



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CEFOXITINA SÓDICA EM
INJETÁVEIS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

GREICI CRISTIANI GOMES TOZO

ARARAQUARA - SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CEFOXITINA
SÓDICA EM INJETÁVEIS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

GREICI CRISTIANI GOMES TOZO

ARARAQUARA - SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CEFOXITINA
SÓDICA EM INJETÁVEIS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

ORIENTADA: GREICI CRISTIANI GOMES TOZO

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

ORIENTADORA: Prof. Dr. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA - SP

2007

Ficha Catalográfica

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

T757a Tozo, Greici Cristiani Gomes
Análise qualitativa e quantitativa de cefoxitina sódica em injetáveis:
desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo de estabilidade. /
Greici Cristiani Gomes Tozo. – Araraquara, 2007.
229 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.Cefoxitina. 2.Validação. 3.Espectrofotometria. 4.CLAE I.Salgado,
Hérica Regina Nunes, orient..II. Título.

CDD: 615.1

CAPES: 40300005

RESUMO

A cefoxitina sódica (CAS 33564-30-6), antimicrobiano cefalosporínico, apresenta espectro de atividade contra microrganismos Gram-negativos mais amplo que as cefalosporinas mais antigas. Também é eficaz contra *Proteus* e *Serratia* indol-positivos, mostrando alta resistência à hidrólise por β -lactamases. Indicada no tratamento de peritonites e outras infecções intra-abdominais e intrapélvicas; sinusites, infecções ginecológicas, septicemias; endocardites; infecções do trato urinário, gonorréia não complicada, infecções do trato respiratório, ossos, articulações e pele. Apesar de este fármaco ser altamente estudado e pesquisado no que concerne à atividade antimicrobiana, farmacocinética e farmacodinâmica, há poucos estudos na literatura em relação ao desenvolvimento de metodologia analítica para esta cefalosporina. Desta forma, pesquisas envolvendo métodos analíticos são de fundamental importância e altamente relevantes para otimizar sua análise na indústria farmacêutica e farmácia magistral de modo a garantir a qualidade do produto já comercializado. A proposta deste projeto foi desenvolver metodologias de análise para a cefoxitina sódica, fármaco comercializado no mercado médico-farmacêutico brasileiro. Foram desenvolvidos e validados métodos por CLAE com detector UV a 235 nm, com acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1) como fase móvel e faixa de concentração de 20,0 à 30,0 $\mu\text{g/mL}$, tempo de retenção de 7,5 minutos. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9995 e a equação da reta $y = 335,67x + 2391,9$. O teste recuperação média obtido foi de 100,50%, com desvio padrão de 1,70%. O teor médio de cefoxitina sódica determinado por CLAE nos frascos ampolas foi de 94,24%, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa nos frascos

ampolas.; por espectrofotometria no UV a 235 nm com faixa de concentração de 18,0 à 28,0 µg/mL mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9997 e equação da reta $y = 0,0297x + 0,0341$. . Obtivemos neste teste recuperação média de 100,40% com desvio padrão de 0,3%. O teor médio de cefoxitina sódica determinado nos frascos ampolas foi de 97,60%; e doseamento microbiológico utilizando *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12226 como microrganismo indicador apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9998. A equação da reta foi $y = 13,935x - 3,712$. O teste de recuperação apresentou média de 100,20% com desvio padrão de 0,81%. Também foram validados doseamento por titulometria em meio não aquoso (anidrovolumetria) com ácido perclórico 0,1 M utilizando cristal violeta como indicador, obtendo teor médio das amostras de 97,17% e recuperação média de 99,41%; e doseamento por titulometria iodométrica com tiosulfato de sódio 0,02 M, apresentando baixo custo em instrumentação e facilidade de execução em laboratórios de rotina. Para o teste de recuperação foi encontrada média 100,66% com desvio padrão médio de 0,55%; paralelamente foi realizado estudo de estabilidade de 12 meses a $30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; $75,0 \pm 5,0\%$ UR aplicando para a determinação do teor os métodos validados por CLAE e doseamento microbiológico, permitindo a comparação com sucesso das duas metodologias de análise validadas.

Palavras-chave: cefoxitina, validação, espectrofotometria, CLAE, iodometria, anidrovolumetria, doseamento microbiológico, análise qualitativa.

ABSTRACT

Sodium cefatoxin (CAS 33564-30-6), a cephalosporinic antibiotic, has a wider spectrum of activity against Gram-negative microorganisms than older cephalosporin. It is also efficient against the indol-positive *Proteus* and *Serratia* and has a high resistance to β -lactamases hydrolysis. Sodium cefatoxin is recommended for the treatment of peritonitis and other intra-abdominal and intra-pelvic infections; sinusitis, gynecological infections, septicemia, endocarditis; urinary tract infections, non-complicated gonorrhoea, respiratory tract infections, bones, articulations and skin. Although this drug has been strongly studied and many researches have been developed about its antibiotics activity, pharmacokinetics and pharmacodynamics, there are few studies in the literature about the development of analytical methodology to this cephalosporin. Researches dealing with analytical methods are extremely important and highly relevant to optimize its analysis at the pharmaceutical industry and manipulation pharmacy, guaranteeing quality of the commercialized product. This project proposes the development of methodologies for analysis of sodium cefatoxin, a commercialized drug at the medical-pharmaceutical Brazilian market. Methods for CLAE with UV detector at 235nm were developed and validated with acetonitrile: water: acetic acid 5M (22: 78:1) as mobile phase and concentration range of 20.0 to 30.0 $\mu\text{g/mL}$, detention time of 7.5 minutes. The correlation coefficient obtained was 0.9995 and the line equation $y = 335.67x + 2391.9$. The medium recovery test was 100.50% with standard deviation of 1.70%. The medium content of sodium cefoxitin determined by CLAE in flask bottles was 94.24%, demonstrating the method sensibility to detect the active substance in

flask bottles; by spectrophotometry on the UV at 235 nm with concentration range of 18.0 to 28.0 $\mu\text{g/mL}$, it was linear, presenting a correlation coefficient of 0.9997 and the line equation was $y = 0.0297x + 0.0341$. At this test we obtained medium recovery of 100.40% with standard deviation of 0.3%. The medium content of sodium cefoxitin determined in the flask bottles was 97.60%; and microbiological dosage using *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12226 as indicator microorganism presenting correlation coefficient of 0.9998. The line equation was $y = 13.935x - 3.712$. The medium recovery test was 100.20% with standard deviation of 0.81%. It was validated the dosage by titulometry in a non aqueous medium (anhidrovolumetry) with perchloric acid 0.1M using violet crystal as indicator, obtaining a medium sample content of 97.17% and medium recovery of 99.41%; and also the dosage by iodometric titulometry with sodium tiosulphate 0.02M, presenting a low instrumentation cost and being easily performed at a routine laboratory. At the recovery test it was found an average of 100.66% with a medium standard deviation of 0.55%; the study of 12 months stability was also carried at $30.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$; $75.0 \pm 5.0\%$ UR and applied methods of validation by CLAE and dosage microbiological to determination of content. This allowed successful comparisons between the two methodologies analysis validated.

Key-words: cefoxitin; validation; spectrophotometry; CLAE; iodometry; anhidrovolumetry; microbiological dosage; quantitative analysis.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xx
LISTA DE TABELAS.....	xxiv
1. Introdução.....	01
2. Revisão bibliográfica.....	10
2.1. Classificação.....	11
2.2. Estrutura.....	12
2.3. Mecanismo de ação.....	13
2.4. Resistência.....	13
2.5. Faixa de atividade.....	14
2.6. Espectro de atividade e uso clínico.....	15
2.7. Contra-indicações/precauções.....	16
2.7.1. Alergia e risco de hipersensibilidade.....	16
2.7.2. Uso durante gestação.....	17
2.7.3. Uso durante a lactação.....	17
2.8. Efeitos colaterais.....	17

2.8.1. Reações gastrointestinais.....	18
2.8.2. Reações cutâneas.....	18
2.8.3. Reações locais.....	18
2.8.4. Reações de hipersensibilidade.....	19
2.8.5. Reações sorológicas.....	19
2.8.6. Reações hematológicas.....	20
2.8.7. Nefrotoxicidade.....	20
2.9. Interações gastrintestinais.....	20
2.10. Outras interações.....	21
2.11. Considerações gerais.....	22
2.12. Absorção, metabolismo e excreção.....	25
2.13. Vias de administração e dose habitual.....	26
2.14. Métodos de análise.....	28
2.15. Estabilidade.....	33
2.16. Qualidade de produtos farmacêuticos.....	41
3. Objetivos.....	45
4. Descrição.....	46
4.1. Substância química de referência.....	47
4.2. Forma farmacêutica.....	47
5. Análise qualitativa.....	49
5.1. Caracteres físicos.....	49
5.1.1. Material e métodos.....	49
5.1.2. Resultados.....	49
5.2. Solubilidade.....	49

5.2.1. Material e métodos.....	49
5.2.2. Resultados.....	50
5.3. Determinação da faixa de fusão.....	53
5.3.1. Material e métodos.....	53
5.3.2. Resultados.....	53
5.4. Determinação de umidade.....	54
5.4.1. Material e métodos.....	54
5.4.2. Resultados.....	54
5.5. Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho.....	56
5.5.1. Material e métodos.....	56
5.5.2. Resultados.....	56
5.6. Resíduo pela incineração.....	61
5.6.1. Material e métodos.....	61
5.6.2. Resultados.....	61
5.7. Análise térmica.....	63
5.7.1. Material e métodos.....	65
5.7.2. Resultados.....	66
5.8. Espectrofotometria na região ultravioleta.....	68
5.8.1. Material e métodos.....	68
5.8.2. Resultados.....	68
5.8.2.1. Em hidróxido de sódio 0,1 <i>M</i>	68
5.8.2.2. Em ácido clorídrico 0,1 <i>M</i>	70
5.8.2.3. Em água purificada.....	72
5.8.2.4. Em metanol.....	73

6. Análise quantitativa.....	77
6.1. Material.....	77
6.1.1.Equipamentos.....	77
6.1.2.Solventes, matérias-primas e reagentes.....	78
6.1.3. Microrganismos.....	80
7. Espectrofotometria na região de ultravioleta.....	81
7.1. Considerações.....	81
7.1.1. Método.....	82
7.1.2. Realização da curva de Ringbom.....	83
7.1.3. Obtenção da curva analítica.....	86
7.1.4. Determinação de cefoxitina na forma farmacêutica.....	89
7.1.4.1. Preparo da solução de cefoxitina substância de referência.....	89
7.1.4.2. Determinação do peso médio.....	90
7.1.4.3. Preparo da amostra.....	91
7.1.4.3. Cálculo.....	93
7.1.5. Teste de recuperação.....	95
7.1.5.1. Preparo das soluções.....	95
7.1.5.2. Cálculo de teste de recuperação.....	97
7.1.6.Análise estatística.....	98
7.1.7. Discussão.....	100
8. Método de análise microbiológica.....	103
8.1. Considerações gerais.....	103
8.2. Método.....	103
8.3. Execução do ensaio.....	105

8.3.1. Preparo das soluções-padrão de cefoxitina sódica.....	106
8.3.2. Preparo das soluções de cefoxitina na forma farmacêutica.....	106
8.4. Material.....	107
8.5. Preparo do inóculo.....	107
8.6. Ensaio.....	108
8.6.1. Cálculos.....	110
8.6.2. Análise estatística.....	114
8.7. Teste de recuperação.....	115
8.7.1. Preparo das soluções.....	116
8.7.2. Cálculo do teste de recuperação.....	119
8.8. Discussão.....	120
9. Titulometria iodométrica.....	123
9.1. Considerações gerais.....	123
9.2. Preparo das soluções.....	125
9.2.1. Solução de NaOH 0,1 M.....	125
9.2.2. Solução de HCl 0,1 M.....	125
9.2.3. Tiosulfato de sódio 0,02 M.....	125
9.2.3.1. Padronização.....	125
9.2.4. Solução de iodo 0,01 M.....	126
9.2.4.1. Padronização.....	127
9.2.5. Tampão acetato.....	128
9.2.6. Solução amido SI.....	128
9.3. Método.....	128
9.4. Determinação de cefoxitina nas amostras.....	129

9.5. Teste de recuperação.....	131
9.5.1. Preparo das amostras.....	132
9.5.2. Cálculo do teste de recuperação.....	133
9.6. Discussão.....	135
10. Titulometria em meio não aquoso.....	136
10.1. Considerações gerais.....	136
10.2. Preparo das soluções.....	137
10.2.1. Solução de HClO ₄	137
10.2.1.1. Padronização.....	137
10.2.2. Solução cristal violeta SI.....	138
10.3. Método.....	138
10.4. Determinação de cefoxitina nas amostras.....	139
10.5. Teste de recuperação.....	142
10.5.1. Preparo das amostras.....	142
10.5.2. Cálculo do teste de recuperação.....	143
10.6. Discussão.....	144
11. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	146
11.1. Considerações gerais.....	146
11.2. Método.....	146
11.3. Obtenção da curva analítica.....	152
11.4. Análise estatística.....	155
11.5. Determinação de cefoxitina nas amostras.....	157
11.5.1. Preparo da solução de cefoxitina substância de referência.....	157
11.5.2. Preparo da amostra.....	158

11.5.3. Cálculo.....	159
11.6. Teste de recuperação.....	161
11.6.1. Preparo das soluções.....	161
11.6.2. Cálculo do teste de recuperação.....	163
11.7. Discussão.....	164
12. Estabilidade.....	167
12.3. Estudo de estabilidade.....	167
12.4. Materiais e métodos.....	169
12.5. Resultados.....	168
12.6. Conclusões.....	170
13. Conclusões gerais.....	177
14. Referências bibliográficas.....	183

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvência
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUFS	<i>Absorbance units of full scale</i> (unidades de absorvência em escala cheia)
CAS	<i>Chemical Abstract System</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CV%	Coefficiente de variação percentual
DCB	Denominação comum brasileira
DCI	Denominação comum internacional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Termogravimetria derivada
DTG	Curva de termogravimetria
e.p.m.	Erro padrão da média
GL	Graus de liberdade
IV	Infravermelho
LC	Limite de confiança
NCM	Nomenclatura Comum Mercosul
r	Coefficiente de correlação de Pearson
R _f	Fator de retenção
s	Desvio padrão
t máx	Tempo de concentração máxima
t _{0,5}	Meia-vida
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

x	Média
λ	Comprimento de onda
ε	Absortividade molar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da cefoxitina sódica.....	46
Figura 2: Espectro na região de infravermelho de cefoxitina sódica substância de referência em dispersão de KBr.....	57
Figura 3: Espectro na região de infravermelho de cefoxitina sódica amostra em dispersão de KBr.....	58
Figura 4: Espectro na região de infravermelho de cefoxitina sódica padrão British Pharmacopoeia, 2005.....	59
Figura 5: Curva TG e DTA de cefoxitina sódica sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90,0 mL/min), razão de aquecimento: 20,0°C /minuto.....	67
Figura 6: Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra à 20,0 µg/mL em NaOH 0,1 M.....	69
Figura 7: Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância de referência de à 20,0 µg/mL em NaOH 0,1 M.....	70
Figura 8: Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra a 20,0 µg/mL em HCl 0,1 M.....	71

Figura 9: Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência a 20,0 µg/mL em HCl 0,1 M.....	71
Figura 10: Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra à 20,0 µg/mL em água purificada.....	72
Figura 11: Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência a 20,0 µg/mL em água purificada.....	73
Figura 12: Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra à 20,0 µg/mL em metanol.....	74
Figura 13: Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência a 20,0 µg/mL em metanol.....	74
Figura 14: Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra à 20,0 µg/mL em metanol, água purificada, NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M a concentração de 20,0 µg/mL.....	76
Figura 15: Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência em metanol, água purificada, NaOH 0,1 M e HCl 0,1 a concentração de 20,0 µg/mL.....	76
Figura 16: Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância de referência a 20,0 µg/mL em água purificada.....	83
Figura 17: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de cefoxitina sódica substância de referência de 2,0 à 36,0	86

$\mu\text{g/mL}$	
Figura 18: Representação gráfica da curva analítica da solução de cefoxitina sódica pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 235 nm.....	89
Figura 19: Preparação das soluções-substância de referência utilizada no método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.....	90
Figura 20: Preparação das soluções-amostra utilizada no método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.....	92
Figura 21: Representação gráfica da curva analítica de cefoxitina sódica através do ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.....	110
Figura 22: Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P ₁ (50 $\mu\text{g/mL}$); P ₂ (100 $\mu\text{g/mL}$); P ₃ (200 $\mu\text{g/mL}$) e A ₁ (50 $\mu\text{g/mL}$); A ₂ (100 $\mu\text{g/mL}$); A ₃ (200 $\mu\text{g/mL}$).....	111
Figura 23: Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P ₁ (50 $\mu\text{g/mL}$); P ₂ (100 $\mu\text{g/mL}$); P ₃ (200 $\mu\text{g/mL}$) e A ₁ (50 $\mu\text{g/mL}$); A ₂ (100 $\mu\text{g/mL}$); A ₃ (200 $\mu\text{g/mL}$).....	112
Figura 24: Cromatograma obtido por CLAE para solução de cefoxitina sódica amostra (A) e substância de referência (B) (24,00 $\mu\text{g/mL}$, $t_r = 7.5\text{min}$).....	147
Figura 25: Representação gráfica da curva analítica da solução de cefoxitina sódica em concentrações de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ à 30,0 $\mu\text{g/mL}$ através de CLAE	150
Figura 26: Representação gráfica da curva analítica da solução de cefoxitina sódica em concentrações de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ à 30,0 $\mu\text{g/mL}$ através de CLAE.....	155

concentrações de 20,0 µg/mL à 30,0 µg/mL através de CLAE.....	
Figura 27: Preparação das soluções-substância de referência utilizada no método por CLAE para cefoxitina sódica substância de referência e amostra.....	158
Figura 28: Estudo de estabilidade de cefoxitina sódica ($30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; $75,0 \pm 5,0\%$ UR).....	174
Figura 29: Cinética de reação de ordem zero de cefoxitina sódica determinadas pelo método CLAE e doseamento micrológico.	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Algumas cefalosporinas usadas por via oral classificadas por geração, forma farmacêutica e amplitude posológica.....	26
Tabela 02: Algumas cefalosporinas parenterais classificadas por geração, vias de administração e amplitude posológica.....	27
Tabela 03: Solubilidade da cefoxitina sódica em diferentes solventes a 25,0°C.....	51
Tabela 04: Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade para determinações feitas à temperatura de 25,0°C (FARM. BRAS., 1988).....	52
Tabela 05: Valores de ponto de fusão obtidos para cefoxitina sódica.....	53
Tabela 06: Umidade da cefoxitina sódica determinada pelo método gravimétrico.....	55
Tabela 07: Absorção de cefoxitina sódica espectro de infravermelho em dispersão de KBr.....	60
Tabela 08: Resíduo de cefoxitina sódica determinado pelo método gravimétrico.....	62
Tabela 09: Obtenção da curva de Ringbom de cefoxitina sódica através de espectrofotometria no ultravioleta a 235 nm.....	85
Tabela 10: Preparo da curva padrão de cefoxitina sódica através de espectrofotometria no ultravioleta a 235 nm.....	87

Tabela 11: Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.....	88
Tabela 12: Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000,0 mg de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.....	94
Tabela 13: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm...	96
Tabela 14: Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica injetáveis através do método espectrofotométrico na região UV a 235 nm.....	98
Tabela 15: Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.....	99
Tabela 16: Parâmetros analíticos utilizados na determinação de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.....	100
Tabela 17: Parâmetros utilizados para a avaliação de cefoxitina sódica por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas.....	104
Tabela 18: Parâmetros fixados na padronização de cefoxitina sódica no ensaio microbiológico – método difusão em ágar – cilindros em placa.....	105

Tabela 19: Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de cefoxitina sódica pelo ensaio microbiológico através do método difusão em ágar – técnica cilindros em placas.....	109
Tabela 20: Valores experimentais obtidos para o doseamento de cefoxitina sódica através do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa.....	113
Tabela 21: Análise da variância dos dados obtidos no doseamento de cefoxitina sódica pelo ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa.....	115
Tabela 22: Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de cefoxitina sódica no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa.....	118
Tabela 23: Valores experimentais do teste de recuperação obtidos em amostras de cefoxitina sódica em frascos ampolas, através do ensaio microbiológico, método difusão em ágar – cilindros em placas.....	120
Tabela 24: Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica através de iodometria.....	131
Tabela 25: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método de iodometria.....	133
Tabela 26: Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica injetáveis através de iodometria.....	134
Tabela 27: Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica através de titulometria em meio não aquoso.....	140

Tabela 28: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método de titulometria em meio não aquoso.....	143
Tabela 29: Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica injetáveis através de titulometria não aquosa.....	144
Tabela 30: Parâmetros analíticos utilizados na determinação de cefoxitina sódica através do método por CLAE.....	148
Tabela 31: Condições cromatográficas utilizadas na adequação de método por CLAE.....	151
Tabela 32: Obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica em concentrações de 20,0 µg/mL à 30,0 µg/mL através de CLAE.....	153
Tabela 33: Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através de CLAE.....	154
Tabela 34: Análise da variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através de CLAE.....	156
Tabela 35: Parâmetros analíticos utilizados na determinação de cefoxitina sódica através de CLAE.....	157
Tabela 36: Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica através de CLAE.....	159
Tabela 37: Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método por CLAE.....	162

Tabela 38: Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica injetáveis através de CLAE..... 164

Tabela 39: Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica submetidas a estudo de estabilidade através de CLAE..... 172

Tabela 40: Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica submetidas a estudo de estabilidade através do doseamento microbiológico..... 173

1. Introdução

Dentre os diferentes processos que levaram à descoberta de fármacos, o “acaso” representando fatores circunstanciais, fortuitos, permitiu que algumas classes terapêuticas importantes fossem descobertas.

Os antibióticos autênticos fármacos “salva-vidas” observaram um desenvolvimento ímpar desde a descoberta da penicilina-G – um dos mais importantes exemplos da contribuição do “acaso” para a descoberta de novos fármacos (BARREIRO e FRAGA, 2000).

Graças a uma série de fatores fortuitos e à sagacidade de Sir Alexander Fleming, então Diretor do Departamento de Inoculação do Hospital St. Mary em Paddington Londres, a ação antibiótica da penicilina-G foi reconhecida por volta de 1930, embora tenha sido descoberta em 1896 pelo estudante francês de medicina Erne Duchesne. Provavelmente, devido à sua instabilidade química, os químicos da época não lograram caracterizá-la estruturalmente (BARREIRO e FRAGA, 2000).

Alguns poucos relatos existiam na literatura da época de Fleming sobre a propriedade antimicrobiana de fungos; entretanto, ainda não haviam sido comprovadas suas propriedades terapêuticas. Em setembro de 1928, ao retornar de férias, Fleming recebia um visitante em seu laboratório, quando observou algumas placas de cultura esquecidas sobre sua bancada, ao invés de estarem acomodadas no incubador térmico. Estas placas apresentavam-se contaminadas, com reduzido crescimento de colônias de estafilococos que haviam sido semeados no início do verão. Esta observação fortuita despertou a sagacidade

de Fleming, que, após tratar a placa contaminada com uma solução de formaldeído, para preservá-la, guardou-a. A posterior constatação de que contaminante era um fungo do gênero *Penicillum* foi realizada consultando o laboratório de vacinas no andar superior.

A observação da inibição do crescimento das cepas de estafilococos e o reconhecimento da presença de metabólitos do fungo *Penicillum notatum* com propriedades antibacterianas, conduziram Fleming à identificação da penicilina, sendo seu trabalho completo sobre o tema publicado em 1932. Talvez devido às inúmeras dificuldades de isolamento do princípio ativo puro, a importância terapêutica da penicilina não foi reconhecida nem por Fleming nem pelos membros da Royal Society. Alguns anos após, por volta de 1940, o processo de isolamento da penicilina foi finalmente desenvolvido por Sir Ernst Chain e Lord Hovvard Florey, em Oxford, estimulados pela então recente descoberta do prontossil, em 1935. No ano seguinte, dispendo da substância isolada, as propriedades antibacterianas da penicilina foram comprovadas em animais de laboratório, evidenciando efeitos adversos causados pela presença de impurezas. Ainda neste ano, Edward Abraham purificou a penicilina cromatograficamente e demonstrou suas propriedades antimicrobianas por injeção endovenosa em ratos. Estes resultados foram publicados, e os estudos clínicos com voluntários se iniciaram, confirmando sua instabilidade ao suco gástrico e sua rápida eliminação renal. Estes estudos contribuíram decisivamente para o conhecimento de sua melhor forma de administração, que permitiu a sua primeira utilização em fevereiro daquele ano (BARREIRO e FRAGA, 2000).

No verão de 1943, nos laboratórios da Universidade de Oxford, Sir Robert Robinson e colaboradores elucidaram a estrutura da penicilina-G, viabilizando sua síntese. A produção de penicilina por rota fermentativa foi desenvolvida, o que permitiu seu amplo emprego terapêutico cerca de 12 anos após a identificação de suas propriedades na colônia

de fungo, validando a antiga premissa de Pasteur: “*La vie empeche la vie*”, que fundou as bases da quimioterapia.

A descoberta da penicilina-G rendeu a Sir A. Fleming, Sir Ernst Boris Chain e Lord Howard Walter Florey o Prêmio Nobel de Medicina em 1945. Graças à descoberta da penicilina iniciou-se a “antibioticoterapia”, que teve significativo impacto para o aumento da esperança e da qualidade de vida de homens e mulheres em todo mundo e, conseqüentemente, para a saúde da humanidade (BARREIRO e FRAGA, 2000).

A penicilina-G foi a primeira representante da importante classe dos antibióticos β -lactâmicos, em que encontram também as cefalosporinas. Atualmente, esta classe de antibióticos se encontra entre os fármacos mais comercializados no mundo, comprovando sua excepcional importância terapêutica.

Inúmeros outros antibióticos, descobertos a partir de então por *screening* randômico, manifestam suas propriedades através de diversos mecanismos de ação, distintos daquele pelo qual atuam os β -lactâmicos, que são inibidores da “biossíntese” da membrana celular externa de microrganismos (BARREIRO e FRAGA, 2000).

O mecanismo de ação atualmente aceito para os antibióticos β -lactâmicos, consiste na inibição da atividade D-alanina carboxipeptidase (DD-Cbase) do microrganismo, prevenindo a inserção da unidade dipeptídica D-Ala-D-Ala na etapa final da construção de sua membrana celular externa. A unidade β -lactâmica, eletrofilicamente reativa, é essencial e participa levando à formação de ligações covalentes, provavelmente irreversíveis.

As bases moleculares deste mecanismo foram elucidadas por Blumberg e Strominger em 1974, que evidenciaram a similaridade estrutural entre a penicilina-G e o

término D-alanil-D-alanina do peptidoglicano da membrana de microrganismos susceptíveis (BARREIRO e FRAGA, 2000).

Em função de sua natureza peptóide, as penicilinas de primeira geração não resistiam à acidez do trato gastrointestinal, sendo inativadas quando administradas por via oral. Entretanto, subseqüentes modificações estruturais ou identificação de outras estruturas β -lactâmicas em outros fungos levaram às novas gerações de antibióticos β -lactâmicos que são ativos quando administrados por via oral, como ilustrado pela tienamicina, derivado da classe dos carbapenenos isolado de fungo, onde o átomo de enxofre não mais compõe o núcleo tiazolidínico, sendo substituído por um grupamento metilênico (KOROLKOVAS, 1982).

A história da penicilina-G é um exemplo da possibilidade de “domesticar-se” a estrutura química natural, “selvagem”, após identificarem-se os principais grupamentos responsáveis pela atividade terapêutica, *o grupamento farmacofórico*, de maneira a superar-se as eventuais limitações da fase farmacocinética e introduzir-se novas características estruturais que potencializem sua eficácia terapêutica (BARREIRO e FRAGA, 2000).

A estrutura original da penicilina-G foi significativamente modificada, de forma planejada, levando a novas gerações de potentes antibióticos β -lactâmicos sintéticos com amplo espectro de ação e ativos por via oral, simultaneamente, no Japão e nos Estados Unidos, no âmbito de um *screening* planejado para identificar-se, de fontes naturais, compostos β -lactâmicos. Esta nova classe de antibióticos, estruturalmente simplificados, em relação às penicilinas originais, foi modificada de maneira a introduzirem-se características estruturais capazes de permitir atividade em cepas de microrganismos resistentes à penicilina que possuem a enzima β -lactamase, uma peptidase, responsável pela

hidrólise do *grupamento farmacofórico* β -lactâmico, bioinativando o antibiótico (BARREIRO e FRAGA, 2000).

As cefalosporinas são antibióticos β -lactâmicos clássicos que apresentam as mesmas características estruturais das penicilinas (SILVA, 2002). Possuem a mesma estrutura β -lactamadiidrotiazínica contendo dois centros quirais. Assim, existem quatro formas opticamente ativas. Os anéis condensados não são coplanares, porém dobrados ao longo da ligação C-6, N-5, mas de forma menos acentuada que nas penicilinas. O átomo de carbono ligado à amida (C-7) possui configuração L (WILSON e GISVOLD, 1998; WILLIANS e LENKE, 2002).

As propriedades físico-químicas das cefalosporinas são muito semelhantes à das penicilinas, por exemplo, maior parte das cefalosporinas são encontradas na forma de sais hidrossolúveis ou anfóteros. Somente a cefalosporina C é encontrada na natureza, isolada de culturas de fungos, particularmente de espécies de *Cephalosporium*. Em 1966, Woodward e sua equipe desenvolveram o primeiro processo de síntese química integral da cefalosporina C. A descoberta do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), como produto de hidrólise da cefalosporina C, levou à introdução de diversas cefalosporinas melhoradas, obtidas por modificações moleculares nas duas cadeias laterais: a 7-acilamida e a 3-acetoximetila. Variações na primeira cadeia são realizadas através do mesmo processo empregado na preparação de penicilinas semi-sintéticas, mas o método compreende acetilação por cloretos de acila (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988; WATSON, 1999).

Foram sintetizadas cefalosporinas em que o S do anel diidrotiazínico foi modificado ou substituído por oxigênio ou metileno, na mesma posição 1 ou na posição 2. A atividade

antibacteriana destes análogos nucleares é semelhante à das cefalosporinas correspondentes. Isso comprova que o átomo de enxofre não é essencial à atividade antibiótica nas cefalosporinas. Ademais, o grupo carboxílico foi substituído pelo tetrazolílico, que é isómero do primeiro; a atividade permaneceu e o novo antibiótico se mostrou resistente à β -lactamase (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982; DONOWITZ, 1989).

As cefalosporinas encontram aplicação no tratamento de infecções causadas pela maioria dos cocos Gram-positivos e muitas bactérias Gram-negativas, especialmente *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella* (MANDELL e PETRI, 1996). Elas são ineficazes contra infecções causadas por *Pseudomonas* e a maioria das espécies indol-positivas de *Proteus* e *Enterobacter*. As cefalosporinas podem ser inativadas pela enzima EC 3.5.2.8., chamada cefalosporina amido- β -lactama hidrolase, que é capaz de cindir o anel β -lactâmico. A esta β -lactamase, as cefalosporinas, em sua maioria, são resistentes. Esta resistência é atribuída à presença da cadeia lateral em C-3. Contudo, as β -lactamases produzidas especialmente por bactérias Gram-negativas cindem este anel, inativando as cefalosporinas (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982; DONOWITZ, 1989).

Por esta razão, elas não estão incluídas entre os fármacos essenciais, nem mesmo como medicamentos de segunda escolha. Por não atravessarem a barreira hematoencefálica, não devem ser usadas para tratamento de meningite. Tampouco devem ser usadas como quimioterápico único em casos de septicemia causada por microrganismos Gram-negativos. Igualmente, elas não são apropriadas para o tratamento de gonorréia e sífilis, doenças para as quais o antibiótico de escolha é a benzilpenicilina (MANDELL e PETRI, 1996).

Entretanto, há sempre o risco de ocorrer reação alérgica quando se administra este antibiótico a um paciente sensível à penicilina. Por isso, é mais prudente que este seja medicado por outro antibiótico, como eritromicina, por exemplo. Entre os efeitos colaterais citam-se casos de necrose tubular, diarreia, tromboflebite e, raramente, anafilaxia. As cefalosporinas de uso terapêutico são as seguintes: cefaclor, cefadroxila, cefalônio, cefalorama, cefamandol, cefamicina, cefaparol, cefatiamidina, cefatrizina, cefaclor, cefazedona, cefmetazol, cefonicida, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotiam, cefroxadina, cefsulodina, cefsumida, ceftazol, ceftióxido, ceftizoxima, cefuroxima e pivcefalexina. A cefaloglicina é atualmente considerada obsoleta, pois outras cefalosporinas são mais eficazes (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982; DONOWITZ, 1989).

As cefalosporinas podem ser agrupadas em três classes segundo a administração:

1. De administração parenteral: cefacetrila, cefaloridina, cefalotina, cefamandol, cefanona, cefapirina, cefazaflur, cefazolina, cefotaxima, cefoxitina e cefuroxima
2. De administração oral: cefaclor, cefadroxila, cefalexina e cefatrizina.
3. De administração oral ou parenteral: celadina.

A cefoxitina sódica apresenta espectro de atividade contra microrganismos Gram-negativos mais amplo que as cefalosporinas mais antigas. Também é eficaz contra *Proteus* e *Serratia* indol-positivos, mostrando alta resistência à hidrólise por β -lactamases. Indicada no tratamento de peritonites e outras infecções intra-abdominais e intrapélvicas; sinusites, infecções ginecológicas, septicemias; endocardites; infecções do trato urinário, gonorréia não complicada, infecções do trato respiratório, ossos, articulações e pele; infecções por

cepas susceptíveis, demonstradas por antibiograma. No trato respiratório inferior é utilizada contra: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides* sp.; infecções geniturinárias: *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Morganella*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp., *Neisseria gonorrhoeae* (não complicada); infecções intra-abdominais: *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp.; infecções ginecológicas: *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Peptococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp., e estreptococos do grupo B; septicemias: *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Bacteroides* sp. Infecções dos ossos e articulações: *S. aureus*. Pele: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* sp., *Bacteroides* sp.; peritonite, apendicite, endometrite, doença inflamatória pélvica, colecistite (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982; MANDELL e PETRI, 1996).

A cefoxitina sódica é uma cefalosporina injetável de segunda geração com atividade bactericida sobre numerosos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, especialmente bactérias anaeróbias, *Bacteroides*. Sua ação antibacteriana é devida à inibição da síntese da parede celular, é resistente a uma grande variedade de β -lactamases e cefalosporinas. Em geral é bem tolerada. Os efeitos adversos mais comuns têm sido reações locais na região da injeção IV ou IM. Foram observadas reações como erupção cutânea, prurido, febre e outras reações alérgicas, inclusive anafilaxia, nefrite intersticial; hipotensão arterial, náuseas e vômitos, eosinofilia, leucopenia, granulocitopenia, neutropenia, anemia (inclusive anemia hemolítica), trombocitopenia e depressão da medula óssea. Em alguns pacientes, em particular nos que têm hiperazoemia, a prova de Coombs direta pode tornar-se positiva durante o tratamento com cefoxitina. Foram observados aumentos passageiros das transaminases glutâmico-oxalacético e pirúvica, da desidrogenase láctica e da fosfatase

alcalina no soro; icterícia, como também aumentos da creatinina sérica e do nitrogênio uréico sanguíneo (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982).

A cefoxitina é comercializada no Brasil pelo nome de Cefton®, pelo Laboratório Ariston; Gamacef®, pelo Laboratório Bergamo®, como Mefoxin®, pela Merck Sharp Dome, Kefox® pela ABL do Brasil e como Cefoxitina sódica pela Eurofarma (Medicamento genérico). Apesar da comprovada eficácia e segurança no seu tratamento, este fármaco, até então, possui poucas metodologias de análise padronizada (COX et al., 1998; TUNG-HU et al, 2000) em compêndios oficiais e em periódicos de circulação internacional. Na Farmacopéia Britânica, USP 28 e Farmacopéia Portuguesa VII constam a metodologia de análise por CLAE. O projeto objetiva novas pesquisas nessa área para desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a cefoxitina sódica.

2. Revisão bibliográfica

A atividade farmacodinâmica dos antibióticos cefalosporínicos é dependente do tempo de atividade bacteriana. A atividade antibacteriana se dá quando a concentração do fármaco excede a concentração inibitória mínima (CIM) e aumenta até alcançar um limite superior de concentração, definido de 2 a 4 vezes maior que a CIM; níveis mais elevados da droga não conferem vantagem antibacteriana adicional (MAZZEI e DENTICO, 2000; CRAFT e PARISH, 2000).

Para que se garanta a atividade antibacteriana, é preferível, ainda que não estritamente necessário, exceder a CIM por todo período entre os intervalos de posologia devido aos efeitos pós-antibióticos (CRAFT e PARISH, 2000; LEVINSON, 1995; MCDONALD et al., 1981). Considera-se geralmente adequado manter-se 50 a 70% dos intervalos de posologia com concentrações de droga acima da CIM (MAZZEI e DENTICO, 2000; CRAFT e PARISH, 2000).

Todavia, a manutenção dos níveis de substância ativa acima da CIM durante todo o período de posologia assegura eficácia e, neste caso, é pouco provável que esteja associada às vantagens de grupos bacterianos resistentes (MAZZEI e DENTICO, 2000; LEVINSON, 1995; LORIAN, 1975). A atividade antibacteriana dependente do tempo requer grande atenção quanto às diferenças farmacocinéticas entre as cefalosporinas, uso de posologia e intervalos adequados, e complacência. A resistência a cefalosporinas tem sido revisada por MARSHALL e BLAIR (1999), LABIA e MORAND (1994) e KARCHMER (2000); que incluem: a susceptibilidade individual da cefalosporina a β -lactamases específicas; alterações das enzimas alvo (PBPs); e alterações na permeabilidade da membrana externa, o que limita a penetração do antibiótico. Várias formas de β -lactamase, produzidas por um amplo arranjo de organismos bacterianos, têm

sido identificadas. A maioria das cefalosporinas são resistentes às β -lactamases produzidas por estafilococos. Um complexo arranjo de β -lactamases pode ser produzido por organismos Gram-negativos, incluindo tanto plasmídeos e enzimas cromossômicas (MARSHALL e BLAIR, 1999; LABIA e MORAND, 1994).

As β -lactamases podem ser os componentes primários da resistência bacteriana ou podem ser induzidas pela exposição a uma cefalosporina antibiótica; comenta-se, ainda, a falha do tratamento com organismos Gram-negativos, tais como *Enterobacter* spp e *Citrobacter* spp, apesar da susceptibilidade inicial *in vitro* e clínica (MARSHALL e BLAIR, 1999; LABIA e MORAND, 1994). A resistência as cefalosporinas em bactérias Gram-negativas pode resultar de alterações nos canais aquosos, chamados porinas, que estão localizados dentro da membrana celular externa.

Dentro das circunstâncias usuais, as porinas permitem a penetração de cefalosporinas, que podem, então, ganhar acessos para atingir os sítios de PBP localizados internamente. A resistência emerge quando mudanças ocorrem na estrutura da porina que limita ou bloqueia a penetração da cefalosporina (MARSHALL e BLAIR, 1999).

2.1. Classificação

As cefalosporinas de primeira geração encontram-se os antibióticos que iniciaram este grupo, caracterizados por um espectro de atividade antimicrobiano entre Gram positivos e Gram negativos, porém mais estreito do que os de segunda e terceira geração. São representadas pela cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefradina, cefalexina e cefadroxil. A segunda geração consiste em cefamandol, na cefoxitina, no cefaclor e na cefuroxima apresentando maior atividade contra as bactérias Gram negativas do que as de primeira geração. A cefoxitina é uma cefamicina, e é

mais resistente às β -lactamases, são entretanto, menos ativas contra Gram positivas. Incluem-se entre as cefalosporinas de terceira geração a cefotaxima, maxolactama, a cefoperazona, a ceftriazona, a ceftizoxima, a ceftazidima e a cefsulodina. Apesar de possuir espectro de atividade menor que as outras cefalosporinas de terceira geração, a cefsulodina possui maior especificidade contra *Pseudomonas aeruginosa*. Novas cefalosporinas continuam sendo desenvolvidas, mais potentes que as atuais, com ação mais prolongada.

Embora os antibióticos cefalosporínicos sejam frequentemente classificados pela geração (primária, secundária e terciária), é mais apropriado discutir estes agentes em termos de seu espectro de atividade limitado, intermediário e amplo. Exemplos de cefalosporinas de espectro limitado são cefazolin e cefalexina (US PRODUCT MONOGRAPH KEFLEX, 2001). Agentes de comum espectro intermediário são ceftriaxona, cefonicida e cefaclor. A maioria das cefalosporinas recentes são de amplo espectro, incluindo cefoxitina e cefepima, e novos agentes orais, tais como as cefeximas.

2.2. Estrutura

Os antibióticos cefalosporínicos consistem de quatro anéis de β -lactâmicos ligados a seis anéis de diidrotiazina. Modificações na posição 7 do anel de β -lactâmico alteram a atividade antimicrobiana. Substituições na posição 3 do anel de diidrotiazina alteram a farmacocinética e a toxicidade das cefalosporinas (GOLDBERG, 1987).

2.3. Mecanismo de ação

As cefalosporinas, assim como outros antibióticos penicilânicos, são bactericidas. Pela ligação a proteínas as cefalosporinas inibem várias funções bacterianas, conduzindo à lise celular (AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 1992). A fim de que uma cefalosporina seja bactericida, o antibiótico precisa penetrar na parede celular externa da bactéria, ligar-se às proteínas ligadas à penicilina, e permanecer estável a β -lactamases.

2.4. Resistência

As bactérias possuem ao menos três mecanismos para resistir aos efeitos bacterianos das cefalosporinas. No primeiro, a bactéria pode alterar a permeabilidade da parede celular. Nas bactérias Gram-negativas, a penetração na parede celular externa pelos antibióticos cefalosporínicos depende das porinas, uma classe especializada de proteínas de membranas externas. Certas bactérias Gram-negativas, tais como as *Pseudomonas aeruginosa* e algumas Enterobacteriaceae, podem alterar as funções ou o número de canais de porina, reduzindo assim, a permeabilidade da membrana celular a várias cefalosporinas (LIVERMORE, 1987).

No segundo, certas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas adquirem resistência a cefalosporinas por meio de mutações nas proteínas. Este mecanismo de resistência tem sido descrito em algumas espécies de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, bem como em *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (CUNHA e GILL, 1995; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998).

O terceiro e mais importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, encontrados tanto entre bactérias Gram-positivas quanto negativas, é a produção de β -lactamases,

enzimas que hidrolisam o anel de lactâmico. As β -lactamases podem, ainda, ser derivadas de cromossomos ou plasmídeos. β -lactamases mediadas cromossomicamente são espécies e gêneros específicos e podem ser induzidos por concentrações baixas de antibióticos β -lactâmicos. Os plasmídeos que mediam as β -lactamases podem ser transferidos entre as bactérias, aumentando assim o número de bactérias resistentes ao antibiótico (GRAHAM et al., 1992).

2.5. Faixa de atividade

Embora semelhantes à penicilina, as cefalosporinas são resistentes às β -lactamases que, por sua vez, inativam a penicilina. Portanto, as cefalosporinas são alternativas eficazes para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes à penicilina. Cefalosporinas de espectro limitado são geralmente resistentes às β -lactamases de Gram-positivos, mas frequentemente são susceptíveis às β -lactamases mais potentes das Gram-negativas. Assim, estes agentes têm ampla aplicação em Gram-positivas, incluindo os *S. aureus* sensíveis à meticilina. Eles são ativos contra muitos microrganismos Gram-negativos, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., e *Proteus* sp., mas têm baixa ou ínfima atividade contra *Pseudomonas*, *Neisseria* e bacterióides (CUCHURAL, 1990). Cefalosporinas de espectro intermediário variam em sua susceptibilidade a β -lactamases. Estas substâncias são moderadamente efetivas contra bactérias anaeróbias e significativamente melhores do que as cefalosporinas de espectro limitado contra organismos Gram-negativos, incluindo as espécies *Neisseria* e *Haemophyllus*.

A maioria das cefalosporinas de amplo espectro são resistentes à hidrólise devido às β -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas (ERIKSEN e BLANCO, 1992). As mais novas cefalosporinas de maior espectro, tais como as cefepimas, são estáveis contra β -lactamases mediadas por plasmídeos e não têm capacidade para induzi-las. Dessa forma, são extremamente

potentes contra uma ampla faixa de infecções causadas por microrganismos Gram-positivos e negativos. Ceftazidima e cefoperazona têm a melhor aplicação para as *Pseudomonas*. Nenhum dos antibióticos cefalosporínicos é ativo contra clamídia ou micoplasma.

2.6. Espectro de atividade e uso clínico

Com tantos compostos de cefalosporina disponíveis, por vezes torna-se difícil selecionar terapias dentre esta ampla e diversificada família de antibióticos. De acordo com Marshall e Blair, “diferenças entre as inúmeras cefalosporinas antimicrobianas são, às vezes, súbitas; porém, a compreensão destas diferenças é essencial para que se otimize o uso destes agentes” (MARSHALL e BLAIR, 1999).

Durante um estudo no qual se avaliou a atividade de várias cefalosporinas, incluindo os 13 agentes orais e 3 antibióticos orais macrolídeos, diferenças significativas na potência antibacteriana e no espectro da atividade contra patógenos foram demonstradas (FUNG-TOMC et al., 1995). Os autores concluíram que as atividades anti-estafilococos das cefalosporinas orais “podem ser determinadas somente pelo teste de agentes individuais” (FUNG-TOMC et al., 1995).

Variações na susceptibilidade de formas específicas de espectros amplos e estreitos de β -lactamases produzidas por diferentes bactérias Gram-positivas e negativas têm sido também demonstradas, apontando algumas diferenças na atividade entre cefalosporinas individuais e quando usadas em práticas clínicas (LABIA e MORAND, 1994; MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000).

A maioria das cefalosporinas exibe alguns graus de atividade inibitória tanto contra organismos Gram-positivos quanto aos Gram-negativos; eis, portanto, sua utilização como

antibióticos de amplo espectro (MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998; MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; SADICK, 2001).

Na realidade, atividades relativas contra organismos específicos podem variar significativamente entre os compostos de cefalosporinas. Cefalosporinas individuais, relevando-se sua classificação de sua geração, diferem na atividade antibacteriana contra organismos Gram-positivos e negativos específicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SULTAN, 1994; LABIA e MORAND, 1994; FUNG-TOMC et al., 1995; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998; MARSHALL e BLAIR, 1999; DEL ROSSO, 2001). Além disso, em certos casos, diferenças farmacocinéticas podem produzir variações na habilidade de se adquirir e manter atividade terapêutica a sítios específicos de infecção (KLEPSEK et al., 1995; MAZZEI e DENTICO, 2000; CRAFT e PARISH, 2000; KARCHMER, 2000; CRAIG, 2000). Os perfis farmacocinéticos de cefalosporinas individuais influenciam também na frequência das vias de administração e posologia (MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998; MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; SADICK, 2001).

2.7. Contra-indicações/Precauções

2.7.1. Alergia e risco de hipersensibilidade

Estudos iniciais mostraram o risco de alergia à cefalosporina em reações adversas em mais de 16.5% dos pacientes com histórico de alergia à penicilina (MARSHALL e BLAIR, 1999; ANNE e REISMAN, 1995). O verdadeiro risco é fracamente definido em estudos mais recentes que sugerem uma incidência mais baixa de contrarreações abrangendo de 1.0 – 7.0% (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000). Recomenda-se evitar terapias com

cefalosporina em pacientes com históricos de hipersensibilidade mediada por reações Ig-E para penicilinas ou cefalosporinas, tais como anafilaxia, urticárias, ou angioedema.

2.7.2. Uso durante gestação

São classificadas várias cefalosporinas como fator de risco à gravidez categoria B, incluindo cefadroxil, cefaclor, cefazolina, cefepima, cefexima, cefoperazona, cefotaxima, cefotetan, cefoxitina, cefpodoxima, cefprozil, ceftazidima, ceftibuten, ceftriaxona e cefuroxima. Cefalexina e cefdinir (US PRODUCT MONOGRAPH OMNICEF, 2001) são também listados nesta mesma categoria em seus produtos aprovados (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1994).

2.7.3. Uso durante a lactação

A Academia Americana de Pedriatras enumera várias cefalosporinas como compatíveis com a amamentação, incluindo cefadroxil, cefazolina, cefotaxima, cefoxitina, cefprozil, ceftazidima e ceftriaxona (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1994).

2.8. Efeitos colaterais

Em geral, o perfil de segurança das cefalosporinas é excelente. As reações mais comuns são as gastrintestinais, maculopapulares temporárias ou erupções cutâneas urticárias e reações de hipersensibilidade (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000).

2.8.1. Reações gastrintestinais

Em geral, diarréias associadas a antibióticos não-específicos ocorrem em 2.0 a 5.0% dos pacientes que receberam terapia com cefalosporínico. Colites pseudomembranasas podem ocorrer e não estão associadas mais frequentemente com qualquer agente cefalosporina (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000).

A hepatotoxicidade clinicamente significativa é rara (KARCHMER, 2000); a ceftriaxona tem sido associada com a formação de lodo biliar (pseudolítíase), que é, geralmente, assintomática e tipicamente sanada dentro de 2 meses após a interrupção da terapia (KARCHMER, 2000). Casos sintomáticos com presença de colelitíase podem ocorrer especialmente em crianças que recebem altas doses (2 g diariamente) ou terapias prolongadas (KARCHMER, 2000).

2.8.2. Reações cutâneas

A erupção cutânea maculopapular, com ou sem febre ou eosinofilia, pode ocorrer em 1.0 a 3.0% dos pacientes e desenvolver-se após períodos variados de uso (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000). Reações urticárias são menos comuns.

2.8.3. Reações locais

A dor tem sido associada com injeções intramusculares de cefalosporinas; a adição de 1.0% de lidocaína na solução reduz desconfortos (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER,

2000). Tromboflebitas na região da cânula ocorrem em mais de 5.0% dos pacientes que recebem terapia com cefalosporina intravenosas (KARCHMER, 2000).

2.8.4. Reações de hipersensibilidade

Reações de hipersensibilidade a cefalosporinas são as reações sistemáticas mais comuns (KARCHMER, 2000). As reações alérgicas de cefalosporinas ocorrem de 1.0 a 2.5% dos pacientes sem um histórico de alergia à penicilina; a incidência em pacientes com alergia à penicilina é da ordem de 1.0 a 7.0 % (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000). As reações mediadas por Ig-E imediatas e retardadas, tais como anafilaxia ou urticária severa, são raras e ocorrem com menor frequência do que com penicilinas (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000).

2.8.5. Reações no sorológicas

O cefaclor tem sido associado às reações no soro, surgindo dentro dos primeiros 21 dias de terapia com a tríade de urticária, febre e artralgias com ou sem linfadenopatia ou eosinofilia (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1994; US PRODUCT MONOGRAPH CECLOR, 2001; US PRODUCT MONOGRAPH CECLOR CD, 2001).

Ao contrário das reais “doenças do soro”, complexos imunes da circulação, hipocomplementemia, vasculites e glomerulonefrites não ocorrem (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1994). O risco desta reação se desenvolver com cefaclor, baseando-se em análises de pacientes pediátricos, é relatado como sendo 0.024 a 0.2% por curso da administração

(AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1994). As reações no sistema imunológico têm ainda sido relatadas com cefprozil (HECKBERT et al., 1990).

2.8.6. Reações hematológicas

A eosinofilia, geralmente introduzida como descobertas hematológicas, pode ser vista em 1.0 a 7.0% dos casos (KARCHMER, 2000). A anemia hemolítica é pouco freqüente com as cefalosporinas apesar de ter sido apontada em 3.0% dos testes positivos de Coombs (KARCHMER, 2000). Determinadas cefalosporinas parenterais, especialmente àquelas que exibem um radical N-metiltiotetrazol (MTT) em sua cadeia, têm sido associadas, quando utilizadas sozinhas, com hipoprotrombinemia. Dentre os exemplos, são citados ceftetan e cefoperazona (KARCHMER, 2000).

2.8.7. Nefrotoxicidade

A nefrotoxicidade associada com o uso de cefalosporina é bastante rara (KARCHMER, 2000). Em virtude de várias cefalosporinas serem excretadas via renal, freqüentemente como drogas inalteradas, a redução na posologia pode ser autorizada em pacientes com deficiências renais (MANDELL e PETRI, 1996).

2.9. Interações gastrintestinais

A maioria das cefalosporinas orais pode ser administrada independente das refeições, incluindo cefalexina, cefaclor, cefprozil e cefdinir (PRINCE e VILLAR, 1983). A absorção das

cefalosporinas esterificadas, tais como cefuroxime e cefpodoxime, requer clivagem enzimática dentro da parede da mucosa intestinal (KARCHMER, 2000).

A absorção destes agentes é aumentada pela administração com a alimentação, devido ao atraso no esvaziamento gástrico, o que produz um tempo de contato prolongado com a mucosa. A liberação prolongada da formulação de cefaclor deve ser tomada com alimentação (STOCKLEY, 1999). A co-administração de agentes supressores da acidez gástrica, tais como antiácidos e receptores antagonistas de H-2, parece reduzir a absorção de cefuroxime. A ingestão de antiácidos também reduz a absorção de cefdinir (PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 2001). Um estudo sugere a terapia concomitante da supressão de ácido como um fator de risco para falhas terapêuticas com cefalexinas em pacientes que tiveram tratamento para celulites (MADARAS-KELLY et al, 2000).

Várias outras cefalosporinas, incluindo cefixime, cefprozil e ceftibuten, não aparentam ser significativamente afetadas pela co-administração com agentes, gerando ácido gástrico. Devido à significativa redução na absorção do cefdinir, a co-administração com sulfato ferroso e outros sais de ferro deve ser evitada (STOCKLEY, 1999; TATRO, 2001). Isto se dá pela complexação do cefdinir pelo ferro.

2.10. Outras interações

Relatos de interações clínicas significativas entre outros fármacos e cefalosporinas são incomuns. Dados limitados sugerem que a ceftriaxona e o ceftazidime podem aumentar os níveis de soro da ciclosporina; porém, um relato mais recente sugere que os níveis aumentados de soro da ciclosporina não ocorrem (STOCKLEY, 1999; UENO et al., 1993; ALVAREZ et al., 2001). É sugerido cuidado (UENO et al., 1993). Cefalosporinas associadas com hipoprotrombinemia

podem aumentar o efeito anticoagulante da varfarina e outras vitaminas anticoagulantes dependentes de K (XU et al., 1997). Casos esporádicos sugerindo interações potenciais do cefixime ou cefaclor com varfarina têm sido relatados (STOCKLEY, 1999; TATRO, 2001; XU et al., 1997).

2.11. Considerações gerais

Cefalosporinas são usadas para o tratamento de várias infecções bacterianas, incluindo tecidos da pele, infecções respiratórias, otológicas, do trato urinário e doenças bacterêmicas (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000).

A escolha de um agente cefalosporínico específico e a via de administração é dependente do agente etiológico e tanto do tipo quanto da gravidade da doença. Uma vez que a atuação da cefalosporina pode variar significativamente para cada organismo, a seleção do antibiótico é extremamente dependente, tanto de suspeitas clínicas quanto da confirmação laboratorial do organismo etiológico (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998; LIPSKY e BERENDT, 2000).

A primeira geração de cefalosporinas inclui agentes parenterais, a exemplo da cefalotina ou cefazolina, e agentes orais, tais como cefalexina ou cefadroxila (KARCHMER, 2000; SADICK, 2001; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998).

Dependendo do quadro clínico, tais agentes são comumente utilizados para casos de infecções respiratórias relacionadas às comunidades estafilocóccicas e estreptocóccicas, ou infecções mais simples na pele e as do trato urinário causadas por patógenos Gram-negativos, como *Escherichia coli* (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998).

Quando infecções por *Pseudomonas* spp, *Haemophyllus influenza*, anaeróbios não estreptocócicos, e infecções nosocomiais de Gram-negativos estão presentes, a primeira geração de cefalosporinas não é aplicável (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000). A cefazolina figura como agente parenteral preferível para a profilaxia contra patógenos que são mais comumente associados às infecções de ferimentos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* (MARSHALL e BLAIR, 1999). As cefamicinas derivadas da segunda geração parenteral, a exemplo da cefoxitina, são úteis para pneumonia, infecções intra-abdominais e doenças inflamatórias pélvicas (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000). A cefuroxima é benéfica para infecções causadas por *Haemophyllus influenza*, incluindo espécies produtoras de β -lactamase (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998). Agentes orais, incluindo cefprozil, cefaclor e cefuroxima, são freqüentemente recomendados para doenças simples do trato respiratório, otites médias ou sinusites, onde os patógenos predominantes são *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophyllus influenzae* (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998).

Outras indicações para tais agentes orais incluem infecções simples do trato urinário e tecidos da pele. Cefalosporinas de terceira geração são freqüentemente utilizadas para tratar uma variedade de infecções, incluindo doenças nosocomiais severas. Agentes parenterais, incluindo cefotaxime e ceftriaxona, fornecem excelentes atividades para um vasto arranjo de infecções nosocomiais de Gram-negativas, considerando-se também pneumonias e doenças do trato urinário (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000). Ambas são utilizadas como tratamento primário de meningites devido às suas atividades, predominantemente, contra patógenos e suas habilidades em adquirirem níveis terapêuticos em patógenos do fluido

cerebroespinhal (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998).

A ceftazidima e a cefoperazona são as duas cefalosporinas ativas contra os patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; MOELLERING e SENTOCHNIK, 1998).

A maioria dos agentes orais de terceira geração exibem elevada atividade contra infecções causadas pelos patógenos *Haemophilus influenza* e vários Gram-negativos, incluindo a Enterobacteriaceae (KARCHMER, 2000). Com exceção do ceftibuten, a maioria também exibe atividades favoráveis contra *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* susceptíveis à penicilina (KARCHMER, 2000). Ao contrário da maioria das outras cefalosporinas orais de terceira geração, o cefdinir é altamente ativo contra *Staphylococcus aureus* e exibe ainda aplicação favorável contra *Streptococcus pyogenes*, viabilizando terapias efetivas de infecções simples dos tecidos da pele devido a patógenos (KARCHMER, 2000; DEL ROSSO, 2001). Pode ser ainda aplicado aos *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* susceptíveis a meticilinas, *Haemophilus influenzae*, Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* (MARSHALL e BLAIR, 1999; KARCHMER, 2000; SADICK, 2001).

O cefdinir oferece ainda uma faixa mais ampla de eficácia para Gram-positivas se comparado com a terceira geração de cefalosporinas parenterais à medida em que mantém atividade significativa contra vários organismos Gram-negativos, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa*. Na presença de outras cefalosporinas parenteralmente administradas, este agente é usado com frequência em pacientes hospitalizados (SADICK, 2001). Organismos peculiarmente resistentes a cefalosporinas são resistentes aos *Staphylococcus aureus*, enterococci, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp e *Legionella* sp., resistentes à meticilina (KARCHMER, 2000; FUNG-TOMC et al., 1995; SULTAN, 1994; DEL ROSSO, 2001).

2.12. Absorção, distribuição e excreção

A cefalexina e a cefradina são bem absorvidas quando administradas por via oral, e a presença de alimentos não causa interação. Algumas são mal absorvidas ao nível do tubo gastrointestinal, sendo então de uso parenteral. As cefalosporinas atravessam a barreira placentária e penetram no líquido sinovial e pericárdio. Os níveis séricos de algumas cefalosporinas está descrito na Tabela 1. A via principal de metabolismo de eliminação das cefalosporinas é representada pelos rins; o fígado desempenha papel muito limitado; a eliminação destes produtos de faz por filtração glomerular. Algumas cefalosporinas como cefalotina, cefapirina degradam-se no organismo transformando-se numa forma menos ativa que também é excretada pelos rins. As concentrações urinárias podem atingir de 600 mg/mL até 5000 mg/mL sendo cerca de 80,0 a 100,0% secretados entre 8 e 12 horas após administração destas cefalosporinas (SILVA, 2002).

Tabela 01 – Algumas cefalosporinas usadas por via oral classificadas por geração, forma farmacêutica e amplitude posológica.

Amplitude Posológica			
Nome Genérico (Nome comercial)	Forma farmacêutica	Dose para Adulto e Intervalo	Dose Pediátrica (mg/kg/d) e intervalo
Primeira Geração			
Cefalexina (Keflex, Keftab, Biocef)	0,25, 05 g comp./cáps 125,250 mg/ 5 mL susp.	0,25-1g, a cada 6 horas	25-100, a cada 6 horas
Cefradina (Velosef)	0,25-0,5 g cáps. 125, 250 mg / 5 mL susp.	0,25-1g, a cada 6 horas	25-50, a cada 6 horas
Cefadroxil (Duricef, Ultracef)	0,5, 1,0 comp. 125, 250, 500 mg/5 mL susp.	0,5-1g, a cada 12-24 horas	30, a cada 12-24 horas
Segunda Geração			
Cefaclor (Ceclor)	0,25, 0,5 cáps. 125, 87, 250, 375 mg/5 mL susp.	0,25-0,5 g, a cada 8 horas	40, a cada 8 horas
(Ceclor CD)	0,375, 0,5 g cáps.	0,375-0,5g, a cada 12 horas	
Cefuroxima axetil (Ceftin)	0,125, 0,25, 0,5g comp.	0,25-0,5 g, a cada 12 horas	30-40, a cada 12 horas*
Cefprozil (Cefzil)	0,25, 0,5 cáps. 125, 250 mg/5 ml susp.	0,25-0,5 g, a cada 12-24 horas	30, a cada 12 horas
Loracarbef (Lorabid)	0,20 g comp.	0,2-0,4 g, a cada 12 horas	15-30, a cada 12 horas*
Terceira Geração			
Cefixima (Suprax)	0,2-0,5 cáps. 100 mg/5 ml susp.**	0,2 g, a cada 12 horas 0,4 g, a cada 24 horas	8, a cada 12 ou 24 horas
Cefpodoxima proxetil (Vantin)	0,1 -0,2 g comp. 50,100 mg/5 ml susp.	0,2-0,4 g, a cada 12 horas***	10, a cada 12 ou 24 horas
Ceftibuteno (Cedax)	400 mg cáps., 90 ou 180 mg/5 ml	0,2 - 0,4g, a cada 12 horas	9, a cada 24 horas
Celdinir (Omnicef)	300 mg cáps., 125 mg/ 5ml susp.	0,3-0,6g, a cada 12 - 24 hora	7 - 14, a cada 12 - 24 horas

* Concentração sérica mais elevada com suspensão

**Infecção do trato urinário inferior: Cefuroxima axetil na dose de 0,125-0,25g, a cada 12 horas; loracarbef, 0,2 g por dia; cefpodoxima, 0,1g, a cada 12 horas.

*** Dose mais levada recomendada para otite média.

2.13. Vias de administração e doses habituais

Existem cefalosporinas para uso oral e parenteral, se faz necessário o conhecimento de pelo menos uma cefaloporina de cada grupo para uso oral e parenteral. A Tabela 2 apresenta dosagens e vias de administração de algumas cefalosporinas de uso parenteral. Para uso oral

contamos com a cefalexina, a cefadrina, o cefaclor com algumas semelhanças em termos de atividade antimicrobiana, absorção, distribuição e excreção; indicadas para furunculose, otites, sinusites e infecções do trato urinário e respiratório. Para uso por via intramuscular o produto mais usado é a cefazolina na dose 0,5 g a cada 6 horas ou 1 g a cada 8 horas; substituindo a utilização de cefaloridina por sua nefrotoxicidade. Por via intravenosa contamos com a cefalotina na dose de 1 g de uma vez a cada 2 ou 4 horas. Como alternativa pode-se usar uma cefalosporina de terceira geração com espectro mais amplo (SILVA, 2002).

Tabela 02 – Algumas cefalosporinas parenterais classificadas por geração, vias de administração e amplitude posológica.

Amplitude Posológica				
Nome genérico (Nome comercial)	Via de administ ração	Adultos		Crianças*
		Dose e intervalo	Dose diária, infecção grave	Dose (mg/Kg/d) e intervalo
Primeira geração				
Cefalotina (Keflin, Seffin)	IV	0,5 – 2,0 g cada 4-6 horas	6,0 – 12,0 g	75,0 – 125,0 cada 4-6 horas
Cefazolina (Ancef, Kefzol)	IV/IM	0,5 – 1,5 g cada 6-8 horas	3,0 – 6,0 g	50,0 – 100,0 cada 6-8 horas
Cefapirina (Cefadyl)	IV/IM	0,5 – 2,0 g cada 4-6 horas	6,0 – 12,0 g	40,0 – 80,0 cada 4-6 horas
Cefradina (Velosef)	IV/IM	0,5 – 2,0 g cada 4-6 horas	4,0 – 12,0 g	50,0 – 100,0 cada 6 horas
Segunda geração				
Cefamandol (Mandol)	IV/IM	0,5 – 2,0 g cada 4-6 horas	6,0 – 12,0 g	100,0 – 150,0 cada 4-8 horas
Cefonicid (Monocid)	IV/IM	0,5 – 2,0 g cada 24 horas	2,0 g	40,0 cada 24 horas*
Cefuroxima (Kefurox)	IV/IM	0,75 – 1,50 cada 6-8 horas	4,5 – 6,0 g	100,0 – 240,0 cada 6-8 horas
Cefamicinas				
Cefoxitina (Mefoxin)	IV/IM	1,0 – 2,0 g cada 4-6 horas	6,0 – 12,0 g	80,0 – 160,0 cada 4-6 horas
Cefotetan (Cefotan)	IV/IM	1,0 – 3,0 g cada 12 horas	4,0 – 6,0 g	40,0 – 80,0 cada 12 horas
Cefmetazol (Zefazone)	IV	2,0 g cada 6-12 horas	8,0 g	*
Terceira geração				
Cefotaxima (Claforan)	IV/IM	1,0 – 2,0 g cada 4-8 horas	6,0 – 12,0 g	100,0 – 180,0 cada 4-6 horas
Ceftizoxima (Cefizon)	IV/IM	1,0 – 4,0 g cada 8-12 horas	6,0 – 12,0 g	150,0 – 200,0 cada 6-8 horas
Ceftriaxona (Rocephin)	IV/IM	0,5 – 2,0 g cada 8-12 horas	6,0 g	90,0 – 150,0 cada 8 horas
Quarta geração				
Cefpiroma	IV/IM	1,0 – 2,0 g cada 12 horas	4,0 g	**
Cefepima	IV/IM	1,0 – 2,0 g cada 12 horas	4,0 g	50,0 cada 8 horas

* a dose em recém nascidos, no primeiro mês de vida, pode diferir. Consultar um especialista, ** experiência em pdiatria ainda limitada, não aprovada para uso pediátrico.

2.14. Metodologia de análise

Um método para a análise de cefalotina e cefoxitina utilizando primeira derivada espectrofotométrica permitiu a quantificação destas drogas com recobrimento aproximado das bandas espectrais sem qualquer passo de separação. As curvas analíticas dos valores da primeira derivada a 235.00 e 236.75 nm para cefalotina e cefoxitina, respectivamente, foram obtidas na faixa de 4.0-32.0 µg/mL. Os resultados da determinação destes antibióticos na mistura de injetáveis são também apresentados, junto com suas determinações no soro fisiológico e soro fisiológico com glicose (MURILLO et al., 1996).

A determinação por CLAE e métodos microbiológicos para antibióticos cefalosporínicos de terceira geração estão descritos em artigo revisão, incluindo agentes de uso oral e parenteral são discutidos quanto às suas propriedades farmacocinéticas bem como as condições específicas dos procedimentos analíticos (PEHOURCQ e JARRY, 1998).

Produtos de degradação de cefoxitina sódica foram induzidos por meio de reações com ninidrina em meio de ácido sulfâmico e determinados por espectrofotometria. A determinação da ninidrina-cefoxitina foi comparada com a CLAE de fase reversa e com o método iodométrico (CAMPINS-FALCO et al., 1996).

Um método simples, rápido e sensível para análise de cefoxitina sódica foi desenvolvido para fluidos orgânicos (0,5 mL) e tecidos (100 mg) depois de homogeneização e centrifugação a alta velocidade. O método cromatográfico foi realizado utilizando coluna mBondapak C e como fase móvel biftalato de potássio 0.005 M, acetonitrila e ácido acético glacial (77.5:22:0.5, v/v/v), fluxo de 2.0 mL/min com detector ultravioleta a 235 nm. O procedimento apresentou curva

linear na faixa de concentração de 100–5000 ng/mL. A dosagem produziu boa repetitividade e resultados rápidos para ambas as amostras de soro e tecido sem a necessidade de utilização de substâncias químicas para realização da extração (TUNG-HU et al., 2000).

Provas simultâneas de microdialise foram administradas na veia jugular do átrio direito e cérebro de ratos Sprague–Dawley para examinar o nível de cefoxitina sódica no sangue e cérebro após a administração de cefoxitina (20 mg/kg, i.v.). As amostras foram eluídas na fase móvel contendo metanol e fosfato monossódico 100 mM (25:75, v/v, pH 5.5), com detector utilizado UV a 235 nm. O método usado proporcionou recuperação de cefoxitina (1 e 5 µg/mL) 44.47 ± 1.76 e $39.87 \pm 1.83\%$ para o sangue do animal e cefoxitina (50 e 100 ng/mL) 16.78 ± 3.66 e $14.56 \pm 3.13\%$ para o cérebro. As análises intra-dia e inter-dia apresentaram precisão e exatidão em 11% na faixa de 0.05 – 10 µg/mL. Estes estudos farmacocinéticos das análises obtidas pelo referido método indicaram que a cefoxitina sódica é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica (TUNG-HU et al., 2000).

JOHNSON e colaboradores (2000) compararam métodos analíticos como UV-visível, niridrina, CLAE e método iodométrico utilizados para as análises de cefoxitina, cefotaxima, cefazolina e cefalexina. Para se obter as curvas analíticas foram usados: absorvância, absorvância da primeira e segunda. Um método simples de CLAE para determinação da cefradina nas amostras do plasma sanguíneo humano foi desenvolvido e validado. Cefradina e cefaloridina (padrão interno) foram extraídas do plasma humano pela precipitação de proteínas com ácido perclórico seguido de centrifugação. Alíquotas dos extratos foram analisadas por colunas CLAE de fase reversa, utilizando-se uma coluna de fase reversa seguida pela detecção UV a 260 nm. O método tem uma faixa de aplicação de 0.2 a 30.0 µg/mL a partir de 200 µL do plasma humano. Este método tem sido aplicado com eficácia em estudos clínicos incluindo estudos de

bioequivalência comparando a farmacocinética de 500 mg de Kefdrin® com 500 mg de Velosef® em voluntários.

Utilização de CLAE para quantificação de algumas cefalosporinas selecionadas: cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, na presença de seus produtos de degradação sob condições alcalinas e em injeções comerciais, foram descritas. Os produtos de degradação ou excipientes da formulações não interferiram na análise. O método espectrofotométrico foi baseado no uso do software FSQ da análise de multicomponentes para determinação simultânea de antibióticos examinados na presença de seus produtos de degradação sob condições alcalinas de degradação. O procedimento CLAE foi baseado na resolução do cefotaxima ou ceftazidima ou ceftriaxona de produtos induzidos-alcalinos de degradação utilizando-se uma coluna ODS e fase móvel de solução tampão (0.1 M) de acetonitrila-acetato de amônia (pH 7.5) com detecção a 270 nm utilizando detector de arranjo de diodo. Os dados coletados mostraram que ambos os procedimentos foram precisos e exatos, contudo, o método CLAE teve maior sensibilidade ($\ll 1 \mu\text{g/mL}$) comparado ao método FSQ. As taxas de pH constantes mostraram que os antibióticos foram relativamente estáveis acima de pH 4 - 6, com estabilidade ótima a pH 5. Os valores extrapolados de vida útil, como determinado nos gráficos de Arrhenius a pH 5 e 25°C, foram 6.56, 2.14 e 0.88 h para cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, e a 4,0°C estes valores foram 15.0, 3.62 e 2.14 h, respectivamente (MOHAMMED e ABEL-HAMID, 1998); outro método espectrofotométrico para determinação de cefalosporinas foi desenvolvido por METWALLY e colaboradores (2001).

Um artigo revisão escrito por Joshi (2001) relaciona diferentes condições de análise por CLAE para antibióticos; dentre estes são abordadas condições para penicílicos e cefalosporínicos, a exemplo da cefalexina onde emprega-se colunas C18 com fase móvel composta por tampão KH_2PO_4 10 mM: MeCN: MeOH (45 : 40 : 1) com pH ajustado para 4.5

com H₃PO₄; para cefotaxima e ceftriaxona descreve a utilização de tampão de MeCN: KH₂PO₄. mM (1 : 4) com pH ajustado para 2.65 com H₃PO₄.

Duas β-lactamases tipo I do *Bacillus cereus* e β-lactamase TEM-1 do *Haemophyllus ducreyi* foram imobilizadas em coluna Quelante de Rápido Fluxo. A análise de injeção do fluxo de β-lactamases foi realizada utilizando-se um reator de coluna ajustado dentro da enzima. Com ambas enzimas, foi possível monitorar as penicilinas e cefalosporinas. Além disso, as constantes de Michaelis da β-lactamase TEM-1 foram significativamente aumentadas acima da imobilização para todos os substratos, especialmente carbenicilina, cefalosporina e cefoperazona (LAWUNG et al., 2001).

Os métodos citados por AYAD, SALEM e ASKAL são vantajosos quando comparados a muitos outros métodos de espectrofotometria e titulação relatados, em virtude de sua maior sensibilidade que permite a determinação acima de 0.5 µg/mL. Eles podem ser aplicados para análises de controle de qualidade de dosagens de cefalosporinas sem interferência dos excipientes e dos produtos de degradação (AYAD et al., 1999; SALEM e ASKAL, 2002; SUN et al., 2004).

Um método rápido, exato e sensível foi desenvolvido e validado para determinação quantitativa simultânea de quatro cefalosporinas: cefalexina e cefadroxil (primeira geração), cefaclor (segunda geração), cefataxin (terceira geração), em matéria-prima bem como no plasma sanguíneo humano e urina. Foi utilizada uma coluna analítica Spherisorb ODS-2 250 x 4 mm, 5µM, utilizada com um sistema eluente consistindo de uma mistura tampão de acetato (pH 4.0) – metanol, 78 – 22% (v/v) sob vazão de 1.2 mL/min, com detector UV-visível de comprimento de onda UV-Vis variável a 265 nm, resultando num limite de detecção de 0.2 ng/mL para cefadroxila e cefalexina, mas apenas 0.1 ng/mL para cefotaxima e cefaclor por injeção de 20 mL. Hidroclorotiazida (HCT) foi utilizada como padrão interno na concentração de 2 ng/mL.

Observou-se uma relação linear acima de 8, 5, 12 e 35 ng/mL para cefadroxila, cefotaxima, cefaclor, cefalexina, respectivamente. O tempo de análise foi menor que 7 minutos. O método foi aplicado a determinação das cefalosporinas em produtos comerciais e fluidos biológicos: plasma sanguíneo humano após extração em fase sólida e urina após filtração e diluição. A recuperação dos analitos nas amostras foi da ordem de 76.3 to 112.0% de 1 - 8 ng/mL (SAMANIDOU et al., 2003). AMIN e RAGAB (2004) descreveram um método espectrofotométrico para determinação de cefalosporinas em medicamentos.

Um método sensível de injeção de fluxo quimioluminescente (IF-QL) para a determinação de cefalosporinas foi baseado nas propriedades destes antibióticos cefalosporínicos que podem aumentar a reação quimioluminescente de glioxal e KMnO_4 em ácido sulfúrico. Sob condições otimizadas foram determinadas: cefalexina, cefadroxila e cefazolina sódica. Os limites de detecção do método foram 10 ng/mL para cefalexina, 2 ng/mL para cefadroxila, e 2 ng/mL para cefazolina sódica (YUANYUAN et al., 2004). WHEATLEY e TOWNSHEND (2005) descrevem outro método utilizando quimioluminescência com KMnO_4 e rutênio.

Um método de injeção de fluxo utilizando o tris (2,2-bipiridil) rutênio(II) $[\text{Ru}(\text{bpi})_3^{2+}]$ e permanganato de potássio quimioluminescente (QL) foi desenvolvido para determinação das cefalosporinas tais como cefoxitina, cefazolina, cefalexina, cefadroxila, cefaclor e cefoperazona. O método é baseado na reação de QL das cefalosporinas e $\text{Ru}(\text{bpi})_3^{2+}$ com permanganato de potássio na presença de ácido perclórico, catalisado por Mn (II). As curvas analíticas foram lineares acima da faixa 0.10 – 12.0 $\mu\text{g/mL}$ para cefoxitina, 0.10 – 10.0 $\mu\text{g/mL}$ para cefoperazona e 0.10 – 15.0 $\mu\text{g/mL}$ para cefazolina, cefalexina, cefadroxila e cefaclor. Os limites de detecção foram 0.03 $\mu\text{g/mL}$ para cefoxitina e cefadroxila, 0.06 $\mu\text{g/mL}$ para cefoperazona e 0.08 $\mu\text{g/mL}$ para cefazolina, cefalexina e cefaclor, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso à determinação da cefoxitina, cefazolina, cefalexina e cefadroxila nas amostras. Não houve de

interferências de alguns excipientes comuns usados nos preparos das formulações (THONGPOON et al., 2005).

2.15. Estabilidade

Todas as substâncias estão sujeitas a alguma forma de decomposição química ou física. Algumas classes químicas são mais vulneráveis e tendem a se decompor mesmo em condições brandas. As condições externas envolvidas na deterioração de fármacos e medicamentos são tidas como fatores extrínsecos ou ambientais; entre os principais fatores temos a luz, temperatura, ar e a umidade. Estes fatores podem afetar a estabilidade física de medicamentos e acelerar processos de decomposição química do fármaco (GIL, 2005).

É sabido, que ao longo do tempo decorrido entre a fabricação, passando pelo transporte, estocagem, o ponto de venda e finalmente durante o armazenamento no “armário do banheiro”, o princípio ativo (as substâncias de efeito terapêutico) podem sofrer alterações.

Os principais processos de degradação química são hidrólise, oxidação, reações fotoquímicas, isomerização e polimerização. A maior ou menor vulnerabilidade de uma espécie sofrer uma reação química é definida como fator intrínseco de estabilidade. Outros fatores intrínsecos são aqueles associados às propriedades físico químicas, tais como ponto de fusão e coeficiente de solubilidade (GIL, 2005).

A estabilidade de formas farmacêuticas sólidas depende da natureza da base empregada na formulação. A escolha dos excipientes pode influenciar na estabilidade física, química e biodisponibilidade; desta forma deve-se respeitar a compatibilidade com os excipientes escolhidos; são componentes importantes das formulações e podem significar melhorias das

características das formulações mas podem também reduzir a eficácia de algumas preparações (KALINKOVA, 1999).

A umidade, a luz, oxigênio e temperatura podem influenciar durante o período de estocagem das formas farmacêuticas, mesmo em formas sólidas podem reduzir o tempo de estabilidade. Na década de 50, concomitante com os acidentes que incentivaram a farmacovigilância, estabeleceram-se as primeiras alternativas para previsão do prazo de validade de medicamentos (NOGUEIRA et al, 2001).

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

Na década de 90, Japão, EUA e União Européia reuniram esforços para harmonização da legislação, realizando a ICH (Stability Testing of New Drug Substances and Product, 2003). No Brasil, os princípios da Farmacovigilância e de estabilidade foram mencionados na Lei Nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976). No entanto, não há regulação específica para farmacovigilância e, apenas em abril de 2002, foi publicado o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade; revogado pela RE nº 398, de 12 de novembro de 2004 que teve como referência

os guias de qualidade editados pelo ICH relativo a requerimentos técnicos para registro de medicamentos para uso humano (BRASIL, 2004).

Esse guia define três tipos de estudos de estabilidade: a) estabilidade acelerada: estudo em que se acelera a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições forçadas de armazenamento; b) estabilidade de longa duração: estudo projetado para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade esperado e, opcionalmente, após seu vencimento; c) estabilidade de acompanhamento: estudo realizado após o início da comercialização do produto, para verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, previstas nos estudos de estabilidade de longa duração; e a inclusão do estudo de estabilidade de acompanhamento, do “plano de estudo de estabilidade reduzido de medicamentos” e especificações para “estudo de fotoestabilidade”.

Em 2005, a resolução RE N° 01 instituiu novo guia, definindo três tipos de estudos de estabilidade: (1) Estabilidade acelerada: projetada para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte; (2) Estabilidade de acompanhamento: realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração; (3) Estabilidade de longa duração: projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do

prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

Na RE número 01, o prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração e de acordo com os parâmetros definidos e por ocasião do registro poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses. Se o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses estiver acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração com, conforme parâmetros definidos que classificam os produtos de acordo com a forma farmacêutica fornecendo dados à respeito das condições de armazenamento e estudos.

Entende-se por estabilidade a capacidade de uma formulação de manter as especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. Um bom estudo de estabilidade é meta fundamental de um programa de garantia da qualidade. Outra meta seria a segurança clínica, intimamente relacionada à estabilidade farmacêutica (VADAS, 2000).

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

Classicamente, a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é separada em estudos de estabilidade física ou farmacêutica, química (incluindo-se a bioquímica) e físico-química. Reconhecer a estabilidade física de uma formulação é importante para o profissional e o usuário. Em primeiro lugar, o produto farmacêutico deve manter boa aparência. Alterações como descoloração ou escurecimento devem ser motivos para desconfiança; a uniformidade de dose do

ingrediente ativo deve ser assegurada com o tempo, pois alguns produtos são dispensados em embalagens de dosagem múltipla e o fármaco ativo deve ter eficiência durante o tempo de validade esperado da preparação. Para cada forma farmacêutica, há diferentes parâmetros a ser avaliados: propriedades organolépticas, velocidade e volume de sedimentação, consistência e viscosidade, polimorfismo, dureza, desintegração e outras. Várias reações químicas podem resultar na degradação de princípios ativos e excipientes. Qualquer alteração na estrutura do princípio ativo pode reduzir a atividade terapêutica e levar a efeitos indesejados, devido à formação de produtos tóxicos (VADAS, 2000).

As reações químicas mais comuns são as de oxidação e hidrólise, devido à presença de oxigênio e umidade na própria atmosfera. Outras formas de degradação ocorrem por reações fotoquímicas (isomerização, ciclização, fragmentação), racemização, incompatibilidade com outros componentes da fórmula ou embalagem, entre outras. Algumas vezes mais de uma reação ocorre ao mesmo tempo, outras vezes ocorrem consecutivamente (LUND, 1994; VADAS, 2000).

A estabilidade química é importante para selecionar as condições de armazenagem (temperatura, luz, umidade), escolha do recipiente adequado (vidro, plástico claro, âmbar ou opaco), tipo de tampa e para prever as interações ao misturar fármacos e excipientes (ANSEL et al, 2000). A degradação química de excipientes pode acarretar problemas de estabilidade física ou microbiológica (NOGUEIRA et al, 2001).

Em geral, as reações químicas ocorrem mais prontamente no estado líquido que no sólido. Portanto, sérios problemas de estabilidade são mais comuns em medicamentos líquidos. Também pode interferir na estabilidade e fatores externos como temperatura, umidade e luz (VADAS, 2000).

O armazenamento, distribuição e uso inadequados podem levar à degradação física e química, resultando em atividade reduzida ou formação de produtos de degradação tóxicos. A

degradação tende a ocorrer em condições tropicais de altas temperaturas e umidades e, por causa da interação química entre princípio ativo e excipientes, as formas farmacêuticas são mais vulneráveis à degradação que as substâncias puras. Estudos de estabilidade realizados em climas temperados, no entanto, não fornecem indicação confiável de sua validade em países com condições climáticas extremas. Assim, provas adicionais de estabilidade devem ser solicitadas ao fabricante, que deve assumir a responsabilidade por formular um produto que seja estável nas condições climáticas do local de destino (WHO, 2002; QUALITY ASSURANCE OF PHARMACEUTICALS, 1997).

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

O problema estaria solucionado, não fossem as diferenças no interior de uma mesma zona climática. Pode-se tomar como exemplo o Brasil, situado na zona climática IV, que se caracteriza por alta temperatura e umidade. Outros problemas são desrespeitos às normas de transporte, armazenamento inadequado e uso incorreto de medicamentos. O guia vigente para realização de estudos de estabilidade brasileiro estabelece a necessidade de informação do período de utilização pelo qual o produto mantém sua estabilidade depois da reconstituição, nas condições de armazenamento determinadas, de preparações que requeiram reconstituição ou diluição.

Considerando que os produtos de degradação podem resultar em atividade reduzida ou tóxica e que as notificações classificadas como possíveis desvios da qualidade com envolvimento

de pacientes poderiam estar relacionadas a problemas de estabilidade dos medicamentos, verifica-se a relevância dos estudos de estabilidade para a farmacovigilância.

A determinação da vida útil ou *shelf life* é realizada quando se pretende estabelecer o período de tempo no qual um produto de composição definida, procedimento de fabricação estabelecido, numa embalagem determinada é capaz de conservar suas características químicas, físicas, microbiológicas, toxicológicas e de funcionalidade dentro de especificações estabelecidas.

Jones e Rigge (2004) realizaram a determinação da vida útil de netilmicina conservada a $7,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ com 60,0% de umidade relativa durante 300 dias. As determinações foram realizadas por cromatografia líquida de fase reversa; concluindo que as amostras conservadas a $7,0^{\circ}\text{C}$ e $25,0^{\circ}\text{C}$ com 60% UR permaneceram estáveis durante 90 dias e 30 dias respectivamente.

Um estudo de determinação de vida útil foi realizado para formulação parenteral de hidrocortisona, inicialmente acondicionados em bolsas de PVC e poliolefina (não-PVC) a $7,0^{\circ}\text{C}$ e $25,0^{\circ}\text{C}$ com 60% de umidade relativa, bem como em seringas. Durante um período de 120 dias de armazenamento. As análises foram realizadas por CLAE com detector UV utilizando como fase móvel tampão fosfato pH 7.0 e metano (50:50). As amostras permaneceram estáveis por 41 dias e 48 dias quando armazenadas nas bolsas de PVC e não-PVC, respectivamente. Quando na forma farmacêutica injetável permaneceu estável 6 dias a $25,0^{\circ}\text{C}/60\%\text{UR}$ e por 81 dias a $5,0^{\circ}\text{C}$ (JONES & RIGGE, 2004).

Os mesmos autores publicaram em 2006 um artigo sobre a determinação em piperacilina e tazobactam utilizando as mesmas condições de temperatura do ensaio para a hidrocortisona, em bolsas de PVC e não-PVC (JONES & RIGGE, 2006). Oliveira e colaboradores descreveram o

efeito das microemulsões na estabilidade dos β -lactâmicos; cefaclor, cefatrizine e cefadroxil (OLIVEIRA et al, 2003).

A estabilidade do meropenem, um antibiótico do largo espectro foi estudado a fim investigar a cinética de degradação desta droga no pó para a injeção e a amostra reconstituída. O carbapenem foi submetido às condições de decomposição térmica acelerada. A degradação do meropenem foi modelada adequadamente por equações específicas para cinética e as análises foram realizadas por CLAE e método microbiológico. Em temperaturas mais altas, as reações de decomposição do meropenem no pó para a injeção podiam ser descritas pela cinética de primeira ordem. A taxa mais elevada da degradação foi observada no meropenem reconstituído em 0.9% de cloreto de sódio. Os resultados obtidos confirmam a confiabilidade do método cromatográfico para determinar a cinética do meropenem na presença de seus produtos da degradação (SCHAPOVAL et al, 2006).

Estudo de estabilidade para comprimidos de captopril de 25 mg acondicionados em tipos diferentes de filmes foi realizado por Nóbrega e colaboradores (2006); foram utilizados policloreto de vinila (PVC) cristal e o cloreto de polivinilideno (PVDC) revestido de PVC nas cores cristal e vermelho. Com a embalagem de PVCPVDC- vermelho obteve-se os melhores resultados, constituindo-se numa barreira adequada para a umidade e para gases em geral.

Comprimidos de cefuroxima foram submetidos de acordo com as normas do ICH de 30,0oC a 60,0% UR, 40,0oC a 75,0% UR, analisados durante 1, 2, 3 e 6 meses e analisados por CLAE (IVANA et al, 2006).

Estudos de estabilidade de cefoxitina sódica na forma sólida e solução foram realizados a fim de fornecer a informação físico química básica necessária para preparar um formulação parenteral apropriada. A cefoxitina sódica é muito solúvel em água e exibe a decomposição de primeira ordem neste meio em pH de 3.0 à 9.0, sendo que a estabilidade máxima na água está em

pH 5.0 à 7.0. Os lotes de substância do estado sólido indicaram perdas rápidas iniciais seguidas por um período de deterioração mais lento (Oberholtzer & Brenner, 1979).

2.16. Qualidade dos produtos farmacêuticos

O conceito de qualidade embora bastante subjetivo, pode ser definido como modo bem simples como um conjunto de atributos que se deseja para um determinado produto, no entanto a satisfação das expectativas dos clientes e o cumprimento dos aspectos técnicos são dois fatores determinantes neste conceito.

O conjunto de normas obrigatórias descritas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) para medicamentos e produtos afins surgiu nos Estados Unidos por volta de 1902, servindo de base para todas as normas adotadas nos outros países. A OMS também criou um conjunto de normas de Boas Práticas de Fabricação, revisadas com base nas normas ISO. As normas ISO são complementares às BPFs, podemos dizer que tal certificação dá o fabricante posição de *status.*; o entanto as ISSO se preocupam não só com a qualidade do produto, mas também uma série de outros fatores que levam à satisfação do cliente. (GIL, 2005). A indústria farmacêutica de medicamentos de uso humano possui a RDC n°210, que regulamenta as BPFs do setor, enquanto as Farmácias Magistrais devem seguir a RDC n°67. Nos últimos anos o setor magistral apresentou um grande crescimento, assumindo uma grande importância cada vez maior no mercado dos medicamentos contribuindo para o mercado de medicamentos; a qualidade dos medicamentos manipulados tem sido objeto de inúmeras discussões, principalmente em função da RDC n°214 (FERREIRA, 2002).

As normas ISO/IEC 17025 tratam da competência dos laboratórios para executar determinados ensaios para o quais foi credenciado junto a ANVISA trouxeram uma nova

realidade aos laboratórios; o reconhecimento dos laboratórios torna-se importante para que este tenha reconhecimento nacional e internacional, que faça parte da rede de laboratórios brasileiros, provando que seu sistema da qualidade funciona e desta forma alcançar novos mercados (BAHIA, 2003).

Existem diversos fatores relacionados à qualidade dos produtos que podem ser afetados pela falta de BPF; o controle de qualidade das matérias primas, produtos intermediários, produtos acabados e material de acondicionamento e embalagem, validação dos processos de produção, limpeza e metodologias analíticas são elementos importantes na implementação de BPFs.

O processo de escolha de um fornecedor de matérias primas pode ser realizado pelos departamentos de Controle de Qualidade e Garantia da Qualidade; pois devem ser avaliada as primeiras amostras do fornecedor, fornecendo subsídio para aprovação dos mesmos. Na inspeção de recebimento, devem ser observadas divergências relativas ao pedido, checando rótulos, certificados analíticos e da embalagem (LÁZARO et al, 2007). O processo de qualificação também traz benefícios para o fornecedor, que deve estar permanentemente buscando um aprimoramento para atender às necessidades de seus clientes, significando uma melhoria contínua (MACEDO, 2003).

A amostragem é um dos passos mais importantes dentro do contexto de obtenção do resultado final, visto que, feita inadequadamente pode influenciar no resultado analítico. A diferença entre os termos amostrar e coletar é muito sutil, porém, podemos interpretar, amostrar como um termo abrangente e coletar, o ato de “pegar” ou retirar, isolar ou de tomar uma alíquota do que se deseja conhecer analiticamente. A amostra deve ser feita heterogeneamente, e o amostrador deve ter conhecimento claro sobre a metodologia de coleta. Durante a amostragem devem ser observados os seguintes critérios: facilidade de contaminação (higroscopia), efeito de superfície (atração eletrostática), perdas por evaporação de espécies da mistura, processos de

oxidação, decomposições catalisadas, ação da temperatura, umidade e luz; radiações ionizantes e não ionizantes, por contato, contaminação aeróbica, anaeróbica bem como a capacidade do meio propiciar o crescimento dos microrganismos (LEITE, 2003).

A água, na grande maioria dos casos, está ligada diretamente ao produto, fazendo parte de sua composição; ou indiretamente, quando é utilizada na lavagem de utensílios e materiais utilizados na produção dos medicamentos. Os compêndios oficiais trazem diversas classificações para os tipos de água; de forma geral a água purificada é o insumo resultante da utilização de processos combinados de tratamento, os quais incluem como unidades finais a destilação, colunas de troca iônica ou aparelhagem de osmose reversa devendo cumprir as especificações físico químicas e microbiológicas (PENNA et al, 2002; JÖNCK, 2002).

O controle integrado de pragas deve ser aplicado a toda a extensão da unidade fabril; os maiores riscos desta natureza incluem: criticidade quanto à localização da unidade, condição de manutenção predial, riscos de contaminação advindas de fornecedores, inexistência de barreiras físicas e mecânicas, falta de conscientização dos colaboradores e ineficiência do Programa de Controle de Pragas (VENERANDA, 2004).

A contaminação microbiana da área industrial pode ser proveniente do ar, dos materiais de acondicionamento e embalagem, dos equipamentos e utensílios de produção, de matérias primas, da água do processo, do ar comprimido, do ar ambiente (condicionado ou não). É importante ressaltar que os controles a serem conferidos ao produto final dependem, além das exigências farmacopeicas, do grau de risco de contaminação que o processo implica o produto. O controle efetivo de todas as etapas, incluindo a qualificação dos fornecedores, é fundamental para garantir a qualidade do produto; a estratégia para prevenção de contaminação está na determinação dos principais vetores de microrganismos e pontos crítico nos processos definindo medidas corretivas (AMARAL, 2004).

No controle de qualidade das matérias primas se tornam importantes a criação de uma ficha de análise bem como as especificações do ensaios descritas de forma detalhada e completa contendo as metodologias que serão realizadas no controle de qualidade e as especificações correspondentes, que devem ser buscados nas monografias farmacopeicas ou qualquer outra literatura reconhecida. As matérias primas que apresentarem resultados de acordo com as especificações serão aprovadas e liberadas, enquanto as não-conformes deverão ser devolvidas ou destruídas, fazendo-se os respectivos registros (PEZZINI et al, 2004).

As embalagens têm funções variadas como embalar, proteger, transportar e vender, produtos para saúde requerem mais cuidado com as embalagens. Qualquer falha pode resultar em alterações na formulação causando ineficácia do produto. Assim como as matérias primas, as embalagens também devem ser avaliadas após seu recebimento, incluindo os seguintes parâmetros: aspecto visual, verificação da presença de bolhas, lascas, falhas; dimensões, espessura e diâmetro; capacidade de fechamento das embalagens; resistência ao choque térmico e teste de alcalinidade no caso de vidros; pesquisa de metais pesados, substâncias redutoras, acidez e alcalinidade das embalagens plásticas; resistência ao amassamento e aderência (JÖNCK, 2003; PEZZINI et al, 2004). Outro fator importante se relaciona à falsificação de medicamentos, podendo alterar o tratamento e até levar o indivíduo à morte.

3. Objetivos

A cefoxitina possui algumas metodologias descritas em compêndios oficiais. O presente trabalho tem como objetivos gerais o desenvolvimento de metodologias de análise para esta cefalosporina, incluindo a caracterização de cefoxitina sódica substância de referência através da execução de métodos tradicionais em controle de qualidade como: umidade, ponto de fusão, solubilidade, características organolépticas, resíduo por ignição, espectrofotometria infravermelho e ultravioleta, bem como análise térmica da substância de referência com objetivo de caracterização desta quanto a TG e DTA.

O trabalho também inclui a proposta de aplicação e validação de metodologia de análise de espectrofotometria na região de ultravioleta, por cromatografia líquida de alta eficiência, metodologia de análise microbiológica através de método de difusão em ágar-cilindros em placa, metodologia de análise por titulometria em meio não aquoso, metodologia de análise por titulometria iodométrica de cefoxitina sódica substância de referência e amostra.

Realizar estudo de estabilidade da cefoxitina sódica por 12 meses a $30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; $75,0 \pm 5,0\%$ UR e posterior avaliação das amostras pelas técnicas validadas por cromatografia líquida de alta eficiência e doseamento microbiológico por difusão em Agar com avaliação do desempenho das técnicas validadas.

4. DESCRIÇÃO

Nome: Cefoxitina sódica

Forma farmacêutica: pó para injetável

Nome químico: Sódio (6R, 7S)-3-[(carbamoloxi)metil]7-metóxi-8-oxo-7[[tiopen-2-il) acetil]amino]-5-tia-1-azabicyclo [4.2.0]oct-2-eno-2-carboxilato (BP, 2005).

Nomes comerciais: Cefton® (Ariston; Brasil), Cefoxitina sódica (Genérico, Eurofarma), Gamacef® (Bergamo), Mefoxin® (Merck Sharp; África do Sul, Argentina, Austrália, Bélgica, Brasil, Canadá, Estados Unidos da América, Finlândia, França, Hong Kong, Inglaterra, Itália, Países Baixos, Nova Zelândia, Portugal), Cefociclin® (Itália), Ceftixin® (Tailândia), Destrepen®, Metaptyl®, Mefoxil® (Grécia), Pluricefo® (Argentina), Tifox® (Itália), Mefoxitin® (Áustria, Alemanha, Espanha, Noruega, Suécia, Suíça).

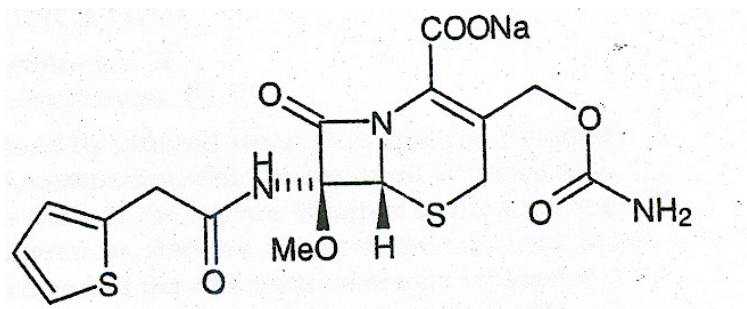


Figura 1 – Estrutura da cefoxitina sódica

(CAS:33564-30-6 / NCM: 2941.90-36/ DCB:02.20.02-7)

DCB: 02.20.02-7

NCM: 2941.90-36

CAS: 33564-30-6

Categoria: Antimicrobiano cefalosporínico

Fórmula química: $C_{16}H_{16}N_3NaO_7S_2$

Peso molecular: 449.4

C (58,16%) H (5,45%) F (10,81%) N (11,96%) O (13,66%)

4.1. Substância química de referência

Foi utilizada cefoxitina sódica, substância química de referência (padrão secundário) gentilmente doada por Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda. O teor estimado está em 99,6% e identificado pelo lote NR: 050804.

4.2. Forma Farmacêutica

Foram utilizados frascos-ampola contendo pó para solução injetável gentilmente doados por Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda, sob o nome comercial de Cefton® e identificado pelo lote de número 040326-B1.

Descrição

Cada frasco ampola contém cefoxitina sódica correspondente a 1000 mg de cefoxitina. Cada ampola diluente contém 10,0 mL de água para injeção, estéril e apirogênica.

5. Análise qualitativa

5.1. Caracteres físicos

5.1.1. Material e métodos

A cefoxitina sódica descrita no item 4.1. foi avaliada em relação ao aspecto, cor e odor.

5.1.2. Resultados

A cefoxitina sódica apresenta-se sob a forma de grânulos, com odor leve e cor amarelo pálido. A descrição é condizente com a citada pelas referências descritas para a caracterização organoléptica desta substância na BP, 2005 e USP26 e 28.

5.2. Solubilidade

5.2.1. Material e métodos

Transferiram-se 100,0 mg de cefoxitina sódica para tubos de ensaio acrescentando alíquotas crescentes de cada solvente, sob agitação até completa solubilização. O ensaio foi realizado a 25,0°C e a solubilidade indicada de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS., 1988). Os solventes utilizados foram: água, metanol, etanol absoluto, diclorometano, éter, clorofórmio, dimetilformamida, acetona, dimetilsulfóxido e hidróxido de sódio 0,1 M.

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

5.2.2. Resultados

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

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no teste de solubilidade para o cefoxitina sódica. O significado do termo descritivo utilizado está apresentado na Tabela 4.

Tabela 3 - Solubilidade da cefoxitina sódica substância de referência em diferentes solventes a 25,0°C.

solventes	termo descritivo
água	muito solúvel
metanol	solúvel
etanol absoluto	insolúvel
diclorometano	insolúvel
éter	insolúvel
clorofórmio	insolúvel
dimetilformamida	pouco solúvel
acetona	insolúvel
dimetilsulfóxido	solúvel
NaOH 0,1 M	muito solúvel
HCl 0,1 M	muito solúvel

Tabela 4 - Significado do termo descritivo utilizado na indicação da solubilidade para determinações feitas à temperatura de 25,0°C (FARM. BRAS., 1988).

termo descritivo	solvente
muito solúvel	menos de 1 parte
facilmente solúvel	de 1 à 10 partes
solúvel	de 10 à 30 partes
ligeiramente solúvel	de 30 à 100 partes
pouco solúvel	de 100 à 1000 partes
muito pouco solúvel	de 1000 à 10000 partes
praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10000 partes

Foram utilizados diversos solventes na determinação das solubilidades cuja finalidade foi de realizar a caracterização da substância qualitativamente testando sua polaridade bem como funcionar como ensaio preditivo na determinação da melhor solubilização para os testes quantitativos para espectrofotometria UV e CLAE.

Os resultados obtidos foram condizentes com os citados pelas referências descritas para a solubilidade desta substância na BP, 2005 (muito solúvel em água, insolúvel em etanol e éter), USP28 e Farmacopéia Portuguesa (muito solúvel na água); o teste de solubilidade pode ser tratado como teste preditivo para determinação de impurezas.

5.3. Determinação da faixa de fusão

5.3.1. Material e métodos

A faixa de fusão foi determinada na substância de referência, descrita no item 4.1, utilizando equipamento automático STUART Cientific SMP1. A amostra, previamente dessecada em estufa a 60,0°C durante 2 horas, foi colocada em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram introduzidos horizontalmente no equipamento. Foi possível realizar a determinação simultânea utilizando-se três capilares.

5.3.2. Resultados

A taxa de aquecimento utilizada foi de 1,0°C por minuto a partir de 10,0°C antes do valor esperado para a faixa de fusão prosseguindo até 10,0°C após este valor. Foram realizadas três determinações para a amostra (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de faixa de fusão obtidas para cefoxitina sódica.

ensaio	faixa de fusão (°C)*
1	152,0 ± 0,60
2	155,0 ± 0,50
3	159,0 ± 0,80

* cada valor é a média de três determinações

O pó apresentou ponto de fusão em cerca de 155,3°C.

Na literatura consultada (THE MERCK INDEX, 2001) a faixa de fusão para cefoxitina está especificada entre cerca de 149,0 - 150,0°C com decomposição; no entanto para a cefoxitina sódica não consta tal parâmetro.

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

5.4. Determinação de umidade

5.4.1. Material e métodos

A cefoxitina sódica foi exatamente pesada em pesa-filtros previamente tarados e dessecados em estufa QUIMIS 702.780 durante 30 minutos a 60,0 °C. Antes da pesagem os pesa-filtros foram dispostos em dessecador para 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 1,0 g em cada determinação.

5.4.2. Resultados

O teor de água foi estudado pelo método gravimétrico (FARM. BRAS., 1988). Tal método consiste em secar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada de 105,0 a 150,0°C, durante várias horas, para fármacos termoestáveis; 20,0°C a princípio e

105,0° 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 (FARM. BRAS, 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 Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS, 1988) e os resultados são apresentados a seguir na Tabela 6.

Tabela 6 - Umidade da cefoxitina sódica determinada pelo método gravimétrico.

ensaio	umidade (%)*
1	1,20 ± 0.21
2	1,70 ± 0.53
3	1,70 ± 0.19
média	1,53 ± 0.27

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

É importante ressaltar que as matérias-primas devem ser armazenadas em frascos muito bem fechados, a fim de evitar a absorção de água pelo fármaco. Não foram encontradas referências descritas para a perda por dessecação de cefoxitina sódica.

5.5. Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho

5.5.1. Material e métodos

Foram utilizadas cefoxitina sódica substância de referência e amostra, descrita nos itens 4.1 e 4.2. A cefoxitina sódica foi exatamente pesada em pesa-filtros previamente tarados e dessecados em estufa QUIMIS 702.780 durante 30 minutos a 60,0 °C e realizada a compressão com KBr para confecção das pastilhas. Foi utilizado espectrofotômetro FTIR SHIMADZU 3000 nas leituras.

5.5.2. Resultados

Os espectros foram obtidos com 1,0 mg de cefoxitina sódica substância de referência e injetável, utilizando-se dispersão de 150,0 mg de brometo de potássio (Figuras 2 e 3).

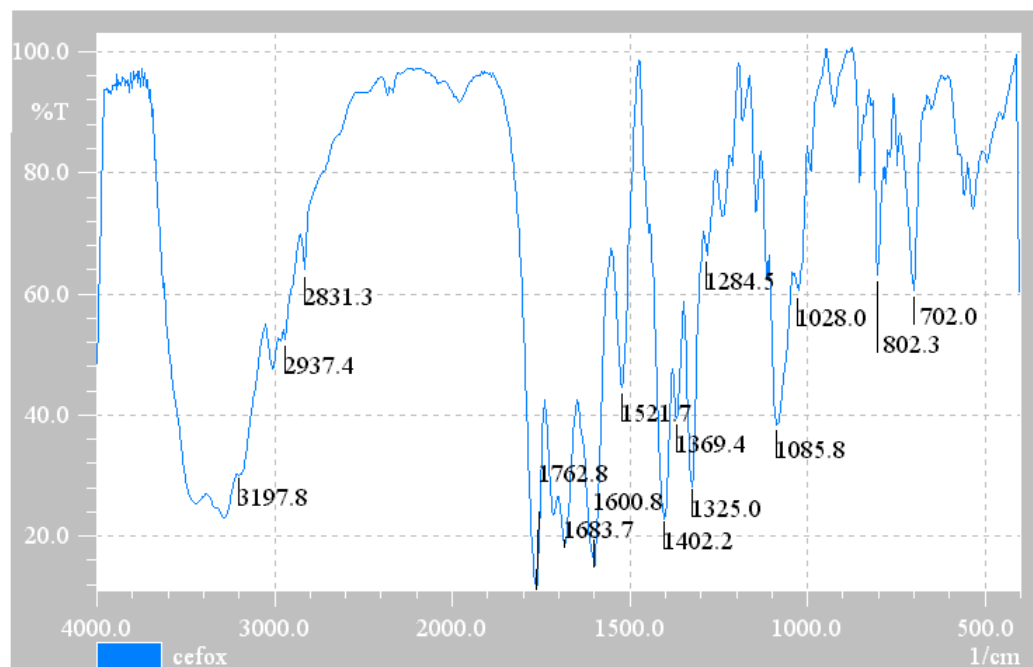


Figura 2 – Espectro na região de infravermelho de cefoxitina sódica substância de referência em dispersão de KBr.

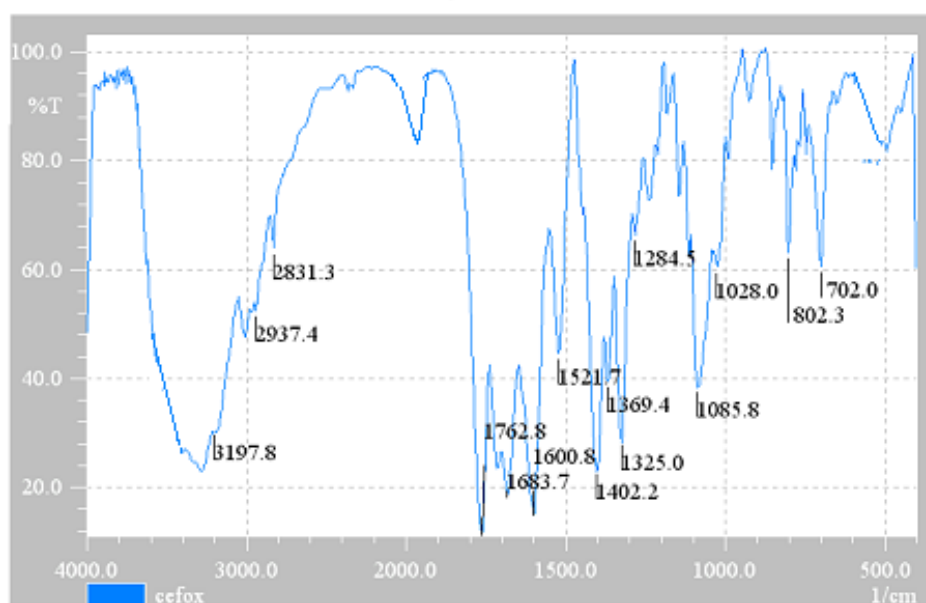


Figura 3 – Espectro na região de infravermelho de cefoxitina sódica injetável em dispersão de KBr.

A Figura 4 representa o espectro de infravermelho da cefoxitina sódica padrão publicado na Farmacopéia Britânica (BP, 2005).

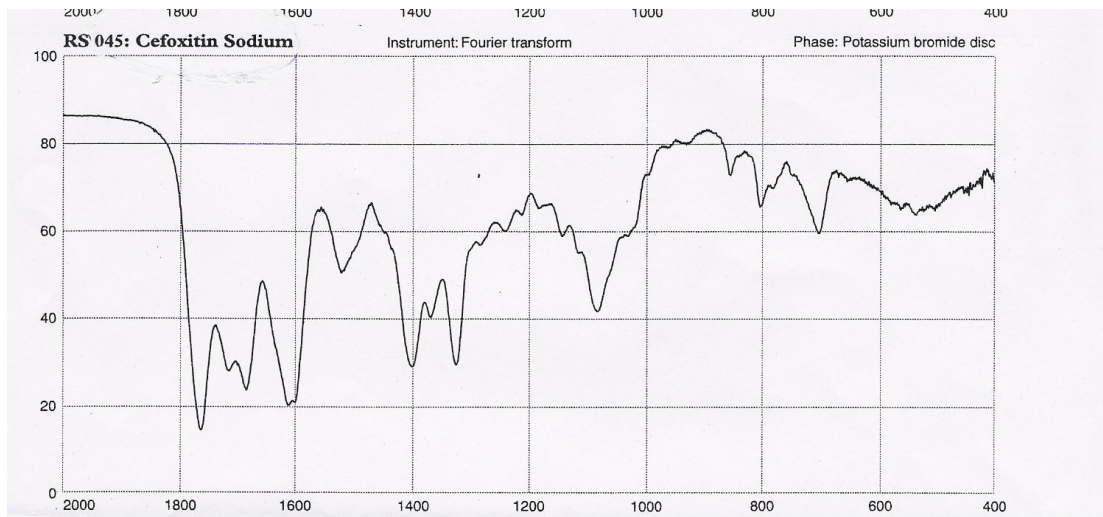


Figura 4 - Espectro na região de infravermelho de cefoxitina sódica padrão BP, 2005.

A Tabela 7 demonstra os picos de absorção da cefoxitina sódica na região do infravermelho.

Tabela 7 – Absorção de cefoxitina sódica espectro de infravermelho em dispersão de KBr.

cm⁻¹	grupamento responsável
3197,8	Deformação axial dos grupamentos N-H e O-H
2937,4	Deformação axial de C-H de CH ₃ e piperazina
2831,3	
1762,8	Deformação axial de grupamentos C = O do aldeído, cetona
1683,7	Deformação axial dos grupamentos C = O da carboxila
1600,8	
1542,9	Deformação axial de C-N e C-C do anel lactâmico
1525,6	
1284,5	Deformação axial de C-O

O espectro de absorção na região infravermelho em pastilha de KBr, apresenta picos de absorção característicos de funções presentes na estrutura química da cefoxitina sódica, demonstrando os grupos funcionais presentes na molécula estudada.

5.6. Resíduo pela incineração

5.6.1. Material e métodos

Cefoxitina sódica substância de referência foi exatamente pesada em cadinhos de porcelana previamente tarados e dessecados em forno mufla COEL LW 2000 a 800,0 °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 em cada determinação, utilizando forno tipo mufla COEL LW 2000 à temperatura de cerca de 800,0°C.

5.6.2. Resultados

O resíduo pela incineração compreende o resíduo não volátil à incineração. Em geral o ensaio visa 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 (FARM. BRAS, 1988).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS, 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 ($800,0 \pm 25,0^\circ\text{C}$), à menos que a monografia especifique.

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

Tabela 8 – Resíduo de cefoxitina sódica determinado pelo método gravimétrico.

ensaio	resíduo (%)*
1	< 0,10
2	< 0,10
3	< 0,10
média	< 0,10

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

5.7. Análise térmica

Análise térmica é definida como um grupo de métodos pelos quais as propriedades físicas ou químicas de uma substância, uma mistura ou um reativo são medidas como funções de temperatura ou tempo, enquanto a amostra está sujeita a um programa de temperatura controlada. O programa pode consistir em aquecer ou resfriar (dinâmico), ou manter a temperatura constante (isotérmica), os métodos térmicos são de grande utilidade para o controle da qualidade e aplicações de investigação sobre produtos industriais como polímeros, farmacêuticos, metais e ligas. Em termogravimetria (TG) a análise da massa da amostra em uma atmosfera controlada é medida como uma função de temperatura ou de tempo. A TG pode ser usada para monitorar qualquer reação que envolve uma fase de gás como a oxidação ou desidratação. O tamanho da amostra varia de uns poucos mg a 10 mg dependendo do equipamento usado. Os estudos podem ser realizados a temperaturas de até 1550 oC. Este método é útil para determinar a pureza e a água na amostra, os conteúdos de carbono e orgânicos e para o estudo das reações de decomposição. A temperatura ideal registrada em um termograma é a temperatura da amostra. Esta temperatura pode ser medida com um termopar pequeno diretamente na amostra, o mais próximo possível do recipiente da amostra. As termobalanças modernas normalmente usam um controle de temperatura computadorizado que, automaticamente, compara a voltagem de saída do termopar com uma tabela de voltagem versus temperatura guardada na memória só para leitura. 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 um controle de temperatura programado (MOTHE, 2004).

O objetivo deste estudo foi determinar a estabilidade de cefoxitina sódica frente à temperatura, como teste complementar na identificação do composto.

Uma série de sais sódicos de penicilinas foram analisadas pelas técnicas termoanalíticas (TG, DTG e DSC). As análises foram realizadas em uma atmosfera de oxigênio e resíduo final da decomposição térmica para todos os compostos analisados foi o sulfato de sódio. A pureza das penicilinas analisadas foi determinada pela quantidade de sódio nos compostos analisados (Ascenzo & Curini, 2001).

Foram estudadas a decomposição térmica de penicilina G, cefalotina sódica, cefamandole sódico e cefamandole nafato. A cinética da reação apresentou-se de primeira ordem (LANG et al, 1977)

Os sais de potássio e de sódio de algumas penicilinas e cefalosporinas foram analisados pelas técnicas termoanalítica (TG, DTG e DSC). As análises foram realizadas nas atmosferas do ar e do oxigênio, com e sem a adição do sulfato de amônio ou do persulfato de amônio. Foi possível avaliar a pureza destes antibióticos através do resíduo resultante do sulfato de sódio ou potássio. Os melhores resultados nos termos da exatidão e da precisão foram obtidos pela adição do sulfato ou do persulfato do amônio aos compostos analisados (SORRENTINO et al, 2001).

A análise termogravimétrica modulada (MTGA) foi avaliada para determinar a estimativa rápida da estabilidade térmica usando diversos antibióticos penicilínicos. A técnica de MTGA utiliza um programa oscilatório da temperatura para obter parâmetros cinéticos de Arrhenius com uma perda maciça durante a degradação térmica. Os valores do registro k estimados por MTGA concordado bem com os valores de literatura quando a

perda do peso observada por MTGA foi mostrada para ser devido à primeira etapa da decomposição do composto (WANG et al, 2004).

Os complexos do cefadroxil (Cef) com metais divalentes da transição da fórmula $MCef_nH_2O$ (onde $n=2$ para $M=Cu^{2+}$, Ni^{2+} , Zn^{2+} e $n=3$ para Co^{2+}) e $CdCef_{1.54}H_2O$ foram preparados e caracterizados por infravermelho. A análise térmica dos complexos investigados na atmosfera do ar foi realizada por meio da técnica simultânea de TG-DSC. A primeira etapa da perda da massa é a perda de água dos complexos. Em seguida, a decomposição ocorre com evolução do CO_2 e do NH_3 . Adicionalmente, como produtos gasosos da decomposição: O HCN , $HNCO$ ($HOCN$), H_2CNH , os CO , o SO_2 , os hidrocarbonetos e os compostos de carbonila foram observados (Mrozek,2004).

5.7.1. Material e métodos

Foram utilizadas cefoxitina sódica substância de referência e amostras descritas nos itens 4.1. e 4.2. Foram utilizados reagentes de grau analítico.

As curvas TG e DTA foram obtidas através de análise térmica simultâneo (SDT 2960), da TA Instruments, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, (SP) pelo Departamento de Físico-Química. A faixa de temperatura utilizada foi de 0,0 a 1200,0 °C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90,0 mL/min) e massa de amostra de aproximadamente 9,0 mg.

A amostra foi acondicionada em cadinho de alumina hermeticamente fechado, e como substância de referência foi utilizado Al_2O_3 .

5.7.2. Resultados

As Figura 5 apresenta a curva de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTA) de cefoxitina sódica sob atmosfera dinâmica de ar.

O presente teste teve como objetivo o estudo de análise térmica de cefoxitina sódica com finalidade qualitativa através da termogravimetria e análise térmica diferencial em atmosfera de ar sintético. As curvas DTA e TG são apresentadas a seguir.

Em torno de 150,0°C observa-se diminuição de massa em virtude de perda de umidade da substância. Nas curvas observaram-se um pico endotérmico em torno de 150,0 à 250,0°C atribuído à perda das estruturas NH₂ e COONa, acima de 650,0°C ocorre a saída do anel β-lactâmico. Através da curva TG, verifica-se a perda de massa total em duas etapas, entre as temperaturas de 180,0 e 250,0°C.

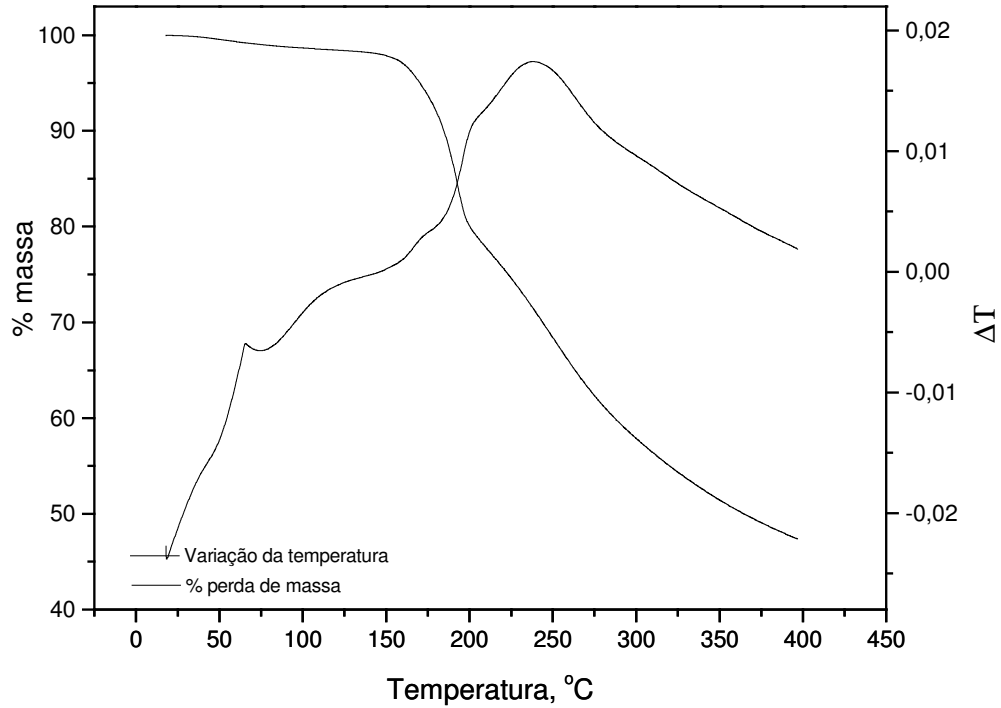


Figura 5 – Curva TG e DTA de cefoxitina sódica substância de referência sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90,0 mL/min), razão de aquecimento: 20,0°C /minuto.

5.8. Espectrofotometria na região ultravioleta

5.8.1. Material e métodos

Foram utilizadas cefoxitina sódica substância de referência e amostra descritas nos itens 4.1 e 4.2 e espectrofotômetro UV-Vis JAS.CO 7800

O espectro na região ultravioleta foi obtido utilizando-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura. As leituras foram feitas entre 200 e 400 nm. Os solventes utilizados foram de grau analítico. Foram utilizados água purificada, metanol, NaOH 0,1 M e HCl 0,1M com o objetivo de verificar o comportamento das leituras e máximos de absorvância da substância de referência e amostras e seleção do melhor solvente para a determinação espectrofotométrica na região do UV.

A água purificada utilizada nos ensaios foi obtida por processo de osmose reversa com condutividade menor que 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e pH de 5.8.

5.8.2. Resultados

5.8.2.1. Em hidróxido de sódio 0,1 M

As soluções de cefoxitina sódica substância de referência e amostra foram preparadas pesando-se 20,0 mg de cefoxitina sódica completando o volume com NaOH 0,1 M em balão volumétrico de 100 mL. Desta solução de concentração de 200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi

tomada uma alíquota de 10,0 mL, que foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com NaOH 0,1 M obtendo concentração final de 20,0 µg/mL.

Os espectros na região ultravioleta estão apresentados nas Figuras 6 e 7.

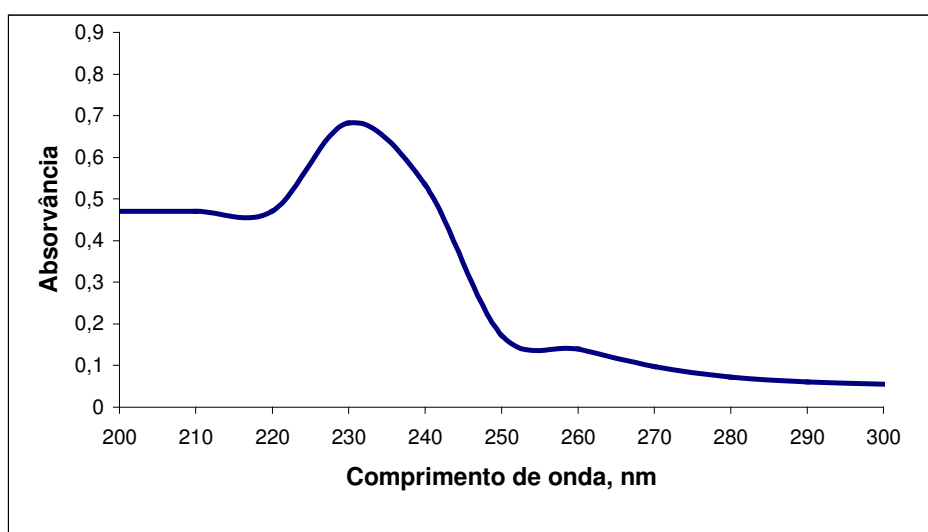


Figura 6 - Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra a 20,0 µg/mL em NaOH 0,1 M.

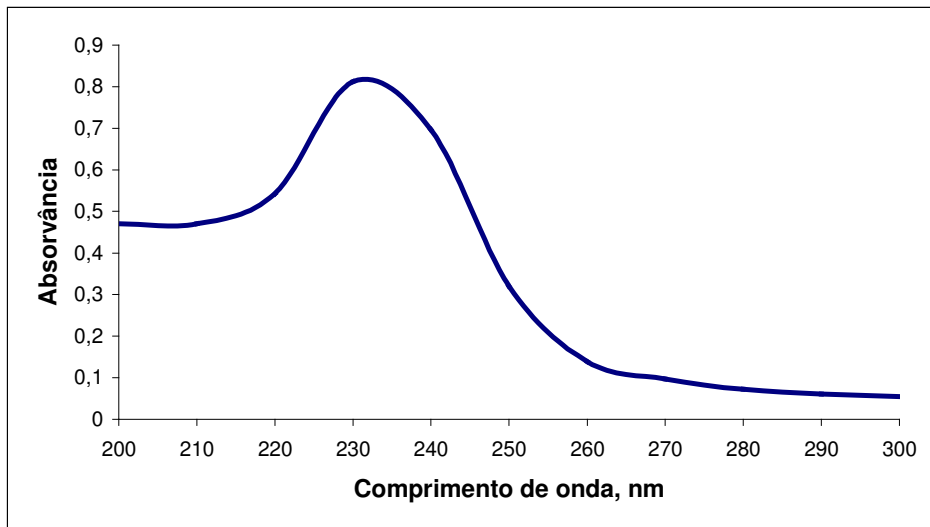


Figura 7 - Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância de referência de a 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em NaOH 0,1 M.

5.8.2.2. Em ácido clorídrico 0,1 M

As soluções de cefoxitina sódica substância de referência e amostra foram preparadas pesando-se 20,0 mg completando o volume com HCl 0,1 M em balão volumétrico de 100 mL. Desta solução de concentração de 200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi tomada uma alíquota de 10,0 mL que foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com HCl 0,1 M obtendo concentração final de 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O espectro na região ultravioleta são apresentados nas Figura 8 e 9.

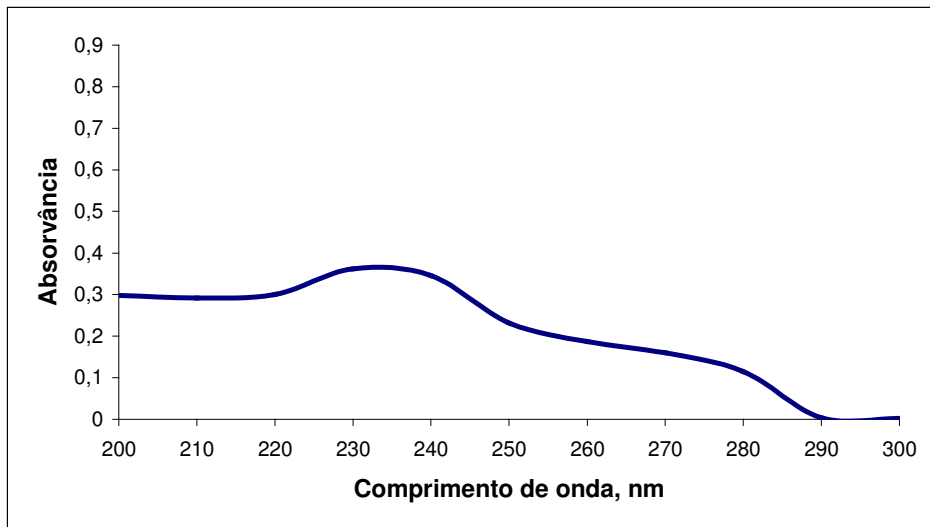


Figura 8 - Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra à 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,1 M.

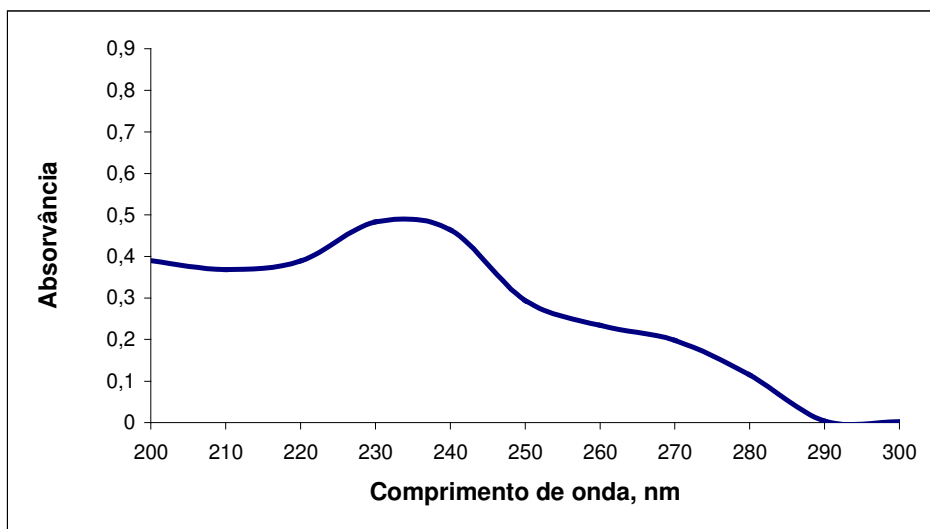


Figura 9 - Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência à 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,1 M.

5.8.2.3. Em água purificada

A solução de cefoxitina sódica substância de referência foi preparada pesando-se 20,0 mg completando o volume com água purificada em balão volumétrico de 100 mL. Desta solução de concentração de 200,0 $\mu\text{g/mL}$ foi tomada uma alíquota de 10,0 mL que foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com água de purificada obtendo concentração final de 20,0 $\mu\text{g/mL}$.

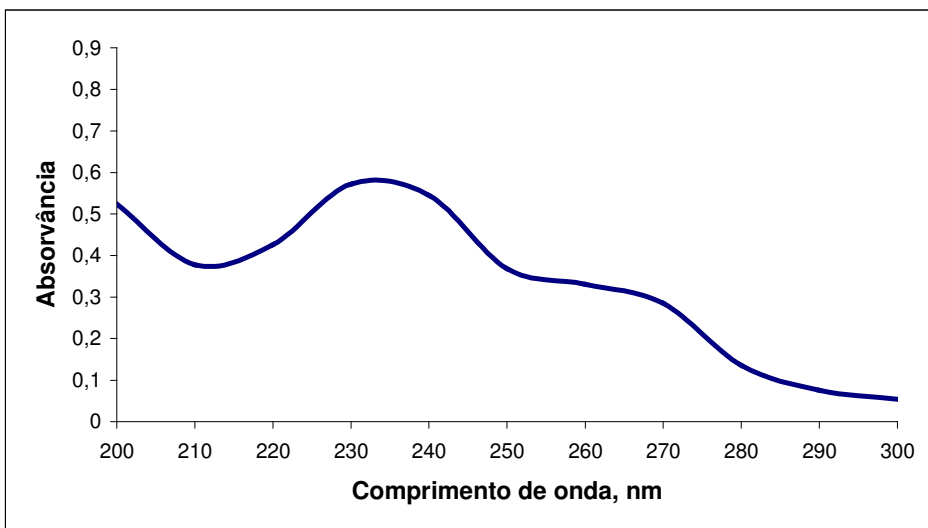


Figura 10 - Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância de referência 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada.

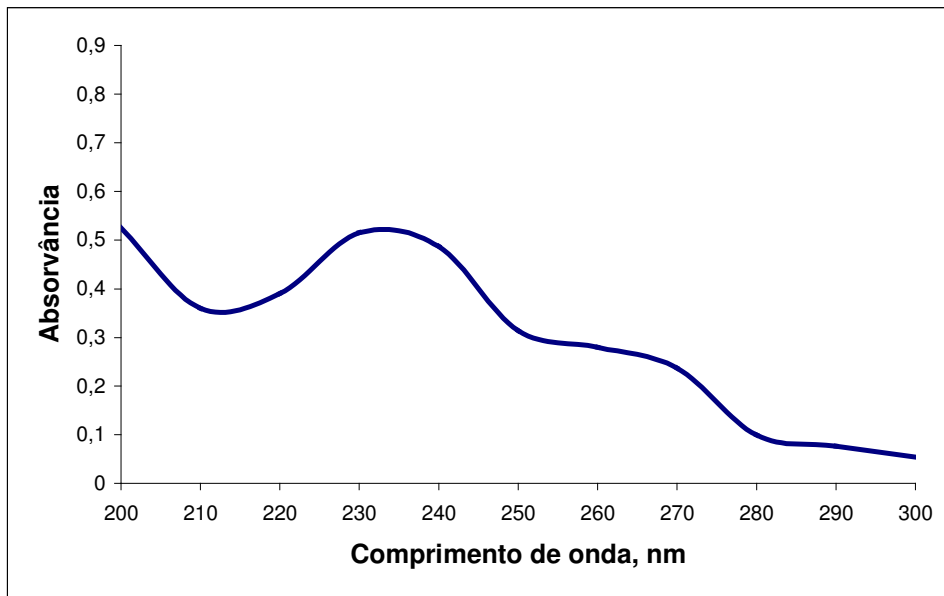


Figura 11 - Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada.

5.8.2.4. Em metanol

As soluções de cefoxitina sódica substância de referência e amostra foram preparadas pesando-se 20,0 mg completando o volume com metanol em balão volumétrico de 100 mL. Desta solução de concentração de 200,0 $\mu\text{g/mL}$ foi tomada uma alíquota de 10,0 mL que foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com metanol obtendo concentração final de 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Os espectros de cefoxitina sódica substância de referência e amostras na região ultravioleta são apresentados nas Figuras 12 e 13.

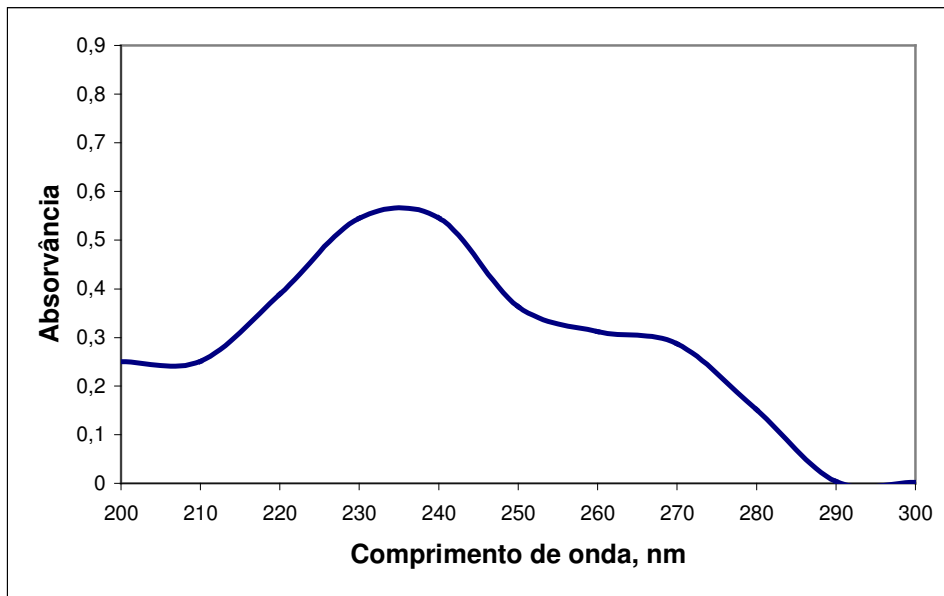


Figura 12 – Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra a 20,0 µg/mL em metanol.

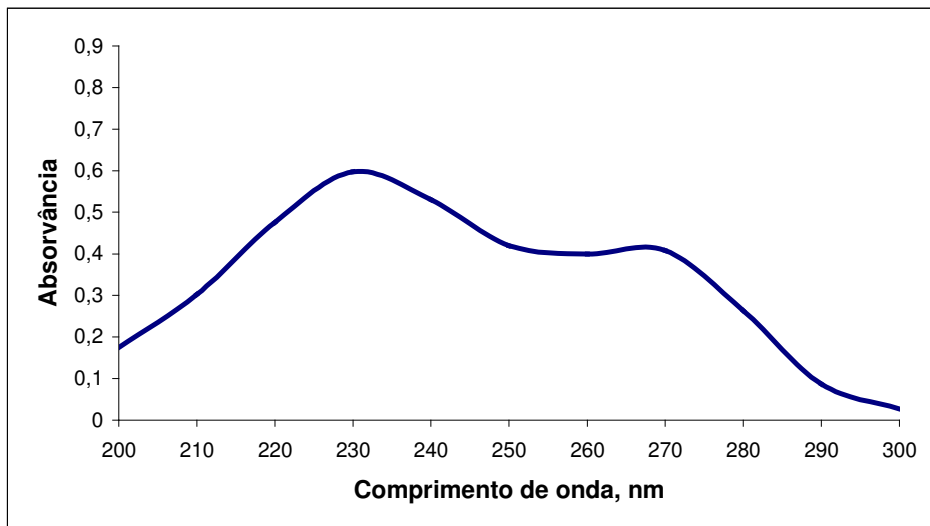


Figura 13 – Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência a 20,0 µg/mL em metanol.

Os espectros na região ultravioleta de cefoxitina sódica amostras e substância química de referência em água de purificada, metanol, HCl 0,1 *M* e NaOH 0,1 *M* estão representados na Figura 14 e 15, respectivamente.

Dentre os diversos solventes utilizados para determinação dos máximos de absorção, a água por ser de fácil aquisição, baixo custo e fácil descarte foi elegida como solvente de escolha para o desenvolvimento da validação do método por espectrofotometria UV; os demais solventes como HCl 0,1 *M* e metanol apresentaram também máximos de absorção por volta de 235 nm como a água purificada; sendo que o solvente HCl 0,1 *M* apresentou uma diminuição do máximo de absorção, sendo considerado o pior caso; quanto ao solvente NaOH 0,1 *M* provou ligeiro deslocamento no máximo de absorção.

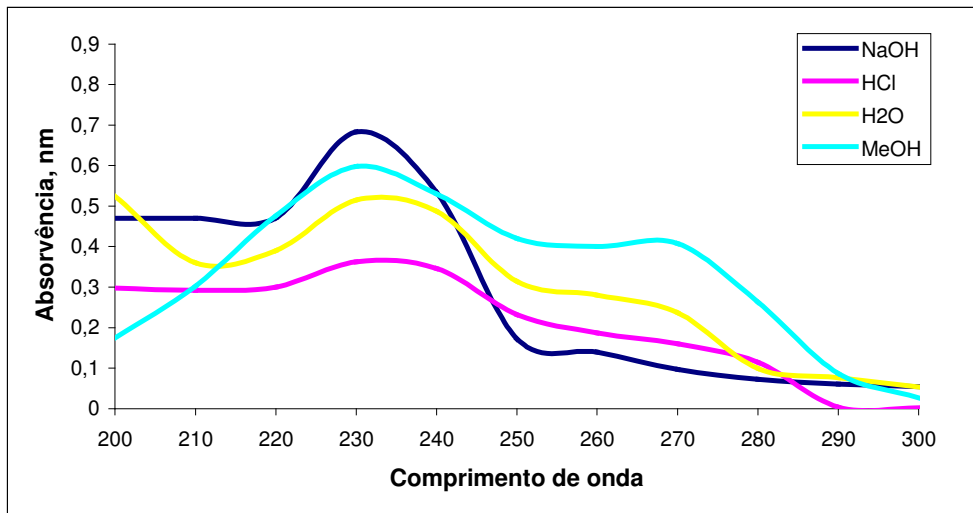


Figura 14 – Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica amostra em metanol, água purificada, NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M em concentração de 20,0 µg/mL.

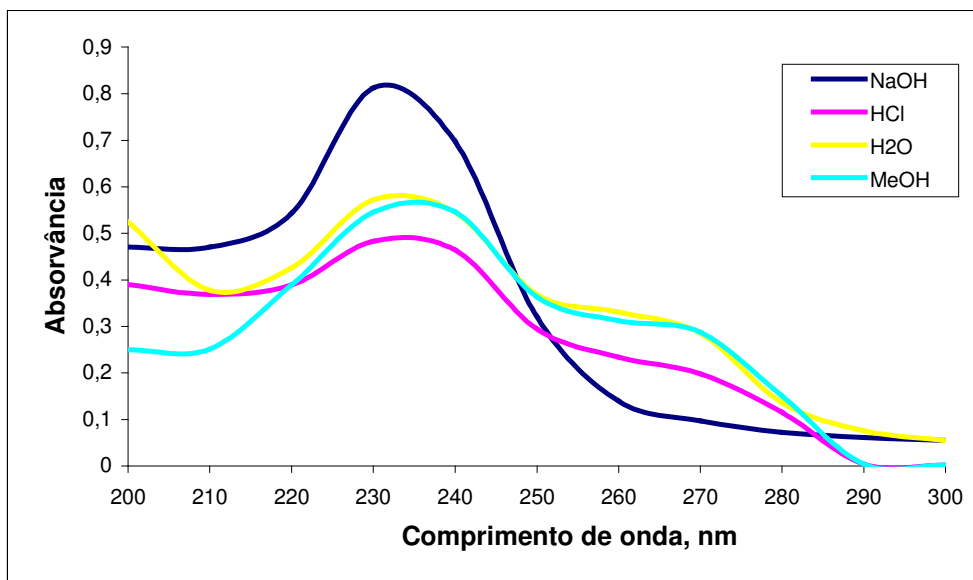


Figura 15 – Espectro na região de ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância química de referência em metanol, água purificada, NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M em concentração de 20,0 µg/mL.

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. Material

6.1.1. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos citados:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência JAS.CO 980
- Detector INTRALAB 5100
- Integrador Processador CG 2000
- Coluna Phenomenex C₁₈ (150 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm tamanho da partícula), detecção 200-400 nm, 00F-4252-EO.
- Espectrofotômetro FTIR SHIMADZU 3000
- Espectrofotômetro UV-VIS JAS.CO 7800
- Balança analítica Sartorius BL2105
- Estufa bacteriológica QUIMIS 316.24
- Autoclave PRISMATEC / QUIMIS 190.21
- Câmara fluxo laminar LOGEN Scientific 1053
- Micropipetador BOECO, mod 20-200 µL
- Pipetador automático BOECO
- Ponto de fusão STUART Cientific SMP1
- Estufa de secagem QUIMIS 702.780
- Fotocolorímetro MERCK SQ 118

- Agitador de tubos, PHOENIX, modelo AP56
- Osmose Reversa, Quimis
- Seringa HAMILTON, 50 μ L
- Paquímetro, STARRET, modelo digital eletrônico, série 727
- Osmose reversa, GEHAKA
- Agitador de tubos, Phoenix

6.1.1. Solventes, matérias-primas e reagentes.

Os reagentes, solventes e matérias primas utilizados na análise quantitativa encontram-se listados a seguir:

- Cefoxitina sódica substância de referência e amostras gentilmente doadas pelo Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda descritas nos itens 4.1.e 4.2.
- Ácido acético PA (Merck)
- Acetonitrila grau CLAE (Merck)
- Metanol grau CLAE (Merck)
- Fosfato monobásico de potássio PA (Merck)
- Fosfato dibásico de potássio PA (Fluka)
- Ágar nº11 (Merck)
- Ágar nº1 (Merck)
- Caldo BHI (Biobrás)
- Ácido acético PA (Synth)
- Hidróxido de sódio PA (Merck)

- Ácido clorídrico PA (Synth)
- Metanol PA (Synth)
- Acetato de etila PA (Synth)
- Clorofórmio PA (Synth)
- Diclorometano PA (Synth)
- Acetona PA (Synth)
- Éter etílico PA (Synth)
- Etanol PA (Synth)
- Hidróxido de amônio PA (Synth)
- Ácido fórmico PA (Synth)
- Iodo ressublimado PA (Mallinckrodt)
- Iodeto de potássio PA (Merck)
- Ácido clorídrico PA (Merck)
- Dicromato de potássio padrão primário (Merck)
- Tiosulfato de sódio PA (Merck)
- Acetato de sódio PA (Merck)
- Amido PA (Synth)
- Ácido perclórico PA (Merck)
- Biftalato de potássio PA (Merck)
- Cristal violeta (Merck)

6.1.2. Microrganismos

- *Staphylococcus aureus* ATCC 12226
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 9372

7. Espectrofotometria na região de ultravioleta

7.1. Considerações Gerais

A espectrofotometria na região de 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 da: estrutura molecular do composto, solvente, temperatura e comprimento da radiação (KOROLKOVAS, 1998).

Vários métodos para determinação de cefalosporinas são descritos com a determinação espectrofotométrica; utilizando cério (VI) e 1-clorobenzotriazol (AYAD et al., 1999a; AYAD et al., 1999b) quantificação de cefazolina sódica, cefalexina monoidratada, cefadroxila monoidratada e cefoperazona na forma pura e também em suas respectivas formas farmacêuticas (SALEH et al., 2001). Também foi proposto um método baseado na reação em meio ácido com ferro resultando em formação de complexos Fe-fenantrolina a 254 nm, para determinação de cefuroxima, ceftriaxona, cefaclor, cefixima, ceftizoxima e cefalexina (AL-MOMANI, 2001).

Outro método descrito para determinação de certas cefalosporinas por espectrofotometria através da complexação com dicromato de potássio em meio ácido foi proposto para cefotaxima, cefuroxima sódica e ceftriaxona dissódica obtendo linearidade entre 0,20 – 0,28 µg/mL (AMIN e RAGAB, 2004). Como identificação para esta

cefalosporina há descrito na literatura uma identificação realizada por espectrofotometria de ultravioleta (USP, 2005).

7.1.1. Método

O espectro na região de ultravioleta foi obtido utilizando-se equipamento espectrofotômetro UV-VIS JAS.CO 7800 e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

O solvente escolhido para o desenvolvimento foi a água purificada conforme descrito no item 5.8.2.

As soluções foram preparadas com a substância de referência de cefoxitina previamente dessecada e pesada.

O espectro de absorção de cefoxitina substância química de referência na região de ultravioleta é representado na Figura 16.

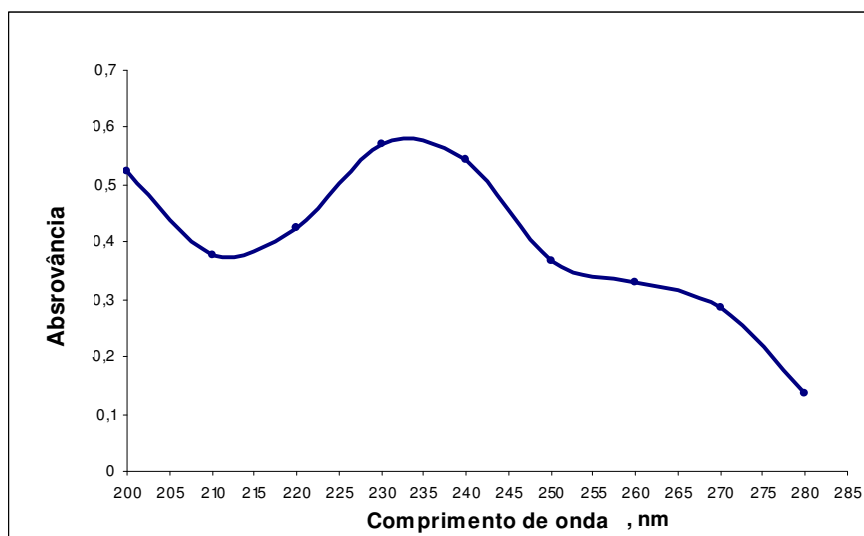


Figura 16 - Espectro na região ultravioleta da solução de cefoxitina sódica substância de referência a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada.

7.1.2. Realização da curva de Ringbom

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

Foram pesados analiticamente 20,0 mg de cefoxitina sódica substância química de referência, previamente dessecados em estufa a 60,0°C durante 2 horas, e transferidos para balão volumétrico de capacidade de 100 mL. A substância foi dissolvida completando-se o volume com água purificada. Foi obtida uma solução de concentração de 200,0 $\mu\text{g/mL}$ em água purificada. A partir desta solução foram transferidas alíquotas para obtenção de curva

analítica com 18 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de bureta calibrada de 10,0 mL. As soluções foram preparadas em triplicata.

Os volumes foram completados com água purificada obtendo-se soluções com concentrações de 2,0 a 36,0 µg/mL de cefoxitina sódica utilizando balões volumétricos de 100 mL (Tabela 9).

Tabela 9 – Obtenção da curva de Ringbom de cefoxitina sódica através de espectrofotometria no ultravioleta a 235 nm.

pontos	Cefoxitina sódica 200,0 µg/mL (mL)	quant. de cefoxitina sódica (mg)	concentração final (µg/mL)	Abs*
1	1,0	200,0	2,0	0,063
2	2,0	400,0	4,0	0,117
3	3,0	600,0	6,0	0,181
4	4,0	800,0	8,0	0,248
5	5,0	1000,0	10,0	0,316
6	6,0	1200,0	12,0	0,367
7	7,0	1400,0	14,0	0,477
8	8,0	1600,0	16,0	0,510
9	9,0	1800,0	18,0	0,561
10	10,0	2000,0	20,0	0,633
11	11,0	2200,0	22,0	0,692
12	12,0	2400,0	24,0	0,743
13	13,0	2600,0	26,0	0,807
14	14,0	2800,0	28,0	0,863
15	15,0	3000,0	30,0	0,930
16	16,0	3200,0	32,0	0,992
17	17,0	3400,0	34,0	1,059
18	18,0	3600,0	36,0	1,119

A curva de Ringbom (Figura 17) foi obtida utilizando-se logaritmo das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) *versus* absorvância ($100 - T\%$).

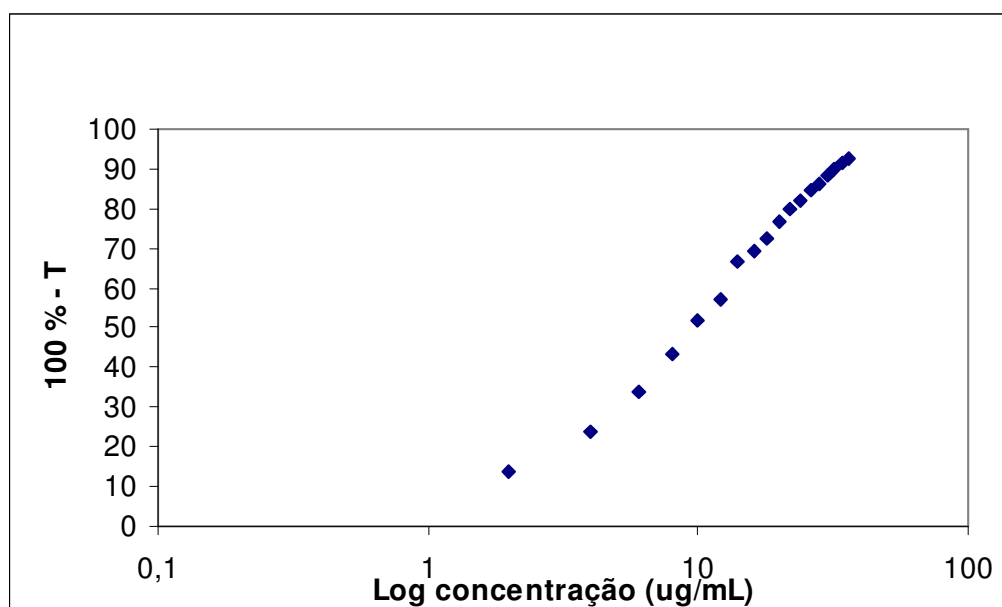


Figura 17 – Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de cefoxitina sódica substância de referência de 2,0 a 36,0 $\mu\text{g/mL}$.

7.1.3. Obtenção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica foram pesados analiticamente 20,0 mg de cefoxitina sódica substância química de referência, previamente dessecados em estufa a $105,0^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, e transferidos para balão volumétrico de capacidade de 100 mL. A substância foi dissolvida completamente completado-se o volume com água purificada obtendo uma solução de concentração de 200,0 $\mu\text{g/mL}$. Com a utilização de bureta calibrada, a partir desta solução, foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de

100,0 mL, para obtenção de soluções com concentrações de 18,0 à 28,0 µg/mL de cefoxitina sódica substância de referência, como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Preparo da curva analítica de cefoxitina sódica através de espectrofotometria no ultravioleta a 235 nm.

pontos	vol. de cefoxitina sódica 200,0 µg/mL (mL)	vol. de água qsp bV 100 mL (mL)	concentração final µg/mL
1	9,0	100,0	18,0
2	10,0	100,0	20,0
3	11,0	100,0	22,0
4	12,0	100,0	24,0
5	13,0	100,0	26,0
6	14,0	100,0	28,0

Os resultados das leituras de absorvância obtidos para curva de calibração estão apresentados na Tabela 11. Cada determinação corresponde ao preparo de três soluções e leitura das mesmas no espectrofotômetro a 235 nm.

Tabela 11 – Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.

concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Abs*	Abs média \pm e.p.m	DPR%
18,0	0,564	0,565 \pm 0,0012	0,27
	0,565		
	0,567		
20,0	0,628	0,627 \pm 0,0012	0,24
	0,626		
	0,629		
22,0	0,692	0,692 \pm 0,0016	0,30
	0,695		
	0,691		
24,0	0,746	0,746 \pm 0,0016	0,27
	0,744		
	0,748		
26,0	0,803	0,806 \pm 0,0021	0,33
	0,808		
	0,807		
28,0	0,863	0,865 \pm 0,0016	0,23
	0,867		
	0,865		

* cada valor é média de três determinações, e.p.m. – erro padrão da média, DPR% - desvio padrão relativo percentual, Abs – absorvância.

A representação gráfica de curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de cefoxitina sódica em concentrações de 18,0 a 28,0 $\mu\text{g/mL}$ através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta à 235 nm estão representados na Figura 18.

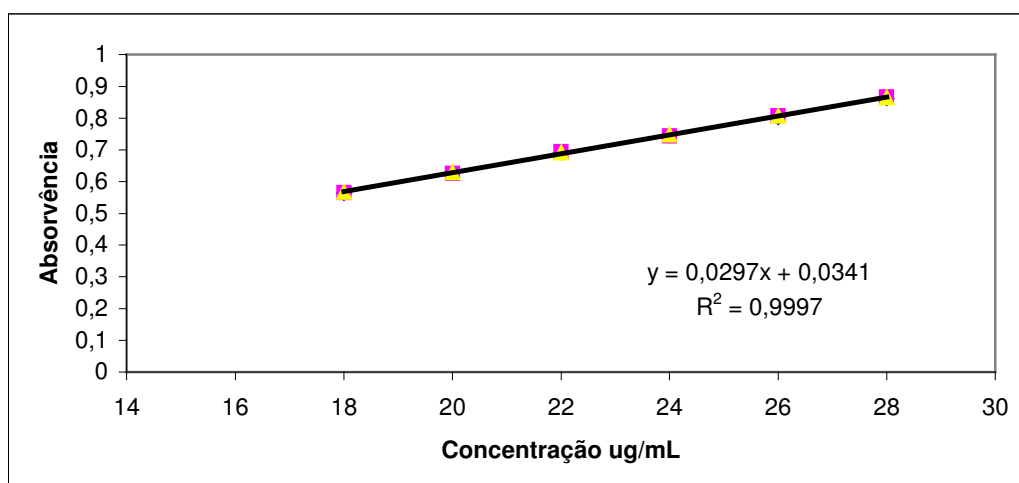


Figura 18 – Representação gráfica da curva de calibração da solução de cefoxitina sódica pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 235 nm.

7.1.4. Determinação de cefoxitina na forma farmacêutica

7.1.4.1. Preparo da solução de cefoxitina substância de referência

Foram pesados exatamente 20,0 mg de cefoxitina sódica substância de referência e transferida para balão volumétrico de capacidade de 100 mL; o volume foi completado com água purificada para obtenção de uma solução com concentração de 200,0 $\mu\text{g/mL}$.

A partir desta solução foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com água purificada, obtendo solução de concentração final de cefoxitina sódica de 20,0 $\mu\text{g/mL}$, conforme Figura 19. Este procedimento foi realizado em triplicata.

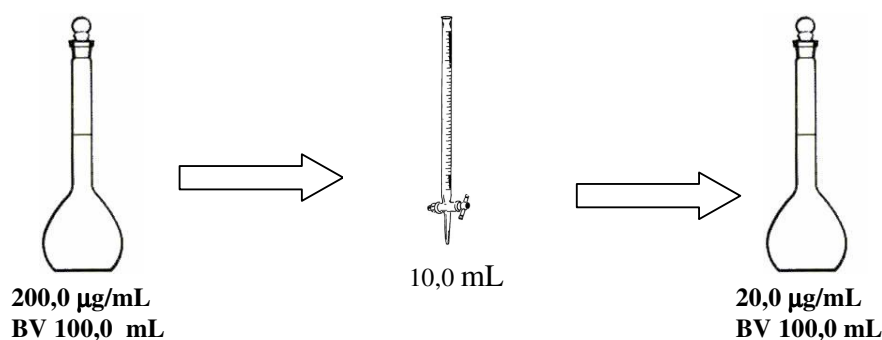


Figura 19 – Preparação das soluções-substância de referência utilizada no método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.

7.1.4.2. Determinação do peso médio

Os recipientes que contêm sólidos destinados a soluções ou suspensões injetáveis devem ser examinados quanto ao peso de sólidos dispensados a satisfazer as exigências especificadas na monografia.

Os sólidos, cujos pesos médios são maiores que 40 mg deve satisfazer as exigências do teste descrito, quando o mesmo é realizado sobre 20 unidades. Para realizar o peso médio devemos remover o rótulo do recipiente. Lavar e secar o recipiente externamente, abrir e pesar imediatamente seu conteúdo. Esvaziar o recipiente o mais completamente possível por meio de leves batidas e enxaguar com água, se necessário, e a seguir com álcool etílico. Secar o recipiente a 105°C por uma hora ou, conforme a natureza do conteúdo, à temperatura mais baixa, até peso constante. Esfriar em dessecador e pesar.

A diferença entre o peso do recipiente com o conteúdo e o peso do recipiente vazio representa o peso do conteúdo. Repetir este procedimento com dezenove recipientes. Não mais que dois dos pesos individuais podem desviar mais que 10% do peso médio determinado sobre os vinte recipientes e nenhum devem desviar mais que 20% (FARM. BRAS., 1988).

7.1.4.3. Preparo da amostra

Após a realização do peso médio, uma quantidade de pó equivalente ao teor do frasco ampola foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado com água purificada para obtenção de solução de concentração teórica de 1,0 mg/mL. Uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com água destilada, obtendo solução de concentração de 200,0 µg/mL.

A partir desta solução foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com água destilada, obtendo solução de concentração final de cefoxitina sódica de 20,0 $\mu\text{g/mL}$, conforme Figura 20. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 235 nm, utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de espessura e água purificada como branco. As soluções foram preparadas em triplicata.

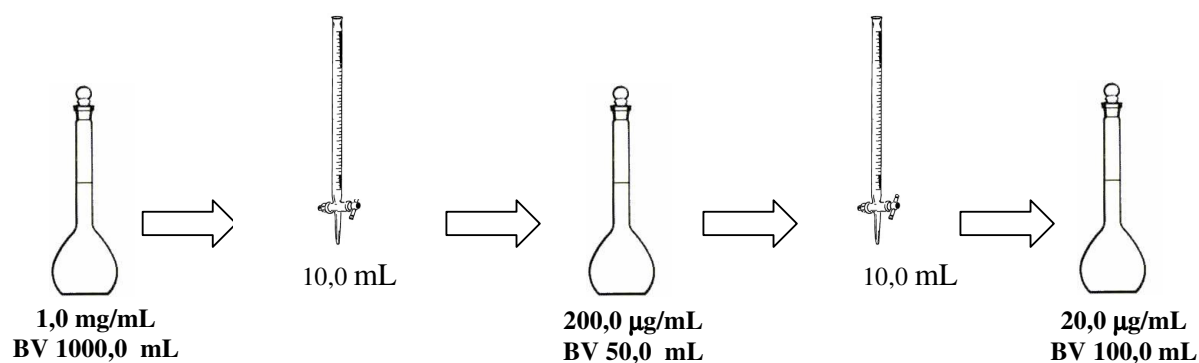


Figura 20 – Preparação das soluções-amostra utilizada no método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.

7.1.4.4. Cálculo

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 1:

$$CA = AA \cdot CSR / ASR$$

Equação 1

Em que:

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

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

AA = absorvância da amostra

ASR = absorvância da substância de referência

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

$$CA\% = CA \cdot 100 / Ct$$

Equação 2

Em que:

CA = concentração de cefoxitina sódica encontrado na amostra (mg)

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

Os valores experimentais da determinação de cefoxitina sódica nos frascos ampolas pelo método proposto encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000,0 mg de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta à 235 nm.

ensaios	Abs*	quantidade encontrada (mg)	teor %	média ± e.p.m.	DPR%
I	0,608	971,00	97,10		
II	0,611	976,00	97,60		
III	0,610	975,00	97,50	97,60 % ±	0,30
IV	0,612	978,00	97,80	0,27	
V	0,611	976,00	97,60		
VI	0,612	980,00	98,00		

* cada valor é a média de três determinações distintas.

e.p.m. – erro padrão da média; DPR% - desvio padrão relativo percentual

7.1.5. Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 28, 2005). Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência foram adicionadas nas soluções de cefoxitina sódica amostras para a quantificação da substância. Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de solução-amostra para balões volumétricos e nestes são adicionadas quantidades exatamente definidas de solução de cefoxitina sódica substância de referência, preparadas em concentrações adequadas e referentes às obtidas para execução do ensaio.

7.1.5.1. Preparo das soluções

Foram analiticamente pesados exatamente 20,0 mg de cefoxitina sódica e transferidos para balão volumétrico de 100 mL para o preparo da solução de cefoxitina sódica substância de referência com concentração de 200,0 µg/mL. A solução da amostra foi preparada com concentração de 200,0 µg/mL, a partir da solução de cefoxitina sódica frascos ampolas em concentração de 1,0 mg/mL, conforme descrito no item 7.1.4.2.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 10,0 mL de solução-amostra para balões volumétricos de 100 mL denominados; A, R₁, R₂ e R₃. Foram adicionados 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução de cefoxitina sódica substância de referência em concentração de 200,0 µg/mL, nos balões R₁, R₂ e R₃, respectivamente.

Para o preparo da solução padrão foram transferidos 10,0 mL de solução de cefoxitina sódica substância de referência de 200,0 µg/mL para um balão de 100 mL completado o volume com água purificada, obtendo solução de concentração final de 20,0 µg/mL.

Os volumes dos balões foram completados com água purificada, obtendo-se concentrações de 20,0; 22,0; 24,0; 26,0; 20,0 µg/mL para os balões A, R₁, R₂, R₃ e P, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 – Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.

	vol. solução- amostra	vol. cefoxitina sódica subst. referência	concentração final (µg/mL) em 100 mL
	200,0µg/mL (mL)	200,0 µg/mL (mL)	
A	10,0	-	20,0
R₁	10,0	1,0	22,0
R₂	10,0	2,0	24,0
R₃	10,0	3,0	26,0
P	-	10,0	20,0

* cada valor é a média de três determinações.

7.1.5.2. Cálculo de teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada através da expressão descrita pela AOAC conforme a equação 3 (AOAC, 1990):

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

Em que:

Equação 3

Cf = Concentração da substância de referência + concentração da amostra

Cu = Concentração da amostra

Ca = Concentração da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para frascos ampolas de cefoxitina sódica estão na Tabela 14.

Tabela 14 - Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica frascos ampolas através do método espectrofotométrico na região UV a 235 nm.

	conc.teórica adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Abs*	conc. encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	recuperação (%)
R₁	2,0	0,657	22,27	102,00
R₂	4,0	0,713	24,17	98,50
R₃	6,0	0,775	26,3	100,60

* Cada valor é média de três determinações

7.1.6. Análise estatística

A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados. As absorvâncias utilizadas na determinação da curva de calibração foram estatisticamente avaliadas pela análise da variância (ANOVA), apresentada na Tabela 15 (MARONA e SCHAPOVAL, 1998).

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 16.

Tabela 15 – Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.

fontes de variação	GL	soma dos quadrados	variância	F	P
ENTRE	5	0,18672	0,0373	778,02*	3,11
regressão linear	1	0,18649	0,1865	3885,24*	4,75
desvio de linearidade	4	0,00023	0,0001	1,21	4,79
RESÍDUO	12	0,00005	0,00005	-	-
TOTAL	17	0,18677	-	-	-

Tabela 16 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de cefoxitina sódica através do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 235 nm.

parâmetros	resultados
λ máximo (nm)	235
ϵ	14088,93
limites da Lei de Beer ($\mu\text{g/mL}$)	18,0 à 28,0
equação: $y = a + bx$	
a	0,0297
b	0,0341
r (coeficiente de correlação)	0,9997
n	6

7.1.7. Discussão

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

A Lei de Lambert Beer explica que há uma relação exponencial entre a transmissão de luz através de uma sustância e a concentração da sustância, assim como também entre a

transmissão e a longitude do corpo que a luz atravessa. Se conhecemos l e α , a concentração da substância pode ser deduzida a partir da quantidade de luz transmitida (EWING, 2001).

O espectro de absorção mostrou pico de absorção máxima de 235 nm, utilizando solução aquosa de cefoxitina sódica a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18). Com o objetivo de determinar a linearidade, foi realizada curva de Ringbom. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 18,0 à 28,0 $\mu\text{g/mL}$, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9997. A equação da reta, que se apresenta na Figura 18, foi de $y = 0,0297x + 0,0341$.

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 cefoxitina sódica frascos ampolas para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,40%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios para a validação de métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se seis determinações de cefoxitina sódica frascos ampolas, sendo cada preparação realizada em triplicata e as medições realizadas de preparações distintas. O desvio padrão relativo foi de 0,30%.

A análise estatística dos resultados de absorvância obtida foi matematicamente verificada pela análise da variância (ANOVA). A análise de variância é um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma

variável dependente, a principal aplicação da ANOVA é a comparação de médias oriundas de grupos diferentes, também chamados tratamentos; e os resultados obtidos, com F significativo para fontes de variação ENTRE e regressão linear, sendo que o desvio da linearidade calculado mostrou-se menor que o tabelado; desta forma valida o método de espectrofotometria na região ultravioleta para cefoxitina sódica.

O teor médio de cefoxitina sódica determinada nos frascos ampolas foi de 97,60%; medidos durante seis dias em triplicata, sendo cada medição originada de soluções distintas, demonstrou a sensibilidade do método para detectar a substância ativa nos frascos ampolas, não ocorrendo interferência dos excipientes.

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

8. Método de análise microbiológica

8.1. Considerações gerais

O objetivo deste estudo é realizar o desenvolvimento e a validação de ensaio de quantificação de cefoxitina substância de referência e forma farmacêutica, utilizando método microbiológico de difusão em ágar, que relaciona o tamanho da zona de inibição com a concentração da substância ensaiada.

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 et al., 2003).

8.2. Método

A partir de parâmetros especificados em ensaios com outros fármacos, como citam os autores (FROEHLICH, 1991; FRATINI, 1993; SOUZA, 1995; EV, 1997; MARONA e SCHAPOVAL, 1998; EV e SCHAPOVAL, 2002; WHITE, 1999), 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, conforme Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros utilizados para a avaliação de cefoxitina sódica por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas.

parâmetros	descrição
microrganismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12226 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 6538 <i>Escherichia coli</i> ATCC 9372
meios de cultura	meio nº 1 de Grove-Randall meio nº2 de Grove-Randall
solução diluente	solução tampão fosfato pH 6,0 solução tampão fosfato pH 8,0
concentração da solução padrão	100,0; 200,0 e 400,0 µg/mL 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL

8.3.Execução do ensaio

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 18). A padronização do ensaio foi realizada utilizando-se técnica descrita para outros agentes antimicrobianos (FDA, 1996; Farm. Bras., 1988).

Tabela 18 – Parâmetros fixados na padronização de cefoxitina sódica no ensaio microbiológico – método difusão em ágar – cilindros em placa.

parâmetros	descrição
microrganismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12226
meios de cultura	meio nº1 de Grove-Randall meio nº2 de Grove-Randall
solução diluente	solução tampão fosfato pH 8,0
concentração da solução padrão	50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL
concentração do inóculo	0,5% (V/V)
temperatura de incubação	35,0 ± 2,0°C
tempo de incubação	18 horas
solução diluente inicial	água purificada

8.3.1. Preparo das soluções-padrão de cefoxitina sódica

Foram transferidos 100,0 mg de cefoxitina sódica substância de referência, exatamente pesados, para balão volumétrico de 100,0 mL e dissolvidos em água para obtenção de uma solução com 1,0 mg/mL. Desta solução foram tomadas alíquotas de 0,5; 1,0 e 2,0 mL com auxílio de uma bureta de 10,0 mL e transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL, respectivamente, completando o volume com solução tampão pH 8,0, obtendo as soluções de concentração de 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL.

8.3.2. Preparo das soluções de cefoxitina na forma farmacêutica

A partir do peso médio dos frascos ampolas realizado conforme item 7.1.4.2, foi pesado o equivalente a 100,0 mg de cefoxitina sódica que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água para obtenção de uma solução com 1,0 mg/mL. Desta solução foram tomadas alíquotas de 0,5; 1,0 e 2,0 mL e transferidos para balão volumétrico 100,0 mL, respectivamente, completando o volume com solução tampão pH 8,0, obtendo as soluções de concentração de 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL.

8.4. Material

No doseamento microbiológico, foram utilizados os meios nº1 de Grove-Randall (Merck), para a manutenção dos microrganismos em tubos com meio inclinado, meio nº1 de Grove-Randall (Merck), como camada base e meio nº2 como camada de inóculo e caldo nutriente (Merck) na preparação e padronização do inóculo. Os meios de cultura e as soluções 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 e cilindros de aço inoxidável com 6,0 mm de diâmetro interno x 8,0 mm de diâmetro externo x 10,0 mm de altura. Estes materiais, assim como a vidraria não volumétrica, foram esterilizados em estufa.

8.5. Preparo do inóculo

Os microrganismos-teste *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12226 foram mantidos em meio inclinado nº1, de manutenção por 24 horas e repicados para caldo nutriente de forma a obter uma suspensão de bactérias que fornecesse $25,0 \pm 2,0\%$ de transmitância, medida em fotocolorímetro a 580 nm (FARM. BRAS, 1988). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 0,5% (V/V) em meio nº2 de Grove-Randall, mantido em banho a $47,0^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$. Todos os meios de cultura e soluções tampão foram esterilizados em autoclave a $121,0^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

8.6. Ensaio

Foram utilizadas 36 placas de Petri para o doseamento de cefoxitina sódica em frascos ampolas. Em capela de fluxo laminar, foram transferidos com auxílio de pipetador automático, 20,0 mL de meio nº1 de Grove-Randall para a camada base em cada placa.

Após a solidificação desta camada, foram adicionados por meio de um pipetador automático, 5,0 mL de meio nº 2 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, que receberam, com auxílio de pipetador automático, 200,0 µL das soluções descritas no item 8.3.3.1 e 8.3.3.2. em cada cilindro.

As placas foram incubadas a $35,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e após 18 horas realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição com auxílio de paquímetro.

Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos para as soluções em diferentes concentrações de padrão e amostra de cefoxitina sódica encontram-se na Tabela 19.

Doseamento microbiológico

Tabela 19 – Valores dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de cefoxitina sódica pelo ensaio microbiológico através do método difusão em ágar – técnica cilindros em placas.

	concentração ($\mu\text{g/mL}$)	diâmetros dos halos de inibição (mm)*	diâmetro médio \pm e.p.m	DPR %
P1	50,0	19,70 – 19,80 20,30 – 19,40 20,40 – 20,00	19,943 \pm 0,37	1,89
P2	100,0	24,80 – 24,30 23,80 – 24,50 23,70 – 24,20	24,210 \pm 0,41	1,72
P3	200,0	28,10 – 28,40 28,30 – 28,50 27,90 – 28,70	28,310 \pm 0,28	1,01
A1	50,0	20,00 – 19,40 19,70 – 19,30 20,00 – 19,60	19,660 \pm 0,29	1,50
A2	100,0	23,70 – 23,80 23,30 – 23,40 23,60 – 24,10	23,70 \pm 0,30	1,28
A3	200,0	28,00 – 28,30 28,10 – 28,00 27,70 – 28,50	28,100 \pm 0,27	0,98

Cada valor do halo de inibição corresponde à média de 6 determinações, média \pm erro padrão média, DPR % - desvio padrão relativo percentual

8.6.1. Cálculos

A reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração *versus* diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da substância de referência. A curva analítica foi construída, em decorrência dos valores da média do diâmetro das concentrações 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL. A curva foi construída utilizando o programa Excel 98 (Figura 21).

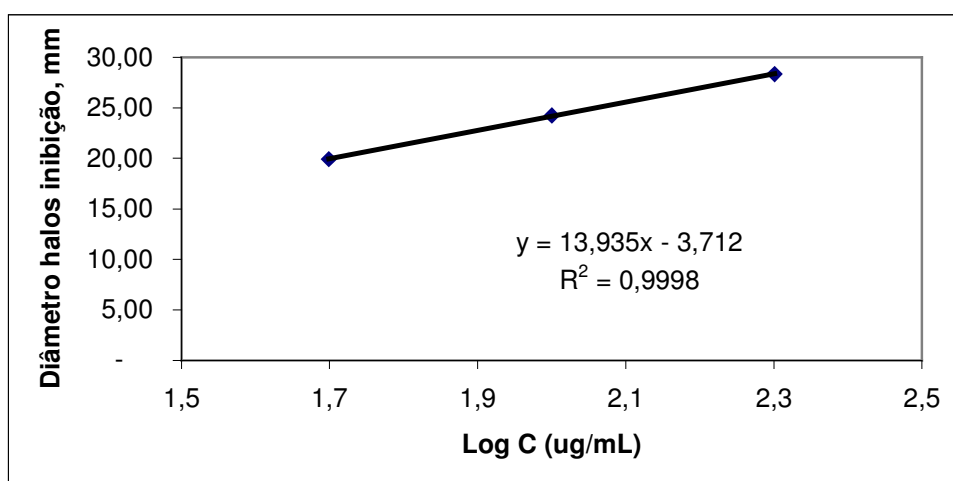


Figura 21 – Representação gráfica da curva analítica de cefoxitina sódica através do ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.

Para a construção da curva analítica foram utilizados 3 pontos como preconizado pela Farm. Bras. (1988) para delineamento 3 x 3. A disposição das soluções substância de referência (**P**) e amostra (**A**) na placa de Petri antes e após o ensaio são demonstradas pelas Figuras 22 e 23, respectivamente.

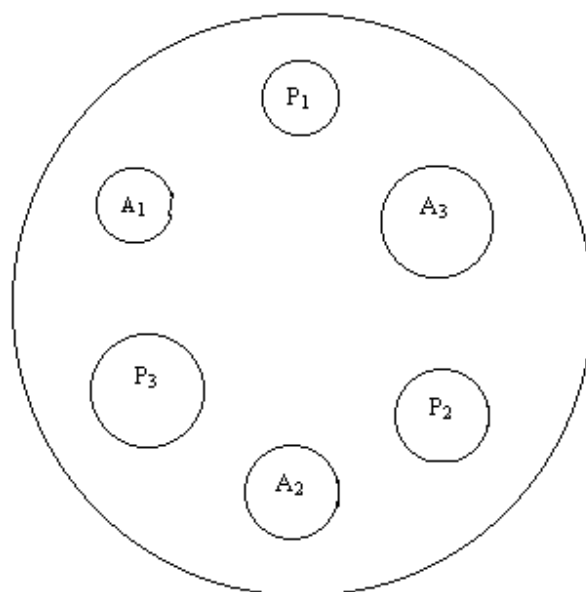


Figura 22 - Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P₁ (50 µg/mL); P₂ (100 µg/mL); P₃ (200 µg/mL) e A₁ (50 µg/mL); A₂ (100µg/mL); A₃ (200 µg/mL)

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.

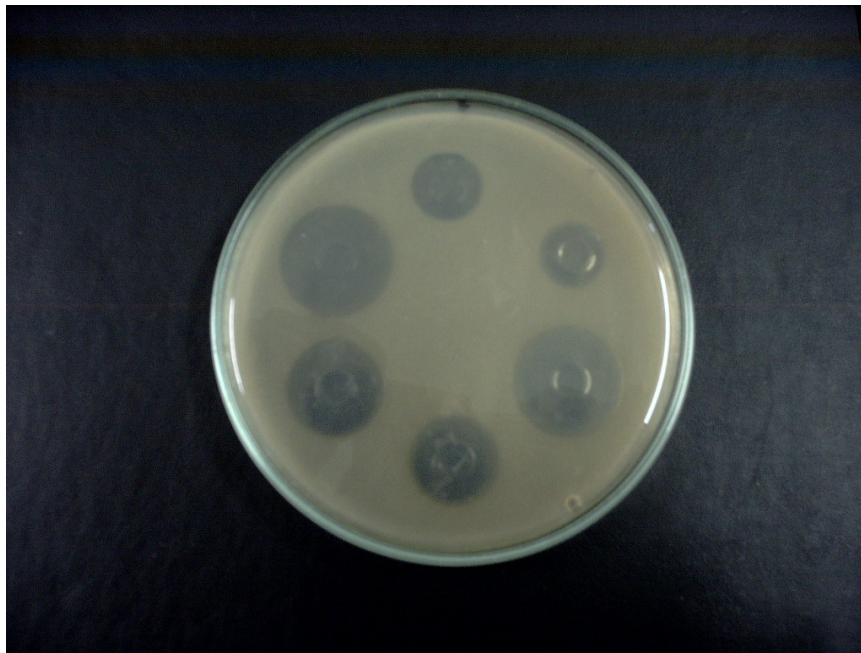


Figura 23 - Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, onde P₁ (50 µg/mL); P₂ (100 µg/mL); P₃ (200 µg/mL) e A₁ (50 µg/mL); A₂ (100 µg/mL); A₃ (200 µg/mL)

Equação de HEWITT

$$T/R (\%) = \text{Antilog } M \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

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

Em que:

$$F = 1/3[(A_1 + A_2 + A_3) - (P_1 + P_2 + P_3)]$$

I = logaritmo da razão das doses

$$E = 1/4 [(A_3 + P_3) - (A_1 + P_1)]$$

Os resultados obtidos na determinação de cefoxitina sódica frascos ampolas no ensaio microbiológico, calculados pela fórmula de HEWITT (1977) estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de cefoxitina sódica através do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa.

ensaio	valor encontrado (mg/ampola)	teor (%)	média ± e.p.m.	DPR %
I	947,00	94,70		
II	981,40	96,14		
III	940,00	94,00	94,90 ± 0,77	0,81
IV	940,00	94,50		
V	955,00	95,50		
VI	946,00	94,60		

$P < 0.05$

e.p.m. - erro padrão da média, DPR % - desvio padrão relativo percentual

8.6.2. Análise estatística

A equação da reta para representação gráfica da curva de analítica foi determinada através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva analítica foi utilizado três pontos, cada um representando a média de três determinações. A validação da metodologia foi realizada pela análise da variância (ANOVA), segundo tratamento estatístico preconizado pela Farm. Bras. (1988) para ensaio 3 x 3 (Tabela 21).

Doseamento microbiológico

Tabela 21 – Análise da variância dos dados obtidos no doseamento de cefoxitina sódica pelo ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa.

fontes de variação	GL	SQ	QM	F _{calc}	F _{tab}
preparação	1	1,000	1,000	8,779*	4,24
regressão	1	424,200	424,200	3723,960*	4,24
desvio paralelismo	1	0,004	0,004	0,033	4,24
quadrático	1	0,017	0,017	0,148	4,24
diferença de quadrático	1	0,151	0,151	1,328	4,24
desvio linearidade	2	0,168	0,084	0,7381	3,38
entre doses	5	425,372	85,074	746,849*	2,6
entre placas	5	0,416	0,083	0,760	2,6
dentro (erro)	25	2,848	0,114	-	-
total	35	428,64	-	-	-

* significativo para $P < 0,05$

8.7. Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 28, 2003).

8.7.1. 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 estará adicionada de padrão.

No desenvolvimento do teste de recuperação do doseamento microbiológico foram padronizados valores de 5,0; 10,0 e 20,0% de substância de referência adicionada, acima dos 100,0% preconizados. Neste ensaio, preparou-se uma solução de substância de referência com concentração de 1,0 mg/mL, pesando-se 100,0 mg de substância de referência em balão volumétrico de 100 mL com água purificada. A solução amostra foi preparada pesando-se o equivalente a 100,0 mg de cefoxitina sódica e diluída com água purificada em balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se solução de concentração de 1,0 mg/mL. As soluções para o teste de recuperação foram preparadas da seguinte forma: para a recuperação 1 foram transferidos volumes de 0,25; 0,50 e 1,0 mL da solução amostra para cada balão volumétrico de 100 mL. A partir da solução substância de referência de 1,00 µg/mL foram transferidos analiticamente, 5,0; 10,0 e 20,0 mL para balões volumétricos de 100 mL, 100 mL, 100mL respectivamente, completando-os com tampão fosfato pH 8.0.

Para a recuperação 2 foram transferidos volumes de 0,5; 1,0 e 2,0 mL da solução amostra para cada balão volumétrico de 100 mL. A partir da solução substância de referência de 1,00 µg/mL foram transferidos analiticamente, 5,0; 10,0 e 20,0 mL para

balões volumétricos de 100 mL, 100 mL, 100mL respectivamente, completando-os com tampão fosfato pH 8.0.

Para a recuperação 3 foram transferidos volumes de 1,0 ; 2,0 e 4,0 mL da solução amostra para cada balão volumétrico de 100 mL. A partir da solução substância de referência de 1,00 µg/mL foram transferidos analiticamente, 5,0; 10,0 e 20,0 mL para balões volumétricos de 100 mL, 100 mL, 100mL respectivamente, completando-os com tampão fosfato pH 8.0.

Desta forma obtivemos as seguintes concentrações teóricas:

- **Para o teste de recuperação 1:** 52,5; 105,0 e 210,0 µg/mL, representando os 5,0% adicionados.
- **Para o teste de recuperação 2:** 55,0; 110,0 e 220,0 µg/mL, representando os 10,0% adicionados.
- **Para o teste de recuperação 3:** 60,0; 120,0 e 240,0 µg/mL, representando os 20,0% adicionados.
- **Soluções Padrão e Amostra:** 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL, representando os 30,0% adicionados.

As soluções foram preparadas conforme Tabela 22.

Doseamento microbiológico

Tabela 22 - Representação do esquema de preparação das amostras no teste de recuperação de cefoxitina sódica no doseamento microbiológico difusão em ágar cilindros em placa.

	vol. da amostra adicionada (mL) (1,00 mg/mL)	vol. da solução padrão adicionada (mL) (1,00 mg/mL)	concentração teórica de amostra + padrão em 100 mL (µg/mL)
recuperação 1	0,25	5,00	52,50
	0,50	10,00	105,00
	1,00	20,00	210,00
recuperação 2	0,50	5,00	55,00
	1,00	10,00	110,00
	2,00	20,00	220,00
recuperação 3	1,00	5,00	60,00
	2,00	10,00	120,00
	3,00	20,00	240,00

Após a execução do ensaio, as placas foram colocadas em estufa incubadora à $35,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Após 18 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.

8.7.2. Cálculo do teste de recuperação

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

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

Equação 5

Em que:

P_F = potência da substância de referência + amostra

P_A = potência da amostra

P_P = potência da substância de referência adicionada

Os resultados do método microbiológico para a determinação de cefoxitina sódica em frascos ampolas estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Valores experimentais do teste de recuperação obtidos em amostras de cefoxitina sódica em frascos ampolas, através do ensaio microbiológico, método difusão em ágar – cilindros em placas.

	atividade percentual de padrão adicionada	recuperação (%)
recuperação 1	5,00	99,00
recuperação 2	10,00	102,00
recuperação 3	20,00	99,50

8.8. Discussão

Para assegurar a validade do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa na determinação da potência de cefoxitina sódica foram utilizados três concentrações diferentes para amostra, idênticas às da substância de referência, em delineamento 3 x 3 (FARM. BRAS., 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 do halo produzido, de forma à não se sobreporem e ficarem bem espaçados. A solução tampão fosfato utilizada foi pH 8,0, pois em pH 6,0 havia sobreposição dos halos e pouca repetibilidade entre as medidas.

A utilização cepas de *S. aureus* e *E. coli*, não apresentou condições de utilização por apresentar halos mal delimitados e medidas irregulares nas faixas de concentração e diluentes testados. No entanto, *S. epidermidis* mostrou-se muito adequado por fornecer halos regulares, bem delimitados, boa repetibilidade e possuir baixa patogenicidade.

Através dos resultados obtidos foi construída a curva analítica com soluções de 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL, as soluções foram preparadas em triplicata, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9998. A equação da reta foi $y = 13,935x - 3,712$.

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 cefoxitina sódica frascos ampolas para quantificação da substância. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,20%; realizado em triplicata. 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 6 determinações de cefoxitina sódica em frascos ampolas, realizadas em triplicata. O desvio padrão relativo foi 0,81% e o teor de cefoxitina sódica determinado nos frascos ampolas foi calculado através da equação de HEWITT obtendo teor médio de 94,90%.

A análise estatística dos resultados de diâmetro dos halos obtidos foi matematicamente verificada pela análise da variância (ANOVA). A análise de variância é um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente, a principal aplicação da ANOVA é a comparação de médias oriundas de grupos diferentes, também chamados tratamentos; e os

resultados obtidos, com F significativo para fontes de variação preparação, regressão e entre doses, sendo que o desvio do paralelismo, desvio da linearidade, entre placas calculado mostrou-se menor que o tabelado; desta forma valida o método microbiológico para cefoxitina sódica em frascos ampolas (Tabela 19).

O método proposto consiste de uma técnica que permite indicar a potência do produto uma vez que apresenta sensibilidade, linearidade, repetibilidade, exatidão e precisão adequadas, segundo a Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS., 1988).

9. Titulometria iodométrica

9.1. Considerações gerais

Os métodos volumétricos que utilizam reações de oxidação e redução dependem dos potenciais das semi-reações envolvidas, mas além dos potenciais favoráveis, os agentes oxidantes e redutores devem ser estáveis em solução e a substância a ser determinada deve ser colocada sob um determinado estado da oxidação, definido e estável, antes da titulação ser iniciada.

A iodometria é um método volumétrico indireto, em que um excesso de íons iodeto é adicionado a uma solução contendo o agente oxidante, que reagirá produzindo uma quantidade equivalente de iodo que será titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio.

Pelo fato do potencial de redução ser relativamente baixo, poucas substâncias são oxidadas pelo iodo, daí a existência de poucos métodos iodimétricos. Por outro lado, muitas espécies são capazes de oxidar o iodeto a iodo, resultando numa ampla variedade de métodos indiretos ou iodométricos, em que a espécie de interesse é quantitativamente reduzida em excesso de solução de iodeto liberando o equivalente em iodo, e esse é dosado por titulação com uma solução padrão de um redutor. O método iodométrico é mais vantajoso porque o iodo é gerado *in situ* evitando perdas por volatilização, uma vez que é facilmente sublimável (VOGEL, 1992).

O tiosulfato de sódio é o redutor mais empregado como titulante do iodo gerado nas metodologias iodométricas. Normalmente as soluções são preparadas a partir do sal

pentaidratado, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (PF = 248,18 g/mol), e devem ser posteriormente padronizadas, pois este sal não se enquadra como um padrão primário. Normalmente as soluções devem ser preparadas com água destilada previamente aquecida à ebulição para eliminar o CO_2 dissolvido e também prevenir a decomposição do tiosulfato por bactérias. É de praxe adicionar algumas gotas de clorofórmio que funciona como um eficiente conservante. Além disso, cerca de no máximo, 0,1g/L de Na_2CO_3 é adicionado para garantir uma leve alcalinidade na solução, pois íon $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ se decompõe em meio ácido, catalisado pela ação da luz, liberando enxofre coloidal e conferindo turbidez na solução. Por outro lado, hidróxidos de metais alcalinos e bórax, não devem ser adicionados, pois tendem a acelerar a decomposição sob ação do oxigênio atmosférico:

Assim: $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$, a solução deve ser armazenada em frasco escuro (âmbar) logo após a preparação. O dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) pode ser utilizado como padrão primário para a padronização indireta do tiosulfato, da mesma forma que o bromato e o iodato. Porém, em meios moderadamente ácidos, a reação de geração de iodo (triiodeto) não é instantânea, sendo necessário um meio de elevada acidez, concomitantemente aumentando o risco da oxidação do iodo formado pelo oxigênio atmosférico (CLEWELL et al., 2003 VOLZKE et al., 2003).

Nas titulações iodométricas, o amido é utilizado como indicador, pois forma complexo com I_2 de coloração azul intensa, e mesmo em concentração de 10^{-5} mol/L, o iodo pode ser detectado. O denominado amido solúvel é encontrado comercialmente e se dispersa facilmente em água. Por outro lado, o complexo amido- I_2 é relativamente pouco solúvel, e, portanto, nas titulações iodométricas o indicador deve ser adicionado na solução do analito um pouco antes do ponto de equivalência em que a concentração do iodo é baixa, pois ocorre o fenômeno de adsorção do iodo. Uma vez que o amido é susceptível ao ataque

por microrganismos, é recomendável preparar a solução no dia da análise. Normalmente, prepara-se solução de amido solúvel a 0,5 – 1,0% (m/v) e adiciona-se ácido bórico como preservativo, para prolongar o tempo de vida útil (VOGEL, 1992).

9.2. Preparo das soluções

9.2.1. Solução de NaOH 0,1 M

Foram dissolvidos 40,0g de hidróxido de sódio R (Merck) em cerca de 950 mL de água e completos com água para 1000 mL em balão volumétrico (USP28, 2005).

9.2.2. Solução de HCl 0,1 M

Foram diluídos 8,5 mL de ácido clorídrico R (Merck) e completados com água para 1000 mL em balão volumétrico (USP28, 2005).

9.2.3. Tiosulfato de sódio 0,02 M

Foram dissolvidos cerca de 26,0 g de tiosulfato de sódio R (Merck), 200,0 mg de carbonato de sódio R, e adicionado água para 1000 mL em balão volumétrico, recentemente fervida e resfriada (USP28, 2005).

9.2.3.1. Padronização

Foram pesados exatamente cerca de 210,0 mg de dicromato de potássio padrão primário (Merck), previamente pulverizados e dessecados a 120° durante 4 horas, e dissolvidos em 100 mL de água em Erlenmeyer de 500 mL de rolha esmerilhada. A amostra foi dissolvida por agitação do conteúdo e, posteriormente, foram adicionados

rapidamente 3,0 g de iodeto de potássio R (Merck), 2,0 g de bicarbonato de sódio R (Merck) e 15 mL de ácido clorídrico R (Merck). O frasco de Erlenmeyer foi fechado com rolha e mantido em repouso no escuro durante 10 minutos.

A rolha e as paredes internas do Erlenmeyer foram lavadas com água e o iodo titulado com a solução de tiosulfato de sódio 0,02 M até que a solução apresentasse apenas uma ligeira cor amarela. Uma alíquota de 3,0 mL de amido SI foi adicionada e a titulação desenvolvida até o desaparecimento da cor azul.

A normalidade é calculada conforme a equação 7.

$$\text{Teor} = \frac{m \text{ (mg)}}{V \text{ (mL)} \times 4,903} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

m= massa de dicromato de potássio em mg.

V= volume gasto na titulação c/ tiosulfato de sódio 0,02 M.

9.2.4. Solução de iodo 0,01 M

Foram dissolvidos 14,0 g de iodo R (Mallinckrodt) em solução iodeto de potássio SR (36,0 g em balão volumétrico de 100 mL com água), adicionadas 3 gotas de ácido clorídrico R (Merck) e volume completado com água para 1000 mL em balão volumétrico (USP28, 2005).

9.2.4.1. Padronização

Foram transferidos 25,0 mL volumetricamente desta solução de iodo 0,01 M para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL, diluído com 100,0 mL de água e adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico 1N. O conteúdo foi agitado vagarosamente e titulado com tiosulfato de sódio 0,02 M até amarelo pálido. Neste ponto foram adicionados 2,0 mL de amido SI para determinação do ponto final da titulação que se dá pela visualização da transparência da solução.

O calculo da padronização foi realizado conforme a Equação 8:

$V \times Fc = X$ $1000 \text{ mL} \text{-----} 24,817\text{g}$ $X \quad \text{-----} \quad Y$	Equação 8
--	-----------

Equivalente iodo: 12,69-----24,81 Equivalente tiosulfato de sódio

Z -----Y

Valor teórico do Iodo 0,1M = 0,31725

$$Fc = Y / 0,31725$$

Em que:

V= volume tiosulfato gasto na titulação;

Fc= fator de correção do tiosulfato de sódio 0,02 M

9.2.5. Tampão acetato

Foram pesados exatamente 5,44 g de acetato de sódio R (Merck) e 2,40 g de ácido acético (Merck) e diluídos com água em balão volumétrico de 100 mL.

9.2.6. Solução amido SI

Foi triturado 1,0g de amido solúvel com 10,0 mL de água fria e adicionados lentamente, sob agitação constante, em 200mL de água fervente. A mistura foi aquecida até obter um fluido translúcido tomando cuidado, uma vez que o aquecimento mais prolongado que o necessário torna a solução menos sensível. O material foi deixado em repouso para sedimentar e permitir a separação do líquido sobrenadante límpido para ser utilizado. É necessário que seja preparada solução nova no dia do uso (USP28, 2005).

9.3. Método

Após a realização do peso médio descrito no item 7.1.4.2, uma quantidade de pó equivalente a 300 mg de cefoxitina sódica foi pesada em frasco de Erlenmeyer de 250 mL com rolha esmerilhada adicionando-se volumetricamente 10,0 mL de solução de NaOH 0,1 *M*. O conteúdo foi deixado em repouso durante 20 minutos. Após este tempo foram adicionados volumetricamente 10,0 mL de HCl 0,1 *M*, 10 mL de tampão acetato e 25,0 mL de solução de iodo 0,01 *M* e mantido ao abrigo da luz em repouso durante 20 minutos. O excesso de iodo foi titulado com solução de tiosulfato de sódio 0,02 *M* usando como indicador solução de amido SI.

O teor de cefoxitina sódica foi determinado pela Equação 6:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{V \times \text{mEq} \times 100}{2 m}$$

Equação 6

Em que:

V = volume de iodo 0,01M (mL)

mEq = miliequivalente de cefoxitina sódica (44.944 mg)

m = massa pesada de cefoxitina sódica

9.4. Determinação de cefoxitina nas amostras

Após a realização do peso médio, conforme descrito no item 7.1.4.2 as amostras foram analisadas conforme procedimento descrito no item 9.2.

Este procedimento foi realizado em triplicata.

A determinação do teor foi realizada de acordo com a equação 9:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{V \times \text{mEq} \times 100}{2 m}$$

Equação 9

Em que:

V = volume de iodo 0,01M (mL)

mEq = miliequivalente de cefoxitina sódica (44.944 mg)

m = massa pesada de cefoxitina sódica

Os resultados obtidos para a determinação de cefoxitina sódica nos frascos ampolas são encontrados na Tabela 24.

Tabela 24 – Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica através de iodometria.

repetição	dia 1 (%)	dia 2 (%)	dia 3 (%)	média inter-dia (%)
1	95,95	96,94	96,48	
2	96,04	97,34	96,09	
3	97,44	96,76	96,61	96,33
4	95,33	96,34	95,79	
5	95,88	96,58	95,16	
6	96,54	95,90	96,71	
média intra-dia (%)	96,20	96,64	96,14	
s	0,72	0,50	0,59	0,60
DPR%	0,66	0,45	0,54	0,55
n	6	6	6	6

s – desvio padrão; RSD - desvio padrão relativo percentual.

9.5. Teste de recuperação

O teste de recuperação deverá ser realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 28, 2005).

9.5.1. Preparo das amostras

O ensaio de recuperação foi conduzido da seguinte maneira: Para os ensaios de amostra (A) e substância de referência (P) foram pesados 300,0 mg e analisados conforme procedimento descrito no item 9.4.

Resumidamente, foram pesadas quantidades de 300,0 mg de cefoxitina sódica amostra em três frascos de Erlenmeyer com rolha esmerilhada, sendo R₁, R₂ e R₃. Foram adicionados 30,0; 60,0 e 90,0 mg de cefoxitina sódica substância de referência, representando 10,0%, 20,0% e 30,0% em cada um dos Erlenmeyers R₁, R₂ e R₃, respectivamente. Desta forma procedeu-se à análise de teor conforme descrito no item 9.4.

A balança utilizada nas pesagens foi previamente calibrada e aferida; as soluções e reagentes utilizados no ensaio foram todos de grau analítico.

O preparo das soluções para o teste de recuperação encontra-se na Tabela 25.

Tabela 25 – Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método de iodometria.

	Massa amostra adicionada (mg)	Massa da substância de referência	Concentração final
A	300,00	-	300,00
R₁	300,00	30,00	330,00
R₂	300,00	60,00	360,00
R₃	300,00	90,00	390,00
P	-	300,00	300,00

* cada valor é a média de três determinações

9.5.2. Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi ser calculada através da expressão descrita pela AOAC demonstrada através da equação 10 (AOAC, 1990):

$$R\% = [(Cf - Cu) / Ca] . 100$$

Equação 10

Em que:

Cf = Concentração da substância de referência + amostra

Cu = Concentração da amostra

Ca = Concentração da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para cefoxitina sódica estão na Tabela 26.

Tabela 26 – Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica frasco ampolas através de iodometria.

	Padrão adicionado (%)	Padrão adicionado (mg)	recuperação (%)
R₁	10,00	30,00	99,59
R₂	20,00	60,00	102,49
R₃	30,00	90,00	99,89
média			100,66

* Cada valor é média de três determinações

9.6. Discussão

O método iodométrico para determinação de cefoxitina sódica em matéria-prima e injetáveis apresenta baixo custo em instrumentação e facilidade de execução em laboratórios de rotina. O método analítico desenvolvido teve como referência o método publicado na Farmacopéia Portuguesa para cefalexina.

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 cefoxitina sódica amostra para quantificação da substância.

A recuperação média do método foi de 100,66%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se 6 determinações de cefoxitina sódica frascos ampolas. O desvio padrão relativo foi de 0,55%.

O teor médio de cefoxitina sódica determinado nos frascos ampolas foi de 96,33%; demonstrando-se um método adequado para detectar a substância ativa nos frascos ampolas. O método desenvolvido foi validado para a quantificação de cefoxitina sódica em frascos ampolas através de fatores como precisão, exatidão e linearidade.

10. Titulometria em meio não aquoso

10.1. Considerações gerais

Fármacos que são bases ou ácidos muito fracos, não podem ser doseados em meio aquoso, pois a água, solvente no processo, compete com o fármaco pelo titulante dificultando a observação do ponto final da titulação. Por exemplo, em casos de fármacos de natureza básica, a titulação em meio aquoso só é possível quando sua basicidade corresponde a $\text{pH} = 6$ (dissociação 10^{-6}). Porém, se a base é mais fraca, poderá ocorrer uma reação de hidrólise do sal formado impedindo a titulação (SKOOG, 1996).

No entanto, fármacos com essas características podem ser doseados em meio não aquoso, sendo o ácido acético glacial o solvente mais usado na anidrovolumetria. Essa metodologia possui algumas vantagens como método rápido e exato, podem-se titular misturas de fármacos; grande utilidade, pois a grande maioria dos fármacos são ácidos ou bases muito fracas (VOGEL, 1992).

No entanto, também existem algumas desvantagens: os solventes orgânicos apresentam expansão cúbica superior à da água, portanto variações de temperatura podem causar erros analíticos, a amostra deve ser finamente pulverizada e solubilizada por completo no solvente, alguns solventes são vendidos de forma restrita (VOGEL, 1992).

Os solventes inorgânicos e orgânicos para determinações em meio não aquoso, devem ser puros e de grau analítico. O ácido acético glacial é o mais utilizado, no entanto se faz necessário verificar seu teor de água, que pode estar entre 0,1 e 1,0%; desta forma

deve-se adicionar anidrido acético para converter toda água em ácido. O ácido acético pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros solventes, tais como acetonitrila. Podem também ser empregados DMF, dioxano, álcoois (2-propanol, 1-butanol) (VOGEL, 1992).

10.2. Preparo das soluções

10.2.1. Solução de HClO₄

Para o preparo da solução de ácido perclórico, uma alíquota de 8,5 mL de ácido perclórico foi adicionada em 500 mL de ácido acético glacial e 21,0 mL de anidrido acético (Merck), após o resfriamento foi adicionado a solução ácido acético glacial R (Merck) em balão volumétrico para completar 1000 mL. A solução foi mantida em repouso por um dia para posterior padronização (FARM. BRAS., 1988).

10.2.1.1. Padronização

Foram pesados exatamente cerca de 700 mg de biftalato de potássio (Merck), previamente triturados e dessecados por 2 horas a 120°C e dissolvidos em 50,0 mL de ácido acético glacial em Erlenmeyer de 250 mL. Após a adição de 2 gotas de indicador cristal violeta SI, procedeu-se a titulação com a solução de ácido perclórico até o ponto de viragem indicado pela coloração verde esmeralda.

A molaridade foi calculada considerando-se que 20,42 mg de biftalato de potássio equivalem a 1 mL de ácido perclórico 0,1 M (FARM. BRAS, 1988).

O cálculo da molaridade foi realizado de acordo com a equação 12.

$$\text{Teor (\%)} = \frac{m \text{ (mg)}}{V \text{ (mL)} \times 20,42}$$

Equação 12

Em que:

m= massa de biftalato de potássio em mg;

V= volume gasto na titulação c/ ácido perclórico 0,1 M em mL.

10.2.2. Solução de cristal violeta SI

Foram dissolvidos 100 mg de violeta cristal R, em ácido acético glacial em balão volumétrico de 100 mL (USP28, 2005).

10.3. Método

Todos os reagentes utilizados no ensaio foram de grau analítico e vidrarias calibradas.

Após a realização do peso médio descrito no item 7.1.4.2, uma quantidade de pó equivalente a 300 mg de cefoxitina sódica foram pesados em frasco de Erlenmeyer de 250 mL com rolha esmerilhada adicionando-se 50,0 mL de ácido acético glacial R (Merck). Após agitação para promover a completa dissolução foi realizada a titulação com solução de ácido perclórico 0,1 M usando como indicador solução de cristal violeta SI.

O cálculo para quantificação foi realizado de acordo com a equação 11:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{V \times \text{mEq} \times 100}{m}$$

Equação 11

Em que:

V = volume de HClO₄ (mL)

mEq = miliequivalente de cefoxitina sódica (44.944 mg)

m = massa pesada de cefoxitina sódica

10.4. Determinação de cefoxitina nas amostras

Após a realização do peso médio, conforme item 7.1.4.2, uma quantidade de pó equivalente a 300 mg de cefoxitina sódica foi pesada em frasco de Erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada adicionando-se 50,0 mL de ácido acético glacial R (Merck). Agitar para promover a completa dissolução e titular com solução de ácido perclórico 0,1 M usando como indicador solução de cristal violeta SI.

Realizar o cálculo de acordo com a equação 13:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{V \times \text{mEq} \times 100}{m}$$

Equação 13

Em que:

V = volume de HClO₄ (mL)

mEq = miliequivalente de cefoxitina sódica (44.944 mg)

m = massa pesada de cefoxitina sódica

Os resultados obtidos para a determinação de cefoxitina sódica pelo método titulométrico não aquoso encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27- Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica através de titulometria em meio não aquoso.

repetição	dia 1 (%)	dia 2 (%)	dia 3 (%)	média inter-dia (%)
1	95,95	97,60	96,48	
2	96,04	97,30	95,70	
3	95,50	96,76	96,61	
4	97,90	96,34	96,80	97,17
5	97,30	96,58	97,45	
6	96,80	97,87	95,40	
média intra-dia (%)	97,50	97,60	96,41	
s	0,91	0,61	0,75	0,76
RSD%	0,83	0,55	0,68	0,69
n	6	6	6	6

s – desvio padrão, RSD - desvio padrão relativo percentual

10.5. Teste de recuperação

O teste de recuperação deverá ser realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 28, 2005).

10.5.1. Preparo das amostras

O ensaio de recuperação foi conduzido da seguinte maneira: Para os ensaios de amostra (A) e substância de referência (P) foram pesados 300,0 mg e analisados conforme procedimento descrito no item 10.4. Resumidamente foram pesadas quantidades de 300, 0 mg de cefoxitina sódica amostra em três frascos de Erlenmeyer com rolha esmerilhada, sendo R₁, R₂ e R₃. Foram adicionados 30,0; 60,0 e 90,0 mg de cefoxitina sódica substância de referência, representando 10,0%, 20,0% e 30,0% em cada um dos Erlenmeyers R₁, R₂ e R₃, respectivamente. Desta forma procedeu-se a análise de teor conforme descrito no item 10.4.

A balança utilizada nas pesagens foi calibrada e aferida; as soluções e reagentes utilizados no ensaio foram todos de grau analítico.

A preparação das soluções para o ensaio de recuperação encontra-se na Tabela 28.

Tabela 28 - Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método de titulometria em meio não aquoso.

	Massa amostra adicionada (mg)	Massa da substância de referência	Quantidade final (mg)
A	300,00	-	300,00
R₁	300,00	30,00	330,00
R₂	300,00	60,00	360,00
R₃	300,00	90,00	390,00
P	-	300,00	300,00

10.5.2. Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi ser calculada através da expressão descrita pela AOAC na equação 14 (AOAC, 1990):

Em que:

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

Equação 14

C_f = Concentração da substância de referência + amostra

C_u = Concentração da amostra

C_a = Concentração da substância de referência adicionada

Os resultados obtidos para o teste de recuperação encontram-se na Tabela 29.

Tabela 29 – Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica frascos ampolas através de titulometria não aquosa.

	Padrão adicionado (%)	Padrão adicionado (mg)	recuperação (%)
R₁	10,00	30,00	98,70
R₂	20,00	60,00	100,75
R₃	30,00	90,00	98,78
média			99,41

*Cada valor é média de três determinações

10.6. Discussão

O método por titulometria em meio não aquoso para determinação de cefoxitina sódica em matéria-prima e injetáveis apresenta baixo custo em instrumentação e facilidade de execução em laboratórios de rotina possibilitando o ponto final visual da titulação.

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 cefoxitina sódica amostra para quantificação da substância.

O teste recuperação forneceu média de 99,41%. Com este resultado comprovou-se a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos

analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se 6 determinações de cefoxitina sódica frascos ampolas. O desvio padrão relativo foi de 0,69%.

O teor médio de cefoxitina sódica determinado nos frascos ampolas foi de 97,17%; demonstrando-se um método adequado para detectar a substância ativa nos frascos ampolas. O método desenvolvido foi validado para a quantificação de cefoxitina sódica em frascos ampolas através de fatores como precisão, exatidão e linearidade.

11. Cromatografia líquida de alta eficiência

11.1. Considerações gerais

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais modernas técnicas de separação e quantificação de substâncias em escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade. A partir de dados encontrados na literatura para outras cefalosporinas (PÉHOURCQ e JARRY, 1998; SAMANIDOU et al., 2004; JOSHI, 2002; JOHNSON et al., 2000; EL-WALILY et al., 2000; SORENSEN e SNOR, 2000; FUJIMOTO et al., 1999; ABDEL-HAMID, 1998; BOMPADRE et al., 1998; NISHINO et al., 2000) em fluidos biológicos e também para o cefoxitina (USP28, 2005), alguns parâmetros foram testados para a determinação da cefoxitina.

11.2. Método

Foram testados para a seleção de fase móvel, misturas de acetonitrila, metanol e água purificada de grau analítico previamente filtrados por membrana (0,45 µm e 47 mm), sob vácuo, e degaseificada empregando ultra-som ou pelo borbulhamento com gás hélio, durante 15 minutos. Após a estabilização do sistema, foram injetados volumes pré-fixados da solução previamente filtrada em membrana com poro de 0,45 µm.

Foram realizadas avaliações com diferentes tipos de fase móvel, colunas para elucidação das condições ideais de ensaio, conforme Tabela 30.

O cromatograma obtido para cefoxitina sódica no sistema composto por: acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22:78: 1) encontra-se na Figura 24.

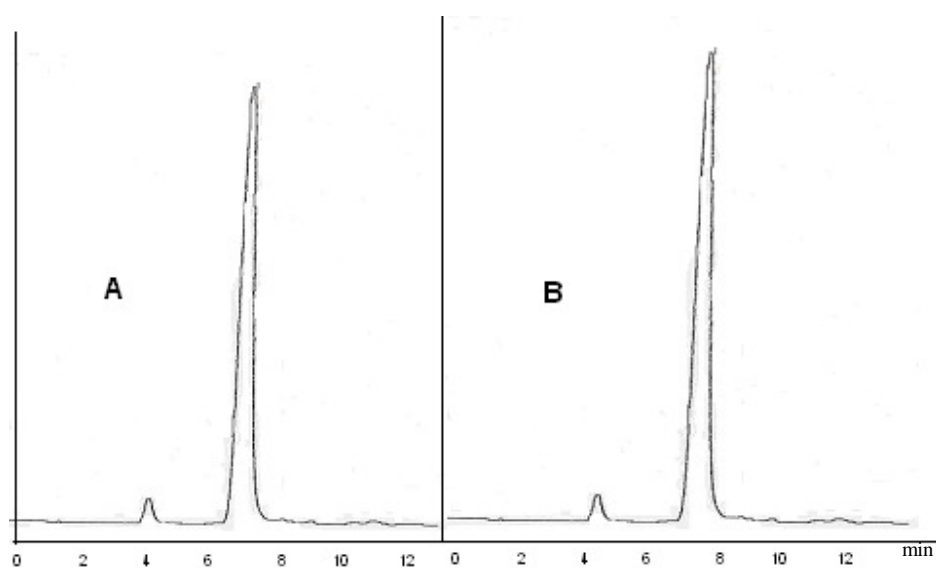


Figura 24 – Cromatograma obtido por CLAE para solução de cefoxitina sódica amostra (A) e substância de referência (B) (condições cromatográficas: acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1), coluna Waters C18 (250,0 mm X 4, 6 mm; 5 μ m) a 235 nm, t_r = 7.5min.

Tabela 30 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de cefoxitina sódica através do método por CLAE.

Parâmetro	Testes
Fase Móvel	acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1) metanol: acetonitrila: tampão fosfato pH 7.0 (40:30:30) acetonitrila: água: ácido acético 5 M (19 : 81 : 1) metanol: água: ácido acético 5 M (12 : 87 : 1) acetonitrila: água: ácido acético 5 M (13 : 84, 2 : 2,8)
Concentração de Substância de Referência	5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 µg/mL
Vazão	1,0 mL/min 1,5 mL/min
Detector	UV
Comprimento de onda	235 nm 254 nm
Volume de injeção	20,0 µL
Velocidade de registro	0,5 cm/min
Temperatura	20,0 ± 1,0°C
Coluna	Phenomenex C18 (150,0 mm X 4,6 mm; 5 µm) Phenomenex C8 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 µm) Waters C18 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 µm)

Dos vários sistemas testados, o sistema utilizando a coluna Phenomenex C8 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 μ m) com fase móvel Metanol: acetonitrila: tampão fosfato pH 7.0 (40 : 30 : 30) e metanol: água: ácido acético (12 : 87: 1) apresentou pico em 9.5 minutos, com baixa resíduos abaixo da linha base; o sistema utilizando fase móvel acetonitrila: água: ácido acético 5 M (19 : 81 : 1) e acetonitrila: água: ácido acético 5 M (13 : 84, 2 : 2,8) com coluna Phenomenex C18 (150,0 mm X 4,6 mm; 5 μ m) e Waters C18 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 μ m) apresentaram pico com baixo tempo de retenção e baixa resolução. Os sistemas acima citados foram avaliados nos comprimentos de onda de 235 e 254 nm; sendo escolhido para validação do sistema a 235 nm, em vista dos ruídos apresentados nas leituras presentes em 254 nm.

O sistema que apresentou melhor desempenho em relação ao tempo de retenção e definição dos picos, foi pré-selecionada a fase móvel composta por acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1), utilizando detector UV à 235 nm, coluna Waters C18 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 μ m), por ser mais nova; vazão 1 mL/min, nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 μ g/mL obtendo linearidade indicada pela Figura 25. Os parâmetros selecionados para o desenvolvimento do método cromatográfico relacionados a curva analítica encontram-se na Tabela 31.

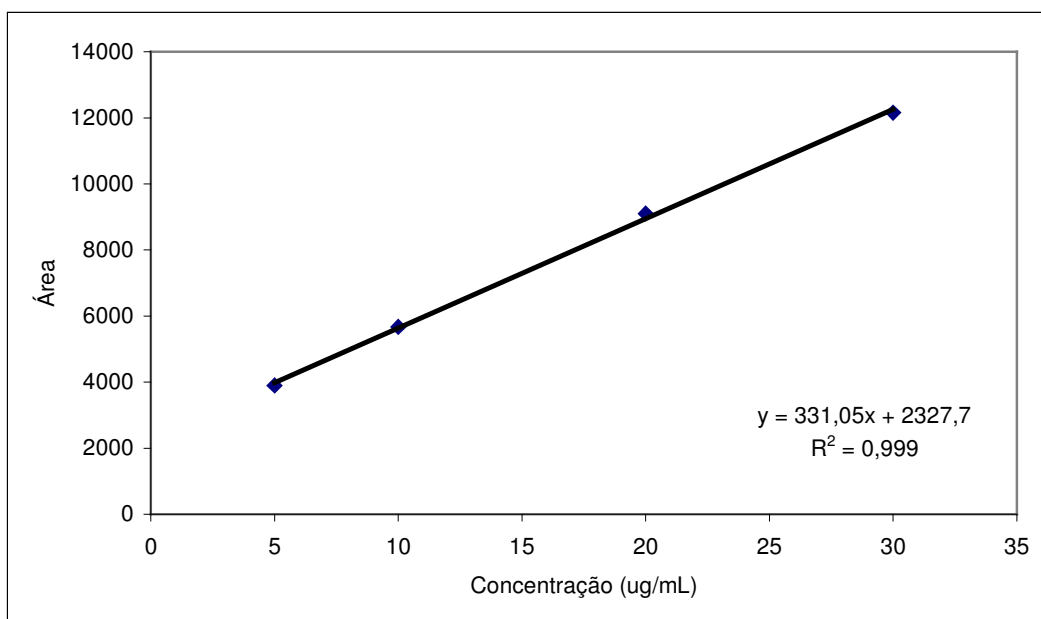


Figura 25 – Representação gráfica da curva analítica da solução de cefoxitina sódica em concentrações de 5,0 µg/mL à 30,0 µg/mL através de CLAE a 235 nm.

Tabela 31 – Condições cromatográficas utilizadas na adequação de método por CLAE.

fase móvel	acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1)
coluna	Waters C18 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 µm)
comprimento de onda	235 nm
vazão	1,5 mL/min
sensibilidade de detecção	0,5 AUFS
volume de injeção	20,0 µL
velocidade de registro	0,5 cm/min
temperatura	20,0 ± 1,0°C
Faixa de concentração	20,0 a 30 µg/mL

11.3.Obtenção da curva analítica

Para a realização da curva analítica, foram pesados, analiticamente, 20,0 mg de cefoxitina substância de referência, previamente dessecadas e transferidas para balão volumétrico de 200,0 mL e adicionada água purificada para a obtenção de solução com concentração teórica de 100,0 µg/mL. Desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL para a obtenção de soluções com concentrações dentro da faixa de análise de 20,0 à 30 µg/mL (Tabela 32). A representação gráfica da equação da reta pode ser determinada pela análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados (RODRIGUES, 1986) (Figura 26). As áreas absolutas utilizadas na determinação da curva de calibração foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

Tabela 32 - Obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica em concentrações de 20,0 µg/mL à 30,0 µg/mL através de CLAE.

	volume de cefotina sódica 100,0 µg/mL (mL)	volume de balão volumétrico (mL)	concentração final (µg/mL)
1	2,0	10,0	20,0
2	2,2	10,0	22,0
3	2,4	10,0	24,0
4	2,6	10,0	26,0
5	2,8	10,0	28,0
6	3,0	10,0	30,0

Os resultados das medidas das áreas absolutas obtidas para a curva analítica estão apresentados na Tabela 33 onde se observa o coeficiente de variação percentual médio.

Tabela 33 – Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através de CLAE.

concentração (µg/mL)	áreas absolutas	área absoluta média ± e.p.m.	DPR %
	8685,00		
20,00	8692,00	8667,66 ± 21,26	0,42
	8625,00		
	9289,00		
22,00	8901,00	9122,00 ± 198,19	0,72
	9181,00		
	10530,00		
24,00	10424,00	10459,00 ± 61,48	0,59
	10423,00		
	11167,00		
26,00	11223,00	11234,00 ± 42,53	0,66
	11313,00		
	11734,00		
28,00	11884,00	11820,00 ± 77,38	0,65
	11842,00		
	12405,00		
30,00	12537,00	12468,00 ± 66,20	0,53
	12462,00		

e.p.m. – erro padrão da média, DPR% - desvio padrão relativo percentual

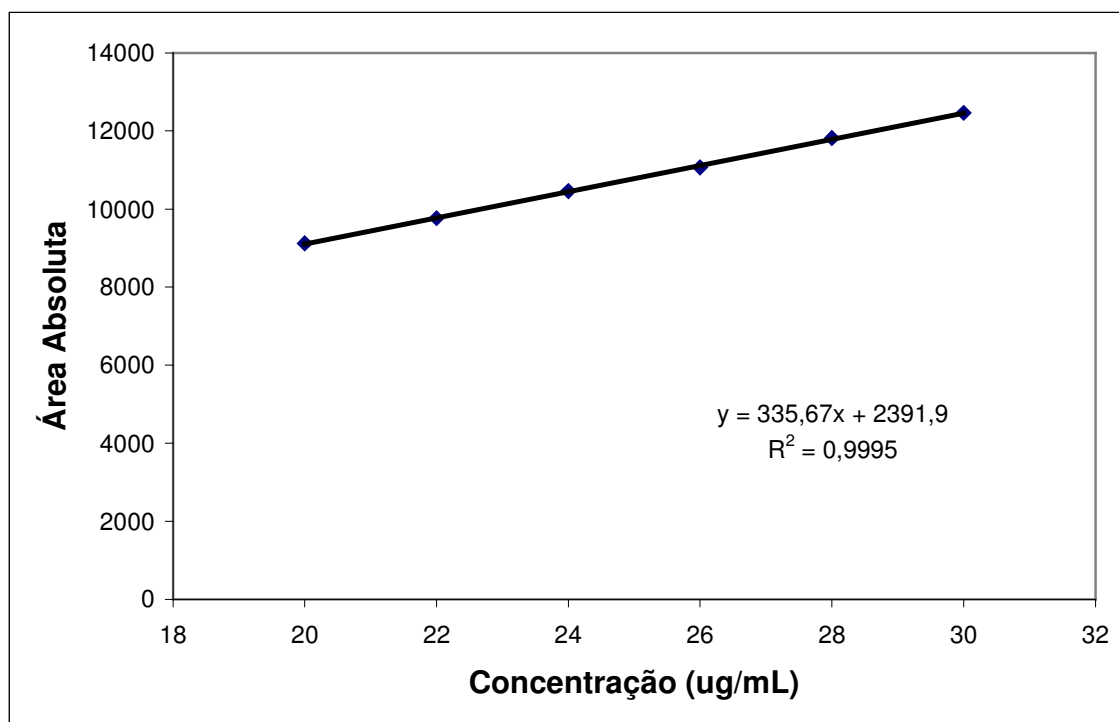


Figura 26 – Representação gráfica da curva de calibração da solução de cefoxitina sódica em concentrações de 20,0 µg/mL à 30,0 µg/mL através de CLAE.

11.4. Análise estatística

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de correlação das soluções de cefoxitina sódica foram determinados pela análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados (RODRIGUES, 1986). As áreas absolutas utilizadas na curva analítica foram estatisticamente avaliadas pela análise da variância – ANOVA (FARM. BRAS., 1988), apresentadas na Tabela 34.

Os parâmetros de tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 35.

Tabela 34- Análise da variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de cefoxitina sódica através de CLAE.

fontes de variação	GL	soma dos quadrados	variância	F	P
ENTRE	5	23675011,11	4735002,222	261,5036 *	3,11
regressão linear	1	23662410	23662410,42	1306,8221 *	4,75
desvio de linearidade	4	12601	3150,173016	0,1740	3,26
RESÍDUO	12	217,282	18106,83333	-	-
TOTAL	17	23892293,11	-	-	-

* significativo $P < 0,05$

Tabela 35 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de cefoxitina sódica através de CLAE.

parâmetros	resultados
equação: $y = a + bx$	
a	2391,9
b	335,67
r (coeficiente de correlação)	0,9995
n	6

11.5. Determinação de cefoxitina nas amostras

11.5.1. Preparo da solução de cefoxitina substância de referência

Foram pesados 20 mg de cefoxitina sódica substância química de referência e transferidos para um balão volumétrico de capacidade de 100 mL completando-se o volume com água purificada, obtendo solução final de concentração de 200 µg/mL. A partir desta solução foi tomada uma alíquota de 2,5 mL com uma bureta e transferida para balão volumétrico de capacidade de 10,0 mL completando o volume com água purificada obtendo concentração final de 25,0 µg/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata.

11.5.2. Preparo da amostra

Após a realização do peso médio, conforme item 7.1.4.2, uma quantidade de pó equivalente 20 mg de cefoxitina sódica substância química de referência e transferido para um balão volumétrico de capacidade de 100 mL completando o volume com água purificada, obtendo solução final de concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução foi tomada uma alíquota de 2,5 mL e transferida para um balão volumétrico de capacidade de 10,0 mL completando o volume com água purificada obtendo concentração final de 25,0 $\mu\text{g/mL}$ conforme Figura 27 . Este procedimento foi realizado em triplicata.

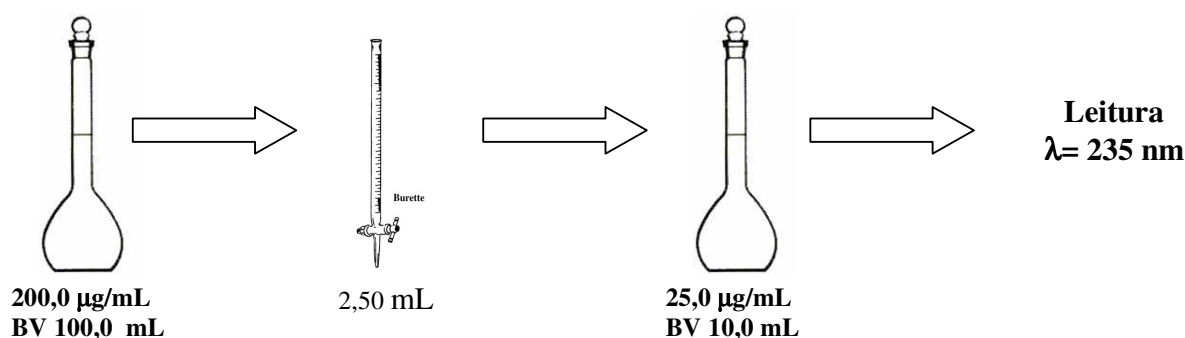


Figura 27 - Preparação das soluções-substância de referência utilizada no método por CLAE para cefoxitina sódica substância de referência e amostra.

11.5.3. Cálculo

Os valores experimentais da determinação de cefoxitina sódica em frascos ampolas pelo método proposto encontra-se na Tabela 36.

Tabela 34 – Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica através de CLAE.

repetições	áreas absolutas*	média ± e.p.m	teor %	quant. encontrada (mg)	DPR %
1	10347,00	10361,00 ± 7,53	94,92	949,20	0,12
	10372,00				
	10365,00				
2	10489,00	10475,00 ± 7,80	94,84	948,40	0,13
	10462,00				
	10475,00				
3	10695,00	10667,00 ± 18,21	93,45	934,50	0,30
	10633,00				
	10674,00				
4	10787,00	10825,00 ± 35,53	93,77	937,70	0,57
	10896,00				
	10792,00				

e.p.m. – erro padrão da média; DPR % - desvio padrão relativo percentual.

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 15:

$$CA = AA \cdot CSR / ASR$$

Equação 15

Em que:

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

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

AA = área da amostra

ASR = área da substância de referência

O teor percentual de cefoxitina sódica nas amostras foi calculado pela Equação 16:

$$CA\% = CA \cdot 100 / Ct$$

Equação 16

Em que:

CA = concentração de cefoxitina sódica encontrado na amostra (mg)

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

11.6. Teste de recuperação

O teste de recuperação deverá ser realizado com o objetivo de determinar a exatidão do método proposto (AOAC, 1990; USP 28, 2005).

11.6.1. Preparo das soluções

Foi preparada solução de cefoxitina sódica substância de referência com concentração de 100,0 µg/mL pesando-se exatamente 10,0 mg da substância de referência e diluindo-se com água purificada em balão volumétrico com capacidade de 100 mL. A solução amostra foi preparada com concentração 200,0 µg/mL, pesando-se 20 mg da amostra e diluindo-se com água purificada em balão volumétrico com capacidade de 100 mL.

Para o ensaio de recuperação foram transferidas alíquotas de 1,0 mL de solução amostra (200,0 µg/mL) para balões volumétricos de 10 mL denominados A, R₁, R₂ e R₃.; completando-se o volume com água purificada. Foram adicionados 0,2; 0,4 e 0,6 mL da solução de cefoxitina sódica substância de referência em concentração de 100,0 µg/mL, nos balões R₁, R₂ e R₃, respectivamente. A solução padrão (P) foi preparada com 2,0 mL da solução de cefoxitina sódica substância de referência em concentração de 100,0 µg/mL em balão volumétrico de 10 mL.

Todos os volumes foram transferidos com auxílio de bureta calibrada. Os volumes dos balões foram completados com água purificada, obtendo-se concentrações de 20,0; 22,0; 24,0; 26,0; 20,0 para os balões A, R₁, R₂, R₃ e P, respectivamente (Tabela 37).

Tabela 37- Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de cefoxitina sódica para o método por CLAE.

	vol. solução- amostra	vol. cefox. subst. referência	concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
	200,0 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	100,0 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	
A	1,0	-	20,0
R₁	1,0	0,20	22,0
R₂	1,0	0,40	24,0
R₃	1,0	0,60	26,0
P	-	2,00	20,0

11.6.2. Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi ser calculada através da expressão descrita pela AOAC conforme a equação 17 (AOAC, 1990):

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

Equação 17

Em que:

C_f = Concentração da substância de referência + amostra

C_u = Concentração da amostra

C_a = Concentração da substância de referência adicionada

Os valores encontrados no teste de recuperação para os frascos ampolas de cefoxitina sódica estão na Tabela 38.

Tabela 38 – Teste de recuperação de solução de cefoxitina sódica substância de referência adicionada à solução de cefoxitina sódica em frascos ampolas através de CLAE.

	conc. teórica adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	área absoluta*	recuperação (%)
R₁	20,00	8160,66	100,50
R₂	40,00	8958,00	102,50
R₃	60,00	9613,25	98,50

* Cada valor é média de três determinações

11.7. Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método analítico de alto custo, tanto pelo material de consumo necessário que se faz de solventes com alto grau de pureza e de padrões de referência como o custo do equipamento, sensível, com capacidade de separação e quantificação dos compostos ativos e seus produtos de degradação quando presentes, podendo ser considerado como método de escolha.

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

De forma geral, as diversas fases móvel testadas provocaram alterações na altura do pico, baixa resolução, alargamento dos picos e velocidade de migração diminuindo o tempo de retenção do composto analisado.

O método analítico desenvolvido teve como referência o método publicado na Farmacopéia Britânica (BP, 2005), com fase móvel simplificada, sem a utilização de tampão, que tornam as análises de CLAE mais complicadas, pois os sais inorgânicos podem danificar a coluna. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1, V/V/V). O tempo de retenção obtido foi de 7,5 minutos.

Através dos resultados obtidos foi construída a curva analítica na faixa de concentração de 20,0 a 30,0 µg/mL, calculando-se o erro padrão da média e o coeficiente de correlação de linear ($R = 0,9995$). A equação da reta obtida foi de $y = 335,67x + 2391,9$.

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 cefoxitina sódica amostra para quantificação da substância.

Obtivemos no teste recuperação média de 100,50%, realizada em triplicata. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se 4 determinações de cefoxitina sódica frascos ampolas. O desvio padrão relativo foi de 1,70%.

A análise estatística dos resultados das áreas obtidas foi matematicamente verificada pela análise da variância (ANOVA). A análise de variância é um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa fundamentalmente verificar se existe uma

diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente, a principal aplicação da ANOVA é a comparação de médias oriundas de grupos diferentes, também chamados tratamentos; e os resultados obtidos, com F significativo para fontes de variação ENTRE e regressão linear, sendo que o desvio da linearidade calculado mostrou-se menor que o tabelado; desta forma valida o método de cromatografia líquida de alta eficiência para cefoxitina sódica.

O teor médio de cefoxitina sódica determinado por CLAE nos frascos ampolas foi de 94,24%, realizada durante quatro dias sendo realizados em triplicata, demonstrando a sensibilidade do método para detectar a substância ativa nos frascos ampolas. O método cromatográfico desenvolvido não apresentou picos relativos a excipientes ou outros interferentes presentes na amostra e foi validado para a quantificação de cefoxitina sódica em frascos ampolas através de análise estatística através de fatores como sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade.

12. Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade são conjuntos de métodos qualitativos e quantitativos, realizados pelos fabricantes em produtos, os quais são submetidos a diferentes tempos e condições de armazenamento, no sentido de avaliar seu prazo de validade e determinar sua data de vencimento. Os testes podem ser divididos em físicos, químicos e microbiológicos. Os testes físicos variam de acordo com a forma farmacêutica. Nos ensaios químicos destaca-se a realização do doseamento e ensaios limites para produtos em decomposição enquanto que os ensaios microbiológicos podem incluir ensaios do tipo teste de eficácia de conservante ou mesmo ensaios de potência para fatores de crescimento e antibióticos. Tais estudos devem ser realizados em câmaras climáticas controladas e qualificadas.

A avaliação da velocidade de degradação de um medicamento ou de um de seus componentes possibilita estimar o seu prazo de validade, tempo no qual o produto poderá ser usado, e para medicamentos é caracterizado pelo tempo durante o qual o fármaco perde no máximo 10,0% de sua integridade, fundamentado no estudo de estabilidade sob condições variadas. As velocidades das reações dependem de uma série de condições, tais como: concentração de reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalisadores. A cinética de uma reação diz respeito à velocidade específica de reação, a qual é expressa por k , que indica a intensidade de degradação ou alteração dos componentes do medicamento durante um determinado tempo. Seja uma reação entre compostos A e B formando produtos C e D, k_1 corresponde à cinética de formação de C e D e k_{-1} a reação inversa. A meia-vida ($t_{1/2}$) de uma reação é importante termo derivado de equações de

cinética química, é definida como tempo necessário para que a concentração de reagente caia pela metade do valor inicial (NUDELMAN, 1975).

A $t_{1/2}$ e o prazo de validade podem ser calculados com base na cinética de reação k , pelas equações:

$$t_{1/2} = 0,693 / k$$

Equação 18

Em que:

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida

k = constante específica

$$t_{90} = 0,1054 / k$$

Equação 19

Em que:

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida

k = constante específica

Embora todas as reações obedeçam à lei de ação das massas, a velocidade de uma reação pode variar dependendo do tipo de reação:

As reações são classificadas quanto à cinética como:

- I) reação de ordem zero ($n = 0$)
- II) reação de primeira ordem ($n = 1$)
- III) reação de segunda ordem ($n = 2$)

$$c = k \cdot t + c_0$$

Equação 20

Em que:

c_0 = concentração inicial

c = concentração de produto no tempo t

Logo, considerando-se que o prazo de validade requer a detecção de, no máximo, 10,0% de produtos de degradação, ou seja, no mínimo 90,0% de integridade. A meia-vida ($t_{1/2}$) e $t_{90\%}$ podem ser calculados (NUDELMAN, 1975).

$$t_{1/2} = c_0 / 2k$$

Equação 21

$$t_{90\%} = 0,1 c_0 / k$$

Equação 22

12.4. Material e métodos

O presente estudo de estabilidade realizado neste trabalho teve por objetivo acompanhar o comportamento das amostras submetidas a condições forçadas de armazenamento em câmara climática (Marconi, MA-835) por um período de 12 meses a uma temperatura de $30,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e com $75,0 \pm 5,0\%$ de umidade relativa.

Uma quantidade de 24 frascos-ampolas foram submetidas ao ensaio em sua embalagem original de vidro. Neste período as amostras foram analisadas mensalmente empregando-se os métodos validados para doseamento de cefoxitina sódica por cromatografia líquida de alta eficiência Waters C18 (250,0 mm X 4,6 mm; 5 µm), detector UV-Vis 235 nm, fase móvel: acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1, V/V/V), fluxo 1,5 mL/min) conforme item 11 e através do método de doseamento microbiológico delineamento 3 x 3 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12226, 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL), conforme item 8.

Ao final do período de armazenamento as amostras foram analisadas através dos dois métodos propostos, em triplicata; obedecendo-se as condições propostas durante as validações. Quanto aos estudos cinéticos a constante de degradação k foi calculada conforme equação 20; e o prazo de validade ($t_{90\%}$) e meia vida ($t_{1/2}$) conforme as equações 21 e 22.

12.5. Resultados

Os resultados obtidos para a determinação do doseamento de cefoxitina sódica em injetáveis submetidos ao estudo de estabilidade sob condições de temperatura de $30,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e com $75,0 \pm 5,0\%$ de umidade relativa por cromatografia líquida de alta eficiência e doseamento microbiológico estão nas Tabela 39 e Tabela 40, respectivamente.

Nas reações de ordem zero a velocidade da reação não depende da concentração das massas dos reagentes, desta forma o fator limitante pode ser a solubilidade, presença de

catalisadores ou luz, sendo caracterizados por gráficos lineares da correlação tempo *versus* concentração, pode ser representada pela equação (NUDELMAN, 1975; GIL, 2005).

O gráfico da concentração *versus* tempo para determinação de teor de cefoxitina sódica durante 12 meses por CLAE e doseamento microbiológico mostrou-se linear, conforme demonstrado na Figura 29, obtendo-se uma reta indicando uma reação de degradação de ordem zero. O $t_{90\%}$ calculado foi correspondente a 5,6 anos e $t_{1/2}$ de 28 anos.

Tabela 37 – Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica submetidas ao estudo de estabilidade através de CLAE a 235 nm.

Meses	áreas absolutas	teor %	média ± e.p.m.	DPR %
1	9545,00 9618,00 9760,00	94,20	9641,00 ± 63,12	1,13
2	9364,00 9487,00 9411,00	94,70	9421,00 ± 35,83	0,66
3	9612,00 9457,00 9561,00	95,60	9543,33 ± 45,61	0,83
4	9597,00 9484,00 9483,00	95,30	9521,00 ± 37,83	0,69
5	9527,00 9466,00 9595,00	95,30	9529,00 ± 37,26	0,68
6	9406,00 9499,00 9542,00	94,82	9482,00 ± 40,13	0,73
7	9606,00 9499,00 9542,00	94,82	9482,33 ± 31,09	0,56
8	9564,00 9595,00 9618,00	95,92	9592,33 ± 15,65	0,28
9	9487,00 9364,00 9364,00	94,05	9405,00 ± 41,00	0,76
10	9595,00 9618,00 9487,00	95,66	9566,67 ± 80,18	0,73
11	9487,00 9618,00 9564,00	95,56	9556,33 ± 38,01	0,69
12	9595,00 9564,00 9527,00	95,62	9562,00 ± 15,65	0,28

DPR% = desvio padrão relativo percentual

Tabela 38– Quantidades determinadas para o doseamento de frascos ampolas de 1000 mg de cefoxitina sódica submetidas ao estudo de estabilidade através do doseamento microbiológico.

Meses	teor %	média ± e.p.m.	DPR %
1	95,70	95,70 ± 1,08	0,81
2	95,30	95,30 ± 1,12	1,05
3	94,00	94,00 ± 1,30	0,77
4	94,50	94,50 ± 0,98	1,12
5	95,50	95,50 ± 1,15	0,75
6	94,60	94,60 ± 1,20	0,83
7	95,50	95,34 ± 0,70	0,93
8	95,70	95,45 ± 0,86	0,77
9	95,50	95,50 ± 1,10	0,85
10	95,64	95,87 ± 1,08	0,81
11	96,10	95,12 ± 0,74	0,67
12	94,00	94,34 ± 1,10	0,79

Os resultados expressos na Tabela 38 estão demonstrados na Figura 28.

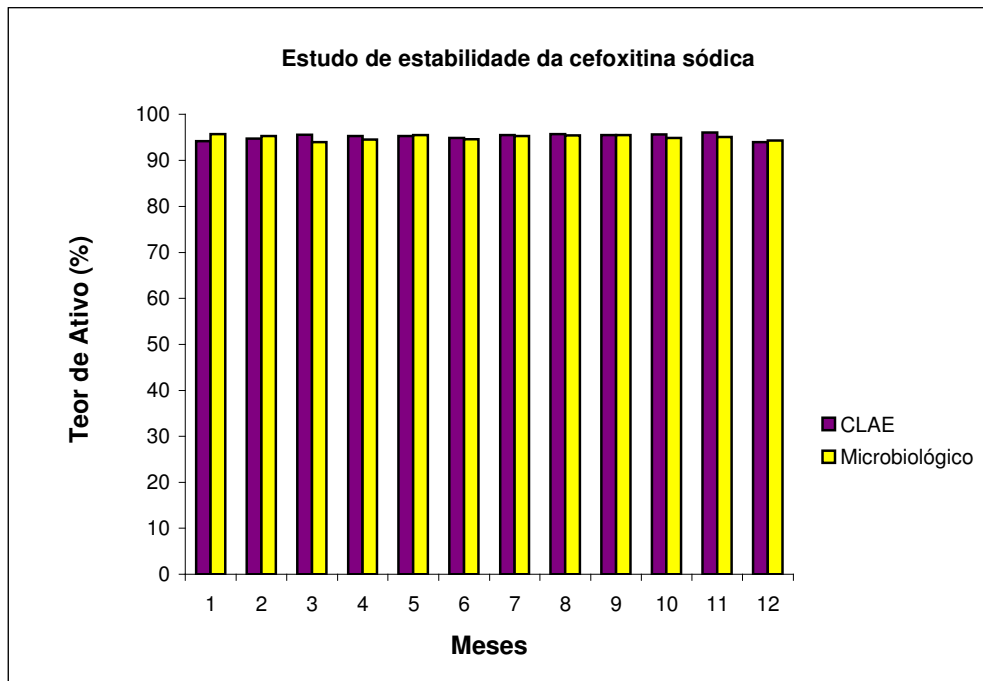


Figura 28 – Teor de cefoxitina sódica determinado no estudo de estabilidade pelos métodos CLAE e microbiológico ($30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; $75,0 \pm 5,0\%$ UR).

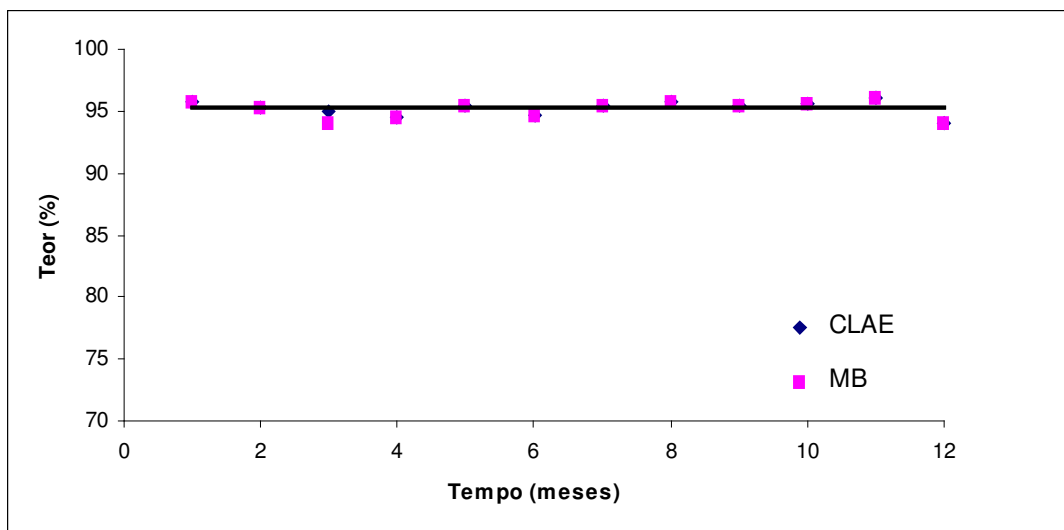


Figura 29 – Cinética de reação de ordem zero de cefoxitina sódica determinadas pelo método CLAE e doseamento micológico.

12.6. Discussão

As amostras foram armazenadas durante 12 meses à temperatura de $30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75,0 \pm 5,0\%$ UR. Durante o decorrer dos meses foram realizadas as análises de determinação de teor através dos métodos validados por cromatografia líquida de alta eficiência e doseamento microbiológico. Nos doze meses do teste não foi observada queda significativa do teor quando comparados com os resultados obtidos na validação dos respectivos métodos. De acordo com a figura 28 os valores de teor para cefoxitina sódica submetida ao ensaio de estabilidade apresentaram-se equivalentes, tanto pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência, como pelo método de doseamento microbiológico apresentando baixos valores de DPR%.

Nos cromatogramas não foi evidenciado nenhum pico adicional, a não ser o apresentado pela presença da substância analisada, com tempo de retenção de 7.3 minutos. No método microbiológico não foi evidenciado crescimento bacteriano no interior do halo de inibição; mostrando-se eficiente como durante a validação da metodologia, quanto aos cálculos cinéticos obteve-se uma reta indicando uma reação de degradação de ordem zero. O $t_{90\%}$ calculado foi correspondente a 5,6 anos e $t_{1/2}$ de 28 anos.

13. Conclusões gerais

As análises qualitativas permitiram caracterizar a cefoxitina sódica pelos seguintes métodos:

- Características físicas: a cefoxitina sódica apresenta-se sob a forma de grânulos, com odor leve e cor amarelo pálido. A descrição é condizente com a citada pelas referências descritas para a caracterização organoléptica desta substância na BP, 2005 e USP26 e 28.
- Determinação da solubilidade: foram utilizados diversos solventes na determinação das solubilidades cuja finalidade foi de realizar a caracterização da substância qualitativamente testando sua polaridade bem como funcionar como ensaio preditivo na determinação da melhor solubilização para os testes quantitativos para espectrofotometria UV e CLAE. Os resultados obtidos foram condizentes com os citados pelas referências descritas para a solubilidade desta substância na BP, 2005 (muito solúvel em água, insolúvel em etanol e éter), USP28 e Farmacopéia Portuguesa (muito solúvel na água); o teste de solubilidade pode ser tratado como teste preditivo para determinação de impurezas.
- Determinação do ponto de fusão: o pó apresentou ponto de fusão em cerca de 155,3°C. Na literatura consultada (THE MERCK INDEX, 2001) a faixa de fusão para cefoxitina está especificada entre cerca de 149,0 - 150,0°C com decomposição; no entanto para a cefoxitina sódica não consta tal parâmetro. A faixa de fusão pode ser empregada na caracterização de um composto, sendo ainda um importante indicativo de pureza,

quando comparado com padrões de referência, pois uma pequena quantidade de impureza pode causar abaixamento do ponto de fusão e/ou alargar a faixa de fusão de um determinado composto (SHRINER et al, 1998).

- Determinação da umidade: as determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS, 1988) e a média obtida foi de 111,53% com desvio de 0,23%.
- Resíduo pela incineração: as determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopéia Brasileira (FARM. BRAS, 1988) e a média obtida foi menor que 0,1%.
- Espectrofotometria na região do infravermelho: utilizada para identificar grupos funcionais da cefoxitina sódica substância de referência e amostra. O espectro de absorção na região infravermelho em pastilha de KBr, apresenta picos de absorção característicos de funções presentes na estrutura química da cefoxitina sódica, demonstrando os grupos funcionais presentes na molécula estudada.
- Espectrofotometria ultravioleta: dentre os diversos solventes utilizados para determinação dos máximos de absorção, a água por ser de fácil aquisição, baixo custo e fácil descarte foi elegida como solvente de escolha para o desenvolvimento da validação do método por espectrofotometria UV; os demais solventes como HCl 0,1 M e metanol apresentaram também máximos de absorção por volta de 235 nm como a água purificada; sendo que o solvente HCl 0,1 M apresentou uma diminuição do máximo de absorção, sendo considerado o pior caso; quanto ao solvente NaOH 0,1 M provou ligeiro deslocamento no máximo de absorção.

- Estudo de análise térmica: realizada pela aplicação de métodos termogravimétricos, o presente teste teve como objetivo o estudo de análise térmica de cefoxitina sódica com finalidade qualitativa através da termogravimetria e análise térmica diferencial em atmosfera de ar sintético. As curvas DTA e TG são apresentadas a seguir. Em torno de 150,0°C observa-se diminuição de massa em virtude de perda de umidade da substância. Nas curvas observaram-se um pico endotérmico em torno de 150,0 à 250,0°C atribuído à perda das estruturas NH₂ e COONa, acima de 650,0°C ocorre a saída do anel β-lactâmico. Através da curva TG, verifica-se a perda de massa total em duas etapas, entre as temperaturas de 180,0 e 250,0°C.

Foram desenvolvidos e validados métodos para determinação quantitativa de cefoxitina sódica sob a forma farmacêutica injetável:

- Espectrofotometria ultravioleta: o espectro de absorção mostrou pico de absorção máxima de 235 nm, utilizando solução aquosa de cefoxitina sódica a 20,0 µg/mL. Com o objetivo de determinar a linearidade, foi realizada curva de Ringbom, de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 18,0 à 28,0 µg/mL, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação de 0,9997. A equação da reta obtida foi de $y = 0,0297x + 0,0341$. No teste de recuperação foi obtida média de 100,40%. O teor médio de cefoxitina sódica determinada nos frascos ampolas foi de 97,60% com desvio padrão de 0,30%.

- Doseamento Microbiológico: para assegurar a validade do ensaio microbiológico difusão em ágar – cilindros em placa na determinação da potência de cefoxitina sódica foram utilizados três concentrações diferentes para amostra, idênticas às da substância de referência, em delineamento 3 x 3 (FARM. BRAS., 1988). Através dos resultados obtidos foi construída a curva analítica com soluções de 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL, as soluções foram preparadas em triplicata, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9998. A equação da reta foi $y = 13,935x - 3,712$. Obtivemos neste teste recuperação média de 100,20% com desvio padrão de 0,81%. O teor de cefoxitina sódica determinado nos frascos ampolas foi calculado através da equação de HEWITT obtendo teor médio de 94,90%.
- Cromatografia líquida de alta eficiência: o método analítico desenvolvido teve como referência o método publicado na Farmacopéia Britânica (BP, 2005), com fase móvel simplificada, sem a utilização de tampão, que tornam as análises de CLAE mais complicadas, pois os sais inorgânicos podem danificar a coluna. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: água: ácido acético 5 M (22 : 78 : 1, V/V/V). O tempo de retenção obtido foi de 7,5 minutos. A curva analítica na faixa de concentração de 20,0 a 30,0 µg/mL, calculando-se o erro padrão da média e o coeficiente de correlação de linear ($R = 0,9995$). A equação da reta obtida foi de $y = 335,67x + 2391,9$. O teor médio de cefoxitina sódica determinado por CLAE nos frascos ampolas foi de 94,24%, no teste recuperação a média foi de 100,50% com desvio padrão de 1,70%.

- Doseamento por titulometria em meio não aquoso (anidrovolumetria) com ácido perclórico 0,1M utilizando cristal violeta como indicador, obtendo-se teor médio de 97,17%. O teste recuperação forneceu média de 99,41%. Com este resultado comprovou-se a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se 6 determinações de cefoxitina sódica frascos ampolas. O desvio padrão relativo foi de 0,69%.
- Doseamento por titulometria iodométrica com tiosulfato de sódio 0,02 M utilizando amido como indicador, obtendo-se teor médio de 96,33%. A recuperação média do método foi de 100,66%. Com este resultado comprovamos a exatidão do método proposto, que é um dos requisitos obrigatórios na validação de métodos analíticos. A precisão do método foi obtida utilizando-se 6 determinações de cefoxitina sódica frascos ampolas. O desvio padrão relativo foi de 0,55%.
- Estudo de estabilidade: as amostras foram armazenadas durante 12 meses à temperatura de $30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75,0 \pm 5,0\%$ UR. Durante o decorrer dos meses foram realizadas as análises de determinação de teor através dos métodos validados por cromatografia líquida de alta eficiência e doseamento microbiológico. Nos doze meses do teste não foi observada queda significativa do teor quando comparados com os resultados obtidos na validação dos respectivos métodos, mantendo-se um teor médio de 95,00%.

Foram validados dois métodos para cefoxitina sódica com técnicas clássicas utilizando anidrovolumetria e iodometria apresentando bons resultados e alternativa de análise em laboratórios mais simples, pois requerem menor investimento em equipamentos e reagentes; dois métodos por técnicas instrumentais, espectrofotometria no UV e CLAE; que apesar de requerer equipamentos e reagentes caros, demonstraram bons resultados e maior sensibilidade, bem como o método microbiológico aplicado a vitaminas e antibióticos, permitindo a avaliação da potência frente ao microrganismo indicador.

Desta forma podemos eleger o método cromatográfico como seletivo, sensível, preciso, exato nos permitindo a separação dos componentes de uma amostra; sendo aplicável ao estudo dos produtos de decomposição. Quanto ao método UV, de segunda escolha por ser menos seletivo, mas como capacidade de quantificação de pequenas quantidades de analito e com custo relativamente menor que um cromatógrafo CLAE.

O método microbiológico, embora sensível e útil na avaliação da potência do analito frente ao microrganismo indicador, apresenta algumas dificuldades de execução como aquisição das cepas por seu custo, padronização das placas, camadas de ágar base e inóculo, inserção dos cilindros sobre a superfície do ágar, controle de temperatura da estufa de cultura bem como medição do halo de inibição pelo analista.

Quanto aos métodos por titulometria, contam como pontos positivos a facilidade de aquisição de vidrarias, mas em se tratando de calibrações, o custo aumenta cerca de 4 vezes o preço da mesma; reagentes e soluções, há a necessidade de padronização e correto preparo, o ponto final ou de viragem também pode ser influenciado pelo observador no reconhecimento da mudança de cor; porém se faz necessário ponderar

que a quantidade de amostra empregada no ensaio se torna bem maior devido a baixa sensibilidade destes métodos em questão.

Todos os métodos apresentam suas diversas aplicabilidades em virtude de custos, poder de aquisição e finalidade de ensaio, estando todos validados, com seus respectivos riscos e benefícios de uso.

14 . Referências bibliográficas

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

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.

ALVAREZ, J. S.; DEL CASTILLO, J. A. S.; ORTIZ, M. J. A. Interaction between ciclosporin and ceftriaxone. **Nephron.**, v.59, p.681-2, 2001.

AMARAL, F. D.; A contaminação microbiana e a busca da qualidade. *Contr. Contam.*, v. 67, p. 14-19, 2004.

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. **Drug Evaluation**: cephalosporins and related agents. Chicago (IL): AMA, 1992.

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

ANNE, S.; REISMAN, R.E. Risk of administering cephalosporin antibiotics to patients with histories of penicillin allergy. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 74, p.167-170, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; LOYD, V. O. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo, Editorial Premier, 2000.

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington, 1990. v.1, p.xvii.
- AYAD, M.M.; SHALABY, A.A.; ABDELLATEF, H.E.; ELSAID, H.M. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins through oxidation with cerium (IV) and 1-chlorobenzotriazole. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 20, p.557-564, 1999a.
- AYAD, M.M.; SHALABY, A.A.; ABDELLATEF, H.E.; ELSAID, H.M. Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of certain cephalosporins. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.18, p.975-983, 1999b.
- BAHIA, O. F. Implantação de sistemas de qualidade em laboratórios de ensaio. **Rev. Anal.**, v. 3, p.24-28, 2003.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos**. Rio de Janeiro, ArtMed, 2000.
- BOMPADRE, S.; FERRANE, L.; LEONE, L. On-line solid extraction of cephalosporins. **J. Chrom. A**, v.812, p.191-196, 1998.
- BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. DOU de 24 de setembro de 1976.
- Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=178&word=>>. Acesso em 25/2/2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RE nº 398, de 12 de novembro de 2004. **Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. DOU 16 de novembro de 2004. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=13227&word>. Acesso em 22/2/05.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade.** Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em 16/1/2007.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. London, The Stationary Office, 2005.
- CAMPINS-FALCO, P.; SEVILLANO-CABEZA, A.; GALLO-MARTINEZ, L.; BOSCH-REG, L. A comparison of various calibration techniques applied to the ninhydrin-cefoxitin determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 334, p.199-208, 1996.
- CARVALHO, J. P.; SANTOS, A. Z.; SA, A. S.; TEIXEIRA, C. S.; NOGUEIRA, M. S. Estabilidade de Medicamentos no Âmbito da Farmacovigilância. **Rev. Fármacos & Medicamentos**. v.34, n.VI, 2005.
- CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo, Ed. Edgar Blücher, 1998.
- CLEWELL, R. A.; MERRILL, E. A.; YU, K. O.; MAHLE, D. A.; STERNER, T. R.; MATTIE, D. R.; ROBINSON, P. J.; FISHER, J. W. Predicting Fetal Perchlorate Dose and Inhibition of Iodide Kinetics during Gestation: A Physiologically-Based Pharmacokinetic Analysis of Perchlorate and Iodide Kinetics in the Rat. **Toxicol. Sci.**, v.73, p.235-255, 2003.
- COMMITTEE ON DRUGS, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**, v. 93, p.137-150, 1994.
- COX, S. K.; BURNETTE, J. D.; HUSS, B. T.; FRAZIER, D. Determination of cefoxitin in serum and tissue. **J. Chromat. B**, v. 705, p.145–148, 1998.

- CRAFT, J.C.; PARISH, L.C. Systemic antimicrobial therapy. In: Millikan, L.E. (Ed). **Drug therapy in dermatology**. New York, Marcel Dekker, p.57-78, 2000.
- CRAIG, W. A. Pharmacokinetics of antibiotics with special emphasis on cephalosporins. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 6 (Suppl 3), p.46-49, 2000.
- CUCHURAL, G.H.; TALLY, F.P.; JACOBUS, N.V. Comparative activities of newer beta-lactam agents against members of *Bacteroides fragilis* group. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.34, p.479-480, 1990.
- CUNHA, B. A.; GILL, M.V. Cefepime. **Clin. North Am.**, v. 79, p.721-732, 1995.
- DEL ROSSO, J.Q. Get the most from antibiotic therapy. **Skin Aging**, v.6, p.56-60, 2001.
- DONOWITZ, G.R. Third generation cephalosporins. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 3, p.595, 1989.
- EL-WALILY, A. F. M.; GAZY, A.A.; BELAL, S.F.; KHAMIS, E.F. Quantitative determination of some thiazole cephalosporins through complexation with palladium (II) chloride. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.22, p.385-392, 2000.
- ERIKSEN, N.L.; BLANCO, J. D. Extended spectrum (second- and third-generation) cephalosporins. **Ob. Gyn. Clin. North Am.**, v. 19, p.461-474, 1992.
- EV, L. S. **Estudo da estabilidade do ofloxacino em forma farmacêutica injetável**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1997. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- EV, L. S.; SCHAPOVAL, E. E. S. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection . **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.27, p.91-96, 2002.
- EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo, Edgar Blücher, 2001.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. VII edição. Lisboa, 2002.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. Juiz de Fora, Ortofarma, 2002.

FDA. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations**. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1996.

FRATINI, L. **Estudo de métodos físico-químicos e microbiológicos para a análise de ciprofloxacino**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1993. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

FROELICH, P. E. **Doseamentos físico-químicos do norfloxacino**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós Graduação em Farmácia, 1991. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

FUJIMOTO, H.; NAGAOKA, T.; NISHINO, I.; UMEDA, T. Determination of a new oral cephalosporin, S-1090, in human plasma and urine by direct injection high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and column switching. **J. Chrom. B**, v.728, p.125-131, 1999.

FUNG-TOMC, J.C.; HUCZKO, E.; STICKLE, T. Antibacterial activities of cefprozil compared with those of 13 oral cephems and 3 macrolides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p.533-538, 1995.

GIL, E. S. **Controle de qualidade físico químico de medicamentos**. Campo Grande, Uniderp, 2005.

GOLDBERG, D.M. The cephalosporins. **Med. Clin. North A**, v.71, p.1113-1133, 1987.

GOMES, G. C. **Desenvolvimento de Métodos Analíticos e Caracterização de Cloridrato de Lomefloxacino em Matéria-Prima e Comprimidos Revestidos**. Araraquara: UNESP, Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

- GONÇALVES, M. C. Análise térmica de materiais. São Paulo, IE editora, 2004.
- GRAHAM, J. M.; OSHIRO, B. T.; BLANCO, J.D. Limited-spectrum (first generation) Limited-spectrum (first generation) cephalosporins. **Ob. Gyn. Clin. North Am.**, v.19, p.449-59, 1992.
- HECKBERT, S.; STRYKER, W.; COLTIN, K.; et al. Serum sickness in children after antibiotic exposure: estimates of occurrence and morbidity in a Health Maintenance Organization population. **Am. J. Epidemiol.**, v.132, p.336-342, 1990.
- HEWITT, W. **Microbiological assay**. New York: Academic Press, 1977. p.41-42.
- ICH. *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2)*, 2003. Disponível em [http://www.ich.org/Media Server.jserv?@_ID=419&@_MODE=GLB](http://www.ich.org/Media_Server.jserv?@_ID=419&@_MODE=GLB). Acesso em 6/3/05.
- IVANA, I.; LJILJANA, Z.; MIRA, Z. A stability indicating assay method for cefuroxime axetil and its application to analysis of tablets exposed. **J. Chroma. A.**; v. 1119, p.209-215, 2006.
- JOHNSON, M. A.; ALLANSON, J. A.; CAUSON, R. C. Determination of the cephalosporin antibiotic cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromat. B**, v.740, p.71–80, 2000.
- JÖNCK, R. H. Purificação da água para fins farmacêuticos,alimentos e cosméticos. **Contr. Contam.**, Fev., p.12 – 25, 2002.
- JÖNCK, R. H. Normas e critérios para a produção de embalagens para a indústria farmacêutica. **Contr. Contam.**, Jan., p.14 – 21, 2003.
- JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.28, p.795-809, 2002.

- KALINKOVA, G. N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **Inter. J. Pharm.**, v.187, p.1-15, 1999.
- KARCHMER, A.W. Cephalosporins. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Ed. **Principles and practice of infectious diseases**. 5.ed. Philadelphia, Churchill-Livingstone, 2000, p. 274-291.
- KLEPSEK, M.E.; MARANGOS, M.N.; PATEL, K.B. Clinical pharmacokinetics of newer cephalosporins. **Clin. Pharmacokinet.**, v.28, p. 361-384, 1995.
- KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
- LABIA, R.; MORAND, A. Interaction of cefdinir with beta-lactamases. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v.20, p.43-48, 1994.
- LAWUNG, R.; DANIELSSON, B.; PRACHAYASITTIKUL, V.; BULOW, L. Calorimetric analysis of cephalosporins using an immobilized TEM-1 β -Lactamase on Ni²⁺ Chelating sepharose fast flow. **Anal. Biochem.**, v.296, p.57-62, 2001.
- LÁZARO, Z. R.; FERREIRA, A. A; Um controle de qualidade abrangente. **Anfarmag**. v. 66, p.52-53, 2007.
- LEITE, F. Amostragem analítica em laboratório. **Rev. Anal.**, v.6, p. 52-58, 2003.
- LEVINSON, M.E. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 9, p.483-495, 1995.
- LIPSKY, B.A.; BERENDT, A. R. Principles and practice of antibiotic therapy of diabetic foot infections. **Diabetes Metab. Res.**, v. 16, (Suppl 1): p-S42-S46, 2000.

- LIVERMORE, D. M. Resistance to cephalosporin antibiotics. **Drugs**, v. 34, (suppl 2), p.64, 1987.
- LORIAN, V. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. **Bull. NY Med.**, v.51, p.1046-1047, 1975.
- LUND, W. The Pharmaceutical Codex. Principles and Practice of Pharmaceutics. 12. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994.v.20, p.20-24, 2003.
- MACEDO, M. M.; A qualificação dos fornecedores na indústria farmacêutica. *Fárma. Medicam.*,
- MADARAS-KELLY, K.J.; ARBOGAST, R.; JUE, S. Increased therapeutic failure for cephalexin versus comparator antibiotics in the treatment of uncomplicated outpatient cellulitis. **Pharmacotherapy**, v.20, p.199-205, 2000.
- MANDELL, G. L.; PETRI Jr., W.A. Fármacos antimicrobianos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.) **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc GrawHill, 1996.
- MANDELL, G.L.; PETRI, W.A. Antimicrobial agents: penicillins, cephalosporins and other beta-lactam antibiotics. In: HARDMAN J.G., LIMBIRD L.E., (Ed) **Goodman's & Gilman's the pharmacologic basis of therapeutics**. 9.ed. New York, McGraw-Hill, 1996, p. 1073-1101.
- MARONA, H. R. N.; SCHAPOVAL, E. E. S. Desarrollo de análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino en polvo y en tabletas de 200 mg. **Información Tecnológica**, v.9, p.251-254, 1998.
- MARSHALL, W.F.; BLAIR, J.E. The cephalosporins. **Mayo Clin. Proc.**, v.74, p.187-95, 1999.

- MAZZEI, T.; DENTICO, P. The pharmacokinetics of oral cephalosporins. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.6, (Suppl 3), p.53-4, 2000.
- MCDONALD, P. J.; WETHERALL, B. L.; PRUUL, H. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. **Infect. Dis.**, p.3:38, 1981.
- MENDEZA, A. S.; DALOMOB, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v.41, p.1363-1366, 2006.
- METWALLY, F. H.; ALWARTHAN, A.A.; AL TAMIMI, S.A. Flow-injection spectrophotometric determination of certain cephalosporines based on the formation of dyes. **II Farmaco**, v.56, p.601-607, 2001.
- MILLER, J. M.; KALE, U. J.; LAU, S. M. K.; GREENE, L.; WANG, H. Y. Rapid estimation of kinetics parameters for thermal decomposition of penicilins by modulated thermogravimetric analysis. **J. Pharm. Biom. Anal.** V. 35, n.1, p.65-73, 2004.
- MOHAMMED, E.; ABDEL-HAMID. FSQ spectrophotometric and HPLC analysis of some cephalosporins in the presence of their alkali-induced degradation products. **II Farmaco**, v. 53 , p.132-138, 1998.
- MOELLERING, R.C.; SENTOCHNIK, D.E. Cephalosporins. In: GORBACH SL, BARTLETT JG, BLACKLOW N. R., (Ed) **Infectious diseases**. 2.ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998, p. 185-97.
- MORETTO, L. D. A estabilidade de fármacos e medicamentos. **Pharmaceutical Technology**. v. 3, n. 4, p. 46 – 48, 1999.

- MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.H.H.; HARTL, A.; WOHLRAB, J. Determination of cephalosporins in urine and bile by zone electroforesis. **Anal. Chim. Acta**, v.349, p.207-213, 1997.
- MROZEK, R.L. Termal investigations of cefadroxil complexes with transition metals. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v.78, p. 473-486, 2004.
- MURILLO, J. A.; LEMUS, J.M.; GARCIA, L.F. Analysis of binary mixtures of cephalothin and cefoxitin by using first-derivative spectrophotometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.14 , p.257-266, 1996.
- NISHINO, I.; FUJIMOTO, H.; UMEDA, T. Determination of a new oral cephalosporin, cefmatilen hydrochloride hydrate, and its seven metabolites in human and animal plasma and urine by coupled systems of ion-exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chrom. B**, v.749, p.101-110, 2000.
- NÓBREGA, I. M. F.; JÚNIOR, S. G.; SILVA, R. M. F. Estudo de estabilidade de comprimidos de captopril 25mg acondicionados em blister frente a diferentes tipos de filmes moldáveis. **Rev. Bras. Farm.**, v.87, n.4, p.128-131, 2006
- OBERHOLTZER, E. R.; BRENNER, G. S.Cefoxitin sodium: solution and solid-state chemical stability studies. **J. Pharm. Sci.**, v.68, n.7, p.863-866, 1979.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; FORMARIZ, T. M., WANCZINSKI, B. J. Estabilidade de Antibióticos b-Lactâmicos incorporados em micelas, microemulsões e outros agregados supramoleculares. **Infarma**. v.15, n.7/8, p. 80-84, 2003.
- PENNA, T. C. V.; ROCHA, L. J.; MARTINS, A. M. S. Água para a produção de soluções parenterais e para lavagem de produtos médico-hospitalares. **Contr. Contam.**, fev, p. 32-39, 2002.

- 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. Chrom. A**, v.812, p.159-178, 1998.
- PEZZINI, B. R.; BAZZO, . C.; ZETOLA, M. Controle de qualidade na farmácia magistral. **Anfarmag**, v.51, p. 2-10, 2004.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Correlatos**. 2.ed. São Paulo, Atheneu, 2003.
- PIKAL, M.J.; LUKES, A. L.; LANG, J.E. Thermal decomposition of amorphous beta-lactam antibacterials. **J. Pharm. Scien.**, v.66, n.9, p.1312-6, 1977.
- PRINCE, R.A.; VILLAR, L.A. Side-effect profiles of newer-generation cephalosporins. **Drug Intell. Clin. Pharm.**, v. 17, p.656-7, 1983.
- QUALITY ASSURANCE OF PHARMACEUTICALS: **A Compendium of Guidelines and Related Materials**, v. 1. Geneva, World Health Organization, 1997. 238 p.
- RABINOW, B.; ROSEMAN, T. Plastic packaging materials. In: GENNARO,A.R. **Remington- the science and practice of pharmacy**. 20.ed. Easton: Mack Publishing, 2000.
- RIGGE, D, C.; JONES, M. F. Shelf lives of aseptically prepared medicines stability of netilmicin injection in polypropylene syringes. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 35, p. 1251–1256, 2004.
- RIGGE, D, C.; JONES, M. F. Shelf lives of aseptically prepared medicines – stability of hydrocortisone sodium succinate in PVC and non-PVC bags and in polypropylene syringes. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 38, p. 332-336, 2005a.

- RIGGE, D. C.; JONES, M. F. Shelf lives of aseptically prepared medicines—Stability of piperacillin/tazobactam in PVC and non-PVC bags. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 39, p. 339-343, 2005b.
- RODRIGUES, P. C. **Bioestatística**. Rio de Janeiro: Universitária, 1986.
- SADICK, N.S. Systemic antibacterial agents. In: WOLVERTON, S. E. (Ed) **Comprehensive dermatologic drug therapy**. New York: WB Saunders, 2001, p. 31-3.
- SADICK, N.S. Systemic antibiotic agents. **Dermatol. Clin.**, v.19, p.1-21, 2001.
- SALEH, G.A.; ASKAL, H.F.; MOHAMED RADWAN, F.; OMAR, M.A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins. **Talanta**, v.54, p.1205-1215, 2001.
- SALEM, H.; ASKAL, H. Coloumetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck´s salt. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.29, p.347-354, 2002.
- SAMANIDOU, V. F.; IOANNOU, A.S.; PAPADOYANNISA, I.N. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction - a comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. **J. Chrom. B**, v.809, p.175-182, 2004.
- SAMANIDOU, V. F.; HAPESHI, E. A.; PAPADOYANNIS, I. N. A Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. **J. Chromat. B**, v.788, p.147–158, 2003.
- SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.
- SHIRNER, R.L.; HERMANN, C. K. F.; MORRIL, T. C.; CURTIN, D. Y.; FUSON, R. **The Systematic Identification of Organic Compounds**. New York: Wiley, 1988.
- SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. São Paulo, 2002.

SOUZA, F. M. B. **Métodos físico-químicos e microbiológico para controle de qualidade e estudo de estabilidade da pefloxacina**. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1995. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

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

STOCKLEY, I. H. **Drug Interactions**. Nottingham, UK: Pharmaceutical Press, 1999, p.126.

SULTAN, T. In vitro activity of cefdinir (FK 482) and ten other antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from adult and pediatric patients. **Chemotherapy**, v.10, p.80-91, 1994.

SUN, Y.; TANG, Y.; YAO, H.; ZHENG, Z. Potassium permanganate-glyoxal chemiluminescence system for flow injection analysis of cephalosporin antibiotics: cefalexin, cefadroxil, and cefazolin sodium in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v.64, p.156-59, 2004.

TATRO, D.S. **Drug interactions facts. Facts and comparisons**. St. Louis, 2000, p. 294.

THE MERCK Index. 13.ed. Whitehouse Station, 2001.

THONGPOON, C.; LIARUANGRATH, B.; LIARUANGRATH, S.; WHEATLEY, R. S.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of cephalosporins in pharmaceutical preparations using tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)-potassium permanganate system. **Analytica Chimica Acta**, v. 553, p.123-133, 2005.

TOMASSETI, M.; CAMPANELLA, L.; SORRENTINO, L. Further applications of thermoanalytical methods to the detection of potassium and sodium salts of penicilins and cephalosporins. **Therm. Acta.** V.70, p. 303-315, 1983.

TUNG-HU, T. S.A. I.; TONG-RONG TSAI, A. B.; YEN-FEI CHENA, C.; CHIEH-FU, C. Determination and pharmacokinetic study of unbound cefoxitin in rat blood and brain with on-line microdialysis and microbore liquid chromatography. **Anal. Chim.Acta.** v. 412, p.13–18, 2000.

UENO, K.; TANAKA, K.; TSUJIMURA, K. Impairment of cefdinir absorption by iron ion. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.54, p.473-5, 1993.

US PRODUCT MONOGRAPH. KEFLEX (cefalexin). In: Physicians' desk reference, Montvale, NJ: Medical Economics, 2001, p.1124-5. Indianapolis, IN: Dista Products.

US PRODUCT MONOGRAPH. OMNICEF (cefdinir). In: Physicians' desk reference, Montvale, NJ: Medical Economics, Abbott Park, IL: Abbott Laboratories, 2000, p. 478-83.

US PRODUCT MONOGRAPH. CECLOR (cefactor). Physicians' desk reference. Montvale, NJ: Medical Economics, Indianapolis, IN: Eli Lilly Company, 2001, p.1706-10.

US PRODUCT MONOGRAPH. CECLOR CD (cefactor extended release). Physicians' desk reference. Montvale, NJ: Medical Economics, San Diego, CA: Dua pharmaceutical. 2001, p.1163-5.

USP 26. The United States Pharmacopoeia. Rockville: USP Convention, 2003.

USP 28. The United States Pharmacopoeia. Rockville: USP Convention, 2005.

VADAS, E.B. Stability of Pharmaceutical Products. In: REMINGTON: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 20.ed., p.986–94, 2000.

- VENERANDA, N.; Indústria não pode dispensar controle de pragas. **Contr. Contam.**, v. 65, p. 10-17, 2004.
- VOGEL, A. **Textbook of quantitative chemical analysis**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC. 1992, p.234-35.
- VOLZKE, H.; LUDEMANN, I.; ROBINSON, D. M.; SPIEKER, K. W.; SCHWAHN, C.; KRAMER, A.; JOHN, U.; MENG.; W. The Prevalence of Undiagnosed Thyroid Disorders in a Previously Iodine-Deficient Area. **Thyroid**, v.13(8), p. 803-810, 2003.
- YUANYUAN, S.; YUHAI, T.; HONG, Y.; XIAOHUI, Z. Potassium permanganate-glyoxal chemiluminescence system for flow injection analysis of cephalosporin antibiotics: cefalexin, cefadroxil, and cefazolin sodium in pharmaceutical preparations. **Talanta**. V. 64, n.1, p. 156-159, 2004.
- WILSON, C.O.; GISVOLD, O. **Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. United States of America: Wilkins, 1998. p. 197-202.
- WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis**. London: Churchill Livingstone, 1999.
- WHEATLEY, A. R.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of cephalosporins in pharmaceutical preparations using tris (2,2-bipyridyl) ruthenium (II)-potassium permanganate system. **Anal. Chim. Acta**, v.553, p.123–133, 2005.
- WHITE, L.O. **Clinical Microbial Assays**, Oxford. 1999. p.149-169.
- WILLIAMS, D.A; LENKE, T.L. **Pharmaceutical Chemistry - Principles of Medicinal Chemistry**. New York: Churchill Livingstore, 2002.
- WHO (World Health Organization). The Importance of Pharmacovigilance: Safety Monitoring of medicinal products. World Health Organization. 2002

XU, F.; WU, Z.; ZOU, H. Effects on renal function and cyclosporin drug concentration by combination with three cephalosporins in renal transplant patients. **Zhongguo Kangshengsu Zashi**, v. 22, p. 223-5, 1997.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A. C. Physicals Parameters in the Emulsion Stability Study. **Rev. Vis. Acadêm.**, v. 2, n. 2, p. 47-58, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)