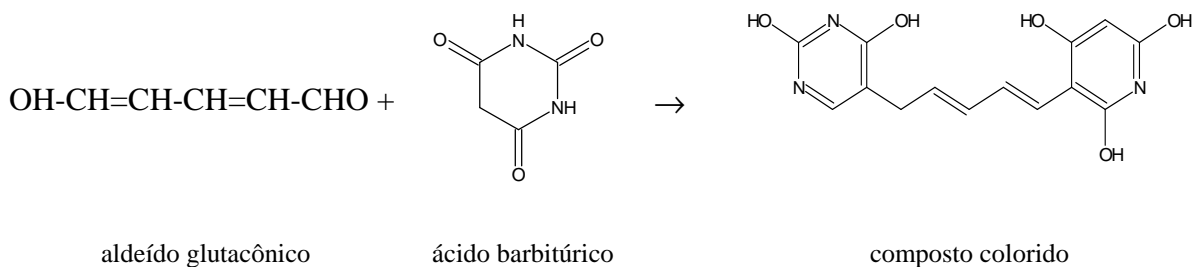
A literatura destaca a clássica reação da piridina com o reagente cromogênico bromocianogênio na presença de aminas primárias aromáticas, tais como anilina ou *o*-tolidina, resultando na formação de bases de Schiff coloridas (amarelas), que constituem a base de numerosos ensaios colorimétricos para determinação de piridina e seus derivados (FEIGL, 1966). Destaca ainda a reação da piridina com o bromocianogênio na presença de solução de ácido barbitúrico, resultando em compostos de coloração rósea (JUNGREIS, 1984). Segundo os autores, a reação requer a abertura hidrolítica do anel de piridina com a formação de aldeído glutacônico, o que ocorre imediatamente após a adição de bromocianogênio (Reação 1); o aldeído glutacônico condensa-se com aminas primárias aromáticas (Reação 2) ou ácido barbitúrico (Reação 3), resultando em compostos coloridos (amarelo ou rósea, respectivamente). As reações envolvidas encontram-se descritas abaixo:

### Reação 1:



### Reação 2:



**Reação 3:**

As soluções utilizadas foram preparadas em capela com reagentes de grau analítico:

*Solução de ácido barbitúrico 0,3 % (p/v):* foram dissolvidos 300 mg de ácido barbitúrico em água destilada, com auxílio de leve aquecimento e completou-se o volume com água destilada em balão volumétrico de 100 mL.

*Solução de anilina 2,5 % (v/v):* foram adicionados 2,5 mL de anilina R em etanol R para 100 mL.

*Solução de bromo 1 N:* foram dissolvidos 10 g de brometo de sódio e 2,80 g de bromato de potássio em 30 mL de água. Juntou-se 1 mL de HCl R e completou-se o volume com água para 100 mL. Preparada em capela.

*Solução de bromocianogênio:* foi adicionada, gota a gota e sob resfriamento, a solução de cianeto de potássio 5% (p/v) à solução de bromo 1 N até o desaparecimento da coloração amarela. Esta solução deve ser preparada recentemente e armazenada sob refrigeração. Cuidados foram tomados porque é muito tóxico.

*Solução de cianeto de potássio 5% (p/v):* foram dissolvidos 5 g de cianeto de potássio em água destilada para 100 mL de solução. Preparada em capela.

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

Para a reação com anilina, juntou-se a 2,0 mL de soluções de ceftazidima substância de referência e amostra, previamente degradadas, 0,5 mL de solução de anilina 2,5 % (p/v) e 0,5 mL de solução de bromocianogênio. Verificou-se o desenvolvimento de coloração, através da comparação entre os tubos padrão e amostra.



Para a reação com ácido barbitúrico, juntou-se a 2,0 mL de soluções de ceftazidima substância de referência e amostra, previamente degradadas, 0,5 mL de solução de ácido barbitúrico 0,3 % (p/v) e 0,5 mL de solução de bromocianogênio. Verificou-se o desenvolvimento de coloração através da comparação entre os tubos padrão e amostra.

### 3.2.10 Cromatografia em camada delgada

A literatura não descreve metodologia para identificação de cefalosporinas por cromatografia em camada delgada, apenas o ensaio de substâncias aparentadas (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002; USP 29, 2006) que utiliza como fase móvel uma mistura de 6 volumes de butanol, 26 volumes de solução tampão de acetato de sódio pH 4.5, 32 volumes de acetato de butila e 32 volumes de ácido acético glacial, sendo as placas examinadas à luz ultravioleta de 254 nm.

As placas utilizadas para a identificação foram preparadas com sílica-gel 60F (20 x 10 cm) com espessura de 0,25 mm e ativadas a 105 °C por 1 hora em estufa. Para o preparo das soluções da substância de referência e da amostra, foram dissolvidos massas equivalentes a 50 mg da substância de referência e da amostra em dimetilformamida R e os volumes completados para 25 mL com o mesmo solvente. O sistema eluente utilizado foi butanol: tampão acetato de sódio pH 4.5: acetato de etila: ácido acético glacial (6:26:32:32, v/v/v/v), sendo todos os solventes utilizados de grau analítico.

Na execução do ensaio, primeiramente o sistema eluente foi colocado para a saturação da cuba. As soluções, preparadas no dia da análise, foram aplicadas em quantidade de 10 µL transferida para a placa com a utilização de pipetador automático. Depois, a placa foi colocada na cuba para eluição dos compostos. Posteriormente, a placa foi retirada da cuba de vidro, para secagem com corrente de ar quente e observação à luz ultravioleta em 254 nm.

### **3.3 Análise quantitativa**

#### **3.3.1 Método de análise microbiológica**

##### **3.3.1.1 Procedimentos preliminares**

A partir de parâmetros especificados em ensaios com outras cefalosporinas (BARRY; THORNSBERRY, 1991; FARMACOPÉIA Brasileira, 1988), foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas, verificando parâmetros como microrganismo, meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco, entre outros, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros utilizados para a avaliação de ceftazidima por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas.

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
Meios de cultura	Brain-heart Infusion Agar (BHI)
	Meio nº 1 de Grove-Randall
	Meio nº 2 de Grove-Randall
	Tryptic Soy Agar (TSA)
Solução diluente	Água destilada
	Solução tampão fosfato pH 6.0
	Solução tampão fosfato pH 8.0
Concentração da solução padrão	2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL
	8,0; 12,0 e 16,0 µg/mL
	100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL
Concentração do inóculo	0,5 %
	1,0 %
	2,0 %
Temperatura de incubação	35 ± 2°C
Tempo de incubação	16 horas
	18 horas
	21 horas
Solução diluente inicial	Água destilada

### 3.3.1.2 Padronização do método

A partir dos resultados obtidos com os diferentes microrganismos e meios de cultura foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico (Tabela 2). A padronização do ensaio foi realizada utilizando-se técnica descrita para outros agentes antimicrobianos (FDA, 1996; FARMACOPÉIA Brasileira, 1988).

**Tabela 2.** Parâmetros fixados na padronização de ceftazidima no ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placa.

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
Meios de cultura	Meio nº 1 de Grove-Randall Meio nº 2 de Grove-Randall
Solução diluente	Solução tampão fosfato pH 6.0
Concentração da solução padrão	100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL
Concentração do inóculo	0,5 %
Temperatura de incubação	35 ± 2°C
Tempo de incubação	21 horas
Solução diluente inicial	Água destilada

### 3.3.1.3 Preparo das soluções de ceftazidima substância de referência

Foram transferidos 100,0 mg de ceftazidima substância de referência, exatamente pesados, para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água destilada para obtenção de solução com 1 mg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 mL e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com solução tampão fosfato pH 6.0, obtendo as concentrações de 100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL.

#### **3.3.1.4 Preparo das soluções de ceftazidima na forma farmacêutica**

A partir do volume de solução injetável utilizado para a extração, foi pesado o equivalente a 100,0 mg e dissolvidos em água para obtenção de solução a 1,0 mg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 mL e transferidos para balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com solução tampão fosfato pH 6,0, obtendo as soluções de concentração de 100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL.

#### **3.3.1.5 Material**

No doseamento microbiológico, foram utilizados os meios nº 1 de Grove-Randall (Merck) para a manutenção dos microrganismos em tubos com meio inclinado e para a preparação e padronização do inóculo e meio nº 2 de Grove-Randall como camada base. Os meios de cultura e a solução tampão utilizados foram esterilizados, previamente, em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Foram empregadas placas de Petri com 20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro externo x 10,0 mm de altura. Estes materiais, assim como a vidraria não volumétrica, foram esterilizados em estufa.

#### **3.3.1.6 Preparo do inóculo**

Os microrganismos-teste *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram mantidos em meio inclinado nº 1, de manutenção por 24 horas e repicado para solução fisiológica utilizada para a padronização do inóculo realizado em fotocolorímetro a 580 nm com transmitância de  $25 \pm 2\%$  (Farm. Bras., 1988). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 0,5 % em meio nº 1 de Grove-Randall, mantido em banho a  $47 \pm 1^\circ\text{C}$ . Todos os meios de cultura e soluções tampão e fisiológica foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 3.3.1.7 Ensaio

Foram utilizadas 12 placas de Petri para o doseamento de ceftazidima em pó para solução injetável. Em capela de fluxo laminar, foram transferidos com auxílio de pipetador automático, 21 mL de meio nº 2 de Grove-Randall para a camada base em cada placa.

Após a solidificação desta camada, foram adicionados por meio de um pipetador automático, 4 mL de meio nº 1 de Grove-Randall com inóculo a 0,5 % (v/v). Após a solidificação da camada semeada, foram distribuídos 6 cilindros de aço inoxidável por placa (6 placas), que receberam, com auxílio de pipetador automático, respectivamente, 200 µL das soluções descritas nos itens 3.3.1.3 e 3.3.1.4 em cada cilindro. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  e após 21 horas realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição com auxílio de um paquímetro digital Starrett, modelo 799 (São Paulo, Brasil).

### 3.3.1.8 Curva analítica

A reta foi construída em gráfico logarítmo da concentração versus diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da substância de referência. A curva foi construída utilizando o programa Excel 98.

### 3.3.1.9 Cálculo da potência do medicamento

A potência do medicamento foi calculada pela equação de HEWITT (1977). Os ensaios foram realizados em dias diferentes, durante seis dias consecutivos dividindo-os em ensaio I, II, III, IV, V e VI, sendo cada ensaio a média de seis determinações.

Equação 1:

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

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

Na qual:

$$F = 1/3 [(\bar{A}_1 + \bar{A}_2 + \bar{A}_3) - (P_1 + P_2 + P_3)]$$

**I = logaritmo da razão das doses**

$$E = 1/4 [(\bar{A}_3 + P_3) - (\bar{A}_1 + P_1)]$$

### **3.3.1.10 Teste de recuperação**

O teste de recuperação foi realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006).

#### **3.3.1.10.1 Preparo das soluções**

O teste de recuperação no doseamento microbiológico é realizado da mesma forma que para o doseamento das soluções amostra, com a diferença que, a solução amostra é adicionada de padrão em concentração conhecida.

No desenvolvimento do teste de recuperação do doseamento microbiológico foram padronizados valores de 5, 10 e 20 % de substância de referência adicionada, acima dos 100% preconizados. Neste ensaio, preparou-se uma solução de substância de referência com concentração de 1000 µg/mL pesando-se 100,0 mg de substância de referência em 100 mL de água destilada. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 25,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com solução tampão pH 6,0 e obtendo-se concentração final de 500 µg/mL. A solução amostra foi preparada pesando-se o equivalente a 100,0 mg de ceftazidima e dissolvidos em água num balão volumétrico de 100 mL. As soluções para o teste de recuperação foram preparadas da seguinte forma: para a recuperação 1 foram transferidos volumes de 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução amostra para cada balão volumétrico de 10 mL. A partir da solução da substância de referência de 500 µg/mL foram transferidos analiticamente 0,1; 0,2 e 0,4 mL para os balões volumétricos de 10 mL contendo a solução amostra e completou-se o volume com tampão fosfato pH 6,0.

Para a recuperação 2 foram transferidos volumes de 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução amostra para cada balão volumétrico de 10 mL. A partir da solução substância de referência de 500 µg/mL foram transferidos analiticamente 0,2; 0,4 e 0,8 mL para os balões volumétricos de 10 mL contendo a solução amostra e completou-se o volume com tampão fosfato pH 6,0.

Para a recuperação 3 foram transferidos volumes de 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução amostra para cada balão volumétrico de 10 mL. A partir da solução substância de referência de 500 µg/mL foram transferidos analiticamente 0,4; 0,8 e 1,6 mL para os balões volumétricos de 10 mL contendo a solução amostra e completou-se o volume com tampão fosfato pH 6,0.

Desta forma, obtivemos as seguintes concentrações teóricas:

Para o teste de recuperação 1: 105,0; 210,0 e 420,0 µg/mL, representando os 5 % adicionados.

Para o teste de recuperação 2: 110,0; 220,0 e 440,0 µg/mL, representando os 10 % adicionados.

Para o teste de recuperação 3: 120,0; 240,0 e 480,0 µg/mL, representando os 20 % adicionados.

Após a execução do ensaio, as placas foram colocadas em estufa incubadora a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após 21 horas, foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de paquímetro. A potência do antimicrobiano foi calculada pela equação de HEWITT (1977) e a partir do valor encontrado da potência dos ensaios de recuperação.

### 3.3.1.10.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) é calculada através da expressão descrita pela AOAC (AOAC, 1990):

**Equação 2:**

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



Na qual:

$P_F$  = potência da substância de referência + amostra

$P_A$  = potência da amostra

$P_P$  = potência da substância de referência adicionada

### 3.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta

O espectro na região ultravioleta foi obtido utilizando-se equipamento Espectrofotômetro UV-Vis JAS.CO modelo 7800 (Columbia, USA) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi feita entre 200 e 400 nm. Foram preparadas soluções de ceftazidima a 10 µg/mL em água destilada, devido a este solvente haver sido escolhido durante a comparação dos espectros em vários solventes, e as leituras foram realizadas a 255,5 nm conforme procedimento descrito no item 3.2.6.

#### 3.3.2.1 Realização da curva de Ringbom

Foram pesados analiticamente 100,0 mg de ceftazidima substância de referência, previamente dessecada em estufa a 105 °C durante 2 horas, e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. Uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL para obtenção de uma solução de concentração de 50 µg/mL em água destilada. A partir desta solução foram transferidas alíquotas para obtenção de curva de Ringbom com 18 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de pipetador automático. Os volumes foram completados com água destilada em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 0,5 a 30,0 µg/mL de ceftazidima.

### **3.3.2.2 Obtenção da curva analítica**

Para obtenção da curva analítica foi preparada uma solução de ceftazidima substância de referência a 50 µg/mL conforme realizado no item 3.3.2.1 e à partir desta solução foram transferidas alíquotas com auxílio de pipetador automático para obtenção de soluções com concentrações de 7,0 a 14,0 µg/mL de ceftazidima substância de referência.

### **3.3.2.3 Determinação de ceftazidima no medicamento**

#### **3.3.2.3.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência**

Foram transferidos volumes de 2,0 mL de solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 50,0 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com água destilada para obtenção de uma solução com concentração 10,0 µg/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata.

#### **3.3.2.3.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra**

Foram pesadas 20 ampolas de ceftazidima pó para solução injetável para a determinação do peso médio. Uma quantidade de pó equivalente a 3 pesos médios foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado com água destilada para obtenção de solução de concentração teórica de 3,0 mg/mL. Uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 150 mL completando o volume com água destilada, obtendo solução de concentração de 100,0 µg/mL.

A partir desta solução foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada, obtendo solução de concentração final de ceftazidima de 10,0 µg/mL

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 255,5 nm, utilizando-se cubeta de quartzo com 1 cm de espessura e água destilada como branco.

### 3.3.2.4 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela equação 3:

**Equação 3:**

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

Na qual:

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

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

$A_A$  = Absorvância da amostra

$A_{SR}$  = Absorvância da substância de referência

O teor percentual de ceftazidima na amostra foi calculado pela equação 4:

**Equação 4:**

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

Na qual:

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

$C_t$  = concentração de ceftazidima teórica na amostra (mg)

### 3.3.2.5 Teste de recuperação

#### 3.3.2.5.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 100,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 1000 µg/mL. Desta solução, foi tomada uma alíquota de 5,0 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada, obtendo-se concentração de 50,0 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração 100,0 µg/mL, a partir da solução de ceftazidima pó para solução injetável a 1000,0 µg/mL, preparada pela dissolução de 127,2 mg de pó em 100 mL de água destilada.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 3,0 mL da solução amostra para balões volumétricos de 25 mL denominados: A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 50,0 µg/mL, nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão foram transferidos 6,0 mL de solução de ceftazidima substância de referência de 50,0 µg/mL para um balão de 25 mL, completando o volume com água destilada e obtendo solução de concentração final de 12,0 µg/mL.

Os volumes nos balões foram completados com água destilada, obtendo-se concentrações de 12,0; 14,0; 16,0 e 18,0 µg/mL para os balões A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>.

#### 3.3.2.5.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 5:**

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

Na qual:

$C_f$  = concentração da substância de referência + concentração da amostra

$C_u$  = concentração da amostra

$C_a$  = concentração da substância de referência adicionada

### **3.3.3 Espectrofotometria na região do visível**

#### **3.3.3.1 Metodologia empregando bromocianogênio e anilina**

O espectro na região visível foi obtido utilizando-se equipamento Espectrofotômetro UV-Vis JAS.Co modelo 7800 (Columbia, USA) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi feita entre 400 e 700 nm. Foram preparadas soluções de ceftazidima a 30  $\mu\text{g/mL}$  em água destilada, devidamente adicionada dos demais reagentes responsáveis pelo desenvolvimento da coloração, conforme citado no item 3.2.9.2.

##### **3.3.3.1.1 Realização da curva de Ringbom**

Foram pesados analiticamente 100,0 mg de ceftazidima substância de referência, previamente dessecada em estufa a vácuo durante 2 horas, e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. Uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL para obtenção de uma solução de concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  em água destilada. A partir desta solução foram transferidas alíquotas para obtenção de curva de Ringbom com 18 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de pipetador automático.

Foram adicionados em cada balão, 500  $\mu\text{L}$  de solução de anilina 2,5 % (v/v) e 500  $\mu\text{L}$  de solução de bromocianogênio. Os volumes foram completados com água destilada em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 0,5 a 80,0  $\mu\text{g/mL}$  de ceftazidima.

### **3.3.3.1.2 Obtenção da curva analítica**

Para obtenção da curva analítica foi preparada uma solução de ceftazidima substância de referência a 100,0 µg /mL conforme realizado no item 3.3.3.1.1 e a partir desta solução foram transferidas alíquotas com auxílio de pipetador automático para obtenção de soluções com concentrações de 10,0 a 50,0 µg/mL de ceftazidima substância de referência.

Foram adicionados em cada balão 500 µL de solução de anilina 2,5 % (v/v) e 500 µL de solução de bromocianogênio e o volume foi completado para 10 mL com água destilada.

### **3.3.3.1.3 Determinação de ceftazidima nos medicamentos**

#### **3.3.3.1.3.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência**

Foram transferidos volumes de 3,0 mL de solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 100,0 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se 500 µL de solução de anilina 2,5 % e 500 µL de solução de bromocianogênio. O volume foi completado com água destilada para obtenção de uma solução com concentração 30,0 µg/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata.

#### **3.3.3.1.3.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra**

Foram pesados 20 frascos de ceftazidima pó para solução injetável para a determinação do peso médio. Uma quantidade de pó equivalente a 3 pesos médios foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado com água destilada para obtenção de solução de concentração teórica de 3,0 mg/mL. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume com água destilada, obtendo solução de concentração de 300 0 µg/mL.

A partir desta solução foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, adicionaram-se 500 µL de solução de anilina 2,5 % (v/v) e 500 µL de bromocianogênio e o volume foi completado com água destilada, obtendo solução de concentração final teórica de ceftazidima de 30,0 µg/mL

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 465 nm, utilizando-se cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico e água destilada adicionada dos reagentes solução de anilina 2,5 % (v/v) e bromocianogênio como branco.

#### 3.3.3.1.4 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela equação 6:

**Equação 6:**

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

Na qual:

$C_A$  = concentração da amostra (µg/mL)

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

$A_A$  = Absorvância da amostra

$A_{SR}$  = Absorvância da substância de referência

O teor percentual de ceftazidima na amostra foi calculado pela equação 7:

**Equação 7:**

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

Na qual:

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

$C_t$  = concentração de ceftazidima teórica na amostra (mg)

### 3.3.3.1.5 Teste de recuperação

#### 3.3.3.1.5.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 100,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Desta solução, foi tomada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada, obtendo-se concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$ . A solução amostra foi preparada com concentração 100,0  $\mu\text{g/mL}$ , a partir da solução de ceftazidima pó para solução injetável a 1000,0  $\mu\text{g/mL}$ , preparada pela dissolução de 127,2 mg de pó em 100 mL de água destilada.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 3,0 mL da solução amostra para balões volumétricos de 10 mL denominados: A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 1,5; 3,0 e 6,0 mL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão foram transferidos 3,0 mL de solução de ceftazidima substância de referência de 100,0  $\mu\text{g/mL}$  para um balão de 10 mL, completando o volume com água destilada e obtendo solução de concentração final de 30,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Os volumes nos balões foram completados com água destilada após a adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução de anilina 2,5 % (v/v) e 500  $\mu\text{L}$  de solução de bromocianogênio, obtendo-se concentrações de 30,0; 31,5; 33,0 e 36,0  $\mu\text{g/mL}$  para os balões A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>.



### 3.3.3.1.5.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 8:**

$$R\% = [Cf - Cu] / Ca \cdot 100$$

Na qual:

Cf = concentração da substância de referência + concentração da amostra

Cu = concentração da amostra

Ca = concentração da substância de referência adicionada

### 3.3.3.2 Metodologia empregando neocuproína como agente complexante

O espectro na região visível foi obtido utilizando-se equipamento Espectrofotômetro UV-Vis JAS.Co modelo 7800 (Columbia, USA) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi feita entre 400 e 700 nm. Foram preparadas soluções de ceftazidima a 30 µg/mL em tampão citrato pH 4,2, devidamente adicionada dos demais reagentes responsáveis pelo desenvolvimento da coloração, conforme descrito no item 3.2.9.1. O preparo das soluções utilizadas encontra-se descrito abaixo, sendo os reagentes obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

#### 3.3.3.2.1 Realização da curva de Ringbom

Foram pesados analiticamente 100,0 mg de ceftazidima substância de referência, previamente dessecada em estufa a vácuo durante 2 horas, e transferidos para balão

volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada, obtendo-se concentração de 1000,0 µg/mL, utilizada para a obtenção das concentrações de 10,0 a 70,0 µg/mL. Desta solução, foi tomada uma alíquota de 10,0 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada, obtendo-se concentração de 100,0 µg/mL, utilizada para a obtenção das concentrações de 1,0 a 70,0 µg/mL. A partir destas soluções foram transferidas alíquotas para obtenção de curva de Ringbom com 18 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de pipetador automático.

Foram adicionados em cada balão 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) 0,005 M. Os volumes foram completados com solução tampão citrato pH 4,2 em balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 1,0 a 70,0 µg/mL de ceftazidima. Em seguida, as soluções resultantes foram aquecidas em banho-maria (40 °C) durante 10 minutos e arrefecidas para a leitura. O branco foi preparado utilizando-se 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) 0,005 M. O volume foi completado com solução tampão citrato pH 4,2 em balão volumétrico de 10 mL e a solução aquecida em banho-maria (40 °C) durante 10 minutos e arrefecida para a leitura.

#### **3.3.3.2.2 Obtenção da curva analítica**

Para obtenção da curva de calibração foi preparada uma solução de ceftazidima substância de referência a 1000,0 µg/mL conforme realizado no item 3.3.3.2.1 e à partir desta solução foram transferidas alíquotas com auxílio de pipetador automático para obtenção de soluções com concentrações de 15,0 a 40,0 µg/mL de ceftazidima substância de referência.

Foram adicionados em cada balão 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) e o volume foi completado para 10 mL com solução tampão citrato pH 4,2. As soluções foram aquecidas em banho-maria (40 °C) durante 10 minutos e arrefecidas para a leitura.

### 3.3.3.2.3 Determinação de ceftazidima no medicamento

#### 3.3.3.2.3.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência

Foram transferidos volumes de 300,0 µL de solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 1000,0 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) 0,005 M. O volume foi completado com solução tampão pH 4,2 para obtenção de uma solução com concentração 30,0 µg/mL. A solução foi aquecida em banho-maria (40°C) durante 10 minutos e arrefecida para a leitura. Este procedimento foi realizado em triplicata.

#### 3.3.3.2.3.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra

Foram pesadas 20 ampolas de ceftazidima pó para solução injetável para a determinação do peso médio. Uma quantidade de pó equivalente a 3 pesos médios foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado com água destilada para obtenção de solução de concentração teórica de 3,0 mg/mL. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume com água destilada, obtendo solução de concentração de 300,0 µg/mL.

A partir desta solução foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) 0,005 M e o volume foi completado com solução tampão citrato pH 4,2, obtendo solução de concentração final de ceftazidima de 30,0 µg/mL. A solução foi aquecida em banho-maria (40 °C) durante 10 minutos e arrefecida para a leitura. Este procedimento foi realizado em triplicata.

O branco foi realizado utilizando-se 300,0 µL de água destilada, 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) 0,005 M e o volume foi completado com solução tampão citrato pH 4,2, em balão volumétrico de 10 mL. A solução foi aquecida em banho-maria (40 °C) durante 10 minutos e arrefecida para a leitura.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 454 nm, utilizando-se cubeta de quartzo com 1 cm de espessura.

#### 3.3.3.2.4 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela equação 9:

**Equação 9:**

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

Na qual:

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

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

$A_A$  = Absorvância da amostra

$A_{SR}$  = Absorvância da substância de referência

O teor percentual de ceftazidima na amostra foi calculado pela equação 10:

**Equação 10:**

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

Na qual:

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

$C_t$  = concentração de ceftazidima teórica na amostra (mg)

### 3.3.3.2.5 Teste de recuperação

#### 3.3.3.2.5.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 100,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 1000,0 µg/mL. Desta solução, foi tomada uma alíquota de 10,0 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada, obtendo-se concentração de 100,0 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração 1000,0 µg/mL, pela dissolução de 127,2 mg de pó em 100 mL de água destilada.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 300,0 µL da solução amostra para balões volumétricos de 10 mL denominados: A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 150; 300 e 600 µL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 100,0 µg/mL, nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão foram transferidos 300 µL de solução de ceftazidima substância de referência de 1000,0 µg/mL para um balão de 10 mL, completando o volume com água destilada e obtendo solução de concentração final de 30,0 µg/mL.

Os volumes nos balões foram completados com solução tampão citrato pH 4,2 após a adição de 1,0 mL de solução de neocuproína 0,01 M e 1,0 mL de solução de cloreto de cobre (II) 0,005 M, obtendo-se concentrações teóricas de 30,0; 31,5; 33,0 e 36,0 µg/mL para os balões A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>.

#### 3.3.3.2.5.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 11:**

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

Na qual:

C<sub>f</sub> = concentração da substância de referência + concentração da amostra

C<sub>u</sub> = concentração da amostra

C<sub>a</sub> = concentração da substância de referência adicionada

### **3.3.4 Espectrofotometria na região do infravermelho**

Foi utilizada ceftazidima 99,9 % proveniente da Ariston Química e Farmacêutica Ltda lote 0,3073321 e medicamento de distribuição nacional contendo ceftazidima em pó para solução injetável. Foi utilizado espectrofotômetro convencional SHIMADZU (Columbia, USA) com digitalização de espectros que permite obter arquivos eletrônicos das análises.

#### **3.3.4.1 Obtenção da curva analítica**

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

### 3.3.4.2 Determinação de ceftazidima no medicamento

#### 3.3.4.2.1 Preparo das pastilhas de ceftazidima substância de referência

Foram tomadas massas de pó equivalentes a 3,0 mg de ceftazidima (30,0 mg da diluição 1:10) e devidamente homogeneizadas com 220 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 250 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

#### 3.3.4.2.2 Preparo das pastilhas de ceftazidima amostra

Foram tomadas massas de pó equivalentes a 3,0 mg de ceftazidima (30,0 mg da diluição 1:10) em relação ao peso médio e devidamente homogeneizadas com 220 mg de brometo de potássio, perfazendo uma massa total da pastilha de 250 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

#### 3.3.4.3 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela equação 12:

**Equação 12:**

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

Na qual:

$C_A$  = concentração da amostra (mg)

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

$A_A$  = Absorvância da amostra

$A_{SR}$  = Absorvância da substância de referência

O teor percentual de ceftazidima na amostra foi calculado pela equação 13:

**Equação 13:**

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

Na qual:

$C_A$  = concentração de ceftazidima encontrada na amostra (mg)

$C_t$  = concentração de ceftazidima teórica na amostra (mg)

#### **3.3.4.4 Teste de recuperação**

##### **3.3.4.4.1 Preparo das pastilhas**

Foi analiticamente pesado o equivalente a 2,0 mg de ceftazidima em relação ao peso médio (diluição 1:10 em KBr) e 100,0; 200,0 e 400 µg de ceftazidima substância de referência (diluição 1:10 em KBr) e homogeneizados com quantidade suficiente de KBr para o preparo das pastilhas com massa de 250 mg.

Assim, foram adicionados 100,0; 200,0 e 400,0 µg de ceftazidima substância de referência às pastilhas, obtendo-se concentrações de 2,1; 2,2 e 2,4 mg de ceftazidima em  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ , respectivamente. Em seguida, as leituras foram realizadas, e a intensidade dos picos determinada em absorvância.

##### **3.3.4.4.2 Cálculo do teste de recuperação**

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):



**Equação 14:**

$$R\% = [Cf - Cu] / Ca \cdot 100$$

Na qual:

Cf = concentração da substância de referência + concentração da amostra

Cu = concentração da amostra

Ca = concentração da substância de referência adicionada

### 3.3.5 Acidimetria

#### 3.3.5.1 Preparo das soluções

*NaOH 0,1 M*: a solução foi preparada segundo Morita & Assumpção (1972) e a Farmacopéia Brasileira (1988), dissolvendo-se 40 g de hidróxido de sódio em água destilada isenta de dióxido de carbono e completou-se o volume para 1000 mL em balão volumétrico com o mesmo solvente. Para a padronização, pesaram-se exatamente cerca de 5 g de biftalato de potássio previamente triturado e dessecado a 120 °C durante 2 horas e dissolveu-se em 75 mL de água isenta de dióxido de carbono. Juntou-se 2 gotas de fenolftaleína SI e titulou-se com a solução de hidróxido de sódio até o aparecimento de cor rosa permanente. Calculou-se a normalidade, sendo que cada 204,2 mg de biftalato de potássio equivalem a 1 mL de hidróxido de sódio 1 N. Uma alíquota de 100,0 mL desta solução foi diluída para 1000 mL em balão volumétrico com água destilada isenta de dióxido de carbono, obtendo-se a solução de NaOH 0,1 M.

*HCl 0,1 M*: a solução também foi preparada segundo Morita & Assumpção (1972) e a Farmacopéia Brasileira (1988), diluindo-se 85 mL de ácido clorídrico R em água destilada para obter 1000 mL e padronizada como segue: pesou-se exatamente cerca de 1,5 g de carbonato de sódio anidro padrão primário previamente dessecado a 270 °C durante 1 hora e dissolveu-se em 100 mL de água; adicionaram-se 2 gotas de vermelho de metila SI e titulou-

se o ácido lentamente até que a solução se tornasse fracamente rosa. Aqueceu-se a solução até a fervura, resfriou-se e continuou-se a titulação, repetindo o processo de aquecimento e resfriamento conforme necessário, até que a cor rosa fraca não fosse mais afetada pela continuação da fervura. Calculou-se a normalidade, sendo que cada 52,99 mg de carbonato de sódio anidro equivalem a 1 mL de ácido clorídrico 1 M. Uma alíquota de 100,0 mL desta solução foi diluída para 1000 mL em balão volumétrico com água destilada isenta de dióxido de carbono, obtendo-se a solução de HCl 0,1 M.

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

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

### 3.3.5.2 Determinação de ceftazidima no medicamento

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 500 mg de ceftazidima em 25 mL de água destilada isenta de dióxido de carbono, adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína SI e neutralizou-se com HCl 0,1 M. Adicionou-se um volume de 25,0 mL de NaOH 0,1 M e aqueceu-se em banho-maria durante 20 minutos a 80 °C, tomando a precaução de evitar a absorção de dióxido de carbono. Esfriou-se e titulou-se o excesso de NaOH 0,1 M com HCl 0,1 M usando fenolftaleína SI como indicador. Repetiu-se a operação sem a ceftazidima; a diferença entre as duas titulações representa a quantidade de NaOH gasta, sendo que 1 mol de NaOH 0,1 M corresponde a 54,658 mg de ceftazidima (medida como  $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$ ).

### 3.3.5.3 Cálculos

O percentual de ceftazidima foi calculado através da equação 15:

**Equação 15:**

$$A (\%) = [v \times mEq \times 100] / m$$

Na qual:

$v$  = mL de hidróxido de sódio 0,1 M

mEq = miliequivalente da ceftazidima (54,658 mg)

$m$  = massa de ceftazidima (mg)

### 3.3.5.4 Teste de recuperação

#### 3.3.5.4.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 1000,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 10,0 mg/mL.

Para o ensaio de recuperação foram adicionados 2,5; 5,0 e 10,0 mL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 10,0 mg/mL, nos erlenmeyers R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente, após a neutralização com HCl a frio.

Para o preparo da solução de referência foram pesados analiticamente 500,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferida para erlenmeyer de 250 mL, dissolvendo-se em 25 mL de água destilada isenta de dióxido de carbono previamente neutralizada à fenolftaleína SI com NaOH 0,01 M.

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 500 mg de ceftazidima em 25 mL de água destilada isenta de dióxido de carbono, adicionaram-se 2 gotas de fenolftaleína SI e neutralizou-se com HCl 0,1 M. Adicionou-se um volume de 25 mL de NaOH 0,1 M e aqueceu-se em banho-maria durante 20 minutos a 80 °C, tomando a precaução de evitar a absorção de dióxido de carbono. Esfriou-se e titulou-se com HCl 0,1 M usando fenolftaleína SI como indicador. Os volumes de solução de referência foram adicionados logo após a neutralização a frio. Repetiu-se a operação sem a ceftazidima; a diferença entre as duas titulações representa a quantidade de NaOH gasta, sendo que 1 mL de NaOH 0,1 M corresponde a 54,658 mg de ceftazidima (medida como C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>).

### 3.3.5.4.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 16:**

$$R\% = [Cf - Cu] / Ca \cdot 100$$

Na qual:

Cf = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

Cu = quantidade da amostra

Ca = quantidade da substância de referência adicionada

### 3.3.6 Volumetria em meio não-aquoso

#### 3.3.6.1 Preparo das soluções

*Ácido perclórico 0,1 M:* a solução foi preparada segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), diluindo-se 8,5 mL de ácido perclórico R em 500 mL de ácido acético glacial e 21 mL de anidrido acético; após resfriamento, adicionou-se ácido acético glacial para obter 1000 mL e padronizada como segue: pesou-se exatamente cerca de 700 mg de biftalato de potássio previamente triturado e dessecado a 120 °C durante 2 horas e dissolveu-se em 50 mL de ácido acético glacial; juntou-se 2 gotas de violeta cristal SI e titulou-se com a solução de ácido perclórico até viragem do violeta ao verde azulado. Realizou-se o ensaio em branco a fim de verificar o volume de ácido perclórico consumido pelos 50 mL de ácido acético glacial e calculou-se a molaridade. Cada 20,42 mg de biftalato de potássio equivalem a 1 mL de HClO<sub>4</sub> 0,1 M.

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

### 3.3.6.2 Determinação de ceftazidima no medicamento

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 250 mg de ceftazidima em 30 mL de ácido acético glacial; adicionou-se 2 gotas de violeta cristal SI e titulou-se com solução de  $\text{HClO}_4$  0,1 M. Repetiu-se a operação sem a amostra; calculou-se a quantidade de  $\text{HClO}_4$  gasta, sendo que 1 mol de  $\text{HClO}_4$  0,1 M corresponde a 54,658 mg de ceftazidima (medida como  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$ ).

### 3.3.6.3 Cálculos

O percentual de ceftazidima foi calculado através da equação 17:

**Equação 17:**

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

Na qual:

v = mL de ácido perclórico 0,1 N

mEq = miliequivalente da ceftazidima (54,658 mg)

m = massa de ceftazidima (mg)

### 3.3.6.4 Teste de recuperação

#### 3.3.6.4.1 Preparo das soluções

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

Para o ensaio de recuperação dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 250 mg de ceftazidima em 30 mL de ácido acético glacial em erlenmeyers de 250 mL denominados: A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 12,5 mg/mL, nos erlenmeyers R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente. Para o preparo da solução padrão foram pesados analiticamente 250,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferida para erlenmeyer de 250 mL, dissolvendo-se em 30 mL de ácido acético glacial. Adicionou-se 2 gotas de violeta cristal SI e titulou-se com solução de HClO<sub>4</sub> 0,1 M até viragem do violeta ao verde azulado. Repetiu-se a operação sem a amostra e a substância de referência; calculou-se a quantidade de HClO<sub>4</sub> gasta, sendo que 1 mL de HClO<sub>4</sub> 0,1 M corresponde a 54,658 mg de ceftazidima (medida como C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>).

#### 3.3.6.4.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 18:**

$$R\% = [Cf - Cu] / Ca \cdot 100$$

Na qual:

Cf = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

Cu = quantidade da amostra

Ca = quantidade da substância de referência adicionada

### 3.3.7 Iodometria

#### 3.3.7.1 Preparo das soluções

As soluções empregadas no ensaio iodométrico foram preparadas segundo Morita e Assumpção (1972), Farmacopéia Brasileira (1988) e Harris (2001).

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

*Amido SI*: para o preparo do indicador amido pesou-se 5,00 g de amido solúvel e acrescentou-se 10 mL de água destilada, fazendo uma pasta. Transferiu-se essa pasta para um béquer contendo 500,0 mL de água destilada quente e ferveu-se em bico de Bunsen até a solução tornar-se clara. Utilizou-se somente o sobrenadante como indicador.

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

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

*Iodo 0,02 N*: foram dissolvidos cerca de 28 g de iodo em solução de 72 g de iodeto de potássio em 100 mL de água; juntou-se 3 gotas de ácido clorídrico R, completou-se o volume com água a 1000 mL. Padronização: pesou-se exatamente cerca de 150 mg de trióxido de arsênio e dissolveu-se em 20 mL de NaOH 1 M aquecendo, se necessário. Diluiu-se com 40 mL de água, juntou-se 2 gotas de alaranjado de metila SI (solução indicadora) e a seguir com ácido clorídrico diluído SR até viragem do amarelo para rosa. Juntou-se 2 g de bicarbonato de sódio, diluiu-se com 50 mL de água e juntou-se 3 mL de amido SI. Titulou-se com solução de iodo 0,2 M até cor azul. Cada 4,946 mg de trióxido de arsênio equivale a 1 mL de iodo 0,2 N. Um alíquota de 100,0 mL desta solução de iodo 0,2 N foi tomada e diluída em água para 1000 mL em balão volumétrico, obtendo-se a solução de concentração 0,02 N.

---

*NaOH 1 M*: dissolveram-se 40 g de hidróxido de sódio em água destilada isenta de dióxido de carbono e completou-se o volume para 1000 mL em balão volumétrico com o mesmo solvente.

*Tampão acetato*: dissolveu-se 5,44 g de acetato de sódio R em cerca de 20 mL de água destilada; acrescentou-se 2,40 mL de ácido clorídrico R e completou-se o volume com água destilada para 100 mL em balão volumétrico.

*Tiosulfato de sódio 0,02 N*: dissolveram-se cerca de 50 g de tiosulfato de sódio e 400 mg de carbonato de sódio em 1000 mL de água isenta de dióxido de carbono e padronizou-se como segue: utilizou-se uma alíquota de 25,0 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,2 N e titulou-se com a solução padronizada de iodo 0,2 N, usando amido SI como indicador. Uma alíquota de 100 mL da solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,2 N foi diluída para 1000 mL com água em balão volumétrico, obtendo-se a solução de concentração 0,02 N.

### 3.3.7.2 Determinação de ceftazidima no medicamento

Dissolveu-se exatamente uma quantidade de pó para solução injetável equivalente a 100 mg de ceftazidima em água destilada e completou-se o volume em balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se solução de concentração 1000 µg/mL. Transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL desta solução para frasco de rolha esmerilhada, adicionou-se 5 mL de NaOH 1 N e deixou-se em repouso durante 20 minutos. Adicionou-se então 20 mL de solução tampão acetato, 5 mL de HCl 1 N e 25,0 mL de iodo 0,02 N. Fechou-se o frasco e deixou-se em repouso durante 20 minutos, protegido da luz. Titulou-se o excesso de iodo com solução de tiosulfato de sódio 0,02 N, usando amido SI como indicador, adicionado quando a titulação chegou próxima do fim. A outra alíquota de 10,0 mL da solução de amostra adicionou-se 20 mL de solução tampão acetato e 25,0 mL de iodo 0,02 N, deixou-se em repouso durante 20 minutos e titulou-se com tiosulfato de sódio 0,02 N, usando amido SI como indicador quando a titulação chegou próxima do fim. A diferença entre as titulações representa o volume de iodo 0,02 N equivalente à ceftazidima total presente, sendo que 1 mL de iodo 0,02 N corresponde a 2,7329 mg de ceftazidima (medida como  $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$ ).



### 3.3.7.3 Cálculos

O percentual de ceftazidima foi calculado através da equação 19:

**Equação 19:**

$$A (\%) = [v \times mEq \times 100] / m$$

Na qual:

v = mL de iodo 0,02 N

mEq = miliequivalente da ceftazidima (2,7329 mg)

m = massa de ceftazidima (mg)

### 3.3.7.4 Teste de recuperação

#### 3.3.7.4.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 500,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 5000 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração 1000,0 µg/mL, preparada pela dissolução de 127,2 mg de pó (equivalente a 100 mg de ceftazidima) em 100 mL de água destilada.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 10,0 mL da solução amostra para frascos de rolha esmerilhada de 125 mL denominados: A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 1,0; 2,0 e 4,0 mL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 5000,0 µg/mL, nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente.

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

Adicionou-se então 20 mL de solução tampão acetato, 5 mL de HCl 1 M e 25,0 mL de iodo 0,02 N. Fechou-se o frasco e deixou-se em repouso durante 20 minutos, protegido da luz. Titulou-se o excesso de iodo com solução de tiosulfato de sódio 0,02 N, usando amido SI como indicador, adicionado quando a titulação chegou próxima do fim. A outra alíquota de 10,0 mL da solução de amostra adicionou-se 20 mL de solução tampão acetato e 25,0 mL de iodo 0,02 N, deixou-se em repouso durante 20 minutos e titulou-se com tiosulfato de sódio 0,02 N, usando amido SI como indicador quando a solução chegou próxima do fim. A diferença entre as titulações representa o volume de iodo 0,02 N equivalente à ceftazidima total presente, sendo que 1 mL de iodo 0,02 N corresponde a 2,7329 mg de ceftazidima (medida como  $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$ ).

#### 3.3.7.4.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 20:**

$$R\% = [Cf - Cu] / Ca \cdot 100$$

Na qual:

Cf = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

Cu = quantidade da amostra

Ca = quantidade da substância de referência adicionada

### 3.3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Waters 1525 Binary HPLC Tump com detecção UV/Vis (Milford, MA) e empregou-se coluna C18 Wat 054275 (Milford, MA) de dimensões 150 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$  e pré-coluna Waters).

Foram utilizados ceftazidima substância de referência e pó para solução injetável descritos nos itens 3.1.1 e 3.1.2 Todos os solventes utilizados foram de grau analítico. A padronização do sistema cromatográfico, equipamento e as condições de trabalho estão apresentadas na Tabela 3.

A fase móvel foi filtrada por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, e desgaseificada durante 15 minutos. Após a estabilização do sistema foram injetados volumes pré-fixados de 20,0  $\mu\text{L}$  da solução previamente filtrada em membrana.

**Tabela 3.** Condições cromatográficas utilizadas na adequação de método por CLAE.

Características	Descrição
Fase móvel	metanol : água (70:30)
Coluna	Waters C18 (WAT 054275)
Comprimento de onda	245 nm
Fluxo	1,0 mL/min
Sensibilidade de detecção	0,5 AUFS
Volume de injeção	20,0 $\mu\text{L}$
Temperatura	20° $\pm$ 1°C

### **3.3.8.1 Obtenção da curva analítica**

A fase móvel foi preparada pela mistura de 70 partes de metanol (grau CLAE) e 30 partes de água purificada por osmose reversa e filtrada em membrana de 0,45 µm de tamanho de poro e 47 mm de diâmetro.

Para a realização da curva de calibração foram pesados analiticamente 50,0 mg de ceftazidima substância de referência previamente dessecada e transferidos para balão volumétrico de 50 mL completando o volume com a fase móvel utilizada para a obtenção de solução com concentração teórica definida de 1 mg/mL. Desta solução foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, sendo o volume completado com a fase móvel, para a obtenção de soluções de 50,0 a 300,0 µg/mL de ceftazidima substância de referência.

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

### **3.3.8.2 Determinação de ceftazidima no medicamento**

#### **3.3.8.2.1 Preparo da solução de ceftazidima substância de referência**

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

#### **3.3.8.2.2 Preparo da solução de ceftazidima amostra**

Uma quantidade de pó equivalente a três pesos médios do pó para solução injetável foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado com água destilada para obtenção da solução de concentração teórica de 3000,0

$\mu\text{g/mL}$ . Uma alíquota de 50,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 150 mL, completando o volume com a fase móvel, obtendo-se solução de concentração de 1000,0  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir desta solução filtrada foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentração final de ceftazidima de 200,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.3.8.3 Cálculos

A concentração da solução amostra foi obtida pela equação 21:

**Equação 21:**

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

Na qual:

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

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

$A_A$  = área da amostra

$A_{SR}$  = área da substância de referência

O teor percentual de ceftazidima na amostra foi calculado pela equação 22:

**Equação 22:**

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

Na qual:

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

$C_t$  = concentração de ceftazidima teórica na amostra (mg)

### 3.3.8.4 Teste de recuperação

#### 3.3.8.4.1 Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados 100,0 mg de ceftazidima substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de ceftazidima substância de referência com concentração de 1000 µg/mL. A solução amostra foi preparada com concentração 1000,0 µg/mL, preparada pela dissolução de 127,2 mg de pó (equivalente a 100 mg de ceftazidima) em 100 mL de água destilada. Após, as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm de tamanho de poro.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 2,0 mL da solução amostra para balões volumétricos de 10 mL denominados: A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 100,0; 200,0 e 400,0 µL da solução de ceftazidima substância de referência em concentração de 1000,0 µg/mL, nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente, e os volumes completados com a fase móvel.

#### 3.3.8.4.2 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990):

**Equação 23:**

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

Na qual:

C<sub>f</sub> = quantidade da substância de referência + quantidade da amostra

C<sub>u</sub> = quantidade da amostra

C<sub>a</sub> = quantidade da substância de referência adicionada

### **3.4 Estabilidade**

Este estudo foi realizado com a finalidade de avaliar a possível interferência de fatores externos, como luz, radiação e temperatura no sentido de alterar quantitativamente a ceftazidima presente na forma farmacêutica pó para solução injetável. Adicionalmente, foi avaliada a estabilidade da ceftazidima em solução aquosa (1000 µg/mL) frente aos diferentes fatores externos mencionados na literatura.

#### **3.4.1 Avaliação do fator luz**

##### **3.4.1.1 Escolha da fonte de radiação**

A revisão bibliográfica indica que a ceftazidima é passível de sofrer alteração por radiação luminosa (INAGAKI et al., 1992; STROM; FOX; WARD, 1992). Baseado nessa literatura, utilizou-se como fonte de irradiação, lâmpada de luz negra de filamento de mercúrio, que emite radiação na região de 320-400 nm.

##### **3.4.1.2 Exposição da amostra à luz**

Três amostras, na embalagem original (frasco de vidro incolor) e três frascos contendo a solução aquosa (1000 µg/mL) foram colocadas sobre um suporte, de tal modo que todas as amostras mantinham uma distância constante e igual a 4 cm da fonte luminosa.

Como controle, foi colocado um frasco ampola de pó para solução injetável de ceftazidima e um frasco contendo solução aquosa (1000 µg/mL) envoltos em papel alumínio, também a 4 cm da fonte de radiação. A avaliação da temperatura no interior da câmara foi avaliada com termômetro.

### **3.4.1.3 Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas nos tempos de exposição de 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias, correspondendo a 24, 48, 168, 336, 504 e 672 horas, respectivamente, para ceftazidima pó para solução injetável. As soluções aquosas (1000 µg/mL) foram coletadas após 6, 12 e 24 horas de exposição.

### **3.4.1.4 Avaliação da fotoestabilidade**

As amostras expostas à luz, bem como as amostras controle, foram avaliadas quanto ao teor por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta e ensaio microbiológico, segundo metodologia estabelecida neste trabalho para determinação quantitativa de ceftazidima.

## **3.4.2 Avaliação do fator temperatura**

### **3.4.2.1 Exposição da amostra ao calor**

Dados da literatura indicam que a ceftazidima é estável à temperatura de 24°C, porém sofre inícios de degradação em solução aquosa a 37°C (MANDURU et al., 1996; ROGER; ARRUDA; HAVERSTICK, 1996). No entanto, não especifica a estabilidade da ceftazidima em preparações na forma sólida (pó para solução injetável). Para testar sua estabilidade térmica, nesta forma farmacêutica, foram colocados em estufa, mantida a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , três frascos da amostra, em embalagem de vidro incolor original, e três frascos contendo solução aquosa (1000 µg/mL) de ceftazidima.



### **3.4.2.2 Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas nos tempos de exposição de 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias, correspondendo a 24, 48, 168, 336, 504 e 672 horas, respectivamente. As soluções aquosas (1000 µg/mL) foram coletadas após 6, 12 e 24 horas de exposição.

### **3.4.2.3 Avaliação da estabilidade térmica**

As amostras expostas à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , foram avaliadas quanto ao teor por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta e ensaio microbiológico, segundo metodologia estabelecida neste trabalho para determinação quantitativa de ceftazidima. Amostra armazenada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi utilizada como controle.

## **3.4.3 Avaliação do fator radiação**

### **3.4.3.1 Escolha da fonte de radiação**

A revisão bibliográfica não traz informações sobre a estabilidade da ceftazidima frente à luz ultravioleta. Porém, de acordo com a literatura, sabe-se que a luz ultravioleta é mais deletérica que a luz visível (FERREIRA, 2002). Assim, utilizou-se como fonte de irradiação, lâmpada Light Express LE UV (Glenside, PA), que emite radiação em 254 nm.

### **3.4.3.2 Exposição da amostra à radiação**

Três amostras, na embalagem original (frasco de vidro incolor) e três frascos contendo solução aquosa (1000 µg/mL) de ceftazidima foram colocados sobre um suporte, de tal modo que todas as amostras foram mantidas a uma distância constante e igual a 4 cm da fonte de irradiação.

Como controle, foi colocado um frasco ampola de pó para solução injetável e um frasco de solução aquosa (1000 µg/mL) de ceftazidima envoltos em papel alumínio, também a 4 cm da fonte de radiação. A avaliação da temperatura no interior da câmara foi avaliada com termômetro.

#### **3.4.3.3 Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas nos tempos de exposição de 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias, correspondendo a 24, 48, 168, 336, 504 e 672 horas, respectivamente. As soluções aquosas (1000 µg/mL) foram coletadas após 6, 12 e 24 horas de exposição.

#### **3.4.3.4 Avaliação da estabilidade frente à radiação**

As amostras expostas à luz UV, bem como a amostra controle, foram avaliadas quanto ao teor por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta e ensaio microbiológico, segundo metodologia estabelecida neste trabalho para determinação quantitativa de ceftazidima.

### **3.4.4 Preparo das amostras para a quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta**

#### **3.4.4.1 Amostras sólidas (pó para solução injetável)**

Pesou-se o equivalente a 50 mg de ceftazidima de cada uma das amostras expostas à luz, temperatura e radiação ultravioleta e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com água. Destas soluções a 5000 µg/mL, foi transferida alíquota de 1000 µL para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, obtendo-se concentração de 500 µg/mL. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 200 µL desta solução para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, obtendo-se a

solução de concentração teórica de 10 µg/mL (solução de trabalho). As soluções foram analisadas a 255,5 nm utilizando água como branco.

#### **3.4.4.2 Amostras líquidas (solução aquosa 1000 µg/mL)**

Das soluções de ceftazidima pó para solução injetável preparadas a 1000 µg/mL em água e expostas à luz, temperatura e radiação ultravioleta, foram transferidas alíquotas de 100 µL para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, obtendo-se a solução de concentração 10 µg/mL (solução de trabalho). As soluções foram analisadas a 255,5 nm utilizando água como branco.

### **3.4.5 Preparo das amostras para a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência**

#### **3.4.5.1 Amostras sólidas (pó para solução injetável)**

Pesou-se o equivalente a 50 mg de ceftazidima de cada uma das amostras expostas à luz, temperatura e radiação ultravioleta e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com água. Destas soluções a 5000 µg/mL, foi transferida um alíquota de 400 µL para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a fase móvel (metanol: água, 70:30, v/v) obtendo-se concentração de 200 µg/mL (solução de trabalho). Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana de tamanho de poro 0,45 µm e volumes de 20 µL foram injetados.

#### **3.4.5.2 Amostras líquidas (solução aquosa 1000 µg/mL)**

Das soluções de ceftazidima pó para solução injetável preparadas a 1000 µg/mL em água e expostas à luz, temperatura e radiação ultravioleta, foram transferidas alíquotas de

2000 µL para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com a fase móvel (metanol: água, 70:30, v/v), obtendo-se solução de concentração 200 µg/mL (solução de trabalho). Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana de tamanho de poro 0,45 µm e volumes de 20 µL foram injetados.

### **3.4.6 Preparo das amostras para a quantificação por ensaio microbiológico**

#### **3.4.6.1 Amostras sólidas (pó para solução injetável)**

Pesou-se o equivalente a 50 mg de ceftazidima de cada uma das amostras expostas à luz, temperatura e radiação ultravioleta e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com água. Destas soluções a 5000 µg/mL, foi transferida alíquota de 2000 µL para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com água estéril, obtendo-se concentração de 1000 µg/mL. Em seguida, alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 mL destas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes completados com tampão fosfato pH 6,0, obtendo-se concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL (soluções de trabalho).

#### **3.4.6.2 Amostras líquidas (solução aquosa 1000 µg/mL)**

Das soluções de ceftazidima pó para solução injetável preparadas a 1000 µg/mL em água e expostas à luz, temperatura e radiação ultravioleta, alíquotas de 1,0; 2,0 e 4,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes completados com tampão fosfato pH 6,0, obtendo-se concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL (soluções de trabalho).

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4.1 Análise qualitativa

### 4.1.1 Características físicas

A ceftazidima apresentou-se sob a forma de pó branco inodoro. A descrição é condizente com a citada pelo fabricante e com órgãos oficiais, como a Farmacopéia Portuguesa (2002), British Pharmacopoeia (2005) e USP 29 (2006).

### 4.1.2 Solubilidade

A expressão *partes* refere-se à dissolução de 1,0 g de um sólido ou 1,0 mL de um líquido no número de mililitros de solvente estabelecido no número de *partes* (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988). O significado do termo descritivo utilizado está apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade para determinações feitas à temperatura de 25°C (FARMACOPÉIA Brasileira 1988).

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

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos no teste de solubilidade para a ceftazidima em diferentes solventes.

**Tabela 5.** Solubilidade da ceftazidima substância de referência em diferentes solventes a 25°C.

<b>Solventes</b>	<b>Termo descritivo</b>
Acetato de etila	muito pouco solúvel
Acetona	muito pouco solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	pouco solúvel
Água	levemente solúvel
Clorofórmio	muito pouco solúvel
Diclorometano	muito pouco solúvel
Etanol absoluto	muito pouco solúvel
Etanol 96%	muito pouco solúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	facilmente solúvel
Isopropanol	muito pouco solúvel
Metanol	levemente solúvel
1-propanol	muito pouco solúvel
Toluol	muito pouco solúvel

#### 4.1.3 Determinação da faixa de fusão

A taxa de aquecimento utilizada foi de 1°C por minuto a partir de 10°C antes do valor esperado para a faixa de fusão prosseguindo até 10°C após este valor. Foram realizadas três determinações para a substância química de referência (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valores de faixa de fusão obtidos para ceftazidima substância de referência.

Ensaio	Faixa de fusão (°C)*
1	265 - 268
2	269 - 273
3	273 - 276
média	269 - 272

\* O produto apresentou decomposição.

O pó apresentou faixa de fusão em cerca de 270°C, com decomposição, evidenciada pela alteração de cor do composto e formação de bolhas. A mudança de cor apresentada pelo pó teve início em cerca de 160°C, aumentando progressivamente de intensidade até completa decomposição e fusão (branco-amarelo-marrom). Esses resultados foram confirmados pela análise térmica.

Na literatura consultada não foi encontrada faixa de fusão especificada para a ceftazidima.

A faixa de fusão pode ser empregada na caracterização de um composto, sendo ainda um importante indicativo de pureza, quando comparado com padrões de referência, pois uma pequena quantidade de impureza pode causar abaixamento do ponto de fusão ou alargar a faixa de fusão de um determinado composto (GRAHAM, 1995).

#### 4.1.4 Determinação de umidade

O teor de água foi estudado pelo método gravimétrico (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988). Tal método consiste em secar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada de 105 a 150°C, durante várias horas, para fármacos termoestáveis; 20°C a princípio e 105°C durante 30 minutos ou uma hora, para fármacos termolábeis; temperatura baixa e pressão reduzida, em estufa a vácuo, para fármacos voláteis (KOROLKOVAS, 1988).



Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), a expressão *dessecação até peso constante* significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após uma hora de secagem adicional nas condições específicas.

As determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela British Pharmacopoeia (2005), Farmacopéia Portuguesa (2002), USP 29 (2006) e pela Farmacopéia Brasileira (1988) para dessecação de substâncias antibióticas (Método 1), estando os resultados apresentados a seguir na Tabela 7.

**Tabela 7.** Teor de umidade da ceftazidima substância de referência determinado pelo método gravimétrico.

Ensaio	Umidade (%)
1	13,9
2	13,4
3	13,7
média	13,67 ± 0,25

É importante ressaltar que as substâncias ativas foram armazenadas em frascos muito bem fechados, em dessecador com sílica-gel, a fim de evitar a absorção de água pelo fármaco.

Os resultados obtidos encontram-se em conformidade com os dados da literatura, que estabelecem a faixa de 13,0% a 15,0% para perda por dessecação (British Pharmacopoeia, 2005; Farmacopéia Portuguesa, 2002; USP 29, 2006). A determinação de água é de extrema importância, uma vez que a análise de fármacos deve ser realizada com amostras secas devido ao teor de umidade acima do especificado demonstrar deterioração ou má conservação das matérias-primas ou a prováveis erros de cálculo de teor ou potência.

#### 4.1.5 Resíduo pela incineração

O resíduo pela incineração compreende o resíduo não volátil à incineração. Em geral o ensaio visa a determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidas em substâncias orgânicas. Também se destina à determinação de componentes inorgânicos em misturas e da quantidade de impurezas contidas em substâncias inorgânicas termolábeis (KOROLKOVAS, 1988).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), a expressão *incineração até peso constante* significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após 15 minutos de incineração adicional nas condições específicas ( $800 \pm 25^\circ\text{C}$ ), a menos que a monografia especifique as condições.

As determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopéia Brasileira (1988) e os resultados são apresentados a seguir na Tabela 8.

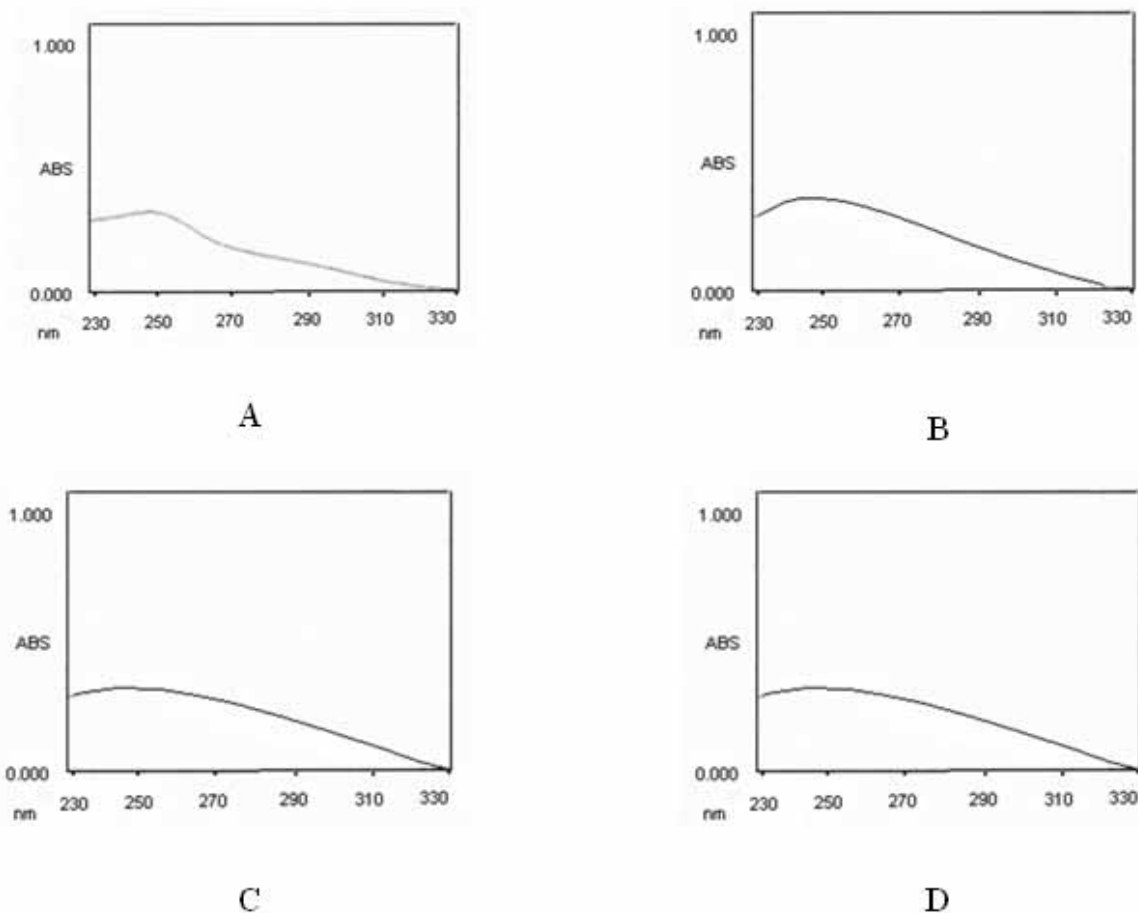
**Tabela 8.** Resíduo por incineração obtido para ceftazidima substância de referência determinado pelo método gravimétrico.

Ensaio	Resíduo (%)
1	0,064
2	0,069
3	0,077
média	$0,070 \pm 0,006$

A literatura não fornece o valor máximo permitido de resíduo por incineração da ceftazidima; porém, de acordo com o resultado obtido ( $0,070 \pm 0,006$  %) verificou-se que encontra-se abaixo de 0,1 %, valor considerado para muitos fármacos de natureza orgânica em suas respectivas monografias farmacopéicas.

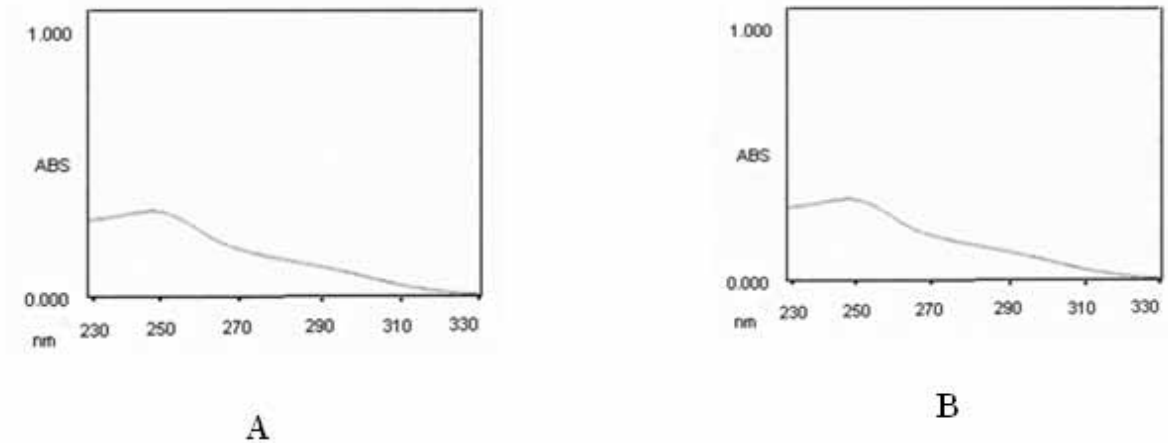
#### 4.1.6 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Após a obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta para ceftazidima substância de referência em vários solventes, optou-se por trabalhar com as soluções aquosas devido à obtenção dos melhores espectros e ao fato de não utilizar solventes voláteis. Os espectros obtidos utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M como solvente indicam início de degradação hidrolítica do fármaco, conforme Martinez, Falcó e Cabeza (2002), não sendo adequados para este tipo de determinação qualitativa. Os espectros obtidos com diferentes solventes utilizando ceftazidima substância de referência estão representados na Figura 4.



**Figura 4.** Espectro na região do ultravioleta de ceftazidima substância de referência a 10  $\mu\text{g/mL}$  em água (A), metanol (B), HCl 0,1 M (C) e NaOH 0,1 M (D).

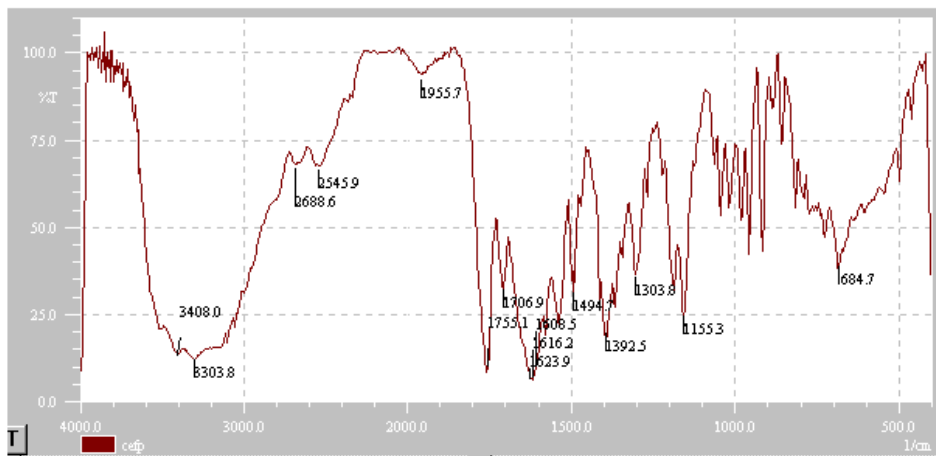
O fármaco em estudo apresentou correspondência com o espectro da substância de referência em água, indicando a identificação positiva, conforme Figura 5.



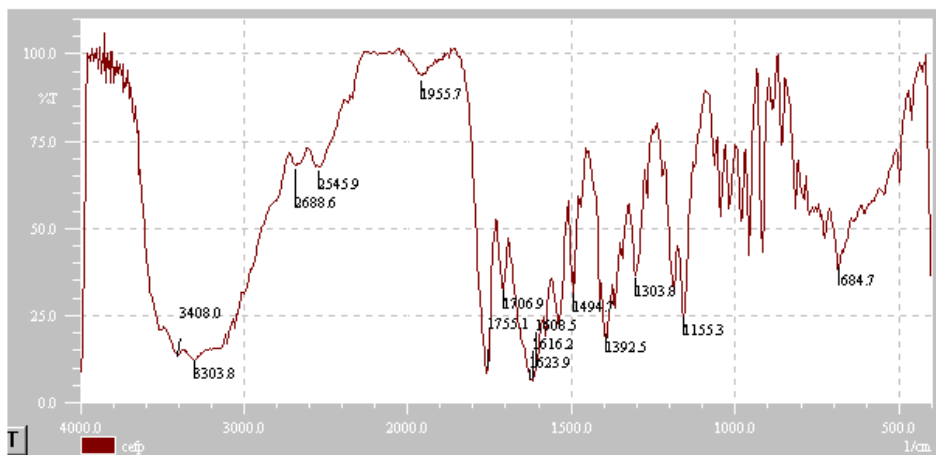
**Figura 5.** Espectro de absorção na região do ultravioleta de ceftazidima substância de referência (A) e pó para solução injetável (B) a 10  $\mu\text{g/mL}$  em água destilada.

#### 4.1.7 Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho

Os espectros obtidos com ceftazidima substância de referência e ceftazidima pó para solução injetável, utilizando-se pastilhas de 250 mg de brometo de potássio estão representados pelas Figuras 6 e 7.



**Figura 6.** Espectro na região de infravermelho de ceftazidima substância de referência em pastilhas de KBr.



**Figura 7.** Espectro na região de infravermelho de ceftazidima pó para solução injetável em pastilhas de KBr.

Através das análises efetuadas em ceftazidima substância de referência e amostra (Figuras 6 e 7) foram obtidos os espectros, que apresentam as mesmas bandas de absorção, foram comparados e analisados com dados apresentados na literatura (SILVERSTEIN et al., 1996).

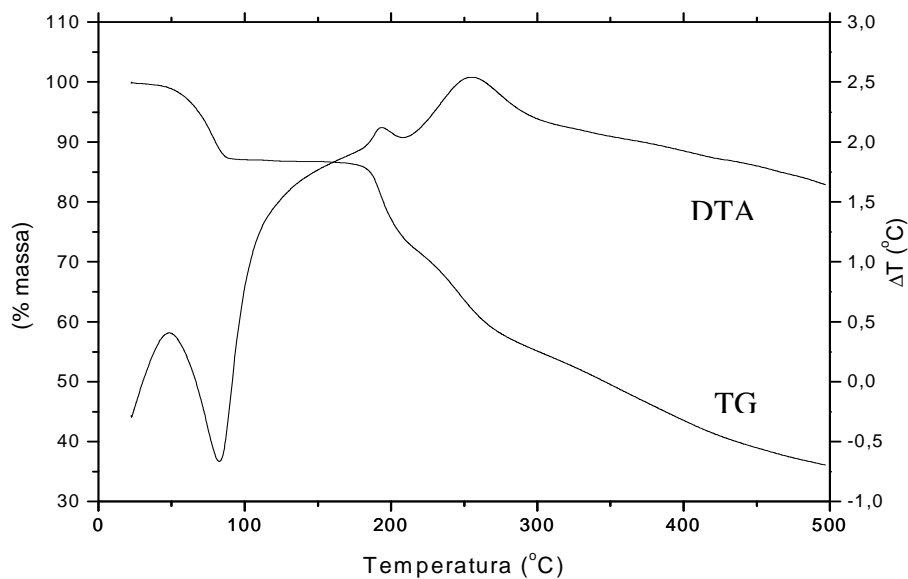
O espectro de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentou bandas de absorção características de compostos cefalosporínicos, tais como: as bandas em  $3600-3250\text{ cm}^{-1}$  devido à deformação axial dos grupamentos N-H, bem como as absorções em  $1750-1725\text{ cm}^{-1}$  que se atribuem ao estiramento do grupo carbonila C=O da função carboxila, as quatro bandas características em  $1475-1600\text{ cm}^{-1}$  com deformação axial do C=C do anel aromático, bandas entre  $1000-1350\text{ cm}^{-1}$  devido à deformação axial de C-N e a banda em  $1680-1630\text{ cm}^{-1}$  devido à deformação axial do C=O de grupamento amida.

#### 4.1.8 Análise térmica

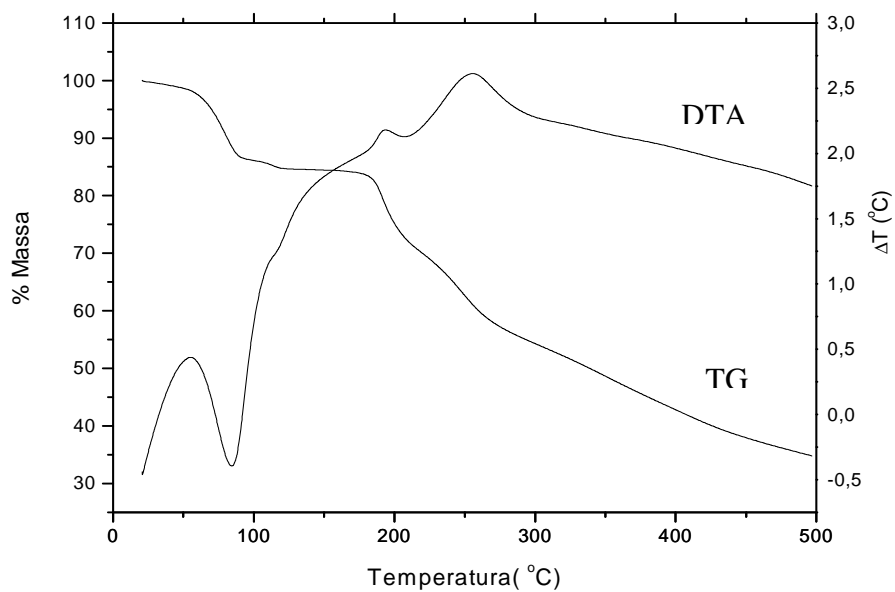
O objetivo deste estudo foi determinar a estabilidade de ceftazidima frente à temperatura bem como sua pureza e ponto ou faixa de fusão. Através da análise termogravimétrica (TG), mede-se a variação da massa de uma substância em função da temperatura ou tempo, sob um controle de temperatura programada. Na análise térmica diferencial (DTA) mede-se a diferença de temperatura entre a substância analisada e o material de referência, quando ambos são submetidos a controle de temperatura programado (HATAKEYAMA; QUINN, 1994; CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999). Na calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede-se, ao invés da diferença de temperatura, a diferença de energia que é fornecida à substância em análise em comparação a um padrão inerte.

A Figura 8 apresenta a curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de ceftazidima sob atmosfera dinâmica de ar.

A Figura 9 apresenta a curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de ceftazidima sob atmosfera de nitrogênio.

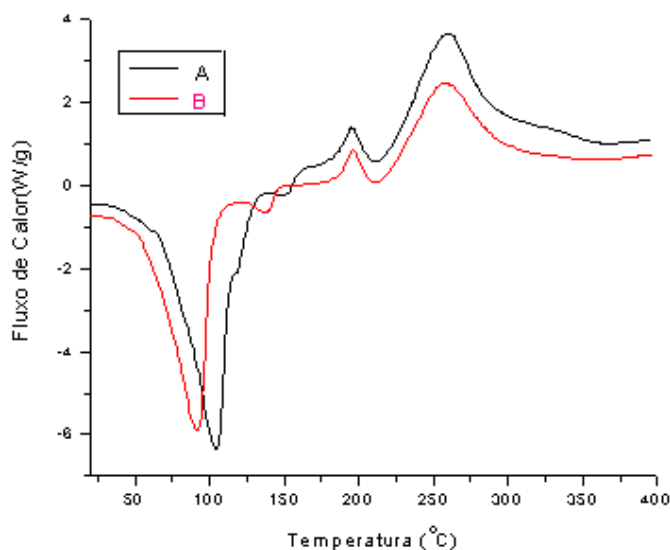


**Figura 8.** Curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de ceftazidima substância de referência sob atmosfera dinâmica de ar.



**Figura 9.** Curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de ceftazidima substância de referência sob atmosfera de nitrogênio.

O presente teste teve como objetivo o estudo de análise térmica de ceftazidima substância de referência através da termogravimetria e análise térmica diferencial em atmosfera de nitrogênio e ar sintético. A curva de DSC para a ceftazidima substância de referência (A) e para ceftazidima pó para solução injetável (B) estão representadas na Figura 10.



**Figura 10.** Curva de análise térmica diferencial (DSC) da ceftazidima substância de referência (A) e ceftazidima pó para solução injetável (B).

As curvas DTA e TG não apresentaram diferenças de comportamento nas condições utilizadas de atmosfera de ar ou nitrogênio.

Nas curvas DTA foram observados picos endotérmicos em torno de 100°C, correspondentes à perda de água (desidratação), dado confirmado pelo pico endotérmico nas curvas de DSC obtidas para ceftazidima substância de referência e pó para solução injetável. Esse resultado confirma a presença de água na substância, conforme especificação farmacopéica de perda por dessecação, citada em 4.1.4.

As curvas DTA apresentam ainda dois picos endotérmicos (198 e 270°C), atribuídos à decomposição do composto. Através das curvas TG, verifica-se perda de massa total em duas etapas, entre as temperaturas de 90°C e 198°C, sendo mais intensa e progressiva a partir de 198°C.



As curvas de DSC obtida para ceftazidima substância de referência e pó para solução injetável apresentaram um pico exotérmico referente à desidratação e dois picos endotérmicos em 198°C e 270°C. A decomposição foi verificada pela leve mudança de coloração a partir de 163°C (branco-amarelo) e posteriormente, formação de bolhas e fusão a aproximadamente 270°C. Esses dados visuais foram obtidos na determinação da faixa de fusão (item 4.1.3) e confirmados pela análise térmica.

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

Assim, a análise térmica é, atualmente, uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento e análise de formulações farmacêuticas. Geralmente, a instabilidade de um produto ou incompatibilidade entre os componentes de uma formulação são caracterizados por processos exotérmicos (GIL, 2005).

#### **4.1.9 Reações de identificação**

##### **4.1.9.1 Caracterização de cefalosporinas**

Para a reação com íons ferro (III), observou-se o desenvolvimento de coloração vermelha devido à oxidação da cefalosporina pelos íons ferro (III), produzindo ferro (II), o qual reagiu com *o*-fenantrolina gerando o composto de cor avermelhada.

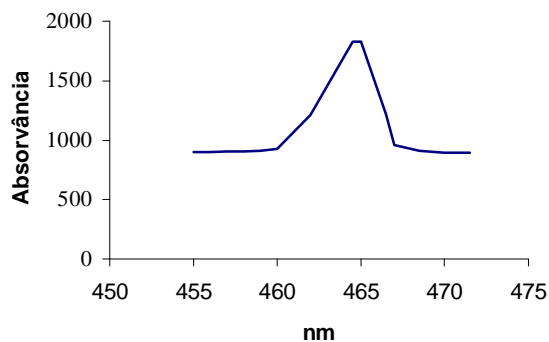
Para a reação com molibdato de amônio, verificou-se o desenvolvimento de intensa coloração azul, comprovando a identificação da cefalosporina.

Estes ensaios de identificação foram realizados também utilizando outras amostras de cefalosporinas, como cefalexina e cefuroxima, apresentando a mesma coloração azul desenvolvida para a ceftazidima, o que indica que essa reação identifica compostos cefalosporínicos, porém, não possui especificidade para uma ou outra.

#### 4.1.9.2 Caracterização de piridina

Verificou-se o desenvolvimento de coloração amarelo ouro, característica para identificação de piridina com anilina, assim como o desenvolvimento de coloração rósea, característica para identificação de piridina com ácido barbitúrico.

Com o objetivo de padronizar a metodologia de análise espectrofotométrica na região do visível para o composto colorido produzido (amarelo ouro), procurou-se realizar a varredura entre os comprimentos de onda de 450 a 475 nm. Foi possível verificar a existência de um pico de absorção máxima nesta faixa em 465 nm, possibilitando a determinação quantitativa do fármaco, conforme pode ser verificado na Figura 11.



**Figura 11.** Espectro da região visível de 450 a 475 nm da solução aquosa de ceftazidima substância de referência.

O principal inconveniente das reações envolvendo o bromocianogênio é a toxicidade do reagente, sendo necessário realizar todo o procedimento em capela de exaustão. No entanto, a adoção de Boas Práticas de Laboratório veio ao encontro da formação de profissionais qualificados e preocupados com o meio ambiente. Desta forma, o desenvolvimento de métodos de análise, que atendam os princípios de Boas Práticas de Laboratório, permite o estabelecimento de parâmetros que possibilitam avaliar todos os produtos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como produtos já comercializados. O ensaio foi realizado para outras cefalosporinas, entre elas a cefalexina e a cefoxitina sódica, também degradadas conforme procedimento mencionado para a ceftazidima. As amostras de cefalexina e cefoxitina sódica não apresentaram desenvolvimento de coloração com os

reagentes bromocianogênio, anilina e ácido barbitúrico devido a não possuírem em suas estruturas a molécula de piridina. Além disso, as soluções aquosas de cefoxitina sódica são amareladas, permitindo a sua identificação dentre as demais analisadas no presente teste.

Desta forma, os ensaios realizados permitiram a rápida caracterização de algumas cefalosporinas amplamente comercializadas no mercado brasileiro, mostrando-se reprodutíveis para identificá-las e distingui-las, podendo ser adotados em análises rotineiras de controle de qualidade.

#### **4.1.10 Cromatografia em camada delgada**

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra fase move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (WATSON, 1999).

Atualmente, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos de análise devido à sua facilidade em efetuar separações, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas. Além disso, possibilita a escolha de fases estacionárias diferentes e adequadas para cada tipo de molécula, apresenta tempo de desenvolvimento relativamente curto, promove a fácil recuperação dos componentes separados, e possui sensibilidade satisfatória, com separações extremamente nítidas e capazes de detectar quantidades muito menores que as manchas muito mais difusas obtidas na cromatografia em papel (BARNARD; CHAYEN, 1970). Foi observado somente o aparecimento da mancha principal comparada com a substância de referência, com valor de  $R_f$  0,462 quando examinadas à luz ultravioleta de 254 nm.

## 4.2 Análise quantitativa

### 4.2.1 Método de análise microbiológica

O objetivo deste estudo é realizar o desenvolvimento e a validação de ensaio de quantificação de ceftazidima matéria-prima e pó para solução injetável, utilizando método microbiológico de difusão em ágar, que relaciona o tamanho da zona de inibição com a concentração da substância ensaiada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Trata-se de um método físico, no qual um microrganismo é usado como revelador. O método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, através do qual a substância teste se difunde. É essencial que se trabalhe com réplicas, de forma a compensar os desvios, inerentes ao ensaio ou acidentais (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Na determinação dos parâmetros para a padronização do ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placa para ceftazidima (Tabela 2), optou-se por trabalhar com *S. epidermidis* ATCC 12228, pois o crescimento do microrganismo foi bastante homogêneo e os halos de inibição formados apresentaram-se bem definidos, além da menor patogenicidade em relação ao *S. aureus* ATCC 6538. A velocidade de crescimento do microrganismo não foi afetada diretamente pela composição do meio, pois, nos três meios testados, observou-se crescimento homogêneo. Foi selecionado o meio nº 1 de Grove-Randall para a camada de superfície e o meio nº 2 de Grove-Randall para a camada base. A concentração do inóculo empregada deve ser suficiente para apresentar crescimento homogêneo do microrganismo, propiciando um contraste com a zona de inibição de crescimento, sem apresentar colônias isoladas. Os melhores resultados e o crescimento mais uniforme foram obtidos com o inóculo com concentração de 0,5 %.

Em soluções diluentes em diferentes pH, observou-se que em pH 6,0 os halos de inibição formados foram maiores e mais uniformes, sendo este pH compatível com o crescimento bacteriano e com a atividade do fármaco. As concentrações do fármaco utilizadas na curva de dosagem devem estar em progressão geométrica, uma vez que existe relação linear entre o logaritmo da concentração e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento. As concentrações de 100,0; 200,0 e 400,0 µg /mL apresentaram excelentes resultados,

avaliados através de análise estatística. Em relação à incubação, deve haver uma combinação entre tempo e temperatura para que o crescimento do microrganismo seja uniforme e os halos formados não estejam pequenos. Os melhores resultados foram com 21 horas de incubação com temperatura de  $35 \pm 2$  °C.

Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos para as soluções em diferentes concentrações de substância de referência e amostra de ceftazidima encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de ceftazidima pelo ensaio microbiológico através do método difusão em ágar – técnica cilindros em placas.

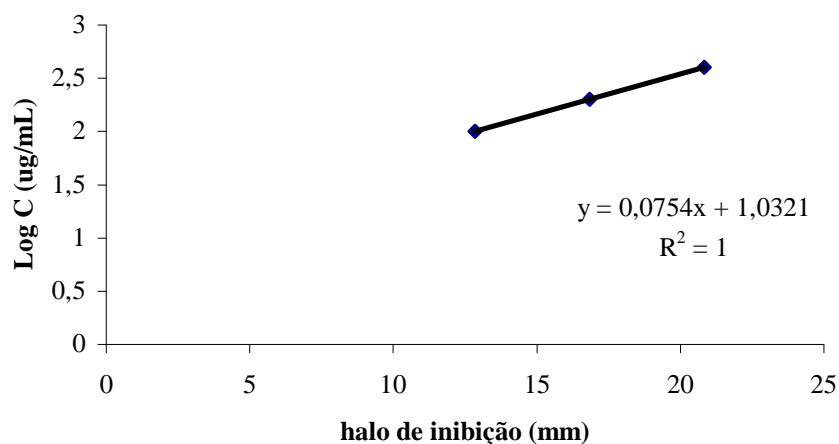
	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Diâmetros dos halos de inibição (mm)*</b>	<b>Diâmetro médio <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>P<sub>1</sub></b>	100,0	12,81	12,85 $\pm$ 0,04	0,311
		12,89		
		12,85		
<b>P<sub>2</sub></b>	200,0	16,86	16,83 $\pm$ 0,03	0,149
		16,83		
		16,81		
<b>P<sub>3</sub></b>	400,0	20,82	20,84 $\pm$ 0,03	0,121
		20,87		
		20,84		
<b>A<sub>1</sub></b>	100,0	12,69	12,71 $\pm$ 0,02	0,164
		12,73		
		12,70		
<b>A<sub>2</sub></b>	200,0	16,70	16,75 $\pm$ 0,05	0,273
		16,79		
		16,76		
<b>A<sub>3</sub></b>	400,0	20,60	20,64 $\pm$ 0,04	0,196
		20,68		
		20,68		

\*Cada valor é a média de seis determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

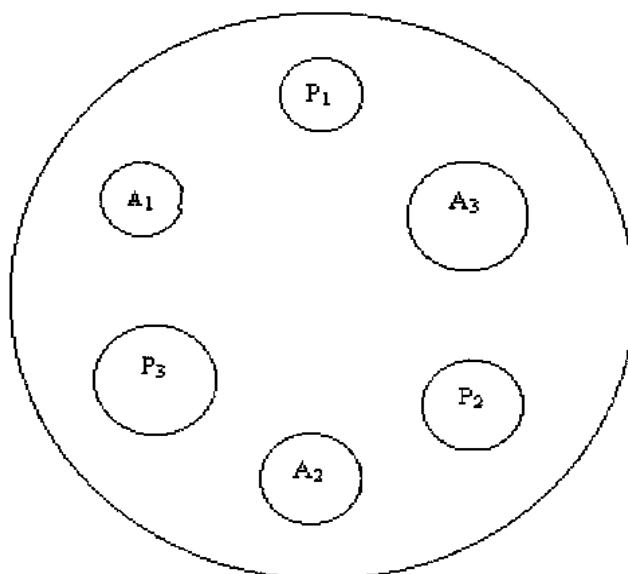
DPR (%) = desvio padrão relativo percentual

A curva analítica construída em decorrência dos valores da média do diâmetro das concentrações 100,0; 200,0 e 400,0  $\mu\text{g/mL}$  está representada pela Figura 12.



**Figura 12.** Representação gráfica da curva analítica de ceftazidima através do ensaio microbiológico – método da difusão em ágar – cilindros em placas.

Para a construção da curva analítica foram utilizados 3 pontos como preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988) para delineamento 3 x 3 e a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri são demonstradas pela Figura 13.



**Figura 13.** Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P<sub>1</sub> (100,0 µg/mL); P<sub>2</sub> (200,0 µg/mL); P<sub>3</sub> (400,0 µg/mL) e A<sub>1</sub> (100,0 µg/mL); A<sub>2</sub> (200,0 µg/mL); A<sub>3</sub>(400,0 µg/mL).

Os resultados obtidos na determinação de ceftazidima em pó para solução injetável, calculados pela fórmula de HEWITT (1977) apresentada na Equação 1 estão apresentados na Tabela 10.



**Tabela 10.** Valores experimentais obtidos para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável (1000 mg de ceftazidima) através do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placas.

Ensaio	Valor encontrado* (mg /ampola)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	974,80	97,48		
II	980,30	98,03		
III	975,00	97,50	97,67 ± 0,406	0,415
IV	977,00	97,70		
V	971,00	97,10		
VI	982,20	98,22		

$P < 0,05$

e.p.m. = erro padrão da média

DPR (%) = desvio padrão relativo percentual

\*Cada valor é a média de seis determinações.

Na análise estatística dos resultados, a equação da reta para representação gráfica da curva de calibração foi determinada através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva de calibração foram utilizados 3 pontos, cada um representando a média de três determinações. A validação do método foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988) para ensaio 3 x 3 utilizando cilindros e está representada na Tabela 11:

**Tabela 11.** Análise da variância dos dados obtidos do doseamento de ceftazidima pelo ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Preparação	1	0,191	0,191	608,546*	4,24
Regressão	1	380,807	380,807	1215340,425*	4,24
Desvio de paralelismo	1	0,004	0,004	13,617	4,24
Quadrático	1	0,003	0,003	10,213	4,24
Diferença de quadrático	1	0,014	0,014	44,326	4,24
Entre doses	5	381,019	76,204	243203,425*	2,6
Entre placas	5	0,001	0,000	0,681	2,6
Dentro (erro)	25	0,008	0,000	-	-
Total	35	381,03	-	-	-

\*Significativo para  $P < 0,05$

O teste de recuperação, realizado com a finalidade de verificar a exatidão do método proposto através da adição de concentrações conhecidas da substância de referência às soluções contendo a amostra. A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela AOAC (AOAC, 1990) e os resultados encontram-se representados na Tabela 12:

**Tabela 12.** Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de ceftazidima no doseamento microbiológico método de difusão em ágar – cilindros em placas.

	<b>Vol. Amostra adicionada (mL) (1000 µg/mL)</b>	<b>Vol. Solução padrão adicionada (mL) (500 µg/mL)</b>	<b>Concentração teórica de amostra + padrão em 10 mL (µg/mL)</b>
R <sub>1</sub>	1,0	0,1	105,0
	2,0	0,2	210,0
	4,0	0,4	420,0
R <sub>2</sub>	1,0	0,2	110,0
	2,0	0,4	220,0
	4,0	0,8	440,0
R <sub>3</sub>	1,0	0,4	120,0
	2,0	0,8	240,0
	4,0	1,6	480,0

Os resultados do método microbiológico para a determinação de ceftazidima em pó para solução injetável estão representados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Valores experimentais do teste de recuperação obtidos em amostras de ceftazidima pó para solução injetável, através do ensaio microbiológico, método de difusão em ágar – cilindros em placas.

	<b>Adicionada</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Encontrado</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Recuperação</b> (%)
Recuperação 1	5,0	4,94	98,80
Recuperação 2	10,0	9,73	97,30
Recuperação 3	20,0	19,74	98,70

O ensaio microbiológico de antibióticos consiste na determinação da potência ou atividade biológica destes agentes; a quantificação de antibióticos por métodos químicos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria mostram-se precisos, porém não fornecem verdadeira indicação sobre a atividade biológica (ADAMS et al., 1998). Além disso, os ensaios biológicos podem sofrer adequações para determinações específicas, como em preparações farmacêuticas, em que freqüentemente se recorre ao uso de soluções diluentes tamponadas, e são capazes de indicar a atividade biológica de produtos de degradação possivelmente originados (THOMPSON, 2000). Desta forma, os ensaios biológicos continuam sendo essenciais para o desenvolvimento e controle de qualidade de substâncias antimicrobianas.

Para assegurar a validade do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placas na determinação da potência de ceftazidima, foram utilizadas três concentrações diferentes para amostra, idênticas às da substância de referência, em delineamento 3x3 (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988). Estas doses estão em progressão geométrica, já que o sistema utilizado possui relação linear entre logaritmo da concentração da substância testada e os diâmetros dos halos de inibição. As diluições foram estipuladas de acordo com o tamanho dos halos produzidos, de forma a não se sobreporem e ficarem espaçados.

Através dos resultados obtidos foi construída a curva de calibração com soluções de 100,0; 200,0 e 400,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos apresentaram correlação linear entre as medidas dos halos de inibição e as concentrações, no intervalo utilizado, com coeficiente de

correlação igual a 1, o que indica a linearidade do método proposto. A equação da reta foi  $y = 5,7708 x - 13,732$ .

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência foram adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste de recuperação média de 98,27 %. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um requisito obrigatório dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi 0,42 % e o teor de ceftazidima determinado no pó para solução injetável foi calculado através da equação de Hewitt (1977) obtendo teor médio de 97,67 %, comprovando a proximidade dos resultados obtidos pelo método proposto com os valores aceitos como referência, que para produto acabado deve variar no máximo, 10 % em relação ao valor nominal, segundo referências farmacopéicas (BRITISH Pharmacopoeia, 2005; FARMACOPÉIA Brasileira, 1988; FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002; USP 29, 2006).

A análise estatística dos resultados de diâmetro dos halos obtidos foi matematicamente verificada pela análise da variância (ANOVA) e os resultados obtidos, com F significativo validam o método microbiológico para ceftazidima (RODRIGUES, 1986).

O método proposto consiste de uma técnica que permite indicar a potência do produto uma vez que apresenta sensibilidade, linearidade, exatidão e precisão adequadas, segundo conceitos sobre validação apresentados na Farmacopéia Brasileira (1988) e por Riley e Rosanske (1996).

## **6.2- Espectrofotometria na região do ultravioleta**

A espectrofotometria na região do ultravioleta é um importante recurso utilizado na quantificação de substâncias, uma vez que está relacionada com a estrutura eletrônica da molécula. Baseia-se no fato de a absorvidade de um composto químico ser constante dependendo da intensidade da radiação incidente, concentração e caminho óptico, embora

dependa de fatores como: estrutura molecular do composto, solvente, temperatura e comprimento da radiação (WATSON, 1999). É utilizada principalmente para a identificação de compostos químicos orgânicos incluindo fármacos, porém, é também largamente utilizada para o doseamento de fármacos (OHANNESIAN; STREETER, 2002).

A relação entre a concentração do analito e a intensidade de luz absorvida é a base das aplicações da espectrofotometria.

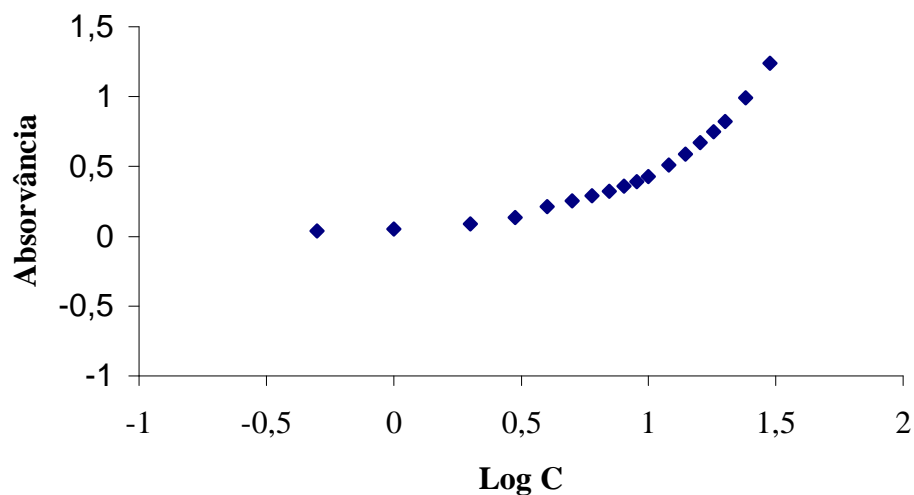
A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta obedece a linearidade. A Tabela 14 representa a preparação das soluções de ceftazidima substância de referência utilizadas na construção da curva.

**Tabela 14.** Obtenção da curva de Ringbom de ceftazidima através de espectrofotometria no ultravioleta a 255,5 nm.

Pontos	Vol. Sol. ceftazidima 50 µg/mL (mL)	Concentração final (µg/mL)	Absorvância *
1	0,1	0,5	0,039
2	0,2	1,0	0,053
3	0,4	2,0	0,088
4	0,6	3,0	0,135
5	0,8	4,0	0,213
6	1,0	5,0	0,255
7	1,2	6,0	0,289
8	1,4	7,0	0,325
9	1,6	8,0	0,360
10	1,8	9,0	0,399
11	2,0	10,0	0,440
12	2,4	12,0	0,515
13	2,8	14,0	0,589
14	3,2	16,0	0,673
15	3,6	18,0	0,751
16	4,0	20,0	0,822
17	4,8	24,0	0,992
18	6,0	30,0	1,239

\*Cada valor é a média de três determinações.

A curva de Ringbom foi obtida utilizando-se logaritmo das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) expresso como  $\text{Log C}$  versus absorvância e encontra-se representada pela Figura 14.



**Figura 14.** Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta para solução de ceftazidima substância de referência de 0,5 a 30,0  $\mu\text{g/mL}$ .

A Tabela 15 representa a preparação das soluções utilizadas para a obtenção da curva analítica de ceftazidima substância de referência.



**Tabela 15.** Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no ultravioleta a 255,5 nm.

Pontos	Vol. Sol. ceftazidima 50 µg/mL (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	1,4	8,6	7,0
2	1,6	8,4	8,0
3	1,8	8,2	9,0
4	2,0	8,0	10,0
5	2,4	7,6	12,0
6	2,8	7,2	14,0

Os resultados das leituras de absorvância obtidos para a curva analítica estão apresentados na Tabela 16.

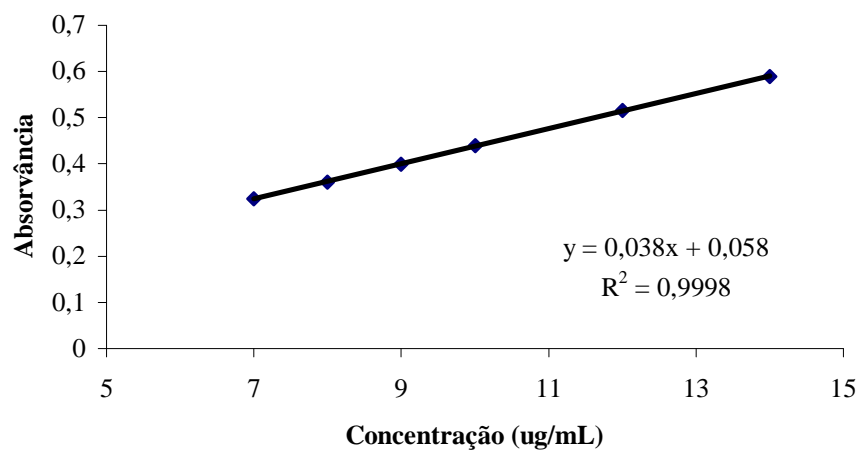
**Tabela 16.** Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância	Abs média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
	0,325		
7,0	0,324	$0,325 \pm 0,0006$	0,185
	0,325		
	0,361		
8,0	0,360	$0,360 \pm 0,0006$	0,167
	0,360		
	0,398		
9,0	0,398	$0,398 \pm 0,0006$	0,151
	0,399		
	0,441		
10,0	0,439	$0,440 \pm 0,0006$	0,136
	0,440		
	0,516		
12,0	0,515	$0,515 \pm 0,0006$	0,194
	0,513		
	0,589		
14,0	0,589	$0,589 \pm 0,0006$	0,102
	0,590		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR % = desvio padrão relativo percentual

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de ceftazidima em concentrações de 7,0 a 14,0 µg /mL através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm estão representados na Figura 15.



**Figura 15.** Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm.

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima nas amostras de pó para solução injetável pelo método proposto encontram-se representados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 255,5 nm.

Ensaio	Abs*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± epm	DPR (%)
I	0,436	994,74	99,47		
II	0,439	1002,6	100,26		
III	0,438	1000,0	100,0	99,82 ± 0,4295	0,4303
IV	0,439	1002,6	100,26		
V	0,435	992,10	99,21		
VI	0,437	997,37	99,73		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006). Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência são adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de ceftazidima substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

A Tabela 18 representa a preparação das soluções de ceftazidima substância de referência e amostra utilizadas na realização do teste de recuperação.

**Tabela 18.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm.

	<b>Vol. sol. amostra (100,0 µg/mL)</b>	<b>Vol. Sol. Referência (50,0 µg/mL)</b>	<b>Concentração final em 25 mL (µg/mL)</b>
A	3,0	-	12,0
R <sub>1</sub>	3,0	1,0	14,0
R <sub>2</sub>	3,0	2,0	16,0
R <sub>3</sub>	3,0	3,0	18,0

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 255,5 nm.

	<b>Adicionado (µg /mL)</b>	<b>Absorvância *</b>	<b>Encontrado (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	2,0	0,589	13,97	99,68
R <sub>2</sub>	4,0	0,665	15,97	99,75
R <sub>3</sub>	6,0	0,740	17,95	99,46

\*Cada valor é a média de três determinações.

O espectro de absorção mostrou pico de absorção máxima de 255,5 nm, utilizando solução aquosa de ceftazidima a 10,0 µg /mL. Com o objetivo de determinar a linearidade, foi realizada a curva de Ringbom. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 7,0 a 14,0 µg /mL, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9998. A equação da reta foi  $y = 0,038x + 0,058$ .

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 99,63 %. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,4303.

O teor médio de ceftazidima determinado no medicamento foi de 99,82 %, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência do excipiente presente no medicamento (carbonato de sódio).

O método de quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta foi validado através de análise estatística e fatores como sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade.

#### **4.2.3 Espectrofotometria na região do visível**

A partir do composto colorido produzido na determinação qualitativa, conforme relatado no item 4.1.9, foi desenvolvido método espectrofotométrico na região do visível para quantificação de ceftazidima, uma vez que esta cefalosporina é a única que possui uma molécula de piridina em sua estrutura (Figura 3).

A espectrofotometria na região do visível é um dos métodos mais utilizados no mundo em laboratórios químicos e clínicos. Em análise farmacêutica é amplamente usado para identificação e doseamento de fármacos e medicamentos. Todos os métodos espectrofotométricos são baseados na interação de uma substância química com energia

radiante e, na maioria dos casos, o efeito desta interação é a absorção de energia pela substância que está sendo analisada (WATSON, 1999; OHANNESIAN; STREETER, 2002).

#### **4.2.3.1 Metodologia empregando bromocianogênio e anilina**

A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do visível obedece à linearidade. A Tabela 20 representa a preparação das soluções de ceftazidima substância de referência utilizadas na obtenção da curva de Ringbom.

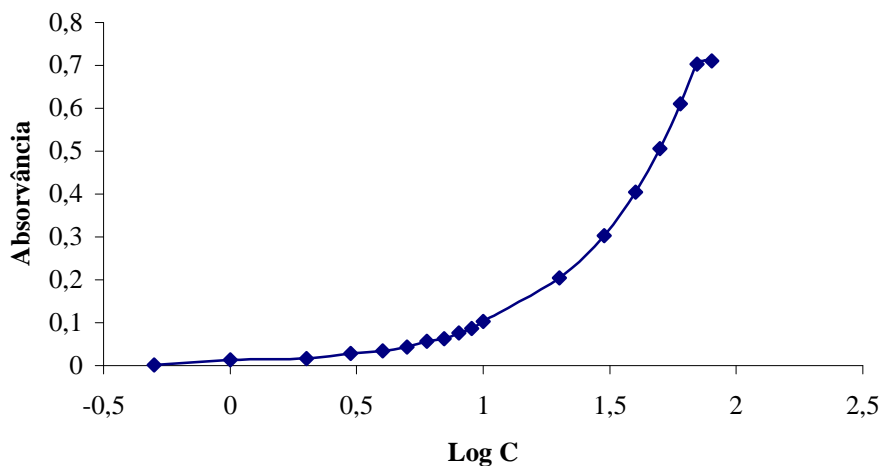
**Tabela 20.** Obtenção da curva de Ringbom de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 465 nm.

Pontos	Vol. Sol. ceftazidima 100 µg/mL (mL)	Concentração final (µg/mL)	Absorvância *
1	0,05	0,5	0,002
2	0,1	1,0	0,013
3	0,2	2,0	0,016
4	0,3	3,0	0,029
5	0,4	4,0	0,034
6	0,5	5,0	0,043
7	0,6	6,0	0,056
8	0,7	7,0	0,062
9	0,8	8,0	0,076
10	0,9	9,0	0,087
11	1,0	10,0	0,103
12	2,0	20,0	0,204
13	3,0	30,0	0,303
14	4,0	40,0	0,405
15	5,0	50,0	0,506
16	6,0	60,0	0,611
17	7,0	70,0	0,710
18	8,0	80,0	0,703

\*Cada valor é a média de três determinações.



A curva de Ringbom foi obtida utilizando-se logaritmo das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) expresso como  $\text{Log C}$  versus absorvância e encontra-se representada na Figura 16.



**Figura 16.** Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para solução de ceftazidima substância de referência de 0,5 a 80,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Para a construção da curva analítica, foram utilizados volumes da solução estoque de ceftazidima substância de referência a 100  $\mu\text{g/mL}$  conforme demonstrado na Tabela 21.

**Tabela 21.** Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 465 nm.

Pontos	Vol. Sol. ceftazidima 100 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	1,0	8,0	10,0
2	2,0	7,0	20,0
3	3,0	6,0	30,0
4	4,0	5,0	40,0
5	5,0	4,0	50,0

Os resultados das leituras de absorvância obtidos para a curva analítica estão apresentados na Tabela 22.

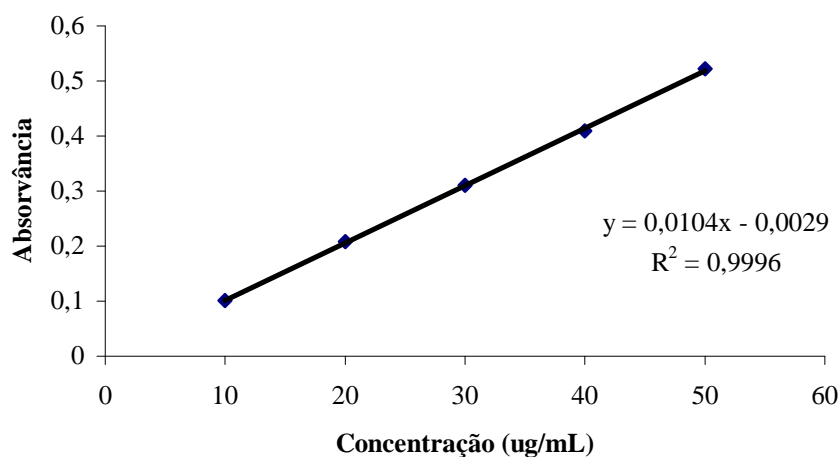
**Tabela 22.** Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através do método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância	Abs média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
10,0	0,101	0,101 $\pm$ 0,0006	0,594
	0,101		
	0,100		
20,0	0,208	0,208 $\pm$ 0,0006	0,288
	0,208		
	0,206		
30,0	0,310	0,310 $\pm$ 0,0006	0,194
	0,311		
	0,311		
40,0	0,409	0,408 $\pm$ 0,0006	0,147
	0,408		
	0,408		
50,0	0,522	0,521 $\pm$ 0,0006	0,115
	0,521		
	0,521		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR % = desvio padrão relativo percentual

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de ceftazidima em concentrações de 10,0 a 50,0 µg/mL através do método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm estão representados na Figura 17.



**Figura 17.** Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm.

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima nos pós para solução injetável pelo método proposto encontram-se na Tabela 23.

**Tabela 23.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região de visível a 465 nm.

Ensaio	Absorvância*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	0,308	996,47	99,65		
II	0,309	999,68	99,97		
III	0,308	996,47	99,65	99,86 ± 0,438	0,4376
IV	0,309	999,68	99,97		
V	0,307	993,27	99,33		
VI	0,311	1006,09	100,61		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006). Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência são adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de ceftazidima substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

A Tabela 24 representa a preparação das soluções utilizadas na realização do teste de recuperação.

**Tabela 24.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm.

	<b>Vol. sol. amostra (100,0 µg/mL)</b>	<b>Vol. Sol. Referência (10,0 µg/mL)</b>	<b>Conc. final em 10 mL (µg/mL)</b>
A	3,0	-	30,0
R <sub>1</sub>	3,0	1,5	31,5
R <sub>2</sub>	3,0	3,0	33,0
R <sub>3</sub>	3,0	6,0	36,0

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 25.

**Tabela 25.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do visível a 465 nm.

	<b>Adicionado (µg/mL)</b>	<b>Absorvância *</b>	<b>Encontrado (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	1,5	0,324	31,43	99,33
R <sub>2</sub>	3,0	0,339	32,88	98,00
R <sub>3</sub>	6,0	0,371	35,95	100,17

\*Cada valor é a média de três determinações.

O espectro de absorção mostrou pico de absorção máxima em 465 nm, utilizando solução aquosa de ceftazidima a 30,0 µg/mL. Com o objetivo de determinar a linearidade, foi

realizada a curva de Ringbom. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 10,0 a 50,0 µg/mL, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9996. A equação da reta foi  $y = 0,0104x - 0,0029$ .

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 99,17 %. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,4376.

O teor médio de ceftazidima determinado no medicamento foi de 99,86 %, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência do excipiente presente no medicamento.

O método de quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta foi validado através de análise estatística e fatores como sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade.

#### **4.2.3.2 Metodologia empregando cloreto de cobre (II) e neocuproína como agente complexante**

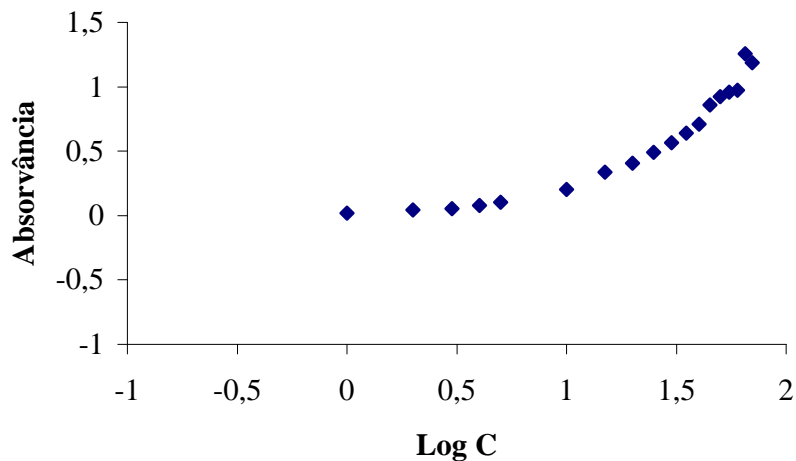
A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do visível obedece a linearidade. O preparo das soluções utilizadas para a obtenção da curva de Ringbom está representado na Tabela 26.

**Tabela 26.** Obtenção da curva de Ringbom de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 454 nm.

Pontos	Vol. Sol. ceftazidima ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância *
1	100	1,0	0,017
2	200	2,0	0,0413
3	300	3,0	0,0560
4	400	4,0	0,0802
5	500	5,0	0,1041
6	100	10,0	0,2043
7	150	15,0	0,3349
8	200	20,0	0,4090
9	250	25,0	0,4928
10	300	30,0	0,5645
11	350	35,0	0,6381
12	400	40,0	0,7110
13	450	45,0	0,8569
14	500	50,0	0,9236
15	550	55,0	0,9589
16	600	60,0	0,9752
17	650	65,0	1,2541
18	700	70,0	1,1864

\*Cada valor é a média de três determinações.

A curva de Ringbom foi obtida utilizando-se logaritmo das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) expresso como  $\text{Log C}$  versus absorvância e encontra-se representada na Figura 18.



**Figura 18.** Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para solução de ceftazidima substância de referência de 1,0 a 70,0  $\mu\text{g/mL}$ .

As soluções utilizadas para a obtenção da curva analítica estão representadas na Tabela 27.



**Tabela 27.** Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no visível a 454 nm.

<b>Pontos</b>	<b>Vol. Sol. ceftazidima 1000 µg/mL (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Concentração final (µg/mL)</b>
1	1,5	10,0	15,0
2	2,0	10,0	20,0
3	2,5	10,0	25,0
4	3,0	10,0	30,0
5	3,5	10,0	35,0
6	4,0	10,0	40,0

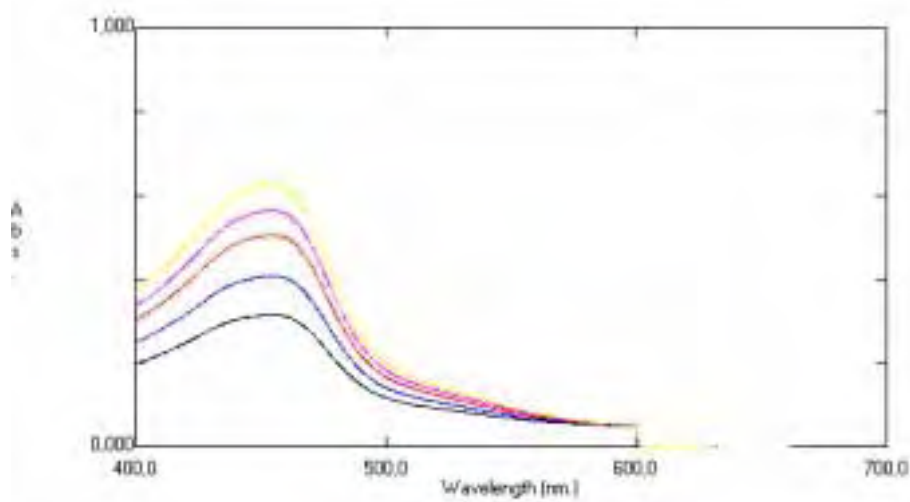
Os resultados das leituras de absorvância obtidos para a curva analítica estão apresentados na Tabela 28 e na Figura 19.

**Tabela 28.** Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através do método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância	Abs média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
15,0	0,3352	$0,3352 \pm 0,0002$	0,059
	0,3354		
	0,3349		
20,0	0,4078	$0,4080 \pm 0,0003$	0,073
	0,4079		
	0,4083		
25,0	0,4923	$0,4920 \pm 0,0003$	0,061
	0,4919		
	0,4918		
30,0	0,5650	$0,5647 \pm 0,0003$	0,053
	0,5644		
	0,5648		
35,0	0,6381	$0,6379 \pm 0,0003$	0,047
	0,6377		
	0,6380		
40,0	0,7113	$0,7111 \pm 0,0003$	0,042
	0,7108		
	0,7112		

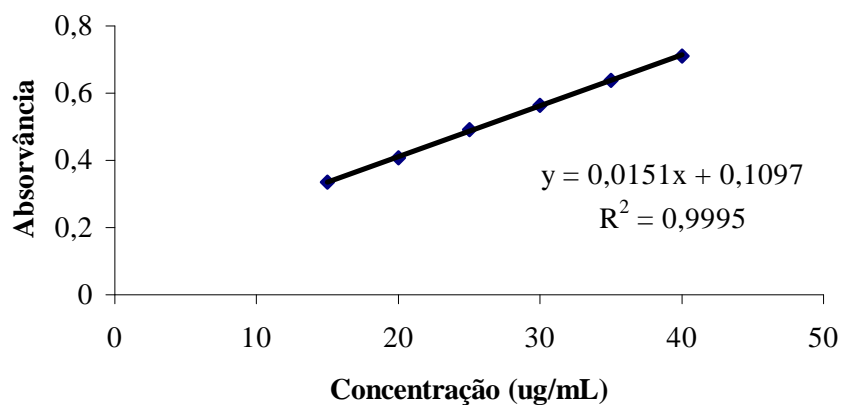
e.p.m. = erro padrão da média

DPR % = desvio padrão relativo percentual



**Figura 19.** Curva de absorção de soluções aquosas de ceftazidima/Cu(II)/neocuproína.

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de ceftazidima em concentrações de 15,0 a 40,0  $\mu\text{g/mL}$  através do método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm estão representados na Figura 20.



**Figura 20.** Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm.

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima nas amostras de pó para solução injetável pelo método proposto encontram-se na Tabela 29.

**Tabela 29.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região de visível a 454 nm.

Ensaio	Absorvância*	Encontrado ( $\mu\text{g}$ )	Teor (%)	Média $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
I	0,5610	29,89	99,63		
II	0,5618	29,94	99,80		
III	0,5630	30,02	100,07	99,56 $\pm$ 0,350	0,351
IV	0,5605	29,85	99,50		
V	0,5587	29,73	99,12		
VI	0,5593	29,77	99,25		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006). Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência são adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de ceftazidima substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio. O preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação encontra-se descrito na Tabela 30.

**Tabela 30.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm.

	<b>Vol. sol. amostra (1000,0 µg/mL) (µL)</b>	<b>Vol. Sol. Referência (100,0 µg/mL) (µL)</b>	<b>Concentração final em 10 mL (µg/mL)</b>
A	300	-	30,0
R <sub>1</sub>	300	150	31,5
R <sub>2</sub>	300	300	33,0
R <sub>3</sub>	300	600	36,0

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 31.

**Tabela 31.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do visível a 454 nm.

	<b>Adicionado (µg/mL)</b>	<b>Absorvância *</b>	<b>Encontrado (µ /mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	1,5	0,5851	31,48	101,33
R <sub>2</sub>	3,0	0,6073	32,95	99,67
R <sub>3</sub>	6,0	0,6523	35,93	99,50

\*Cada valor é a média de três determinações.

Uma significativa coloração amarela foi desenvolvida somente pela adição de ceftazidima em uma mistura de Cu(II) e neocuproína, podendo ser considerada a evidência da

formação de um complexo ternário Cu(II)-ceftazidima-neocuproína. A intensidade máxima da coloração foi obtida imediatamente após arrefecimento da mistura previamente aquecida em banho de aquecimento (40°C) durante 10 minutos, sendo que a coloração amarela permaneceu constante por até 2 dias. O complexo ternário forma-se na faixa de pH 3,0-5,5, e o máximo de coloração desenvolvida ocorreu em pH 4,2.

Os efeitos do aumento das concentrações de Cu(II) (com concentração de neocuproína constante) sobre a intensidade da coloração do complexo foi examinada e as concentrações ótimas de Cu(II) e neocuproína para a máxima intensidade de coloração foram de 0,005 M e 0,01 M, respectivamente. Solução tampão citrato foi o escolhido, segundo procedimentos recomendados para metodologia envolvendo a utilização de neocuproína (JEFFREY et al., 1992; ZUHRI et al., 1994).

A reação mostrou-se específica para ceftazidima na presença de cefalexina, ampicilina, amoxicilina e cefuroxima, outras penicilinas e cefalosporinas relatada, cujos produtos de degradação também reagem com Cu(II). Os excipientes e diluentes não interferiram no ensaio.

O espectro de absorção mostrou pico bem definido de absorção máxima em 454 nm, utilizando solução aquosa de ceftazidima a 30,0 µg/mL. Com o objetivo de determinar a linearidade, foi realizada a curva de Ringbom. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 15,0 a 40,0 µg/mL, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9995. A equação da reta foi  $y = 0,0151x + 0,1097$  e o limite de detecção foi de 0,02 µg/mL.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,17 %. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,351.

O teor médio de ceftazidima determinado no medicamento foi de 99,56%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência dos excipientes.

O método de quantificação por espectrofotometria na região do visível foi validado através de análise estatística e fatores como sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade, mostrando-se mais versátil e simples de ser aplicado em relação aos métodos cromatográficos ou polarográficos, utilizando o mínimo de reagentes e etapas de reação, sendo vantajoso o seu emprego no controle de qualidade de formulações contendo ceftazidima.

#### **4.2.4 Espectrofotometria na região do infravermelho**

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

Os espectros de absorção no infravermelho podem ser usados para a identificação de compostos puros ou para a detecção e identificação de impurezas. A maioria das aplicações se referem a compostos orgânicos, principalmente em virtude de a água, o principal solvente dos compostos inorgânicos, absorver fortemente além de 1,5  $\mu\text{m}$ . Além disso, os compostos inorgânicos possuem bandas de absorção largas, enquanto as substâncias orgânicas podem proporcionar numerosas bandas mais estreitas (JEFFREY et al., 1992).

O espectro de absorção de um composto no infravermelho pode ser encarado como uma espécie de “impressão digital” do composto. O espectro de uma mistura de compostos é essencialmente o da soma dos espectros dos componentes individuais, desde que não ocorram associação, dissociação, polimerização ou formação de composto. A fim de detectar uma impureza numa substância, pode-se fazer uma comparação entre o espectro da substância e o espectro do composto puro; as impurezas provocam o aparecimento de bandas de absorção extras no espectro (HARRIS, 2001). O caso mais favorável será quando as impurezas

presentes possuem grupamentos característicos que não estiverem presentes no constituinte principal.

Apesar de a espectrofotometria no infravermelho ser aceita oficialmente para a identificação de diversos compostos, a literatura registra poucas publicações que utilizam esta técnica para a análise quantitativa (MATKOVIC et al., 2004). Assim, procedeu-se à determinação dos parâmetros para a determinação quantitativa de ceftazidima por espectrofotometria no infravermelho.

Os resultados das leituras encontram-se demonstrados na Tabela 32.

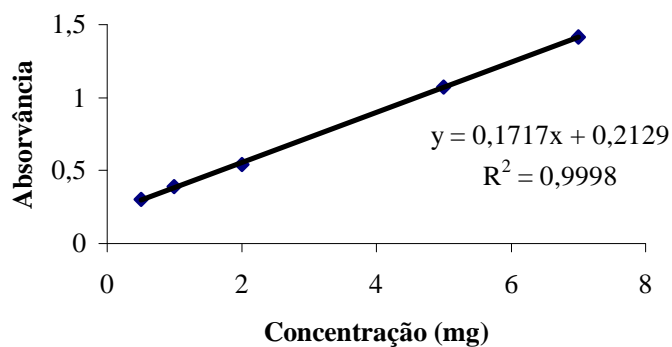
**Tabela 32.** Preparo da curva analítica de ceftazidima através de espectrofotometria no infravermelho.

<b>Pontos</b>	<b>Quantidade ceftazidima (mg) *</b>	<b>Quantidade KBr (mg)</b>	<b>Concentração final (mg/250 mg)</b>
1	5,0	245	0,5
2	10,0	240	1,0
3	20,0	230	2,0
4	50,0	200	5,0
5	70,0	180	7,0

\* Ceftazidima na diluição de 1:10 em KBr.



A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão de ceftazidima em concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 7,0 mg/pastilha através do método espectrofotométrico na região do infravermelho estão representados na Figura 21.



**Figura 21.** Representação gráfica da curva analítica de ceftazidima pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.

A concentração da amostra (em mg) foi obtida à partir da curva analítica desenvolvida, utilizando a equação da reta ( $y = 0,1717x + 0,2129$ ), sendo  $x$  a concentração e  $y$  a absorvância.

A Tabela 33 representa as quantidades de ceftazidima encontradas nas pastilhas analisadas.

**Tabela 33.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do infravermelho.

Ensaio	Absorvância*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	0,7312	3,019	100,63		
II	0,7154	2,93	97,67		
III	0,7259	2,99	100,00	99,46 ± 1,62	1,63
IV	0,7372	3,054	101,80		
V	0,7186	2,94	98,00		
VI	0,7214	2,96	98,67		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

A Tabela 34 representa a preparação das pastilhas de ceftazidima substância de referência e amostra utilizadas na realização do teste de recuperação.

**Tabela 34.** Preparação das pastilhas para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método espectrofotométrico na região do infravermelho.

	Quantidade amostra (mg)*	Substância de Referência (µg)*	Total por pastilha (mg)
A	2,0	-	2,0
R <sub>1</sub>	2,0	100,0	2,1
R <sub>2</sub>	2,0	200,0	2,2
R <sub>3</sub>	2,0	400,0	2,4

\* Diluição sólida 1:100 em KBr.

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 32.

**Tabela 35.** Teste de recuperação de ceftazidima substância de referência adicionada à ceftazidima pó para solução injetável através do método espectrofotométrico na região do infravermelho.

	Adicionado (mg)	Encontrado (mg)	Recuperação (%)	DPR (%)
R <sub>1</sub>	0,1	0,9835	98,35	
R <sub>2</sub>	0,2	1,978	98,90	0,689
R <sub>3</sub>	0,4	3,989	99,72	

\*Cada valor é a média de três determinações.

Na primeira etapa do trabalho de desenvolvimento de método analítico foi estudado o espectro infravermelho de ceftazidima substância de referência para identificar as bandas do espectro, o que demonstrou que a ceftazidima apresenta uma banda intensa em  $3303,8\text{ cm}^{-1}$  que se atribui ao grupamento amina primário da molécula. Os resultados evidenciaram relação linear entre as concentrações de ceftazidima substância de referência utilizada na preparação das pastilhas versus absorvância, sendo possível a construção da curva analítica, a qual apresentou equação da reta  $y = 0,1717x + 0,2129$  e coeficiente de regressão linear de 0,9998, indicando a linearidade do método e, portanto, a possibilidade de o mesmo ser utilizado para quantificação de ceftazidima. Quanto à determinação nos medicamentos, tornou-se necessário conhecer os excipientes comumente presentes que poderiam interferir na análise. Na forma farmacêutica pó para solução injetável não houve interferência do carbonato de sódio, único excipiente em pó presente na amostra.

Os resultados encontrados para o medicamento foram de 99,46 %, revelando boa exatidão e precisão, com desvio padrão relativo de 1,63.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 98,99 %. Com este resultado foi comprovada a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,689.

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

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

#### 4.2.5 Acidimetria

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

No passado, usava-se o termo “análise volumétrica” para identificar esta determinação quantitativa, mas este termo foi substituído por análise titrimétrica. Considera-se que esta denominação exprime melhor o processo de titulação, enquanto a denominação antiga poderia ser confundida com medições de volumes, como as que envolvem gases. Na análise titrimétrica, o reagente de concentração conhecida é o titulante e a substância que se titula é o titulado (JEFFREY et al., 1992; HARRIS, 2001).

No atual estágio da Química Analítica, a titrimetria que contempla a titulação volumétrica rompe a barreira dos anos para atingir secularidade. Num mundo de cromatografias, espectrofotometrias e espectroscopias, a titulação segue resolvendo problemas e sempre despertando discussões sobre sua validade, o que permite dentro deste mundo instrumental, desafiar o conhecimento dos analistas na busca de equações químicas que possam interpretar o processo titulométrico, tais como: estequiometria, reação química, cinética, equilíbrio ou outras análises que legitimem a titulação. Uma grande vantagem da titulação é dispensar, na maioria das análises, o padrão analítico de referência. Além disso, utiliza menor volume de solvente (LEITE, 2004).

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

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

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima pó para solução injetável pelo método proposto encontram-se na Tabela 36.

**Tabela 36.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método acidimétrico.

Ensaio	Vol. NaOH 0,1 M (mL)*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	9,30	508,32	101,66		
II	9,27	506,68	101,34		
III	9,08	496,29	99,26	100,13 ± 1,21	1,208
IV	9,20	502,67	100,53		
V	9,05	494,65	98,93		
VI	9,06	495,20	99,04		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006). Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência são adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de ceftazidima substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

O preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação encontra-se descrito na Tabela 37.

**Tabela 37.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método acidimétrico.

	Quantidade amostra (mg)	Vol. Sol. Referência (10,0 mg/mL)	Concentração final (mg)
A	500	-	500
R <sub>1</sub>	500	2,5	525
R <sub>2</sub>	500	5,0	550
R <sub>3</sub>	500	10,0	600

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 38.

**Tabela 38.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método acidimétrico.

	Adicionado (mg)	Vol. NaOH 0,1 M (mL)*	Encontrado (mg)	Recuperação (%)
R <sub>1</sub>	25,0	9,58	523,62	100,56
R <sub>2</sub>	50,0	10,03	548,22	99,48
R <sub>3</sub>	100,0	10,97	599,60	101,12

\*Cada valor é a média de três determinações.

O ensaio de determinação de ceftazidima por método volumétrico (acidimetria) demonstrou-se simples, de fácil execução, rápido, não havendo a necessidade de

equipamentos sofisticados, grande número de reagentes ou longas etapas de extração e preparação da amostra.

A degradação hidrolítica de antibióticos é freqüentemente muito usada como etapa preliminar nos seus procedimentos analíticos de determinação, sendo a hidrólise alcalina a mais empregada. A finalidade dessa etapa preliminar é romper o anel  $\beta$ -lactâmico e formar o sal sódico do derivado do ácido penicilóico, podendo ser facilmente determinado por acidimetria (KOROLKOVAS, 1988; MARTINEZ; FALCÓ; CABEZA, 2004).

A amostra de ceftazidima pó para solução injetável possui em sua constituição carbonato de sódio anidro (equivalente a 2,3 mEq de  $\text{Na}^+$  em 10 mL de solução injetável) como excipiente e sabe-se que o mesmo também reage com a solução de HCl empregada para dosear o NaOH que não reagiu com a amostra degradada. Para eliminar esta interferência sem ter que passar por procedimentos de extração, procedeu-se à neutralização a frio da amostra dissolvida em água com a solução de HCl 0,1 M para posteriormente realizar o ensaio acidimétrico propriamente dito. Esta etapa não apresentou interferência nos resultados obtidos, o que foi demonstrado pelo teste de recuperação.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às quantidades de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,39 %. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 1,208.

O teor médio de ceftazidima determinado no medicamento foi de 100,13%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência dos excipientes.

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



#### 4.2.6 Volumetria em meio não-aquoso

Os fármacos que não podem ser doseados em meio aquoso, por serem demasiadamente pouco básicos ou pouco ácidos, são doseados em meio não-aquoso. Isso ocorre porque a teoria considera ácido qualquer substância que tenha tendência a doar um próton e base a substância que aceitará o próton. As substâncias que proporcionam pontos finais indefinidos, em virtude de serem ácidos fracos ou bases fracas, em solução aquosa, freqüentemente proporcionam pontos finais mais satisfatórios quando as titulações são efetuadas em meios não-aquosos. Uma vantagem adicional é a de que muitas substâncias que são insolúveis em água são suficientemente solúveis em solventes orgânicos para que possam ser titulados nestes meios não-aquosos (JEFFREY et al., 1992).

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

Os solventes utilizados são de natureza relativamente neutra ou ácida; o caráter básico do fármaco é que determina a escolha do solvente. Dos disponíveis, o ácido acético glacial é o mais empregado devido à solubilidade de muitos fármacos e de as reações serem realizadas com ácido perclórico, no caso de bases fracas. O ácido acético glacial é uma base muito mais fraca do que a água e o ácido acético protonado, um ácido mais forte que o íon hidrônio. A debilidade relativa de ácido acético como base e a força de ácido acético protonado como ácido atuam conjuntamente, diminuindo a extensão das reações ácido-básicas em ácido acético em comparação com as reações em água. Os processos de dissociação ocorrem em extensões diferentes, com o ácido perclórico apresentando maior tendência para a dissociação. Assim, o ácido acético glacial tem capacidade para diferenciar as forças do ácido perclórico, sendo um solvente diferenciador (KOROLKOVAS; FERREIRA, 1986).

O método de detecção do ponto final de doseamento varia de acordo com o pKa das bases em água. Naquelas que apresentam pKa da ordem de 4, a detecção é por meio de indicadores; já naquelas cujos pKas se situam na faixa de 1 a 4, via de regra é potenciométrica (KOROLKOVAS; FERREIRA, 1986). Os indicadores mais utilizados e as respectivas

mudanças de cor são: alaranjado de metila (amarelo a vermelho), azul de timol (amarelo a vermelho), naftolbenzeína (amarelo a verde), verde de malaquita (verde azulado a amarelo), cristal violeta (violeta a verde azulado).

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

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima pó para solução injetável pelo método proposto encontram-se na Tabela 39.

**Tabela 39.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método volumétrico em meio não-aquoso.

Ensaio	Vol HClO <sub>4</sub> 0,1 M (mL)*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	4,54	248,15	99,26		
II	4,58	250,33	100,13		
III	4,55	248,69	99,48	99,08 ± 0,70	0,704
IV	4,51	246,51	98,60		
V	4,52	247,05	98,82		
VI	4,49	245,41	98,16		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006). Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência são adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente

definidas de solução de ceftazidima substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

O preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação encontra-se descrito na Tabela 40.

**Tabela 40.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método volumétrico em meio não-aquoso.

	<b>Quantidade amostra (mg)</b>	<b>Vol. Sol. Referência (12,5 mg/mL)</b>	<b>Concentração final (mg)</b>
A	250	-	250
R <sub>1</sub>	250	1,0	262,5
R <sub>2</sub>	250	2,0	275
R <sub>3</sub>	250	4,0	300

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 41.

**Tabela 41.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método volumétrico em meio não-aquoso.

	<b>Adicionado (mg)</b>	<b>Volume (mL)*</b>	<b>Encontrado (mg)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	12,5	4,80	262,36	100,06
R <sub>2</sub>	25,0	5,03	274,93	100,56
R <sub>3</sub>	50,0	5,47	298,98	98,38

\*Cada valor é a média de três determinações.

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

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

A amostra de ceftazidima pó para solução injetável possui em sua constituição carbonato de sódio anidro (equivalente a 2,3 mEq de Na<sup>+</sup> em 10 mL de solução injetável) como excipiente e sabe-se que o mesmo também reage com a solução de HClO<sub>4</sub> empregada. Para corrigir esta interferência sem ter que passar por procedimentos de extração, procedeu-se à titulação, descontando posteriormente o volume de HClO<sub>4</sub> consumido pelo carbonato de sódio. Essa cálculo foi possível levando-se em conta o peso médio determinado para 20

ampolas de ceftazidima pó para solução injetável, o qual foi de  $1271,92 \pm 11,77$  mg. Na composição do medicamento, o carbonato de sódio é utilizado em quantidade de 118 mg por ampola; sendo assim, para uma massa de pó equivalente a 250 mg de ceftazidima, temos 29,50 mg de carbonato de sódio, o qual consome 5,57 mL de solução de  $\text{HClO}_4$  0,1 M. Desta forma, o volume de 5,57 mL foi subtraído do volume total gasto nas titulações, a fim de corrigir essa interferência do excipiente, uma vez que o mesmo também é solúvel em ácido acético glacial. Esta etapa não apresentou interferência nos resultados obtidos, conforme demonstrado pelo teste de recuperação.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às quantidades de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 99,67%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,704.

O teor médio de ceftazidima determinado no medicamento foi de 99,08%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência dos excipientes.

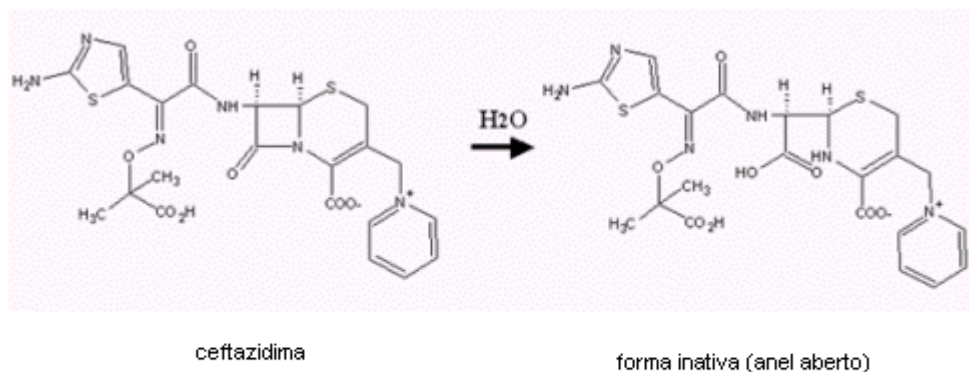
O método de quantificação por volumetria em meio não aquoso foi validado através de análise estatística e fatores como sensibilidade, precisão e exatidão.

#### **4.2.7 Iodometria**

O método iodométrico para doseamento de penicilinas e cefalosporinas é oficializado em muitas farmacopéias, como British Pharmacopoeia (2005), Farmacopéia Brasileira (1988), Farmacopéia Mexicana (1988), Farmacopéia Portuguesa (2000) e USP 29 (2006).

A ruptura do anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas por álcali ou  $\beta$ -lactamase dá um derivado do ácido penicilóico; este, ao contrário do que ocorre com o fármaco íntegro, consome iodo. Cerca de 8 equivalentes de iodo são consumidos por mL, sendo que a equivalência exata de iodo deve ser determinada analisando uma amostra padrão

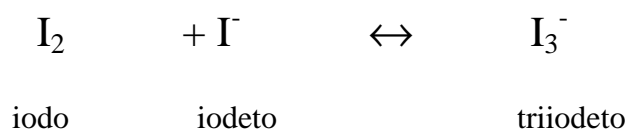
sob as mesmas condições usadas para a amostra (KOROLKOVAS, 1988; VENTURA; SOUZA; KOROLKOVAS, 1989).



**Figura 22.** Hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico na cefazidima.

Um grande número de procedimentos analíticos é baseado nas reações de iodo. Quando um analito redutor é titulado diretamente com iodo (para produzir  $I^-$ ), o método é chamado “iodimetria”. Na “iodimetria” um analito oxidante é adicionado a um excesso de  $I^-$  para produzir iodo ( $I_2$ ), o qual é titulado com solução padrão de tiosulfato.

A solubilidade do  $I_2$  em água é bastante escassa (0,335 g/L a 25°C). Além disso, a solução possui elevada pressão de vapor de iodo, o que faz com que sua concentração vá diminuindo com o tempo devido à volatilização. Tais dificuldades podem ser contornadas, dissolvendo-se o iodo em uma solução de iodeto de potássio. A solubilidade do iodo em soluções de iodeto (tanto maior quanto mais concentrada for a solução de iodeto) é devido ao equilíbrio de formação do íon triiodeto:



Desta maneira, as perdas por volatilização (em comparação com a simples solução aquosa de I<sub>2</sub>) diminuem bastante. Todavia, é necessário manter os frascos sempre bem fechados (HARRIS, 2001).

O amido é o indicador escolhido para o iodo porque ele forma um complexo com o iodo na presença de iodeto de coloração azul intensa. A sensibilidade da reação corada é tal que a cor azul é visível quando a concentração de iodo é  $2 \times 10^{-5} M$ . O amido é um indicador redox porque corresponde especificamente à presença de I<sub>2</sub> e não para uma variação no potencial redox. Apresenta dois componentes principais: a amilose, que é um composto de cadeia linear e dá cor azul com o iodo e a sua cadeia assume uma forma espiralada, e a amilopectina, que possui cadeia ramificada e forma um produto de cor púrpura-vermelho provavelmente por adsorção (HARRIS, 2001, JEFFREY et al. 1992). Deve ser adicionado próximo ao ponto de viragem a fim de fornecer visualização mais nítida da coloração.

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima pó para solução injetável pelo método proposto encontram-se na Tabela 42.

**Tabela 42.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através do método iodométrico.

Ensaio	Vol Iodo 0,02 N (mL)*	Encontrado (mg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	3,67	10,03	100,30		
II	3,63	9,92	99,20		
III	3,71	10,14	101,39	99,75 ± 0,98	0,982
IV	3,65	9,97	99,75		
V	3,63	9,92	99,20		
VI	3,61	9,86	98,66		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

O teste de recuperação é realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 29, 2006). Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência são adicionadas nas soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação são transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de ceftazidima substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

A Tabela 43 representa o preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação.

**Tabela 43.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método iodométrico.

	<b>Quantidade amostra (mg)</b>	<b>Vol. Sol. Referência (5,0 mg/mL)</b>	<b>Quantidade final (mg)</b>
A	10	-	10
R <sub>1</sub>	10	1,0	10,5
R <sub>2</sub>	10	2,0	11,0
R <sub>3</sub>	10	4,0	12,0

Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 44.



**Tabela 44.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através do método iodométrico.

	<b>Adicionado (mg)</b>	<b>Vol Iodo 0,02 N (mL)*</b>	<b>Encontrado (mg)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	0,5	3,83	10,47	98,40
R <sub>2</sub>	1,0	4,02	10,99	101,10
R <sub>3</sub>	2,0	4,38	11,97	99,75

\*Cada valor é a média de três determinações.

O método iodométrico para determinação de cefalosporinas necessita de uma etapa prévia de degradação do anel  $\beta$ -lactâmico, o que se dá geralmente por álcali ou  $\beta$ -lactamases, originando um derivado do ácido correspondente que reage com o iodo. No entanto, o fármaco íntegro não consome iodo. Assim, durante o ensaio, foi necessário analisar a amostra degradada e sem sofrer degradação a fim de verificar se a mesma já não encontrava-se em processos degradativos influenciados pela temperatura, luz, umidade e outros. O método proposto foi baseado em ensaios iodométricos existentes na literatura para outras cefalosporinas, mostrando-se aplicável e vantajoso em relação a outros ensaios instrumentais de custo elevado.

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

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às quantidades de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 99,75%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,982.

O teor médio de ceftazidima determinado no medicamento foi de 99,75%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa, não ocorrendo interferência dos excipientes.

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

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

#### **4.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

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

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

A partir de dados encontrados na literatura para outras cefalosporinas em fluidos biológicos ou preparações farmacêuticas e também para a ceftazidima, alguns parâmetros foram testados para a determinação de ceftazidima.

Foram experimentalmente testadas diferentes fases móveis, variando-se, basicamente, a proporção da fase orgânica.

Segundo a Farmacopéia Portuguesa (2000), a British Pharmacopoeia (2005) e a USP 29 (2006) para a determinação de ceftazidima os comprimentos de onda empregados são 245 nm e 254 nm. Optou-se em desenvolver o método em  $\lambda$  de 245 nm, embora em 254 nm os picos também apresentem-se nítidos e com resolução.

Ainda segundo as mesmas referências farmacopéicas, a fase móvel utilizada é obtida pela dissolução de 4,26g de fosfato dissódico R e 2,73g de fosfato monopotássico R em 980 mL de água e 20 mL de acetonitrila, mantendo-se um fluxo de 2 mL/min. Porém, sabe-se que os tampões acabam danificando a coluna com o tempo, assim como a utilização de um fluxo elevado (acima de 1 mL/min). Sendo assim, optou-se pela seguinte fase móvel: metanol-água (70:30), o que constituiu uma excelente melhora na metodologia, pois com esta fase móvel torna-se desnecessária a lavagem da coluna após as análises. Além disso, a amostra mostrou-se bastante solúvel nessa fase móvel, sem qualquer problema de precipitação.

Os resultados das medidas das áreas absolutas para a curva de calibração estão representados na Tabela 45, onde observa-se o coeficiente de variação percentual médio.

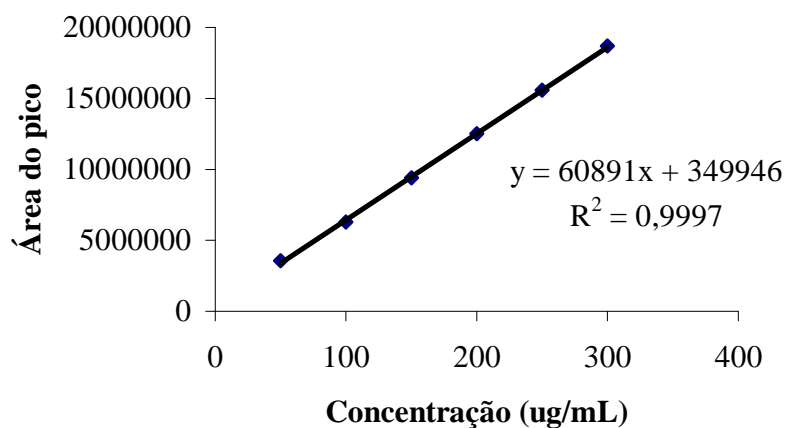
A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de correlação das soluções foram determinados pela análise da regressão linear e estão apresentadas na Figura 23.

**Tabela 45.** Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de ceftazidima através de CLAE.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área do pico	Área absoluta média $\pm$ e.p.m.*	CV (%)
50,0	3547233	$3538925 \pm 6504$	0,1838
	3535317		
	3534225		
100,0	6247393	$6316690 \pm 58724,5$	0,9297
	6337835		
	6364842		
150,0	9356786	$9418781,6 \pm 70658$	0,7502
	9401457		
	9498102		
200,0	12493280	$12510918 \pm 30113$	0,2407
	12523393		
	12516082		
250,0	15538897	$15568256 \pm 26892$	0,1727
	15592681		
	15573190		
300,0	18589792	$18681284 \pm 98864,5$	0,5292
	18666540		
	18787521		

\* cada valor é a média de três determinações

e.p.m. = erro padrão da média



**Figura 23.** Representação gráfica da curva analítica da solução de ceftazidima em concentrações de 50 a 300 µg/mL através de CLAE.

Os valores experimentais da determinação de ceftazidima em pó para solução injetável pelo método proposto encontra-se na Tabela 46.

**Tabela 46.** Quantidades determinadas para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável através de CLAE.

Ensaio	Área do pico*	Encontrado (µg)	Teor (%)	Média ± e.p.m.	DPR (%)
I	12428146	198,36	99,18		
II	12394275	197,80	98,90		
III	12497321	199,49	99,75	99,42 ± 0,412	0,414
IV	12518037	198,19	99,10		
V	12495389	199,46	99,73		
VI	12513686	199,76	99,88		

\*Cada valor é a média de três determinações.

e.p.m. = erro padrão da média

DPR% = desvio padrão relativo percentual

A Tabela 47 representa a preparação das soluções de ceftazidima substância de referência e amostra utilizadas na realização do teste de recuperação.

**Tabela 47.** Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de ceftazidima para o método CLAE.

	<b>Vol. sol. amostra</b> <b>200,0 µg/mL</b> <b>(mL)</b>	<b>Vol. Sol. Referência</b> <b>1000 µg/mL</b> <b>(µL)</b>	<b>Concentração final em</b> <b>10 mL</b> <b>(µg/mL)</b>
A	2,0	-	200
R <sub>1</sub>	2,0	100,0	210
R <sub>2</sub>	2,0	200,0	220
R <sub>3</sub>	2,0	400,0	240

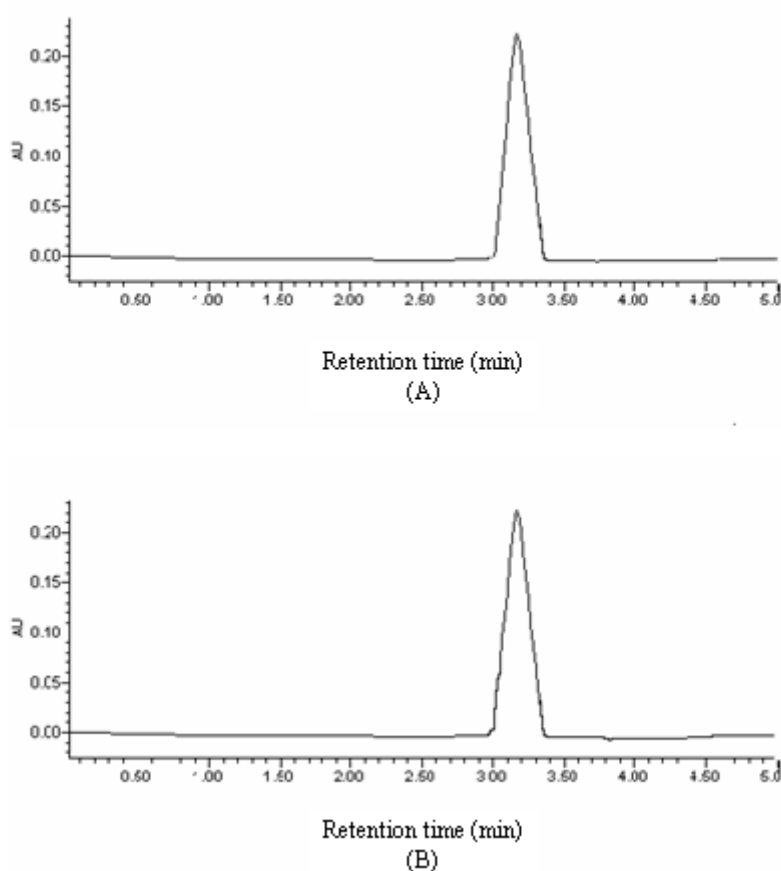
Os valores encontrados no teste de recuperação para ceftazidima pó para solução injetável estão representados na Tabela 48.

**Tabela 48.** Teste de recuperação de solução de ceftazidima substância de referência adicionada à solução de ceftazidima pó para solução injetável através de CLAE.

	<b>Adicionado</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Encontrado</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Recuperação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
R <sub>1</sub>	10,0	10,078	100,78	
R <sub>2</sub>	20,0	20,036	100,18	0,412
R <sub>3</sub>	40,0	39,596	99,99	

\*Cada valor é a média de três determinações.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método analítico de alto custo, tanto pelo uso necessário que se faz de solventes com alto grau de pureza como de padrões de referência. O método analítico desenvolvido emprega fase móvel simples, sem a utilização de tampão, que tornam as análises de CLAE mais complicadas, pois os sais inorgânicos podem danificar a coluna, através da interação com a sílica (OHANNESIAN; STREETER, 2002; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; WATSON, 1999). O tempo de retenção obtido foi de 3,02 minutos, conforme Figura 24.



**Figura 24.** Cromatogramas obtidos por CLAE para ceftazidima substância de referência (A) e ceftazidima pó para solução injetável (B).

Através dos resultados obtidos foi construída a curva analítica, na faixa de 50,0 a 300,0 µg/mL. A equação da reta obtida foi de  $y = 60891x + 349946$  com coeficiente de correlação de 0,9997.

O teor médio de ceftazidima determinado em pó para solução injetável foi de 99,42%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa.

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas de substância de referência foram adicionadas às soluções de ceftazidima pó para solução injetável para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,32 %. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios dos métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de ceftazidima em pó para solução injetável. O desvio padrão relativo foi de 0,412.

O método apresenta vantagens em relação aos encontrados em farmacopéias para a determinação de ceftazidima, uma vez que não emprega tampões na fase móvel, o fluxo utilizado é menor e a fase móvel é muito simples, sendo desnecessária a troca da fase móvel para a lavagem da coluna após a realização do ensaio.

#### **4.2.9 Análise comparativa dos métodos propostos**

Os resultados obtidos para a determinação quantitativa de ceftazidima pó para solução injetável, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 49. A análise estatística dos valores experimentais obtidos para o doseamento de ceftazidima pelos diferentes métodos propostos encontra-se na Tabela 50.



**Tabela 49.** Valores médios experimentais obtidos para a determinação quantitativa de ceftazidima na forma farmacêutica pó para solução injetável, pelos métodos avaliados.

Amostra	MB	UV	Vis*	Vis**	IV	ACID	VMNA	IOD	CLAE
I	97,48	99,47	99,65	99,63	100,63	101,66	99,26	100,30	99,18
II	98,03	100,26	99,97	99,80	97,67	101,34	100,13	99,20	98,90
III	97,50	100,00	99,65	100,07	100,00	99,26	99,48	101,39	99,75
IV	97,70	100,26	99,97	99,50	101,80	100,53	98,60	99,75	99,10
V	97,10	99,21	99,33	99,12	98,00	98,93	98,82	99,20	99,73
VI	98,22	99,73	100,61	99,25	98,67	99,04	98,16	98,66	99,88

\*Método usando anilina: bromocianogênio

\*\*Método usando cobre(II):neocuproína

**Tabela 50.** Análise da variância dos resultados obtidos para o doseamento de ceftazidima pó para solução injetável pelos métodos propostos.

Fontes de variação	SQ	GL	Variância	F
entre	8,768648	8	1,096081	0,000143
resíduo	345276,1	45	7672,801	
total	345284,8	53		

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

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

Os métodos propostos não diferem estatisticamente, porém, apresentam diferenças quanto ao custo e tempo de execução.

Os métodos espectrofotométricos (regiões do ultravioleta, visível e infravermelho) utilizam reagentes de baixo custo e são de simples execução. O método de cromatografia líquida de alta eficiência exige equipamentos de custo mais alto, nem sempre disponíveis em todos os laboratórios, além de trabalhar com reagentes de custo mais elevado (grau HPLC). Os métodos titrimétricos são os de mais fácil execução e rapidez, utilizando reagentes simples e de custo mais baixo. Já o ensaio microbiológico envolve um tempo de execução maior; porém, é o único dos métodos propostos que apresenta a peculiaridade de analisar a atividade biológica do fármaco.

Na comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos propostos, observou-se que a variabilidade entre eles é muito pequena, uma vez que os desvios relativos mostraram-se menores que 1 %, com exceção dos métodos acidimetria e espectrofotometria na região do infravermelho, que apresentaram, respectivamente, desvio padrão relativo de 1,208 e 1,630. No entanto, essa variação continua sendo bem inferior ao recomendado pela Resolução 899/2003 (BRASIL, 2003), que considera como valor máximo aceitável 2 %, não se admitindo valores superiores para métodos analíticos.

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

Segundo LEITE (2002): “não ter validação é ter apenas um número não um resultado”. Logo, a importância da validação de métodos analíticos para garantia e controle da qualidade é incontestável.

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida. É um processo pelo qual se estabelece por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida (RILEY; ROSANSKE, 1996).

A validação não infere que o método seja livre de erros, somente confirma que ele é adequado para a proposta (MEHTA, 1997) e deve ser considerada como parte de um conceito integrado que visa a assegurar a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001).

Segundo a Resolução 899/2003 (BRASIL, 2003), a qual dispõe um guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Segundo Gil e Baptista Filho (2005), “um método analítico deve, idealmente, ser *exato* para fornecer valor real, ser *preciso* para fornecer em um menor número de ensaios esse valor real, ser *seletivo* para que a exatidão não desvie com interferentes potenciais, ser *sensível* ou capaz de determinar concentrações as menores possíveis e, enfim, responder de forma proporcionalmente *linear*, ao longo de ampla faixa de concentração”.

### 4.3 Estabilidade

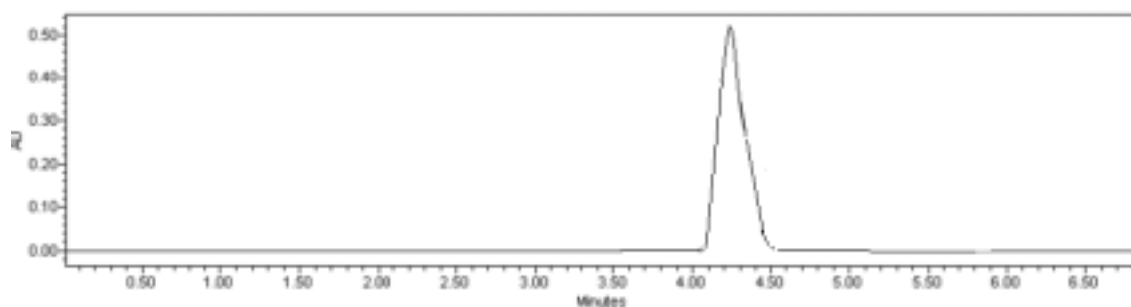
O estudo de estabilidade foi realizado com a finalidade de verificar a possível degradação do fármaco quando exposto a diferentes fatores, como luz, temperatura e radiação, e para confirmar a sua estabilidade na forma sólida (pó para solução injetável) e em solução (solução aquosa), procedeu-se à determinação quantitativa do mesmo utilizando três metodologias propostas no presente trabalho: ensaio microbiológico, espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar (cilindros em placas) demonstrou a diminuição da atividade antibacteriana de ceftazidima na forma sólida e em solução exposta à luz, temperatura e radiação, em função do tempo, sendo a diminuição da atividade antimicrobiana mais intensa em solução do que na forma sólida.

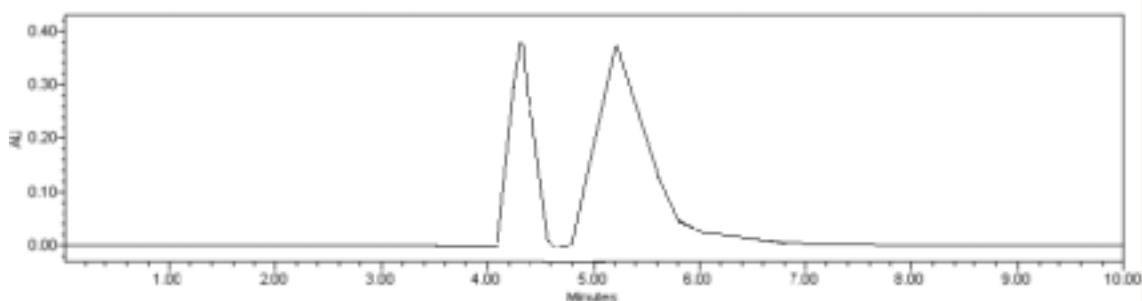
A análise dos cromatogramas indica que ocorre um aumento da área do pico, em função do tempo de exposição, que apresenta tempo de retenção diferente daquele obtido para ceftazidima íntegra (3,02 min); porém, não foi verificado o aparecimento de outros picos que possam indicar a formação de outros produtos de degradação.

A literatura reporta a determinação de piridina como indicador de degradação da ceftazidima (ARSÈNE et al., 2002; FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002; BRITISH Pharmacopoeia, 2005). De acordo com a metodologia farmacopéica, a piridina é determinada por CLAE utilizando-se detecção a 254 nm, enquanto que o fármaco íntegro é determinado a 245 nm. Já Arsène e colaboradores (2002) empregam a determinação simultânea de ceftazidima e piridina utilizando as mesmas condições cromatográficas, porém destacam a dificuldade de detecção da piridina.

A fim de verificar o pico de piridina por CLAE, foram injetados 20  $\mu$ L de piridina na concentração de 400  $\mu$ g/mL dissolvida na fase móvel (metanol:água 70:30, v/v) e a detecção realizada a 245nm e 254 nm. Foi observado o aparecimento de um pico com tempo de retenção de aproximadamente 4,2 minutos, com e sem a adição de ceftazidima íntegra na concentração de 200  $\mu$ g/mL, a qual apresenta tempo de retenção de 3,02 minutos, indicando ser o método proposto sensível à presença de piridina, conforme representado nas Figuras 25 e 26.



**Figura 25.** Cromatograma obtido para piridina em solução aquosa 400  $\mu$ g/mL.



**Figura 26.** Cromatograma obtido para piridina a 400  $\mu$ g/mL e ceftazidima a 200  $\mu$ g/mL (soluções aquosas).

Porém, sem a adição de piridina às soluções de ceftazidima não ocorre aparecimento de picos, provavelmente devido à baixa concentração de piridina liberada durante a degradação, sendo a quantidade insuficiente para a determinação simultânea, uma vez que os procedimentos farmacopéicos empregam soluções de piridina a 2,5 µg/mL e de ceftazidima a 5000 µg/mL para a verificação de degradação.

Desta forma, o método proposto para determinação de ceftazidima por CLAE não foi capaz de quantificar o produto de degradação, apenas indica a sua presença através da obtenção de pico com tempo de retenção diferente daquele obtido para o fármaco íntegro.

O método espectrofotométrico na região do ultravioleta não foi capaz de distinguir o produto original do produto de degradação.

Os resultados obtidos na quantificação de ceftazidima em forma farmacêutica pó para solução injetável (forma sólida) submetida à luz, temperatura e radiação, analisadas pelos métodos propostos, estão representados nas Tabelas 51, 52, 53, 54, 55 e 56.

**Tabela 51.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm).

Tempo exposição (dias)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)	Intervalo de confiança $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	9,941	99,41	99,28	0,171
	9,935	99,35	$\pm$	
	9,909	99,09	0,170	
1	9,877	98,77	98,96	0,174
	9,910	99,10	$\pm$	
	9,902	99,02	0,172	
2	9,805	98,05	98,10	0,249
	9,837	98,37	$\pm$	
	9,789	97,89	0,244	
7	9,756	97,56	97,57	0,497
	9,806	98,06	$\pm$	
	9,709	97,09	0,485	
14	9,714	97,14	97,32	0,422
	9,779	97,79	$\pm$	
	9,703	97,03	0,411	
21	9,642	96,42	96,86	0,476
	9,734	97,34	$\pm$	
	9,683	96,83	0,461	
28	9,648	96,48	96,55	0,460
	9,703	97,03	$\pm$	
	9,615	96,15	0,444	

**Tabela 52.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, através do método de ensaio microbiológico.

Tempo exposição (dias)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)	Intervalo de confiança $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	388,88	97,22	97,65	0,417
	390,80	97,70	$\pm$	
	392,12	98,03	0,407	
1	388,80	97,20	97,11	0,455
	390,0	97,50	$\pm$	
	386,52	96,63	0,442	
2	388,32	97,08	96,90	0,203
	387,72	96,93	$\pm$	
	386,76	96,69	0,197	
7	377,84	94,46	94,24	0,588
	378,60	94,65	$\pm$	
	374,44	93,61	0,554	
14	373,68	93,42	93,53	0,528
	376,28	94,07	$\pm$	
	372,40	93,10	0,494	
21	372,88	93,22	92,97	0,354
	372,40	93,10	$\pm$	
	370,40	92,60	0,329	
28	365,36	91,34	91,86	0,655
	370,08	92,52	$\pm$	
	366,88	91,72	0,602	

**Tabela 53.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm).

Tempo exposição (dias)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)	Intervalo de confiança $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	9,959	99,59	99,41	0,186
	9,942	99,42	$\pm$	
	9,922	99,22	0,185	
1	9,889	98,89	99,09	0,245
	9,936	99,36	$\pm$	
	9,902	99,02	0,243	
2	9,817	98,17	98,50	0,370
	9,889	98,89	$\pm$	
	9,843	98,43	0,365	
7	9,821	98,21	98,15	0,320
	9,843	98,43	$\pm$	
	9,781	97,81	0,314	
14	9,729	97,29	97,49	0,479
	9,802	98,02	$\pm$	
	9,715	97,15	0,467	
21	9,738	97,38	97,22	0,684
	9,779	97,79	$\pm$	
	9,649	96,49	0,665	
28	9,723	97,23	97,20	0,484
	9,765	97,65	$\pm$	
	9,671	96,71	0,471	



**Tabela 54.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , através do método de ensaio microbiológico.

<b>Tempo exposição (dias)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	390,68	97,67	97,85	0,184
	392,12	98,03	$\pm$	
	391,44	97,86	0,180	
1	389,96	97,49	97,43	0,430
	391,24	97,81	$\pm$	
	387,92	96,98	0,419	
2	386,84	96,71	96,50	0,556
	387,60	96,90	$\pm$	
	383,56	95,89	0,537	
7	384,48	96,12	95,53	0,573
	381,72	95,43	$\pm$	
	380,16	95,04	0,547	
14	379,72	94,93	94,41	0,751
	378,76	94,69	$\pm$	
	374,40	93,60	0,709	
21	371,64	92,91	93,05	0,324
	373,60	93,40	$\pm$	
	371,40	92,85	0,302	
28	366,80	91,70	91,73	0,676
	369,44	92,36	$\pm$	
	364,48	91,12	0,620	

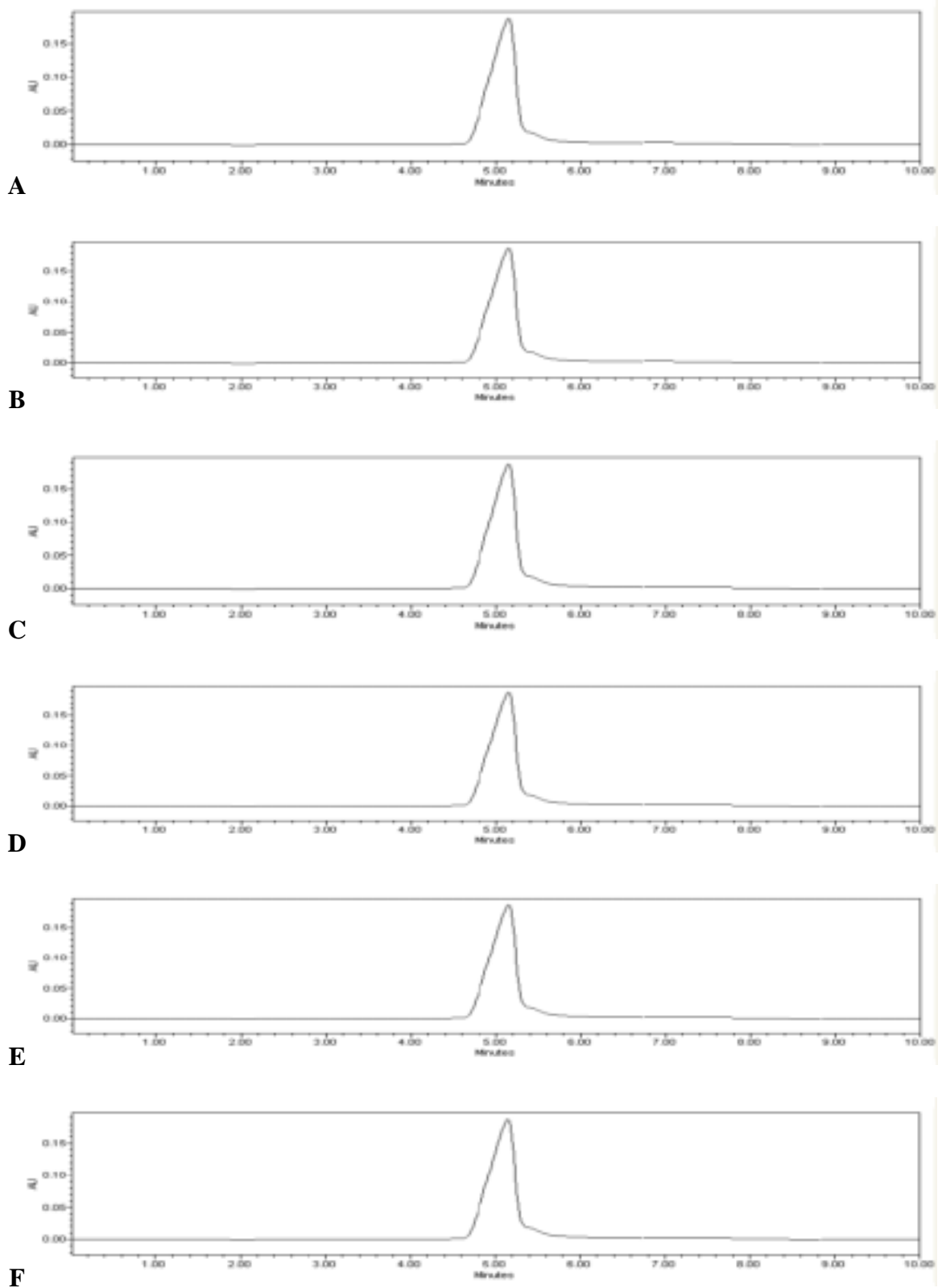
**Tabela 55.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à radiação UV, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm).

Tempo exposição (dias)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)	Intervalo de confiança $\pm$ e.p.m.	DPR (%)
0	9,933	99,33	99,33	0,236
	9,956	99,56	$\pm$	
	9,909	99,09	0,235	
1	9,917	99,17	98,99	0,415
	9,928	99,28	$\pm$	
	9,852	98,52	0,411	
2	9,813	98,13	98,36	0,244
	9,861	98,61	$\pm$	
	9,835	98,35	0,240	
7	9,728	97,28	97,68	0,437
	9,813	98,13	$\pm$	
	9,763	97,63	0,427	
14	9,701	97,01	97,24	0,360
	9,764	97,64	$\pm$	
	9,706	97,06	0,350	
21	9,648	96,48	96,84	0,400
	9,725	97,25	$\pm$	
	9,680	96,80	0,387	
28	9,643	96,43	96,57	0,452
	9,706	97,06	$\pm$	
	9,622	96,22	0,437	

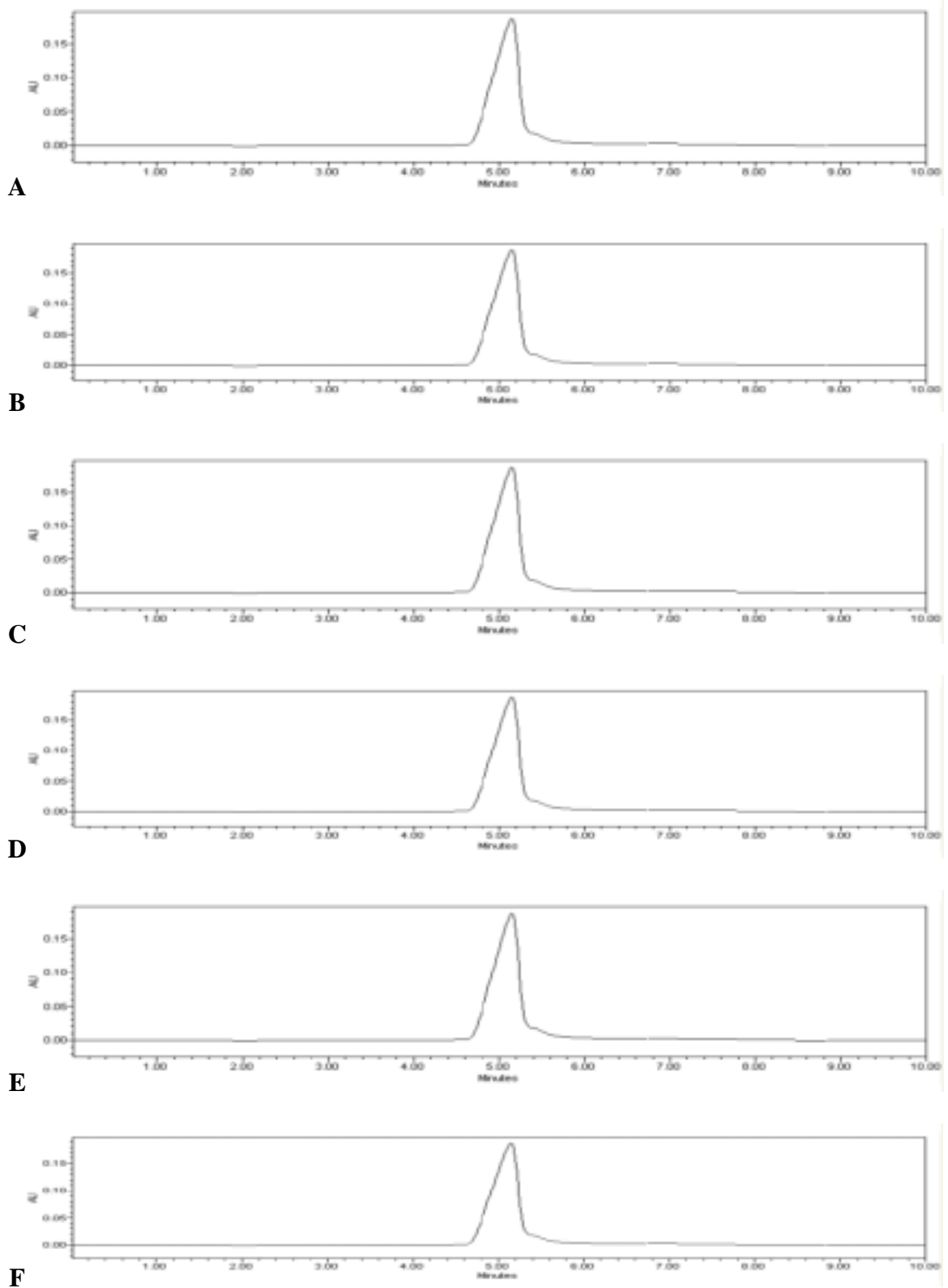
**Tabela 56.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima pó para solução injetável exposta à radiação UV, através do método de ensaio microbiológico.

<b>Tempo exposição (dias)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança ± e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	389,92	97,48	97,50	0,421
	391,68	97,92	±	
	388,40	97,10	0,410	
1	389,96	97,49	97,29	0,727
	391,48	97,87	±	
	386,00	96,50	0,707	
2	384,40	96,10	96,97	0,783
	389,24	97,31	±	
	390,00	97,50	0,759	
7	384,08	96,02	96,76	0,704
	387,60	96,90	±	
	389,44	97,36	0,681	
14	387,56	96,89	96,28	0,661
	385,32	96,33	±	
	382,48	95,62	0,636	
21	387,20	96,80	95,90	0,860
	382,88	95,72	±	
	380,72	95,18	0,825	
28	376,56	94,14	94,90	0,732
	382,00	95,50	±	
	380,28	95,07	0,695	

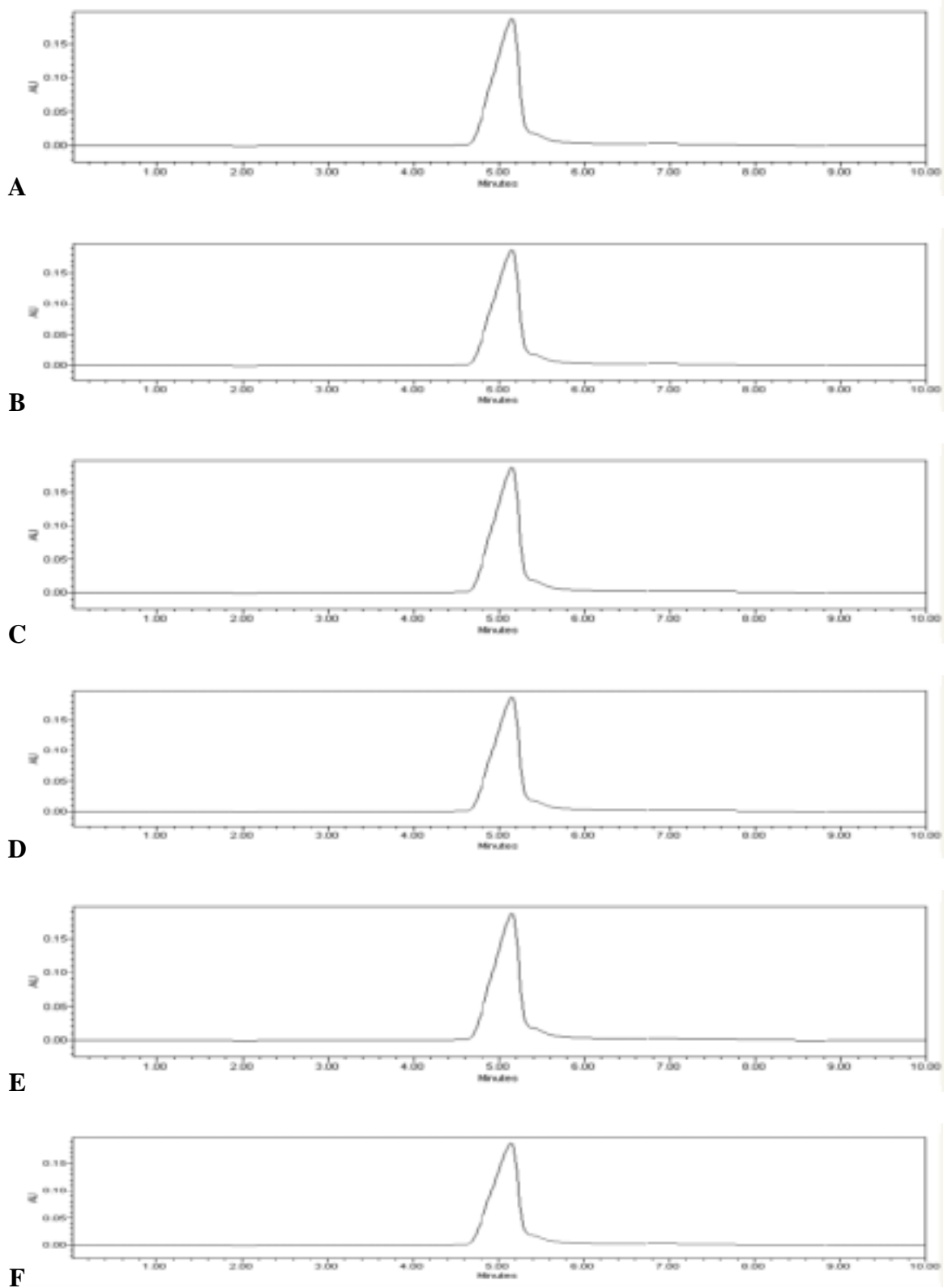
As figuras 27, 28 e 29 representam os cromatogramas obtidos na análise de ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, temperatura e radiação.



**Figura 27.** Cromatogramas obtidos para ceftazidima pó para solução injetável exposta à luz, durante 1 dia (A), 2 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D), 21 dias (E) e 28 dias (F).



**Figura 28.** Cromatogramas obtidos para ceftazidima pó para solução injetável exposta à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 1 dia (A), 2 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D), 21 dias (E) e 28 dias (F).



**Figura 29.** Cromatogramas obtidos para ceftazidima pó para solução injetável exposta à radiação UV, durante 1 dia (A), 2 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D), 21 dias (E) e 28 dias (F).

Os resultados obtidos na quantificação de ceftazidima em solução após exposição à luz, temperatura e radiação pelos métodos propostos encontram-se na Tabela 57, 58 e 59, respectivamente.

**Tabela 57.** Teores médios de ceftazidima pó para solução injetável (amostra sólida), obtidos na avaliação da degradação pela luz, pelos diferentes métodos.

<b>Tempo de exposição (dias)</b>	<b>UV (%)</b>	<b>MB (%)</b>
0	99,28	97,65
1	98,96	97,11
2	98,10	96,90
7	97,57	94,24
14	97,32	93,53
21	96,86	92,97
28	96,55	91,86



**Tabela 58.** Teores médios de ceftazidima pó para solução injetável (amostra sólida), obtidos na avaliação da degradação pela temperatura, pelos diferentes métodos.

<b>Tempo de exposição (dias)</b>	<b>UV (%)</b>	<b>MB (%)</b>
0	99,41	97,85
1	99,09	97,43
2	98,50	96,50
7	98,15	95,53
14	97,49	94,41
21	97,22	93,05
28	97,20	91,73

**Tabela 59.** Teores médios de ceftazidima pó para solução injetável (amostra sólida), obtidos na avaliação da degradação pela radiação, pelos diferentes métodos.

<b>Tempo de exposição (dias)</b>	<b>UV (%)</b>	<b>MB (%)</b>
0	99,33	97,50
1	98,99	97,29
2	98,36	96,97
7	97,68	96,76
14	97,24	96,28
21	96,84	95,90
28	96,57	94,90

As tabelas 51-56 mostram a diminuição dos teores de ceftazidima pó para solução injetável exposta a fatores como luz, temperatura e radiação, determinados pelos métodos propostos de espectrofotometria na região do ultravioleta e ensaio microbiológico.

Os resultados demonstraram que a amostra sólida (ceftazidima pó para solução injetável) apresenta diminuição no teor de forma semelhante pelos dois métodos, porém, o ensaio microbiológico apresentou maior sensibilidade em detectar a diminuição da atividade antimicrobiana, demonstrando teores médios de 91,86 %; 91,73 % e 94,90 % após a exposição à luz, temperatura e radiação, respectivamente, durante 28 dias, enquanto o método espectrofotométrico na região do ultravioleta demonstrou teores médios de 96,55 %; 97,20 % e 96,57 % nas mesmas condições (tipo e tempo de exposição).

Os picos nos cromatogramas (Figuras 27,28 e 29) para ceftazidima indicaram que houve um aumento na área do pico em função do tempo de exposição, e um tempo de retenção diferente daquele obtido para o fármaco íntegro (Figura 24).

Os resultados mostraram ainda que luz, temperatura e radiação interferem na estabilidade da ceftazidima pó de maneira semelhante, havendo perdas correspondentes nos teores do fármaco e, praticamente, na mesma velocidade, conforme pode ser verificado nas tabelas 57, 58 e 59.

Os resultados da quantificação de ceftazidima em forma farmacêutica pó para solução injetável (solução) submetida à luz, temperatura e radiação, analisadas pelos métodos propostos, estão representados nas Tabelas 60, 61, 62, 63, 64 e 65.

**Tabela 60.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à luz, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança ± e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	9,947	99,47	99,38	0,196
	9,952	99,52	±	
	9,916	99,16	0,195	
6	9,845	98,45	98,68	0,555
	9,931	99,31	±	
	9,829	98,29	0,548	
12	9,683	96,83	96,39	0,705
	9,674	96,74	±	
	9,561	95,61	0,680	
24	1,944	19,44	19,66	0,992
	1,980	19,80	±	
	1,975	19,75	0,195	

**Tabela 61.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à luz, através do método de ensaio microbiológico.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	387,32	96,83	97,32	0,488
	391,12	97,78	$\pm$	
	389,36	97,34	0,475	
6	348,04	87,01	87,00	0,488
	349,68	87,42	$\pm$	
	346,28	86,57	0,425	
12	347,60	86,90	87,11	0,231
	348,56	87,14	$\pm$	
	349,20	87,30	0,201	
24	55,24	13,81	13,91	0,841
	56,16	14,04	$\pm$	
	55,56	13,89	0,117	

**Tabela 62.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	9,933	99,33	99,41	0,245
	9,968	99,68	$\pm$	
	9,921	99,21	0,244	
6	9,811	98,11	98,80	0,617
	9,927	99,27	$\pm$	
	9,902	99,02	0,610	
12	9,487	94,87	95,50	0,596
	9,598	95,98	$\pm$	
	9,564	95,64	0,569	
24	1,979	19,79	19,65	0,687
	1,965	19,65	$\pm$	
	1,952	19,52	0,135	

**Tabela 63.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , através do método de ensaio microbiológico.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	389,28	97,32	97,37	0,474
	391,40	97,85	$\pm$	
	387,72	96,93	0,462	
6	296,84	79,68	80,34	0,768
	298,72	80,90	$\pm$	
	294,80	80,45	0,617	
12	318,72	74,21	74,20	0,660
	323,60	74,68	$\pm$	
	321,80	73,70	0,490	
24	63,12	15,78	15,93	1,055
	64,44	16,11	$\pm$	
	63,56	15,89	0,168	

**Tabela 64.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à radiação UV, através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta (255,5 nm).

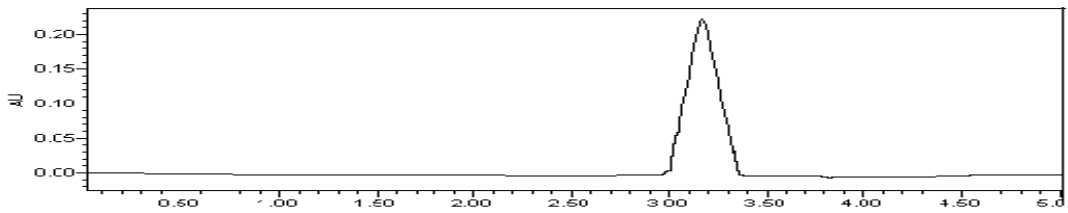
<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	9,941	99,41	99,33	0,277
	9,955	99,55	$\pm$	
	9,902	99,02	0,275	
6	9,833	98,33	98,78	0,563
	9,940	99,40	$\pm$	
	9,860	98,60	0,556	
12	9,517	95,17	95,32	0,582
	9,593	95,93	$\pm$	
	9,485	94,85	0,555	
24	1,923	19,23	19,40	0,876
	1,957	19,57	$\pm$	
	1,941	19,41	0,170	

**Tabela 65.** Resultados obtidos na quantificação de ceftazidima solução exposta à radiação UV, através do método de ensaio microbiológico.

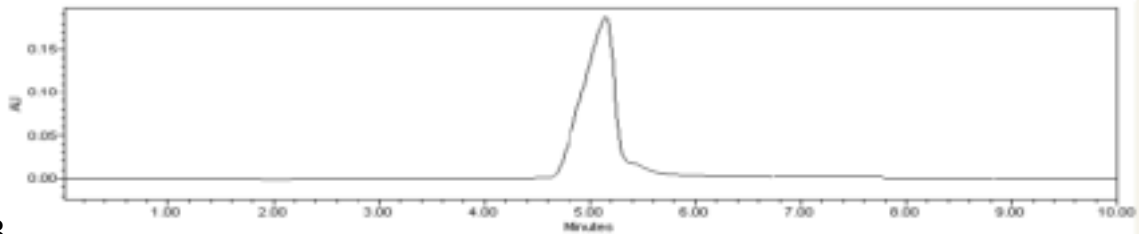
<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Intervalo de confiança ± e.p.m.</b>	<b>DPR (%)</b>
0	387,56	96,89	97,51	0,558
	391,64	97,91	±	
	390,92	97,73	0,544	
6	351,60	87,90	88,37	0,464
	354,36	88,59	±	
	354,52	88,63	0,410	
12	327,88	81,97	82,44	0,623
	329,48	82,37	±	
	331,96	82,99	0,514	
24	58,40	14,60	14,76	1,118
	59,04	14,76	±	
	59,72	14,93	0,165	

Os cromatogramas obtidos para determinação de ceftazidima solução aquosa exposta à luz, temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  e radiação UV encontram-se representados nas figuras 30, 31 e 32, respectivamente.

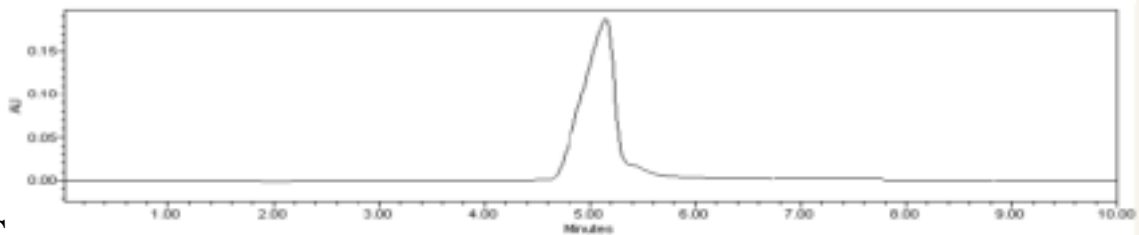




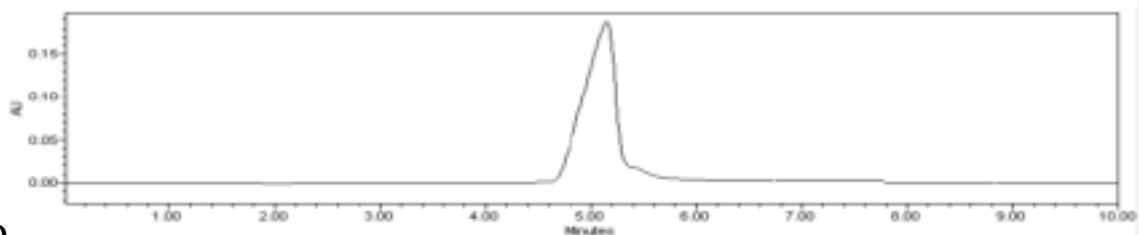
A



B

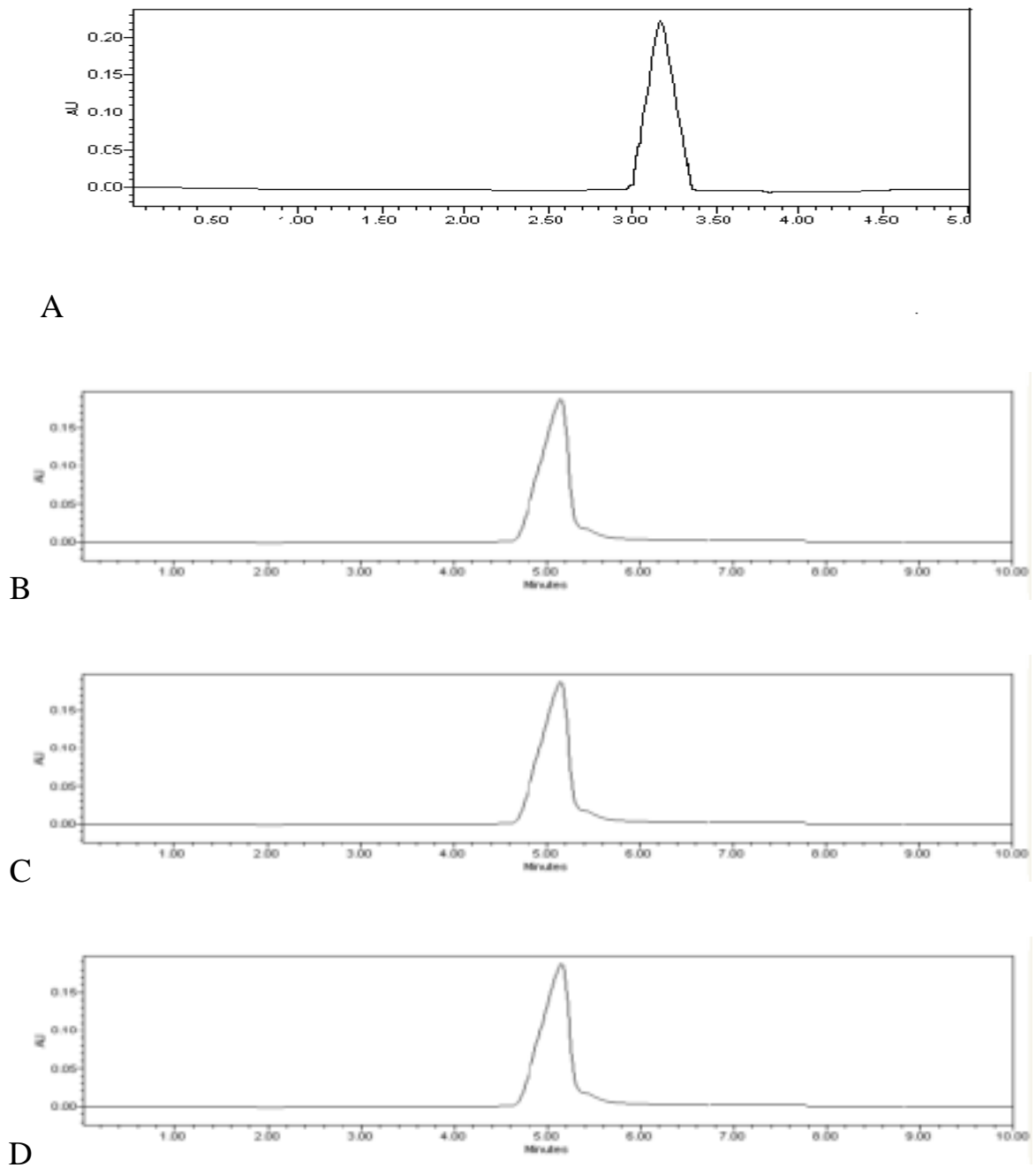


C

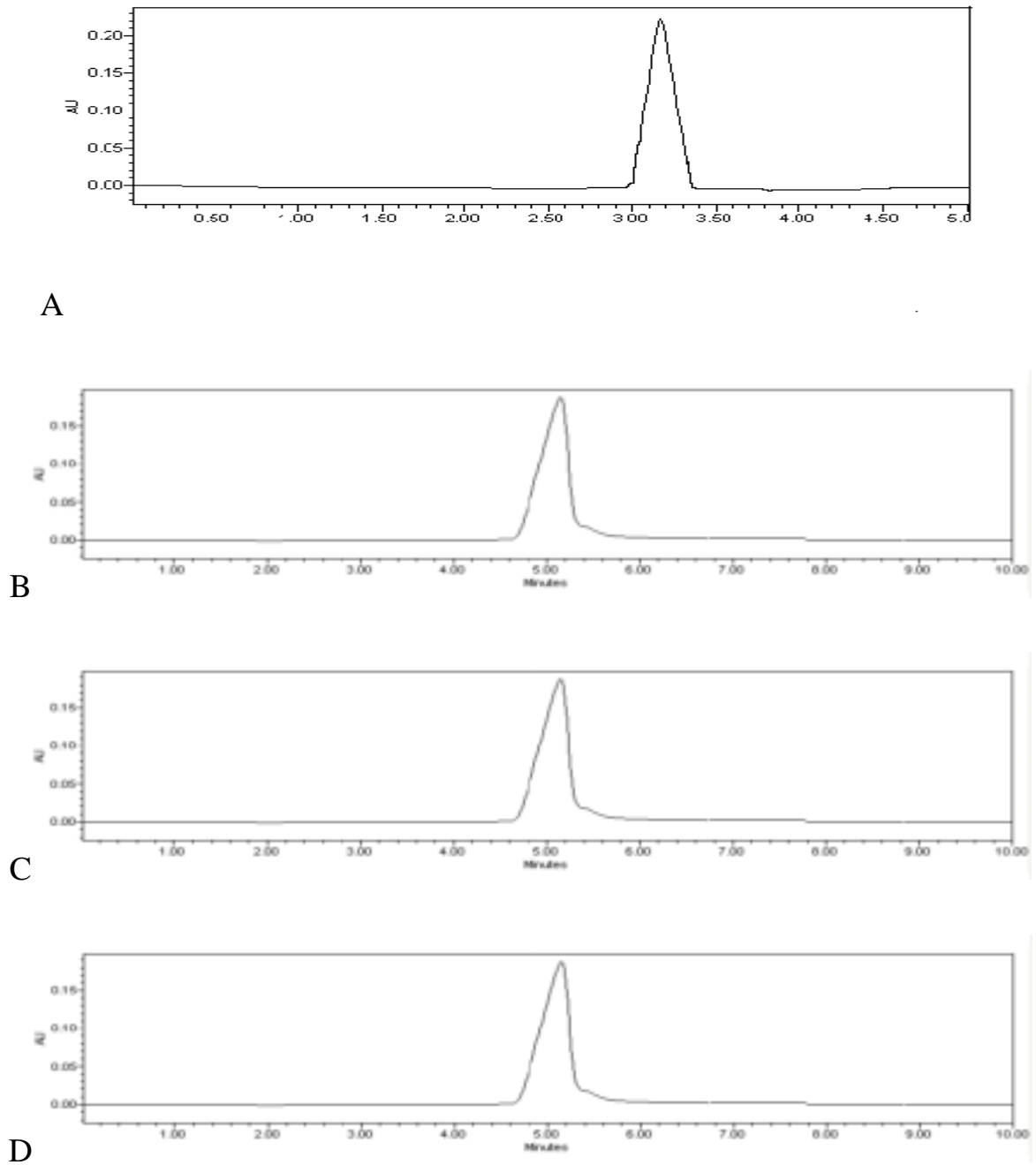


D

**Figura 30.** Cromatogramas obtidos para ceftazidima solução aquosa exposta à luz, durante 24 horas (A: controle; B: 6 h; C: 12 h e D: 24 h).



**Figura 31.** Cromatogramas obtidos para ceftazidima solução aquosa exposta à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 24 horas (A: controle; B: 6 h; C: 12 h e D: 24 h).



**Figura 32.** Cromatogramas obtidos para ceftazidima solução aquosa exposta à radiação UV, durante 24 horas (A: controle; B: 6 h; C: 12 h e D: 24 h).

Os resultados obtidos na quantificação de ceftazidima em solução após exposição à luz, temperatura e radiação pelos métodos propostos encontram-se nas Tabelas 66, 67 e 68, respectivamente.

**Tabela 66.** Teores médios de ceftazidima em solução, obtidos na avaliação da degradação pela luz, pelos diferentes métodos.

<b>Tempo de exposição (horas)</b>	<b>UV (%)</b>	<b>MB (%)</b>
0	99,38	97,32
6	98,68	87,00
12	96,39	87,11
24	19,66	13,91

**Tabela 67.** Teores médios de ceftazidima em solução, obtidos na avaliação da degradação pela temperatura a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , pelos diferentes métodos.

<b>Tempo de exposição (horas)</b>	<b>UV (%)</b>	<b>MB (%)</b>
0	99,41	97,37
6	98,80	74,20
12	95,50	80,34
24	19,65	15,93

**Tabela 68.** Teores médios de ceftazidima em solução, obtidos na avaliação da degradação pela radiação UV, pelos diferentes métodos.

<b>Tempo de exposição (horas)</b>	<b>UV (%)</b>	<b>MB (%)</b>
0	99,33	97,51
6	98,78	88,37
12	95,32	82,44
24	19,40	14,76

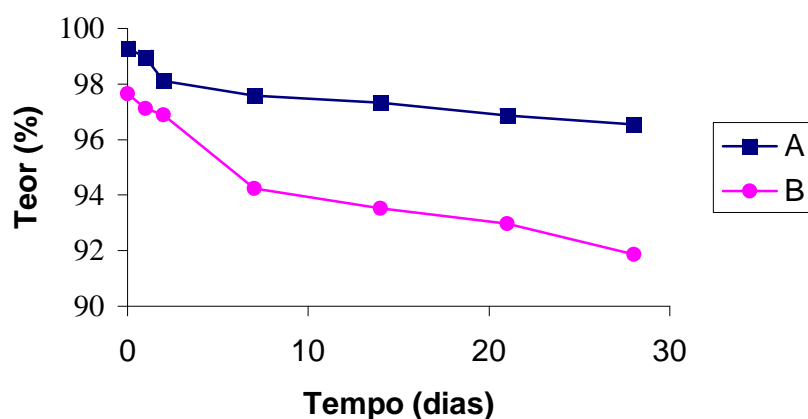
As tabelas 60-65 indicam a diminuição acelerada nos teores de ceftazidima exposta a fatores como luz, temperatura e radiação em solução quando comparado à diminuição dos teores na forma sólida.

De acordo com o observado para a forma sólida, o ensaio microbiológico mostrou-se mais sensível que o método espectrofotométrico na região do ultravioleta, com valores médios de 13,91 %; 15,93 % e 14,76 % respectivamente para a exposição à luz, temperatura e radiação, contra teores de 19,66 %; 19,65 % e 19,40 % nas mesmas condições (tipo e tempo de exposição). Esses valores médios encontram-se nas tabelas 66, 67 e 68.

Os resultados revelam a contribuição da água na aceleração das reações de degradação de fármacos (EV, 2003). Quando a decomposição do fármaco é resultante de uma reação de hidrólise, como é o caso do anel  $\beta$ -lactâmico, um efetivo meio de estabilizar a molécula é limitar o contato do fármaco com a água, o que é facilmente alcançado pela utilização de formas de dosagens sólidas, como é o caso da ceftazidima, a qual normalmente encontra-se disponível na apresentação extemporânea de pó para solução injetável, justamente em função da sua instabilidade em formulações líquidas em poucas horas, conforme pode ser verificado no presente trabalho.

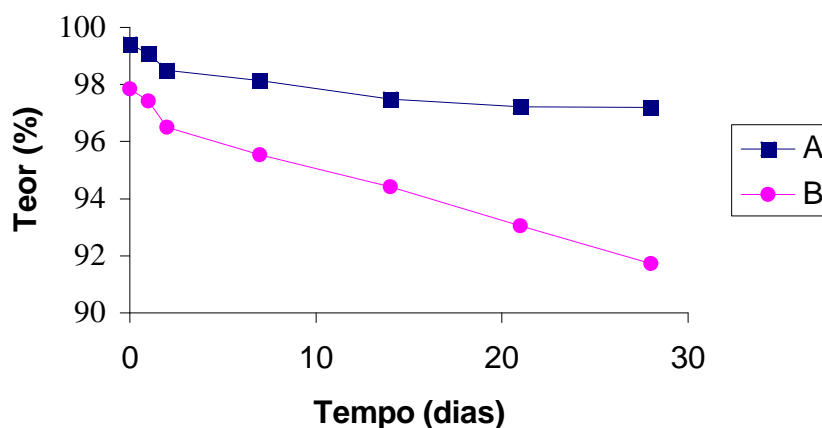
Os picos obtidos nos cromatogramas para ceftazidima em solução também indicaram um aumento na área do pico e tempo de retenção diferente daquele obtido para o fármaco íntegro (Figuras 30, 31 e 32), comprovando a degradação do fármaco.

A Figura 33 representa os teores de ceftazidima pó para solução injetável obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à luz, por um período de 28 dias.



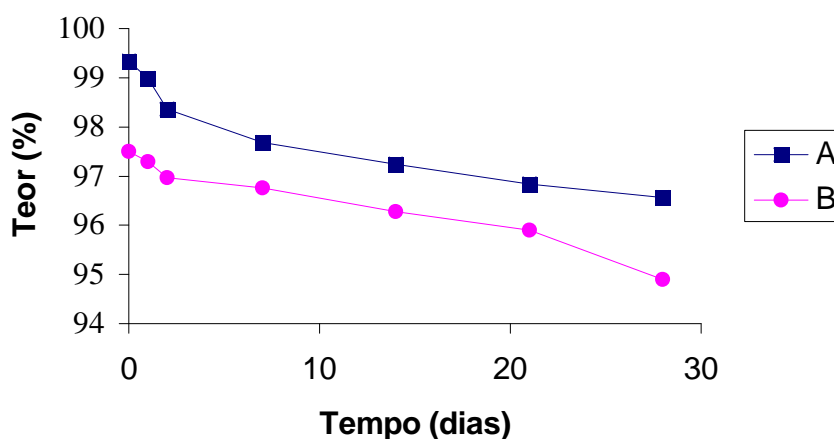
**Figura 33.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima obtidos após exposição à luz por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.

A Figura 34 representa os teores de ceftazidima pó para solução injetável obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à temperatura, por um período de 28 dias.



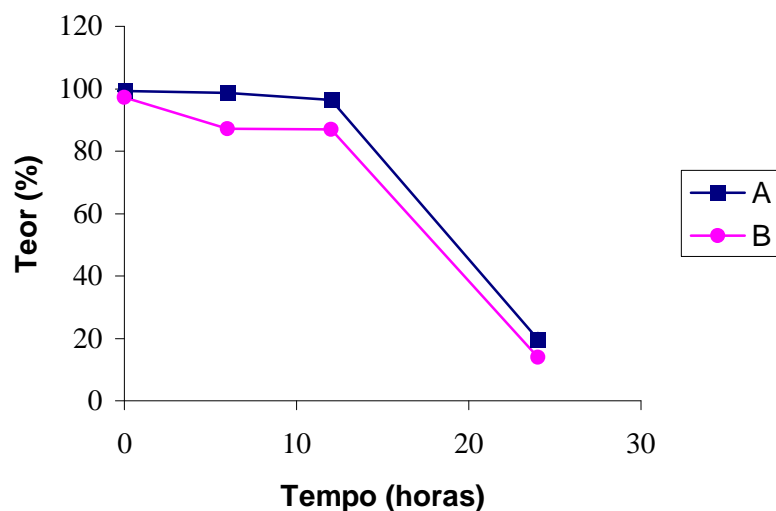
**Figura 34.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima obtidos após exposição à temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.

A Figura 35 representa os teores de ceftazidima pó para solução injetável obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à radiação UV, por um período de 28 dias.



**Figura 35.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima obtidos após exposição à radiação UV por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 28 dias.

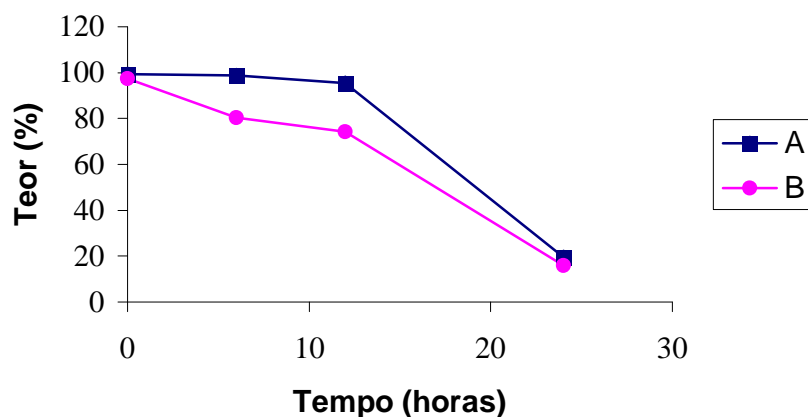
A Figura 36 representa os teores de ceftazidima solução aquosa obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à luz, por um período de 24 horas.



**Figura 36.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima solução aquosa obtidos após exposição à luz por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.

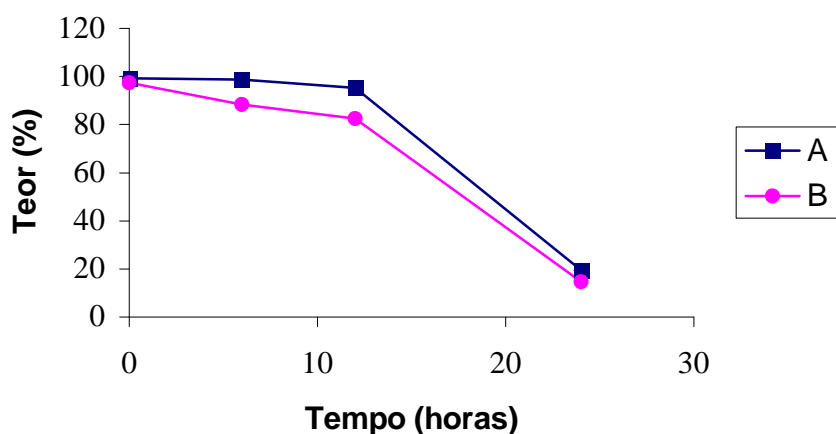
A Figura 37 representa os teores de ceftazidima solução aquosa obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à temperatura de  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ , por um período de 24 horas.





**Figura 37.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima solução aquosa obtidos após exposição à temperatura de  $42 \pm 2^\circ\text{C}$  por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.

A Figura 38 representa os teores de ceftazidima solução aquosa obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B), após a exposição à radiação UV, por um período de 24 horas.



**Figura 38.** Representação gráfica dos teores de ceftazidima solução aquosa obtidos após exposição à radiação UV por espectrofotometria na região do ultravioleta (A) e por ensaio microbiológico (B) por um período de 24 horas.

A diminuição nos teores do fármaco também pode ser visualizada nas Figuras 33 a 38, onde essa diminuição mostra-se nítida em função do tempo de exposição.

Já as soluções aquosas de ceftazidima mantiveram a atividade biológica por algumas horas, apresentando em seguida diminuição drástica dos teores do fármaco, conforme Figuras 36, 37 e 38. Esse fato confirma a necessidade do correto armazenamento do medicamento, uma vez que os processos degradativos têm início quando condições adversas de luminosidade, temperatura e/ou radiação estão presentes. Os resultados indicam que o fármaco deve ser utilizado por um período de até 6 horas após a preparação da solução aquosa; períodos de tempo maiores devem ser analisados caso a caso.

O método espectrofotométrico na região do ultravioleta não foi capaz de distinguir o produto de degradação, apenas demonstrou teores mais baixos do produto original, indicando diminuição de sua concentração inicial.

A cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições estabelecidas, indicou que ocorre um aumento da área do pico, em função do tempo de exposição, e um tempo de retenção diferente daquele obtido para o fármaco íntegro, inclusive com as amostras líquidas (soluções), conforme verificado nas figuras 27, 28 e 29.

O ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar-cilindros em placas demonstrou maior sensibilidade em detectar a diminuição da atividade antimicrobiana de ceftazidima que o método espectrofotométrico na região do ultravioleta, indicando ser de extrema importância a sua realização em produtos que necessitam da confirmação de sua atividade biológica, como é o caso dos fármacos antimicrobianos.

Deve ser considerada ainda a degradação ácida e alcalina do fármaco estudado. Conforme verificado na figura 4, a ceftazidima apresenta diferenças nos espectros obtidos na região do ultravioleta quando preparada em soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Assim, soluções do referido fármaco devem ser utilizadas em curto período de tempo após a preparação, além da necessidade de abrigo da luz, evitar a exposição a altas temperaturas e controlar possíveis variações de pH. Tais requisitos são de extrema importância para a segurança do medicamento, pois segundo Nudelman (1975) “o que pode acontecer a um paciente, gravemente enfermo, que recebe um medicamento deteriorado, que não contém as doses terapêuticas prescritas, ou se a contém, não está biologicamente disponível”?

---

## **CONCLUSÕES**

---

No presente trabalho foi possível desenvolver e validar novos métodos para determinação quantitativa de ceftazidima, verificando-se a importância dos parâmetros de validação realizados para a aceitabilidade de cada novo método proposto.

As análises qualitativas permitiram caracterizar o fármaco através da espectrofotometria nas regiões infravermelho, visível e ultravioleta, da cromatografia em camada delgada e das reações de coloração, que demonstraram resultados positivos quando comparados com aqueles da substância de referência. As determinações de faixa de fusão, umidade, resíduo por incineração, solubilidade e caracteres físicos permitiram verificar a possível presença de impurezas na substância de referência e o estudo de análise térmica, realizado pelo método termogravimétrico, foi possível demonstrar que a ceftazidima substância de referência não apresentou degradações ou impurezas antes do desenvolvimento dos métodos quantitativos.

As análises quantitativas permitiram desenvolver e validar alguns métodos analíticos para determinação de ceftazidima, tais como ensaio microbiológico, espectrofotometria nas regiões infravermelho, visível e ultravioleta, titrimetria por acidimetria, iodometria e meio não-aquoso e cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos avaliados no presente trabalho mostraram-se precisos, exatos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas.

No estudo de estabilidade, foi possível concluir que a ceftazidima sofre degradação tanto na forma sólida (pó para solução injetável) como na forma líquida (solução) quando exposta a fatores como luz, temperatura e radiação, sendo a degradação mais acelerada quando o fármaco apresenta-se em solução.

Foi possível verificar também a importância da realização de ensaios de atividade para substâncias antimicrobianas, uma vez que esse método foi o mais sensível na detecção dos teores de ceftazidima remanescentes. Porém, os métodos não foram capazes de detectar os produtos de degradação do fármaco quando exposto a condições adversas.

O estudo de estabilidade procurou demonstrar a importância do correto armazenamento de fármacos, dando ênfase à proteção contra exposição à luz, temperatura elevada ou radiação, a fim de se garantir os teores de fármaco aceitáveis durante o período de validade do medicamento.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABDEL-KHALEK, M. M.; MAHROUS, M. M. Use of ammonium molybdate in the colorimetric assay of cephalosporins. **Talanta**, v. 31, p. 635-637, 1984.

ADAMIS, G.; PAPAIOANNOU, M. G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; GARGALIANOS, P.; KOSMIDIS, J.; GIAMARELLOU, H. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 23, p. 144-149, 2004.

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

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

ALTINOZ, S.; OZER, D.; TEMIZER, A.; YUKSEL, N. Determination of ceftriaxone in aqueous humour and serum samples by differential-pulse adsorptive stripping voltametry. **Analyst**, v. 119, p. 1575-1577, 1994.

ALY, F. A.; HEFNAWY, M. M.; BELAL, F. A selective spectro-fluorimetric method for the determination of cephalosporins in biological fluids. **Anal. Lett.**, v. 29, p. 1-10, 1996.

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

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacéuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p. 113-164.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15 ed. Arlington, 1990. v.1, p.xvii.

ARSENE, M.; FAVETTA, P.; FAVIER, B.; BUREAU, J. Comparison of ceftazidime degradation in glass bottles and plastic bags under various conditions. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 27, p. 205-209, 2002.

AYAD, M. M.; SHALABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E.; ELSAID, H. M. Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of certain cephalosporins. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 975-983, 1999.

AYAD, M. M.; SHALABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E.; ELSAID, H. M. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins through oxidation with cerium (IV) and 1-chlorobenzotriazole. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, p. 557-564, 1999.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist. Updat.**, v. 9, n. 3, p. 142-156, 2006.

BAFELTOWSKA, J. J.; BUSZMAN, E.; MANDAT, K.; HAWRANEK, J. Determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 976, p. 249-254, 2002.

BARNARD, J. A.; CHAYEN, R. **Metodos modernos de analisis quimico**. Bilbao: Urmo, 1970. p. 75-83.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. In: Manual of clinical microbiology. **American Society for Microbiology**. Washington, DC, 1991. p. 1117-1125.

BASKARAN, N. D.; GAN, G. G.; ADEEBA, K.; SAM, I. C. Bacteremia in patients with febrile neutropenia after chemotherapy at a university medical center in Malaysia. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 23, 2007.

BETHEL, C. R.; HUJER, A. M.; HELFAND, M. S.; BONOMO, R. A. Exploring the effectiveness of tazobactam against ceftazidime resistant *Escherichia coli*: insights from the

comparison between susceptibility testing and beta-lactamase inhibition. **Microbiol Lett.**, v. 234, n. 1, p. 99-103, 2004.

BOSSO, J. A.; PRINCE, R. A.; FOX, J. L. Compatibility of ondasetron hydrochloride with fluconazole, ceftazidime, aztreona and cefazolin sodium under simulated Y-site conditions. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 51, p. 389-391, 1994.

BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução n.1, de 29 de julho de 2005. Aprova o regulamento técnico que trata do guia para a realização de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Brasília, 01 de agosto de 2005. Seção 1.

BRASIL, Leis, decretos, etc... Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1.

BRENT, A. J.; MATTHEWS, P. C.; DANCE, D. A.; PITT, T. L.; HANDY, R. Misdiagnosing melioidosis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 349-351, 2007.

BRITISH Pharmacopoeia 2005. London: The Stationary Office, 2005. v. 1, p. 396-398.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick & Adelberg's: medical microbiology.** 22<sup>nd</sup>. ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 144-175.

CASTANHEDA, P. G.; JULIEN, E.; FABRE, H. Cross validation of capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for cefotaxime and related impurities. **J. Chromatogr.**, v. 42, p. 159-164, 1996.

CAVALLO, J. D.; HOCQUET, D.; PLESIAT, P.; FABRE, R.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, n. 5, p. 1021-1024, 2007.



CHOI, C. C.; JOHNSON, C. E.; JACOBSON, P. A. Stability of tacrolimus and ceftazidime during simulated intravenous co-administration. **ASHP Midyear Clinical Meeting**, v. 32, p. 128E, 1997.

CLARIDGE, J. A.; EDWARDS, N. M.; SWANSON, J.; FABIAN, T. C.; WEINBERG, J. A.; WOOD, C.; CROCE, M. A. Aerosolized ceftazidime prophylaxis against ventilator-associated pneumonia in high-risk trauma patients: results of a double-blind randomized study. **Surg. Infect.**, v. 8, n. 1, p. 83-90, 2007.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Research Focus**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

COHEN, R. Antipyocyanic antibiotic therapy. Principles and efficacy factors. **Arch. Pediatr.**, v. 13, n. 1, p. 10-12, 2006.

CONIL, J. M.; GEORGES, B.; LAVIT, M.; LAGUERRE, J.; SAMII, K.; HOUIN, G.; SAIVIN, S. A population pharmacokinetic approach to ceftazidime use in burn patients: influence of glomerular filtration, gender and mechanical ventilation. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 22, 2007.

DEMOTES-MAINARD, F. M.; VINÇON, G. A.; JARRY, C. H.; ALBIN, H. C. Micromethod for determination of ceftriaxone in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 6, p. 407-413, 1988.

EAGYE, K. J.; KUTI, J. L.; NICOLAU, D. P. Evaluating empiric treatment options for secondary peritonitis using pharmacodynamic profiling. **Surg. Infect.**, v. 8, n. 2, p. 215-226, 2007.

EL-MAALI, N.A.; ALI, A. M. M.; GHANDOUR, M. A. Square-wave voltametric determination of cefoperazone in a bacterial culture, pharmaceutical drug, milk and urine. **Electroanalysis**, v. 52, p. 599-604, 1994.

EL-MAMMLI, M. Y. Spectrophotometric determination of flucoxacillin in pharmaceutical preparations some nitrophenols as a complexing agent. **Spectrochim. Acta**, v. 59, p. 771-776, 2003.

EL-WALILY, A. F. M.; GAZY, A. A.; SAIED, F. B.; KHAMIS, E. F. Quantitative determination of some thiazole cephalosporins through complexation with palladium (II) chloride. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 22, p. 385-392, 2000.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: an integrated approach. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 755-767, 2001.

EV, L. S. Estabilidade de medicamentos. In: GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.235-250.

FABRE, H.; BLANCHIN, M. D.; LERNER, D.; MANDROU, B. Determination of cephalosporins utilizing thin-layer chromatography with fluorescence detection. **Analyst**, v. 110, p. 775-779, 1985.

FALKOWSKI, A. J.; SILBER, Z. M. L. N. M. Determination of cefixime in biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 422, p. 145-152, 1987.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1, p.v.5.2.17.-v.5.2.17.-9, vi.1.9.-8.

FARMACOPEA de los Estados Unidos Mexicanos. 5. ed. México: 1988. p. 86.

FARMACOPÉIA Portuguesa. 6. ed. Lisboa: Imprensa Nacional, 2000. p.166-168.

FARRELL, C. D.; ROWELL, F. J.; CUMMING, R. H. A rapid fluorescence ELISA for ceftazidime. **Anal. Proc.**, v. 32, p. 205-206, 1995.

FDA. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations**. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1996.

FEIGL, F. **Spot tests in organic analysis**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company, 1966. p.384-386, 648-649.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 2. ed. Juiz de Fora, 2002. p. 479-492.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003. p. 155-218.

FOGG, A. G.; ABDALLA, M. A. Visible spectrophotometric determination of cephalosporins and penicillins by indophenol derivatization with and without alkaline degradation to ammonia. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 3, p. 315-321, 1985.

FOGG, A. G.; ABADÍA, M. A.; HENRIQUES, H. P. Titrimetric determination of the yield of sulphide formed by alkaline degradation of cephalosporins. **Analyst**, v. 107, p. 449-451, 1982.

FRANCO-VIDAL, V.; BLANCHET, H.; BEBEAR, C.; DUTRONC, H.; DARROUZET, V. Necrotizing External Otitis: A Report of 46 Cases. **Otol. Neurotol.**, v. 19, 2007.

GASPAR, A.; ANDRASI, M.; KARDOS, S. Application of capillary electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. **J. Chromatogr. B**, v. 775, p. 239-246, 2002.

GHELDRE, Y. D.; AVESANI, V.; BERHIN, C.; DELMÉE, M.; GLUPCZYNSKI, Y. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 591-597, 2003.

GIL, E. S. Métodos calorimétricos. In: GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Uniderp, 2005. p. 327-333.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de processos. In: GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Uniderp, 2005a. p. 43-54.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Estabilidade de fármacos e medicamentos. In: GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Uniderp, 2005b. p. 287-305.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals. **Research Focus**, v. 1, n. 5, p. 191-199, 1998.

GRAHAM, P.L. **Pharmaceutical Chemistry - An Introduction to Medicinal Chemistry**, British Library, 1995. p.201-202.

GRANNEMAN, G. R.; SENNELLO, L. T. A very high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of cefmenoxime, a new cephalosporin antibiotic, in plasma. **J. Chromatogr. B**, v. 229, p. 149-157, 1982.

GUITTON, J.; LAFFONT, A.; BRUZEAU, J.; ROCHET-MINGRET, L.; BONNEFOY, M.; BUREAU, J. Determination of ceftazidime in plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: application for individualizing dosage regimens in elderly patients. **J. Chromatogr. B**, v. 719, p. 151-157, 1998.

HALL, P. D.; YUI, D.; LYONS, S.; BOSSO, J. A. Compatibility of filgrastim with selected antimicrobial drugs during simulated Y-site administration. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 54, p. 185-189, 1997.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.) **Goodman & Gilman: the pharmacological basis of therapeutics**. 11<sup>th</sup>. ed. New York: McGraw Hill, 2006. p. 1206-1213.

HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2001. p. 224-260, 355-367, 434-526.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. **Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer**. New York: John Wiley & Chichester, 1994. p. 89-92.

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

HUANG, S. S.; LEE, S. C.; LEE, N.; SEE, L.C.; TSAI, M. H.; SHIEH, W.B. Comparison of in vitro activities of levofloxacin, ciprofloxacin, ceftazidime, cefepime, imipenem, and piperacillin-tazobactam against aerobic bacterial pathogens from patients with nosocomial infections. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, n. 2, p. 134-140, 2007.

INAGAKI, K.; GILL, M. A.; OKAMOTO, M. P.; TAKAGI, J. Stability of ranitidine hydrochloride with aztreonam, ceftazidime, or piperacillin sodium during simulated Y-site administration. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 49, p. 2769-2772, 1992.

ISLA, A.; GASCON, A. R.; MAYNAR, J.; ARZUAGA, A.; SANCHEZ-IZQUIERDO, J. A.; PEDRAZ, J. L. In vitro AN69 and polysulphone membrane permeability to ceftazidime and in vivo pharmacokinetics during continuous renal replacement therapies. **Chemotherapy.**, v. 53, n. 3, p. 194-201, 2007.

ISSOPOULOS, P. B. Analytical investigations of  $\beta$ -lactam antibiotics in pharmaceutical preparations. Spectrophotometric determination of cephalexin, cephradine, ampicillin and

amoxicillin using copper(II) acetate as a complexing agent. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 6, p. 321-327, 1988.

ISSOPOULOS, P. B. Analytical investigations of  $\beta$ -lactam antibiotics in pharmaceutical preparations. Spectrophotometric determination of some cephalosporins using paramolybdate anion. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, p. 619-625, 1989.

JAMIESON, C. E.; LAMBERT, P. A.; SIMPSON, I. N. In vitro activities of novel oxapenems, alone and in combination with ceftazidime, against Gram-positive and Gram-negative organisms. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, n. 8, p. 2615-2618, 2003.

JAWETZ, E. Penicilinas e cefalosporinas. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 518-527.

JEFFREY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel: Análise química quantitativa**. 5ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1992. p. 213-254, 314-325, 521-542, 597-608.

JOHNSON, V. M.; ALLANSON, J. P.; CAUSON, R. C. Determination of the cephalosporin antibiotic cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B**, v. 740, p. 71-80, 2000.

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

JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 795-809, 2002.

JUNGREIS, E. **Spot test analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p. 168, 201.

KALINKOVA, G. N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm.**, v. 187, p. 1-15, 1999.

KANDARAPU, R.; GROVER, V.; CHAWLA, H. P. S.; GARG, S. Evaluation of the compatibility of ketorolac tromethamine with selected polymers and common tablet excipients by thermal and isothermal stress testing. **S. T. P. Pharma Sciences.**, v. 11, n. 6, p. 449-457, 2001.

KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; SAIFON, P.; LAESRIPA, C.; KITPHATI, R.; MUNDY, L. M. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 29, 2007.

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

KITAMURA, S.; KODA, S.; MIYAMAE, A.; YASUDA, T.; MORIMOTO, Y. Dehydration effect on the stability of cefixime trihydrate. **Int. J. Pharm.**, v. 59, p. 217-224, 1990.

KODYM, A.; ZAWISZA, T.; NAPIERALA, B.; KUKULA, H. Influence of additives and storage temperature on physicochemical and microbiological properties of eye drops containing ceftazidime. **Acta Pol. Pharm.**, v. 63, n. 6, p. 507-513, 2006.

KORANY, M. A.; EL-SAYED, H. M. A.; GALAL, S. M. The applications of a new chromogenic and fluorescent reagent for cobalt(II). **Anal. Lett.**, v. 22, p. 619-622, 1989.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 46-50, 185-187.

KOROLKOVAS, A.; FERREIRA, E. I. Análise titulométrica em meio não-aquoso. **Rev. Port. Farm.** v. 36, n. 1. p.1-21, 1986.

LACHMAN, L.; DE LUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LAKINGS, D. B.; WOZNIAC, J. M. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of cefpimizole in plasma and urine. **J. Chromatogr.**, v. 308, p. 261-271, 1984.

LEITE, F. A fantástica titrimetria: titulação volumétrica. **Rev. Analytica**, v. 12, p. 30-34, 2004.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. p. 13-20.

MAIQUES, J. M.; DOMENECH, A.; CABELLOS, C.; FERNANDEZ, A.; RIBES, S.; TUBAU, F.; GUDIOL, F.; VILADRICH, P. F. Evaluation of antimicrobial regimens in a guinea-pig model of meningitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 4, p. 435-441, 2007.

MANDURU, M.; FARIELLO, A.; WHITE, R. L.; FOX, J. L.; BOSSO, J. A. Stability of ceftazidime sodium and teicoplanin sodium in a peritoneal dialysis solution. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 53, p. 2731-2734, 1996.

MARBLE, D. A.; BOSSO, J. A.; TOWNSEND, R. J. Stability of clindamycin phosphate with aztreonam, ceftazidime sodium, ceftriaxone sodium, or piperacillin sodium in two intravenous solutions. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 43, p. 1732-1736, 1986.

MARTIN, M. G. Encephalopathy with myoclonic jerks resulting from ceftazidime therapy: an under-recognized potential side-effect when treating febrile neutropenia. **Leuk. Lymphoma**, v. 48, n. 2, p. 413-414, 2007.



MARTINDALE: guía completa de consulta farmaco-terapéutica. 2<sup>nd</sup>. ed. Barcelona: Pharma Editores, 2006. p. 287-288.

MARTINEZ, L. G.; FALCÓ, P. C.; CABEZA, A. S. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 405-423, 2002.

MARUNAKA, T.; MATSUSHIMA, E.; MANIWA, M. Determination of cefodizime in biological materials by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 420, p. 329-339, 1987.

MASON, N. A.; JOHNSON, C. E.; O'BRIEN, M. A. Stability of ceftazidime and tobramycin sulfate in peritoneal dialysis solution. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 49, p. 1139-1142, 1992.

MATKOVIC, S. R.; VALLE, G. M.; GALLE, M.; BRIAND, L. E. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopia infrarroja. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 527-532, 2004.

MAYBAUER, M. O.; MAYBAUER, D. M.; FRASER, J. F.; TRABER, L. D.; WESTPHAL, M.; COX, R. A.; HUDA, R.; NAKANO, Y. Y.; ENKHBAATAR, P.; HAWKINS, H. K.; HERNDON, D. N.; TRABER, D. L. Ceftazidime improves hemodynamics and oxygenation in ovine smoke inhalation injury and septic shock. **Intensive Care Med.**, v. 15, 2007.

MESSERCHMIDT, W. Pharmazeutische Kompatibilität von ceftazidim und metronidazol. **Pharmazeutische Zeitung**, v. 135, p. 36-38, 1990.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

MOHAMED, G. G. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacillin, flucoxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 561-567, 2001.

MONTGOMERY, E. H. Antibióticos antibacterianos. In: YAGIELA, J. A.; NEIDLE, E. A.; DOWD, F. **Farmacologia e terapêutica para dentistas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 468-487.

MORELLI, B. First and second derivative spectrophotometric assay of mixtures of cefuroxime and cephalexin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 6, p. 199-209, 1988.

MORELLI, B. Derivative spectrophotometry in the analysis of mixtures of cefotaxime sodium and cefadroxil monohydrate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 257-267, 2003.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1972. 629 p.

MOUTON, J. W.; PUNT, N.; VINKS, A. A. Concentration effect relationship of ceftazidime explains why the static effect in vivo is 40% fT>MIC. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 18, p., 2007.

MOUTON, J. W.; VINKS, A. A. T. M. M.; PUNT, N. C. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 733-738, 1997.

MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.; SCHIEWE, J.; HARTI, A. Application of capillary zone electrophoresis in cephalosporin analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 690, p. 321-326, 1997.

MYERS, C. M.; BLUMER, J. L. Determination of ceftazidime in biological fluids by using high-pressure liquid chromatography. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 24, n.3, p.343-346, 1983.

NASCIMENTO, J. W. L.; OMOSAKO, C. E.; CARMONA, M. J.; AULER JUNIOR, J. O.; SANTOS, S. R. C. J. Micrométodo para quantificação de cefuroxima em plasma através da cromatografia líquida de alta eficiência. Aplicação na profilaxia de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 39, p. 265-272, 2003.

NAVARRO, P. G.; LAS PARRAS, P. J. M.; GARCIA, A. M. Reaction os sodium amoxicillin with Cu(II) ion in a methanolic medium. **J. Pharm. Sci.**, v. 80, n. 9, p. 904-907, 1991.

NEU, H. C. Cephalosporin antibiotics: molecules that respond to different needs. **The American Journal of Surgery**, v. 155, n. 1, p. 1-4, 1988.

NGUYEN, D. Q.; SIDEBOTTOM, R.; BATES, A. K. Microbial keratitis in keratoglobus-associated vernal keratoconjunctivitis and atopic dermatitis. **Eye Contact. Lens.**, v. 33, n. 2, p. 109-110, 2007.

NICHOLS, W. K. Antiinfeciosos. In: GENNARO, A. R. (Ed.) **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1584-1589.

NICKERSON, B.; CUNNINGHAM, B.; SCYPINSKI, S. The use of capillary electrophoresis to monitor the stability of a dual-action cephalosporin in solution. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 73-83, 1995.

NUDELMAN, N.E.S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. p.1-4

OH, E. J.; LEE, S.; PARK, Y. J.; PARK, J. J.; PARK, K.; KIM, S. I.; KANG, M. W.; KIM, B. K. prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. **J. Microbiol. Methods**, v. 54, p. 411-418, 2003.

OHANNESIAN, L.; STREETER, A. J. **Handbook of pharmaceutical analysis**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 87-149, 187-224)

OKAMOTO, Y.; ITOH, K.; NAMIKI, Y.; MATSUSHITA, J.; FUJIOKA, M.; YASUDA, T. Method development for the determination of cefdinir and this related substances by high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 739-748, 1996.

OZKAN, S. A.; ERK, N.; USLU, B.; YLMAZ, N.; BIRYOL, I. Study on electrooxidation of cephadroxil monohydrate and its determination by differential pulse voltametry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, p. 263-273, 2000.

PENNELL, A. T.; ALLINGTON, D. R.; CHANDLER, M. H. H. Effect of ceftazidime, cefotaxime, and cefoperazone on serum tobramycin concentrations. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 48, p. 520-522, 1991.

PEREIRA, O. A. **Substâncias farmacêuticas comerciais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Abiquif, 2002. p. 262.

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

PERILLI, M.; SEGATORE, B.; TAVIO, M.; SETACCI, D.; SELENZA, C.; DE SANTIS, F.; PELLEGRINI, C.; ROSSOLINI, G. M.; AMICOSANTE, G. In vitro selection and characterization of mutants in TEM-1-Producing *Escherichia coli* by ceftazidime and ceftibuten. **J. Chemother.**, v. 19, n. 2, p. 123-126, 2007.

PHELPS, R.; ZURLINDEN, E.; CONTE, J. E.; LIN, E. High-performance liquid chromatographic determination of cefonicid in human plasma, serum and urine. **J. Chromatogr. B**, v. 375, p. 111-118, 1986.

PICHICHERO, M. E. Use of selected cephalosporins in penicillin-allergic patients: a paradigm shift. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 3, p. 3-8, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 261-280.

PLASENCIA, V.; BORRELL, N.; MACIA, M. D.; MOYA, B.; PEREZ, J. L.; OLIVER, A. Mechanisms and dynamics of in vitro and in vivo resistance development to single or combined antipseudomonal agents: influence of high mutation rates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, 2007.

PUGH, J. Cinética e estabilidade de produtos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 112-123.

RAJA, N. S. Melioidotic septic arthritis: a case report and literature review. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, n. 2, p. 178-182, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 726-730.

REDDY, G. V. S.; REDDY, S. J. Estimation of cephalosporin antibiotics by differential pulse polarography. **Talanta**, v. 44, p. 627-631, 1997.

RIBEIRO FILHO, N. Agentes antimicrobianos. In: FERNANDES, A. T. (Ed.) **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 1485-1534.

RICHARDSON, B. L.; WOODFORD, J. D.; ANDREWS, G. D. Pharmacy of ceftazidime. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 8, p. 233-236, 1981.

RILEY, C. M.; ROSANSKE, T. W. **Development and validation of analytical methods**. London: Pergamon, 1996. v. 3, 352 p.

RIVERS, T.E.; WEBSTER, A.A. Stability of ceftizoxime sodium, ceftriaxone sodium and ceftazidime with metronidazole in ready-to-use metronidazole bags. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, n. 52, p. 2568-2570, 1995.

ROBERTS, J. A.; WEBB, S. A.; LIPMAN, J. Cefepime versus ceftazidime: considerations for empirical use in critically ill patients. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, n. 2, p. 117-128, 2007.

RODENAS, V.; GARCIA, M. S.; SANCHEZ-PEDRENO, C.; ALBERO, M. I. Spectrophotometric methods for the determination of cephadrine or ceftazidime in human urine using batch and flow-injection procedures. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p.1687-1693, 1997.

RODRIGUES, P. C. **Bioestatística**. Rio de Janeiro, Universitária, 1986. p. 98-100.

ROGER, P. D.; ARRUDA, E.; HAVERSTICK, D. M. Stability of vancomycin, gentamicin and ceftazidime in peritoneal dialysis solution. **ASHP Midyear Clinical Meeting**, v. 31, p. 32, 1996.

ROLINSON, G. N.; GEDDES, A. M. The 50<sup>th</sup> anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, p. 3-8, 2002.

SADER, H. S.; BHAVNANI, S. M.; AMBROSE, P. G.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Re-evaluation of the role of broad-spectrum cephalosporins against staphylococci by applying contemporary in-vitro results and pharmacokinetic-pharmacodynamic principles. **J. Chemother.**, v. 19, n. 1, p. 38-43, 2007.

SALEM, H.; ASKAL, H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck's salt. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 347-354, 2002.

SALEM, H.; SALEH, G. A. Selective spectrophotometric determination of phenolic  $\beta$ -lactam antibiotics. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1205-1213, 2002.

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

SCIACCHITANO, C. L.; MOPPER, B.; SPECCHIO, J. J. identification and separation of five cephalosporins by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 657, p. 395-399, 1994.

SENGUN, F. I.; ULAS, K.; FEDAI, I. Analytical investigations of cephalosporins-II. Polarographic behaviour of ceftriaxone, cefuroxime, cefotaxime and ceftizoxime and assay of their formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 3, p. 191-199, 1985.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; SILVA, A. C. G. Antibióticos e quimioterápicos. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 553-555.

SHARMA, P.; CHAWLA, H. P. S.; PANCHAGNULA, R. LC determination of cephalosporins in *in vitro* rat intestinal sac absorption model. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 27, p. 39-50, 2002.

SILVA, P. **Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1032-1039.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 200-210.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. v. 1, p. 292-316.

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

STEWART, G. M.; THORP, A.; BROWN, L. Perichondritis--a complication of high ear piercing. **Pediatr. Emerg. Care**, v. 22, n. 12, p. 804-806, 2006.

STRATEVA, T.; OUZOUNOVA-RAYKOVA, V.; MARKOVA, B.; TODOROVA, A.; MARTEVA-PROEVSKA, Y.; MITOV, I. Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 7, p. 956-963, 2007.

STROM, J.G.; FOX, J.L.; WARD, E.S. Compatibility and stability of ranitidine and ceftazidime. **ASHP Midyear Clinical Meeting**, v. 27, p. 506E, 1992.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14<sup>th</sup>. ed. Whitehouse Station: Merck & Co., Inc., 2006. p. 321.

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

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 429-446.

TONNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 225, p. 1-14, 2001.

USP 29. The United States Pharmacopeia. Rockville: USP Convention, 2006. p.434-436, 2572.

VADAS, E. B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENNARO, A. R. (Ed.) **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1022-1031.



VENTURA, N.; SOUZA, A. A.; KOROLKOVAS, A. Doseamento das penicilinas pelo método iodométrico. **Rev. Port. Farm.**, v. 39, p. 9-15, 1989.

YANG, J. H.; ZHOU, G. J.; JIE, N. Q.; HAN, R. J.; LIN, C. G.; HU, J. T. Simultaneous determination of cephalexin and cephadroxil by using the coupling technique of synchronous fluorimetry and H-point standard additions method. **Anal. Chim. Acta**, v. 325, p. 195-200, 1996.

WATERMAN, K. C.; ADAMI, R. C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **Int. J. Pharm.**, v. 293, p. 101-125, 2005.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis**. London: Churchill Livingstone, 1999. p. 75-96, 237-276.

WOOTEN, M. D.; PANWALKER, A. P. Septic arthritis caused by burkholderia pseudomallei: case report and review of the literature. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 7, n. 4, p. 242-247, 2001.

ZAJAC, M.; JELINSKA, A.; DOBROWOLSKI, L.; OSZCZAPOWICZ, I. Evaluation of stability of cefuroxime in solid state. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 1181-1187, 2003

ZIVANOVIC, L.; IVANOVIC, I.; VLADIMIROV, S.; ZECEVIC, M. Investigation of chromatographic conditions for the separation of cefuroxime axetil and its geometric isomer. **J. Chromatogr. B**, v. 800, p. 175-179, 2004.

ZHOU, M.; NOTARI, R. E. Influence of pH, temperature, and buffers on the kinetics of ceftazidime degradation in aqueous solutions. **J. Pharm. Sci.**, v. 84, p. 534-538, 1995.

ZUHRI, A. Z. A.; RADY, A. H.; EL-SHAHAWI, M. S.; AL-DHAHERI, S. Spectrophotometric determination of ampicillin by ternary complex formation with 1,10-phenantroline and copper(II). **Microchem J.**, v. 50, p. 111-115, 1994.