

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO  
DE CEFTAROLINA EM PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL – ESTUDO  
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

Idamir José Mascarello Junior

Porto Alegre, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO  
DE CEFTAROLINA EM PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL – ESTUDO  
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

Dissertação apresentada por **Idamir José  
Mascarello Junior** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Martin Steppe

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Profa. Dr. Amanda Thomas Barden

#### CIP - Catalogação na Publicação

Macarello Junior, Idamir José  
Desenvolvimento e validação de bioensaio para  
determinação de ceftarolina em pó para solução  
injetável - Estudo preliminar de estabilidade /  
Idamir José Macarello Junior. -- 2017.  
102 f.

Orientadora: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. ceftarolina fosamila. 2. bioensaio. 3.  
estabilidade. 4. CLAE. 5. validação. I. Scherman  
Schapoval, Elfrides Eva, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (402,403) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter nos dado a oportunidade de estarmos aqui.

À Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval, pela orientação, carinho, dedicação, exemplo de profissional, pessoal e pela confiança no meu trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pelas condições de trabalho oferecidas.

Aos professores, Dr Martin Steppe, Dra Cássia Garcia, Dra Nadia Volpato e Dr Andreas Mendez pela receptividade e disposição em sempre colaborar. Em especial, ao Professor Dr. Tércio Oppe pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade: Mariana, Julia, Joanna, Lívia, Elisa, Caren, Nathalie, Camila, Jéssica, Fábio pela receptividade e amizade. Em especial à Leticia pela sua disposição e auxílio para realização deste trabalho.

Aos meus pais que sempre me incentivaram ao estudo e me apoiaram nas dificuldades, com muito amor e carinho.

A minha irmã que mesmo longe sempre me apoiou.

Em especial, a minha esposa Rafaela pela ajuda, apoio e incentivo, no desenvolvimento do trabalho. Por sempre me apoiar e estar ao meu lado nas dificuldades e me proporcionar momentos felizes e inesquecíveis ao seu lado.

E a todos que mesmo não citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.





## RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos e validados métodos analítico e microbiológico, bem como estudo preliminar de estabilidade, cinética de degradação e citotoxicidade da Ceftarolina Fosamila em pó para solução injetável, um antibiótico da classe das cefalosporinas de quinta geração, indicado para pneumonias adquiridas na comunidade e infecções graves, de pele e tecidos moles. A validação do ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar cilindros em placa, delineamento 3x3, apresentou resultados satisfatórios, como especificidade, linearidade na faixa de 2,0 - 8,0 µg/mL, precisão (109,42 %), exatidão (102,3 %) e robustez. Soluções de Cefatarolina Fosamila do produto acabado expostas à radiação UVC (254 nm) e à degradação térmica a 60 °C foram utilizadas para avaliar a especificidade do bioensaio. A robustez foi avaliada através da alteração da concentração do meio inoculado (0,8 e 1,2 %). O desenvolvimento e validação de método por CLAE foi avaliado através da especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. No método cromatográfico foi utilizado cromatógrafo à líquido de alta eficiência SHIMADZU com coluna Agilent® C18, fase móvel (água com trietilamina 1,0% pH 5,0:acetonitrila 87:13 v/v). O método apresentou-se específico, linear, no intervalo de 5,0 - 60,0 µg/mL, preciso (110,0 %), exato (100,68 %) e robusto. Os métodos microbiológico e cromatográfico validados foram comparados estatisticamente e verificou-se não haver diferença significativa entre eles quando comparados através do teste “t” de Student. No estudo preliminar de estabilidade constatou-se ser estável em hidrólise ácida (0,1 M) e luz UVA no período avaliado, e instável frente à degradação térmica (40 e 60 °C), oxidativa com peróxido de hidrogênio, básica em NaOH (0,1 M e 0,01 M) e luz UVC. As cinéticas de degradação frente à luz UVC e degradação térmica 60 °C mostraram que as amostras possuem cinética de degradação de ordem zero e de segunda ordem, respectivamente. O ensaio de citotoxicidade demonstrou não haver diferença entre a condição normal e a amostra submetida à degradação forçada, sugerindo que os possíveis produtos de degradação formados não alteraram o resultado.

**Palavras-chaves:** ceftarolina fosamila, validação, bioensaio, estabilidade, CLAE.



## ABSTRACT

In this work, analytical and microbiological methods were developed and validated, as well as a preliminary study of the stability, degradation kinetics and cytotoxicity to Ceftaroline Fosamil powder for injectable solution, this is a fifth generation cephalosporin antibiotic indicated for community-acquired pneumonia and severe infections of the skin and soft tissues. The validation of the microbial assay by diffusion method in 3x3 cylinder agar delineated showed satisfactory results in specificity, linearity in the range of 2.0 - 8.0 µg / mL, precision (109.42 %), accuracy (102.3 %) and robustness. The development and validation of the method by HPLC was evaluated through specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. In the chromatographic method was used high performance liquid chromatograph from SHIMADZU with Agilent® C18 column, mobile phase (water with triethylamine 1.0 % pH 5.0: acetonitrile 87:13 v/v). The method was linear, specific in the range of 5.0 - 60.0 µg/mL, accurate (110.0 %), exact (100.68 %) and robust. The validated microbiological and chromatographic methods were compared statistically and there was no significant difference between them when compared through Student's t-test. In the preliminary stability study, it was found stable in acid hydrolysis (0.1M) and UVA light in the period evaluated, and instable against thermal degradation (40 and 60 °C), oxidative with hydrogen peroxide, basic in NaOH (0.1 M and 0.0 1M) and UVC light. Samples exposed in UVC light an thermal degradation at 60°C showed degradation kinetics following zero order and second order, respectively. The cytotoxicity assay showed no difference between the normal condition and the sample submitted to forced degradation, suggesting that the possible degradation products formed did not change the result.

**Key words:** ceftaroline fosamila, validation, bioassay, stability, HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Estrutura básica das cefalosporinas.

**Figura 2:** Esquema representativo da bioconversão da Ceftarolina Fosamila no plasma.

**Figura 3:** Cromatograma representativo das condições validadas para o método cromatográfico para quantificação da CEF.

**Figura 4:** Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções amostra submetida à degradação forçada onde: (A) meio ácido 180 minutos; (B) meio básico 5 minutos; (C) oxidativa 45 minutos; (D) UVA 180 minutos; (E) UVC 90 minutos; (F) térmica 40 °C 180 minutos; (G) térmica 60 °C 120 minutos.

**Figura 5:** Representação gráfica da curva padrão da CEF na faixa de 5,0 – 60 µg/mL quantificados por CLAE.

**Figura 6:** Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis para avaliação da robustez do método analítico, usando desenho experimental Plackett-Burman.

**Figura 7:** Placa de petri com os halos de inibição de crescimento do microrganismo *Kocuria rhizophila*, pelo método de difusão em ágar cilindros em placa para determinação de CEF.

**Figura 8:** Curva analítica da solução SQR obtida através do método microbiológico de difusão em ágar cilindros em placa.

**Figura 9:** Cromatogramas representativos obtidos através da análise por CLAE das amostras de CEF: (A) 60 °C 120 minutos; (B) UVC 90 minutos.

**Figura 10:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem da degradação térmica a 60° C de CEF monitorada por CLAE.

**Figura 11:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem submetida à degradação térmica a 60° C de CEF monitorada pelo método microbiológico.

**Figura 12:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem submetida à degradação UVC de CEF monitorada pelo CLAE.

**Figura 13:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem da degradação UVC de CEF monitorada pelo método microbiológico.

**Figura 14:** Resultados obtidos para amostra de CEF na condição normal (T0) e submetida à degradação térmica 60 °C (TE) através do ensaio da atividade metabólica mitocondrial (MTT). Valores de 100% indicam viabilidade total (CN).

**Figura 15:** Resultados obtidos para amostra de CEF na condição normal (T0) e submetida à degradação fotolítica UVC (UVC) através do ensaio da atividade metabólica mitocondrial (MTT). Valores de 100% indicam viabilidade total (CN).

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Principais grupos das cefalosporinas.

**Tabela 2:** Parâmetros otimizados para utilização na validação do método por CLAE para determinação de CEF.

**Tabela 3:** Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.

**Tabela 4:** Fatores avaliados para robustez pelo método Plackett-Burman.

**Tabela 5:** Parâmetros de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e recomendados.

**Tabela 6:** Análise da variância (ANOVA) para ajuste do modelo linear da curva padrão por CLAE.

**Tabela 7:** Valores experimentais obtidos através da repetibilidade e da precisão intermediária na determinação da CEF por CLAE.

**Tabela 8:** Resultado da determinação do teste de recuperação de CEF por CLAE.

**Tabela 9:** Parâmetros usados na determinação de Ceftarolina Fosamila em ensaio microbiológico.

**Tabela 10:** Diâmetro dos halos de inibição utilizados na construção da curva padrão obtidos pelo ensaio microbiológico.

**Tabela 11:** Análise da variância dos halos de inibição determinados na obtenção da curva padrão, utilizando o método de difusão em ágar.

**Tabela 12:** Resultados obtidos através do ensaio microbiológico para determinação de CEF.

**Tabela 13:** Resultados obtidos no teste de recuperação de CEF pelo ensaio microbiológico.

**Tabela 14:** Teores obtidos após a degradação frente à luz UVC avaliados por CLAE e método microbiológico.

**Tabela 15:** Teor de CEF após a degradação térmica 60°C avaliados por CLAE e método microbiológico.





## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEF	Ceftarolina fosamila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMEM	<i>“Dulbecco's Modified Eagle's Medium”</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DPR	Desvio padrão relativo
EUA	Estados Unidos
EMA	<i>“European Medicines Agency”</i>
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>“Food and Drug Administration”</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Council on Harmonization
IPTM	Infecções graves, como de pele e tecidos moles
IV	Intravenosa
MRSA	Resistência da meticiclina ao microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	Atividade metabólica mitocondrial
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
SIH-SUS	Sistema de Informação Hospitalar
SQR	Substância química de referência



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>30</b>
3.1 Pneumonias Adquiridas na Comunidade (PACS).....	32
3.2 Infecções de pele e tecidos moles.....	33
3.3 Cefalosporinas.....	35
3.4 Ceftarolina Fosamila.....	37
3.5 Validação de métodos analíticos.....	38
<b>4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
4.1.1 Validação.....	44
4.1.2 Resultados e discussão.....	47
4.2 Ensaio microbiológico – Método em Ágar-cilindros em placa.....	53
4.2.1 Materiais e métodos.....	54
4.2.2 Validação.....	57
4.2.3 Resultados e discussões.....	58
4.3 Análise comparativa entre os métodos desenvolvidos.....	63
<b>5. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE.....</b>	<b>66</b>
5.1 Introdução.....	68
5.2 Parte Experimental.....	68
5.3 Resultados e discussão.....	70
5.4 Estudo da cinética de degradação.....	72
5.4.1 Cálculos cinéticos.....	74
5.4.2 Resultados e discussão.....	74
<b>6. ESTUDO DE CITOTOXICIDADE.....</b>	<b>80</b>
6.1 Introdução.....	82
6.2 Parte Experimental.....	82
6.3 Resultados e discussão.....	84
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>







Antimicrobianos, podendo ser de origem natural ou sintética, são substâncias que agem sobre os microrganismos inibindo seu crescimento ou causando a sua morte, contudo sua utilização indiscriminada aliada à capacidade adaptativa dos microrganismos possibilitou o surgimento de cepas resistentes. Estas tem causado preocupação, assim como a dificuldade na descoberta de novos antimicrobianos e a toxicidade dos mesmos. O tratamento empírico é determinado pelo conhecimento do microrganismo infectante, características do paciente, funções renais e hepáticas, hipersensibilidade aos antibióticos e tratamento anterior com antibióticos (EISENSTEIN, 2008; WHITE e SEATON, 2011).

Infecções graves, como de pele e tecidos moles (IPTM) e pneumonia adquirida na comunidade (PAC), são muito comuns e de grande risco (MPENGE e MACGOWAN, 2015). Bactérias como *Staphylococcus aureus* (S. aureus) e estreptococos beta-hemolítico, grupos A, B, C e G, são comumente causadoras das IPTM, sendo mais comum em pacientes idosos, diabéticos e pós-cirúrgicos (DIEKEMA *et al.*, 2001; DINUBILE e LIPSKY, 2004; STEVENS *et al.*, 2005).

A resistência bacteriana a medicamentos é considerada um problema de saúde pública, principalmente no âmbito hospitalar. Os programas de uso racional de antibióticos em hospitais são de extrema importância, pois por meio destes é possível qualificar o uso do antimicrobiano e reduzir o aparecimento de cepas resistentes (KADOSAKI; SOUSA e BORGES, 2012).

A resistência da meticiclina ao microrganismo S. aureus (MRSA) foi detectada em 1961 (JEVONS, 1961), e vem causando uma epidemia nas últimas décadas. As maiores taxas de resistência encontram-se na América do Norte (35,9%), seguida pela América Latina (29,4%) e Europa (22,8%). (WENZEL *et al.*, 1991; GRUNDMANN *et al.*, 2006; MOET *et al.*, 2007; BRUCE *et al.*, 2008; DRYDEN, 2008). Um estudo, relatado por Sader e colaboradores (2010), realizado em centros médicos europeus, mostrou o S. aureus como o patógeno mais comum (71% dos casos), com 22,5 % dos isolados sendo MRSA.

A PAC na comunidade é uma infecção pulmonar não adquirida no âmbito hospitalar ou instituição de saúde e possui quantidades significativas de morbidade e mortalidade (WATKINS e LEMONOVICH, 2011). A PAC é

predominantemente causada por *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), o qual se torna cada vez mais resistente aos antimicrobianos (NIEDERMAN, 2005). *S. pneumoniae* foi o microrganismo mais encontrado nos Estados Unidos (EUA), identificado em 4,2 milhões de atendimentos em 2006 (FILE e MARRIE, 2010).

Na busca de novos antimicrobianos pertence a classe das cefalosporinas, encontra-se a Ceftarolina Fosamila (CEF) a qual é um cefalosporínico de quinta geração que possui utilização intravenosa (IV). Em 2010, foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de IPTM e PAC. A European Medicines Agency (EMA) aprovou a substância em 2012, com as mesmas indicações (MPENDE e MACGOWAN, 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou, em 2014, com o nome de Zinforo®, comercializada pela empresa Astra Zeneca, na forma farmacêutica de pó para solução para infusão, sendo seu uso em infecções complicadas de pele e tecidos moles (SBOC, 2015).

Ceftarolina fosamila é um pró-farmaco que é convertido em ceftarolina ativa após administração IV e possui ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua atividade bactericida se dá por ligação a proteínas de ligação à penicilina (PBPs), resultando em inibição da síntese da parede celular bacteriana (MPENGE e MACGOWAN, 2015).

A preocupação relativa à qualidade, quando associada à atividade produtiva, foi sempre um aspecto inerente ao ser humano, que busca aperfeiçoar, desenvolver, independentemente da atividade que exerça, a fim de atender aos anseios da sociedade como consumidora. As características essenciais de qualidade esperadas pelo consumidor são a eficácia terapêutica e funcional, além da segurança (PINTO *et al.*, 2010).

Para que se possa avaliar a qualidade dos produtos e insumos farmacêuticos são necessários compêndios oficiais, os quais são reconhecidos por agências regulatórias como a Farmacopeia Americana, Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Britânica, Farmacopeia Europeia, entre outras. Não tendo estes disponíveis para controle de produtos de degradação e impurezas deve-se toda vez desenvolver um método para ser avaliado.

O controle de qualidade de medicamentos é um processo complexo, de grande importância para o desenvolvimento e para comercialização do



fármaco. Tem como objetivo a obtenção de medicamentos melhores, mais eficazes, menos tóxicos, mais estáveis, e principalmente a garantia do conteúdo da substância ativa nas especialidades disponíveis no mercado. Por isto, é importante desenvolver metodologias que tenha confiabilidade dos resultados.

Os trabalhos científicos publicados relatam o uso terapêutico à avaliação da resistência *in vitro* e os ensaios clínicos, no entanto há uma escassez de artigos publicados em relação à quantificação da ceftarolina. O desenvolvimento e a validação de metodologia analítica para este fármaco, é importante pelo limitado número de estudos na literatura e, também, pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos antimicrobianos está relacionada com o surgimento de cepas resistentes, uso indiscriminado e pela baixa dose terapêutica.







## 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliar quantitativamente a ceftarolina na forma de pó para solução para uso injetável, bem como o estudo preliminar de sua estabilidade.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método microbiológico, difusão em ágar-cilindros em placa, para doseamento da ceftarolina na forma farmacêutica pó para solução injetável;
- Desenvolver e validar método para determinação quantitativa de ceftarolina na forma farmacêutica pó para solução, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Realizar estudo preliminar de estabilidade nas condições térmica, fotoquímica, oxidativa e hidrólise do pó para solução injetável;
- Realizar estudo de cinética de degradação da ceftarolina, forma farmacêutica pó para solução, por meio de métodos microbiológicos e CLAE, previamente validados;
- Realizar estudo de citotoxicidade *in vitro* da ceftarolina degradada e não degradada na forma farmacêutica pó para solução injetável.









### 3.1 PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE (PACS)

Pneumonias são doenças inflamatórias agudas de causa infecciosa que acometem as cavidades aéreas sendo causadas por vírus, bactérias ou fungos. Continuam sendo uma das principais causas de morte no mundo, apesar de todo o avanço na área médica e social no decorrer do século (ALMEIDA e FERREIRA, 2004; CORRÊA *et al.*, 2009).

Estudos demonstram a ligação entre infecções do trato respiratório e riscos de eventos cardiovasculares, tais como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e arritmias cardíacas (VIOLI, CANGEMI e CALVIERI, 2014; VIOLI *et al.*, 2015).

As doenças do aparelho respiratório constituem a quinta causa de óbitos no Brasil, e, dentre essas, a pneumonia é a segunda mais frequente (CORRÊA *et al.*, 2009).

As pneumonias adquiridas na comunidade (PACs) são infecções agudas do parênquima pulmonar, geralmente ocasionadas por bactérias, embora possam apresentar como agentes etiológicos vírus ou fungos. Caracterizam-se por acometer pacientes fora de unidades hospitalares, ou com até 48 horas de hospitalização (CORRÊA *et al.*, 2009).

As maiores incidências das PACs estão concentradas nos extremos da faixa etária, principalmente em menores de cinco anos e maiores de setenta anos. É considerada a infecção que provoca maior morbidade, com ocorrência de 13,8 milhões de novos casos em todo mundo a cada ano (FARHA e THOMSON 2005; NAIR e NIEDERMAN, 2011; NOVAES, SARTORI e SOÁREZ, 2011).

Em países que estão em desenvolvimento a estimativa mundial da incidência entre crianças de 1–5 anos é de 0,29 episódios/criança/ano. Anualmente contabiliza 150 milhões de casos, sendo que destes 11 – 20% necessitam de internação hospitalar (NOVAES, SARTORI e SOÁREZ, 2011).

Segundo o Sistema de Informação Hospitalar (SIH-SUS), no Brasil, de janeiro de 2005 a março de 2006, a PAC foi a causa de internação de cerca de 20% de pacientes com menos de cinco anos (OBARO e MADHI, 2006; GRANDO *et al.*, 2015).

Os agentes etiológicos variam de acordo com a gravidade do quadro, sendo o *Streptococcus pneumoniae* responsável por quase metade dos casos de PACs e considerado o principal causador em crianças e adultos (CORRÊA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2013). O diagnóstico é composto por exame clínico (febre e tosse), físico (ruídos ventilatórios) e complementação com a realização de radiografia simples de tórax (LEAL, KISSMAN e FRANCO, 2012).

### 3.2 INFECÇÕES DE PELE E TECIDOS MOLES

A pele é o órgão mais acessível do corpo humano devido sua exposição, assim sendo é o mais traumatizável, tornando-se o órgão mais sujeito à infecção. Estas podem ser classificadas como primárias ou secundárias, dependendo da existência da lesão antes do surgimento da infecção (BRASIL, 2013).

O *Staphylococcus aureus* é um colonizador natural da pele, que com o rompimento da barreira cutânea e a diminuição da imunidade pode tornar-se patogênico causando infecções de pele. Este patógeno se aproveita do rompimento da barreira cutânea através de traumas que comprometem a integridade da barreira, tornando assim esta a principal causa da mudança de comportamento deste microrganismo (FERREIRA, GONÇALVES e ASSIS, 1985; BARRAVIERA, 1994; GELATTI *et al.*, 2009).

Algumas infecções por *Staphylococcus aureus* podem ser agudas, piogênicas e disseminar para diferentes tecidos provocando focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais, são também frequentemente documentados (LOWY, 1998). Em um estudo realizado por Gales e colaboradores (2009), em hospitais brasileiros entre 2005 e 2008, demonstrou o *S. aureus* como principal agente de infecção da corrente circulatória (20,2%), principal responsável por infecções de pele e tecidos moles (28,1%) e segundo microrganismo mais comum (24,9%) de pneumonia em pacientes hospitalizados.

Os isolados de *Staphylococcus aureus* que apresentam resistência à meticilina são denominados MRSA e representam um importante patógeno nosocomial. Vários fatores de risco estão relacionados com aquisição deste

microrganismo como: internação em unidade de tratamento intensivo, prolongada hospitalização, doença de base grave, procedimentos invasivos e exposição prolongada ou repetida aos antimicrobianos (DUNKLE *et al.*, 1981; LOWY, 1998).

Ao descobrirem a penicilina, acreditava-se que mortalidade por processos infecciosos não seria mais problema, porém apenas um ano após a industrialização já apareceram as primeiras cepas de *S. aureus* produtoras de penicilinas. Para tentar reverter essa situação, foram desenvolvidos derivados sintéticos da penicilina, resistentes à ação das beta-lactamases: oxacilina e metilicina. Os antimicrobianos beta-lactâmicos ligam-se a sítios de proteínas na parede das células bacterianas, denominadas de proteínas de ligação à penicilinas (PBP). Ao passar do tempo, devido o uso crescente deste grupo de antimicrobianos o *S. aureus* desenvolveu um mecanismo de resistência, resultando uma alteração estrutural destas PBPs formando assim uma proteína chamada PBP 2<sup>a</sup>, esta com baixa afinidade de ligação aos antibióticos (LUNA *et al.*, 2010). O elemento genético responsável pela produção de PBPs alteradas é o gene *MecA*. A presença deste gene implica em resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, assim sendo, quando o *S. aureus* apresentar este mecanismo de resistência é denominado *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA) (GELATTI *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, as infecções causadas por este patógeno estavam limitadas aos hospitais, porém a partir da década passada, infecções foram descritas em todo o mundo, de forma crescente em crianças e adultos provenientes da comunidade. As síndromes clínicas causadas por estes isolados se estendem desde infecções de pele e partes moles até pneumonia e sepse grave (RATHORE e KLINE, 1989; CDC, 1999; GROOM *et al.*, 2001; DUFOUR *et al.*, 2002; GELATTI *et al.*, 2009).

As infecções obtiveram um aumento de 29% no total das internações hospitalares para este patógeno entre 2000 e 2004. Além disso, 6,3 milhões de consultas médicas por ano são atribuíveis à IPTM. Da mesma forma, entre 1993 e 2005 aumentou de 1,2 milhões para 3,4 milhões de pacientes em unidades de emergência. Este aumento está relacionado com o surgimento de MRSA (PALLIN *et al.*, 2008; EDELSBERG *et al.*, 2009).

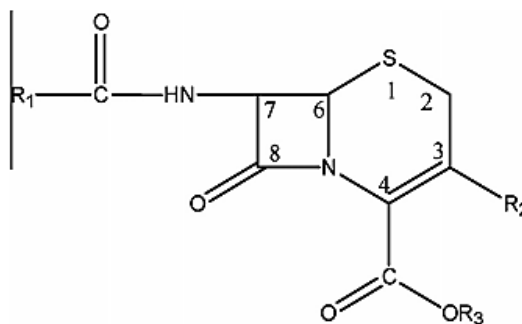
### 3.3 CEFALOSPORINAS

As cefalosporinas são antibacterianos que pertencem ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, porém mais estáveis em relação a betalactamases bacterianas e possuem um espectro mais amplo. São agentes bactericidas que inibem a síntese da parede celular bacteriana. Este bloqueio se dá pela inibição da enzima transpirtase, a qual é responsável pela finalização das ligações cruzadas dos peptidoglicanos que constituem a parede celular das bactérias (BRUNTON *et al.*, 2006; LICHTENFELS *et al.*, 2007; SUAREZ e GUDIOL, 2009; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Em geral, as cefalosporinas não possuem boa absorção via oral, apresentam baixa lipossolubilidade, assim não atravessam a barreira hematoencefálica salvo algumas exceções da classe. Possuem ligação a proteínas plasmáticas variáveis entre 74-86%, sua excreção, em geral, é predominantemente renal, mas pode variar conforme o fármaco e sua via de eliminação. Assim como as penicilinas possuem baixa toxicidade (PEREA, PÉREZ e BOY, 2016).

Geralmente são usadas para controlar infecções gram-negativas e gram-positivas. Consideradas a segunda classe mais importante de beta-lactâmicos, depois das penicilinas, para o tratamento de doenças infecciosas (WEISS e ADKINSON, 1988). As cefalosporinas são usadas em diversos tipos de infecções como: septicemia, pneumonia, meningite, endocardite, osteomielite, infecção do trato biliar, infecção do trato urinário, sinusite, além de infecções hospitalares e na profilaxia de casos cirúrgicos (SILVA, 2006; RANG e DALE, 2007).

A estrutura química das cefalosporinas (Figura 1) é constituída por um núcleo cefem, que consiste na fusão do anel diidrotiazínico (em vez do anel tiazolidina característico das penicilinas) e um anel  $\beta$ -lactâmico. As alterações das cadeias laterais originam as várias cefalosporinas (MARIN e GUDIOL, 2003). Essas alterações nas cadeias laterais podem modular a estabilidade em meio ácido, sendo que esta modificação na molécula é fundamental para a atividade por via oral (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).



**Figura 1:** Estrutura básica das cefalosporinas.

Na classificação microbiológica, tradicionalmente as cefalosporinas estão separadas em cinco gerações, de acordo com sua atividade antimicrobiana, espectro, estabilidade, absorção intestinal, metabolismo e efeitos colaterais, como demonstrados na Tabela 1.

**TABELA 1:** Principais grupos das cefalosporinas.

1ª geração	2ª geração	3ª geração	4ª geração	5ª geração
Cefalotina	Cefamandol	Cefotaxima	Cefepima	Cefatrolina
Cefapirina	Cefuroxima	Ceftizoxima	Cefepiroma	
Cefazolina	Cefonicida	Ceftriaxona		
Cefalexina (a)	Ceforanida	Ceftazidima		
Cefradina (a)	Cefoxitina (b)	Cefoperazona		
Cefadroxilo (a)	Cefmetazole (b)	Cefixima (a)		
	Cefminox (b)	Ceftibuteno (a)		
	Cefotetam (b)	Cefdinir (a)		

(a) Cefalosporinas orais; todas as outras são cefalosporinas parentais.

(b) Embora sejam cefamicinas (classificação química), elas são geralmente incluídas na classificação microbiológica como cefemos da 2ª geração.

(Adaptado de Fernandes, 2008).

Os fármacos pertencentes a 1ª geração possuem sua atividade estreita ou limitada, quando comparadas com o largo espectro das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Durante a década de 60 do século passado a evolução das cefalosporinas foi bastante lenta. Na década de 70 do século passado aparecem as cefalosporinas de 2ª geração, caracterizadas pela presença de um grupo metoximino na posição 7, como acontece na cefuroxima e nas

cefalosporinas da 3ª e 4ª geração, com atividade contra bacilos Gram negativos (Bennett, 2004).

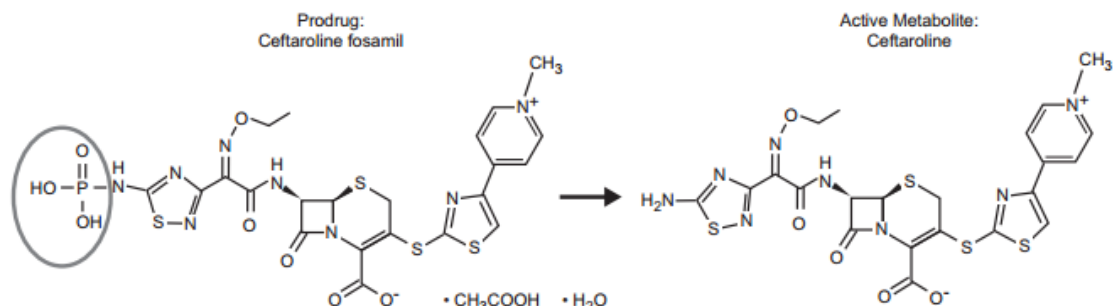
### 3.4 CEFTAROLINA FOSAMILA

Ceftarolina fosamila é um novo pró-fármaco de uso parenteral, que pertence à classe das cefalosporinas. É convertido *in vivo* para a forma microbiologicamente ativa, ceftarolina. É um antimicrobiano utilizado para o tratamento de infecções bacterianas agudas da pele e tecidos moles, pneumonia bacteriana adquirida na comunidade e também pode ser utilizada para o tratamento esporádico de outras infecções graves por MRSA, incluindo osteomielite e abscessos epidurais (IIZAWA *et al.*, 2004; SADER *et al.*, 2005; GE *et al.*, 2008).

Ceftarolina fosamila foi aprovada nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration (FDA), em outubro de 2010 e pela Agência Europeia de Medicamentos, em Agosto de 2012 (Teflaro<sup>®</sup>), também foi aprovado em outros países incluindo Israel, Kuwait e África do Sul. No Brasil, teve aprovação em 2014, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o nome comercial Zinfo<sup>®</sup>, comercializado por Astra Zeneca sendo que seu uso é restrito para pacientes hospitalizados. Possui ação frente à *Staphylococcus aureus* (incluindo isolados resistentes à meticilina), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, bem como as pneumonias bacterianas causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* (KARLOWSKY *et al.*, 2016).

Ao contrário dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos comercializados, a ceftarolina é muito mais ativa *in vitro* contra a MRSA devido ao poder de inibir as proteínas de ligação à penicilina (PBP) que são ligadas às membranas citoplasmáticas, enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana, assim possui potente atividade bactericida contra organismos gram-positivos resistentes (SADER *et al.*, 2005, YEE *et al.*, 2011).

A ceftarolina é administrada como pró-fármaco ceftarolina fosamil, a qual é rapidamente convertida pelas enzimas fosfatases ao seu metabolito bioativo, ceftarolina (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema representativo da bioconversão da Ceftarolina Fosamila no plasma (YEE *et al.*, 2011).

Ceftarolina segue um modelo farmacocinético de dois compartimentos e é principalmente eliminada por excreção renal, com uma meia-vida de aproximadamente 3 horas. Semelhante a outras cefalosporinas, o tempo acima da concentração inibitória mínima é o parâmetro farmacodinâmico que melhor prediz a eficácia para ceftarolina (STEED e RYBAK, 2010).

A administração de 600 mg de ceftarolina por via intravenosa a cada 12 horas, foi demonstrado ter uma eficácia semelhante à vancomicina em associação com aztreonam para o tratamento de infecções da pele e da estrutura da pele, para o tratamento de pneumonia adquirida na comunidade, também apresenta um perfil de segurança semelhante ao de outras cefalosporinas (STEED e RYBAK, 2010).

É necessário ajuste posológico de insuficiência renal moderada e para pacientes submetidos à hemodiálise. É uma cefalosporina de amplo espectro, excretada por via renal, que é clinicamente eficaz para o tratamento de infecções complicadas da pele e da estrutura da pele e pneumonia bacteriana adquirida na comunidade e, tem atividade distinta contra alguns organismos gram-positivos multirresistentes difíceis de tratar (STEED e RYBAK, 2010).

### 3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

É de extrema importância o desenvolvimento de uma metodologia analítica eficaz e confiável para o controle de qualidade dos medicamentos

comercializados, tornando imprescindível o desenvolvimento de rotinas de análises que além de servirem para este propósito sejam favoráveis para implantação em comparação com métodos usuais (PARISOTTO *et al.*, 2005).

Validação de método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. É um aspecto vital não apenas para os propósitos regulatórios, mas também para uma aplicação eficiente e de longo prazo da metodologia desenvolvida. Tem como objetivo demonstrar que o método é adequado para a aplicação desejada e demonstra, por estudos em laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem a exigência frente a sua aplicação (BARROS, 2002; ERMER e PLOSS, 2005; ICH, 2005; USP, 2016).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, robustez, adequadas à análise (BRASIL, 2003).

Os métodos analíticos que serão utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e/ou para avaliar sua qualidade devem ser validados. Um método validado é essencial do ponto de vista industrial, pois os dados analíticos são limitantes para proceder a liberação de um lote e também para estabelecer/verificar o prazo de validade de um medicamento (EPSHTEIN, 2004; ERMER e PLOSS, 2005).

Os antibióticos estão entre as classes de medicamentos mais importantes mundialmente. No controle de qualidade, sua principal etapa é realizada através do ensaio microbiológico convencional que permanece quase inalterado desde seu desenvolvimento. A avaliação da eficácia de um antibiótico frente a um microrganismo específico é essencial, sendo que refletirá no sucesso da terapia antimicrobiana e diminuirá o surgimento de bactérias multirresistentes (BUTTLER e COOPER, 2011; FRANCISCO *et al.*, 2014; GOTTARDI *et al.*, 2015; SILVA e SALAGADO, 2015).



---

#### **4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

---



#### 4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (em inglês, high performance liquid chromatography) é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. Em uma única análise pode-se separar componentes individualmente de uma mistura, e fornecer uma estimativa qualitativa e quantitativa de cada constituinte. Podem ser pontuadas algumas razões da popularidade do método como: sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, adequação a espécies não voláteis ou termicamente frágeis, ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para indústria e ciência (SKOOG *et al.*, 2002; SCOTT, 2003; SILVA, 2012).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consiste em um processo de separação, onde os componentes da amostra são distribuídos entre duas fases imiscíveis, uma móvel e outra estacionária. A fase estacionária pode ser sólida, porosa ou em pequenas partículas. A fase móvel é composta por solventes que podem possuir diferentes polaridades, ou seja, a separação baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre pela diferente interação entre duas fases imiscíveis. A CLAE possui alguns pontos críticos em sua técnica como: composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura da separação (CASS e DEGANI, 2001; MEYER, 2010).

O termo validação refere-se à capacidade de medir o “real” ou capacidade que o instrumento tem de evitar o erro. O processo deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade do resultado, ou seja, assegura sua credibilidade durante o uso rotineiro (BRASIL, 2003; ARAUJO, 2009; USP, 2016).

A validação do método é um aspecto fundamental para a garantia da qualidade analítica. Os métodos de ensaios usados para avaliar a conformidade dos produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (DE ALENCAR *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

Em busca de trabalhos na literatura científica que relatassem a quantificação de CEF, foram encontrados estudos como: Ali e colaboradores

(2015) desenvolveram e validaram um método analítico para estimar a Ceftarolina na forma a granel utilizando CLAE, no estudo os autores utilizaram fase móvel composta de acetonitrila:tampão fosfato de amônio pH 9,0 empregando comprimento de onda para detecção UV em 214 nm. Suneetha e Venkanna (2013) utilizaram como fase móvel tampão, acetonitrila e metanol na proporção 40:30:30 com detecção em 242 nm, no estudo feito para desenvolvimento e validação de indicadores de estabilidade para CEF.

Baseado na escassez de estudos sobre a Ceftarolina em sua forma farmacêutica, desenvolveu-se e validou-se um método analítico capaz de quantificar a Ceftarolina em pó para solução injetável. Optou-se por desenvolver uma metodologia analítica que não utilizasse tampão na composição da fase móvel tendo em vista que este pode reduzir a vida útil da coluna cromatográfica e danificar as tubulações do equipamento.

Durante o desenvolvimento do método por CLAE para a quantificação da CEF foram testadas diferentes combinações e proporções de solvente orgânico (metanol; trietilamina, acetonitrila), água em diferentes pH's (4,0; 4,5; 5,0; 9,0), vazão (0,8; 1,2 mL/min) e diversas temperaturas (25, 30, 35, 40 °C).

Para realização das análises, utilizou-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU, modelo 20A, equipamento com bomba de fluxo LC20AT, injetor automático SIL-20A/C, desgaseificador DGU-20A5, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno CTO-20A/C e controlador CBM-20A.

A melhor condição cromatográfica empregada para realização da análise quantitativa por CLAE está descrita na Tabela 2. Esta condição foi definida através da avaliação dos parâmetros da conformidade do sistema cromatográfico (fator capacidade, fator cauda, pratos teóricos e resolução).

**Tabela 2:** Parâmetros otimizados para utilização na validação do método por CLAE para determinação de CEF.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	Agilent® C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro das partículas)
Fase móvel	Água com trietilamina 1% pH 5,0:acetonitrila (87:13 v/v)
Volume de injeção	20 µL
Vazão	1,0 mL/min
Detecção	242 nm
Temperatura do forno	30 °C

Os seguintes parâmetros de desempenho analítico foram avaliados, a fim de garantir os resultados obtidos pelo método por CLAE-UV, para quantificação da CEF: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

#### 4.1.1 VALIDAÇÃO

- **Especificidade**: A especificidade foi verificada através da avaliação de prováveis produtos de degradação que poderiam interferir na determinação. Segundo ICH, (2005) a especificidade é a habilidade do método analítico em medir a resposta do analito na presença de suas possíveis impurezas. As soluções amostra de CEF a serem degradadas foram preparadas a partir de uma solução estoque na concentração de 500 µg/mL, utilizando água mili-Q como diluente e, submetidas à degradação. A pureza do pico foi verificada, a qual é indicativo de que o sinal cromatográfico é atribuído a um só componente. Todas as condições foram realizadas em duplicata, seguindo os parâmetros a seguir:

- **Degradação térmica 40 e 60°C**: 1 mL da solução estoque de CEF foi adicionado em cubetas descartáveis e fechadas com parafilme, mantidas em estufa (Biomatic) por 120 minutos. Após foi retirada uma alíquota de 800 µL para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com água mili-Q, obtendo assim uma concentração de 40 µg/mL.

- **Degradação ácida**: uma alíquota de 800 µL da solução estoque de CEF foi colocada em balão volumétrico de 10 mL e, neste mesmo balão adicionou-se 800 µL de HCl 1 M por 3 horas, após o tempo especificado foi adicionado 800 µL de NaOH 1,0 M para neutralizar a degradação, após foi completado o volume do balão volumétrico com água mili-Q, obtendo uma concentração final de 40 µg/mL.

- **Degradação básica**: foi adicionado 800 µL da solução estoque de CEF, juntamente com 800 µL de NaOH 0,1M, em balão volumétrico de 10 mL por 60 minutos, para neutralizar a degradação foi adicionado 800 µL de HCl 0,1 M, completado o volume do balão volumétrico com água mili-Q, obtendo uma concentração final de 40 µg/mL. Esta condição foi avaliada também em NaOH 0,01M.

- **Degradação oxidativa**: foi adicionado 800 µL da solução estoque de CEF em balão volumétrico de 10 mL e 800 µL de peróxido de hidrogênio 3 % por 60 minutos. Após, foi adicionada água mili-Q para completar o volume do balão volumétrico, obtendo uma concentração final de 40 µg/mL.

- **Degradação UVC**: em cubeta de descartáveis foi adicionado 1 mL da solução estoque e vedada com parafilme, após foi exposta à luz UVC germicida (Daylight F30T8 UV-C 254 nm com potência de 30 watts) em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm), por 90 minutos, após o tempo determinado foi retirada uma alíquota de 800 µL e transferida para balão volumétrico de 10 mL completado com água mili-Q, obtendo uma concentração final de 40 µg/mL.

- **Degradação UVA**: 1 mL da solução estoque foi transferida para uma cubeta de descartáveis e vedada com parafilme, após esta foi exposta à luz UVA lâmpada UVA (Light Express<sup>®</sup>, 352 nm, 30 watts), em câmara espelhada (100x16x16 cm) por 3 horas. Após este período foi retirada uma alíquota de 800 µL com auxílio de um pipetador automático, foi transferida para balão volumétrico 10 mL e completou-se volume com água mili-Q para obtenção da concentração final de 40 µg/mL, após foram filtradas e em seguida procedeu-se a análise cromatográfica.

- **Linearidade**: A linearidade foi obtida através da construção de três curvas padrão, em três dias consecutivos, cada uma com 7 níveis de concentração, utilizando SQR na faixa de concentração de 5,0 a 60,0 µg/mL. Pesou-se o equivalente a 2 mg de SQR e transferiu-se para um balão de 25 mL, em seguida 10 mL de água mili-Q foram adicionados e levada a banho

ultrassônico, por 10 minutos, após foi completado o volume obtendo uma concentração de 80 µg/mL com o mesmo diluente. Retirou-se alíquotas para obter as concentrações finais de 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 e 60,0 µg/mL, todas as concentrações foram preparadas em triplicata. Todas as amostras passaram pelo processo de filtração e em seguida procedeu-se análise cromatográfica, realizando 3 injeções de cada no cromatógrafo à líquido. A curva padrão foi obtida pela construção do gráfico de concentração (µg/mL) versus área (mAU). Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear que foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância (ANOVA) para conformidade do modelo linear.

- **Precisão:** A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). Para o preparo das soluções amostra foi pesado o equivalente a 5 mg de CEF de 6 frascos diferentes e adicionado em um balão de 25 mL com 15 mL de água mili-Q, este foi levado ao banho ultrassônico, por 10 minutos, após completou-se o volume com o mesmo diluente obtendo solução com concentração de 100 µg/mL. Desta foi retirado uma alíquota de 2 mL com ajuda de micropipeta automática para balão volumétrico de 5 mL e completado o volume com a solução diluente obtendo seis concentrações finais de 40 µg/mL. A repetibilidade foi obtida por análise de 6 amostras de 40 µg/mL analisadas no mesmo dia e avaliada a área absoluta. Para a precisão intermediária, soluções amostras de 40 µg/mL foram analisadas em três dias diferentes e analisados os resultados. Foi determinado o desvio padrão relativo (DPR), sendo que este não deve ultrapassar 5% para que o método seja considerado preciso, segundo Brasil, (2003).

- **Exatidão:** A exatidão do método foi obtida através do teste de recuperação, onde quantidades conhecidas de SQR foram adicionadas à amostra. Para o preparo das amostras partiu-se de uma concentração de 100 µg/mL tanto solução SQR quanto solução sem adição de SQR (A), foram feitas em triplicata, obtendo concentrações finais de 15,0, 20,0, 25,0 µg/mL (R1, R2, R3, respectivamente), conforme a Tabela 3.

**Tabela 3:** Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.

	<b>Volume da amostra (mL)*</b>	<b>Volume adicionado da SQR (mL)*</b>	<b>Concentração final (µg/mL)</b>
A	0,5	-	5,0
R1	0,5	1,0	15,0
R2	0,5	1,5	20,0
R3	0,5	2,0	25,0

\*Alíquotas transferidas a balões volumétricos de 10mL.  
Para cada solução foram feitas 3 determinações.

A percentagem de recuperação foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% R = \frac{(C_F - C_A) \times 100}{C_R}$$

Onde:

$C_F$ : concentração da solução (R1, R2, R3);

$C_A$ : concentração da amostra;

$C_R$ : concentração teórica da SQR adicionada.

- **Robustez:** A robustez foi avaliada pelo método (Plackett-Burman), onde foram feitas modificações nas condições cromatográficas conhecidas, tais como: percentagem de orgânico, temperatura e vazão, conforme descrito na Tabela 4.

**Tabela 4:** Fatores avaliados para robustez pelo método Plackett-Burman.

<b>Fator</b>	<b>Nominal</b>	<b>Nível (+1)</b>	<b>Nível (-1)</b>
% de orgânico	13	14	12
Temperatura(°C)	30	31	29
Vazão (mL/min)	1,0	1,1	0,9

#### 4.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após serem realizados os testes preliminares para o desenvolvimento da metodologia analítica para CEF, algumas alterações na condição cromatográfica foram realizadas. Para determinar o melhor método realizou-se

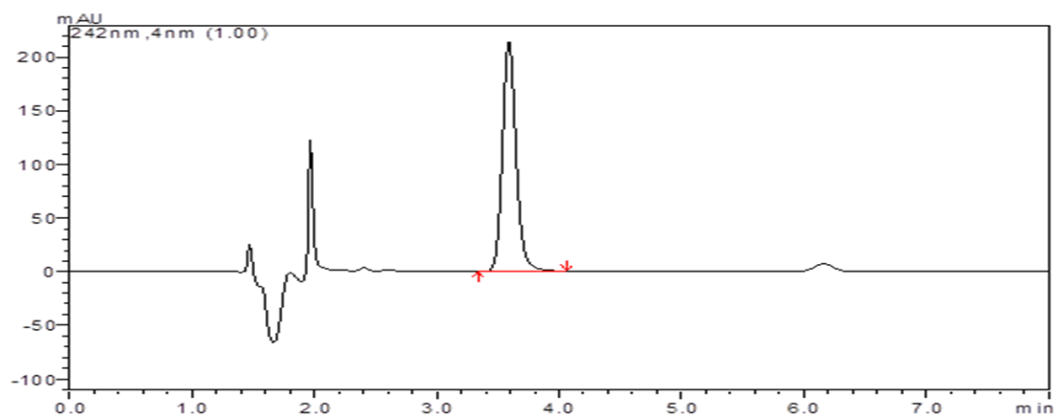


a conformidade do sistema que avaliou o número de pratos teóricos, fator capacidade, tempo de retenção e fator cauda, como demonstrado na Tabela 5.

**Tabela 5:** Parâmetros de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e recomendados (SHABIR, 2003; RIBANI, 2004).

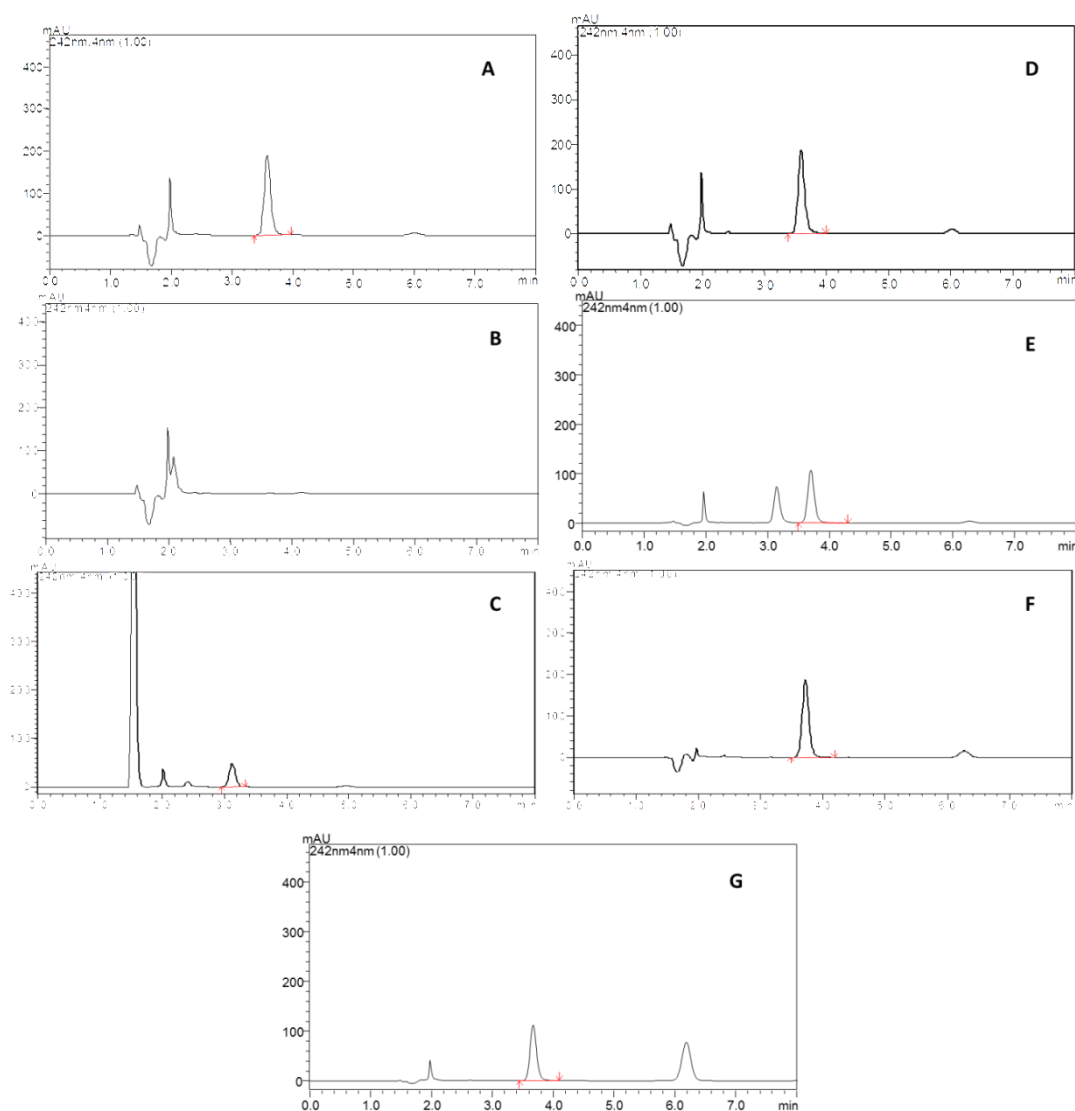
Parâmetro	Recomendação	Valor experimental
Pratos teóricos	Em geral deve ser maior que 2000 para CLAE.	4.498,57
Fator capacidade	O pico deve estar separado de outros picos e do pico não retido $k > 2$ .	2,45
Fator cauda	Recomendável $< 2$ , picos muito assimétricos afetam a quantificação.	1,21

A Figura 3 ilustra o cromatograma obtido por CLAE, nas condições escolhidas para a validação.



**Figura 3:** Cromatograma representativo das condições validadas para o método cromatográfico para quantificação da CEF.

Para verificar a especificidade do método foram analisados os cromatogramas das amostras submetidas à degradação forçada (Figura 4).



**Figura 4:** Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções amostra submetida à degradação forçada onde: (A) meio ácido 180 minutos; (B) meio básico 5 minutos; (C) oxidativa 45 minutos; (D) UVA 180 minutos; (E) UVC 90 minutos; (F) térmica 40 °C 180 minutos; (G) térmica 60 °C 120 minutos.

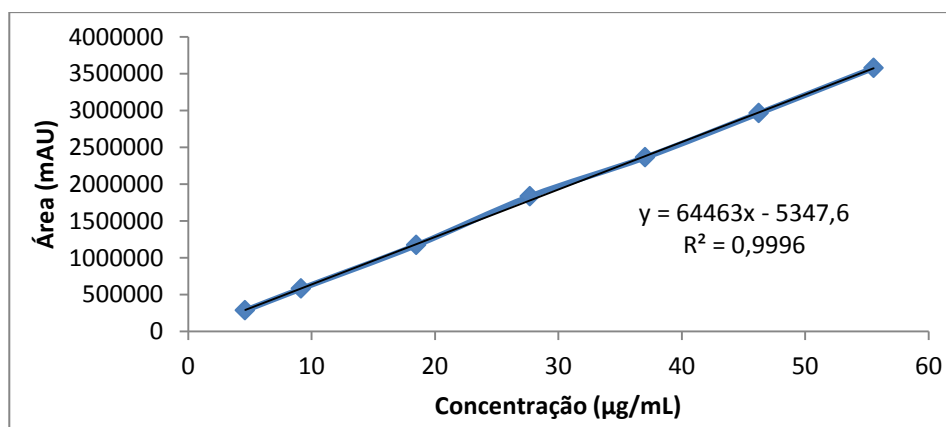
Pode-se observar através das análises dos cromatogramas e da pureza do pico da CEF que não houve interferência de possíveis produtos de degradação nas condições testadas.

Avaliando os parâmetros de degradação observa-se que não houve decaimento na concentração de CEF em 180 min de hidrólise ácida 0,1M e de

UVA em 180 min. Na degradação térmica a 40°C observou-se em 180 min degradação de apenas 15%, na térmica 60°C em 120 min ocorreu degradação de 55%, sendo que esta é uma degradação elevada tendo em vista alteração de 20°C. Na degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio em 45 min degradou 91%, ocorrendo a degradação mais expressiva entre as analisadas. A degradação básica analisada em NaOH 0,1M e 0,01M após 5 min não foi detectado sinal do fármaco na corrida cromatográfica, na condição de degradação UVC em 90 minutos mostrou degradação de 56%. Em todas as condições analisadas o sinal do fármaco apresentou-se puro comprovando a ausência de interferência de possível produto de degradação. Assim sendo estes resultados comprovam a especificidade do método.

A linearidade do método foi verificada por meio da construção da curva padrão, através da concentração versus área do pico.

O método apresentou-se satisfatório na faixa de concentração de 5,0 – 60,0 µg/mL nos três dias analisados. A representação gráfica da curva encontra-se na Figura 5, onde a equação média foi  $y = 64463x + 5347,6$  e o coeficiente de correlação foi de 0,9996, este demonstrou concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas obtidas pela CLAE.



**Figura 5:** Representação gráfica da curva padrão da CEF na faixa de 5,0 – 60 µg/mL quantificados por CLAE.

A avaliação da linearidade do método pela análise da variância (ANOVA) está demonstrada na Tabela 6.

**Tabela 6:** Análise da variância (ANOVA) para ajuste do modelo linear da curva padrão por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	6	2,88 x10 <sup>13</sup>	4,80 x10 <sup>12</sup>	1773,07	
Regressão linear	1	2,88 x 10 <sup>13</sup>	2,88 x10 <sup>13</sup>	10634,00 <sup>1</sup>	8,86
Desvio linearidade	5	3,65 x10 <sup>10</sup>	2,40 x10 <sup>9</sup>	2,70 <sup>2</sup>	4,69
Dentro	14	3,80 x10 <sup>10</sup>	2,71 x10 <sup>9</sup>		
Total	20	2,88 x10 <sup>13</sup>			

<sup>1</sup>Significativo para p < 5%.<sup>2</sup>Significativo para p > 5%.

Os resultados da ANOVA demonstraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade, confirmando assim a linearidade do método.

A precisão por CLAE foi avaliada através da repetibilidade (intradia) e da precisão intermediária (interdia), analisando 6 amostras por dia em três dias diferentes, expressando o valor em Desvio Padrão Relativo (DPR). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Valores experimentais obtidos através da repetibilidade e da precisão intermediária na determinação da CEF por CLAE.

	Precisão intradia (n=6)			
	Teor (%) <sup>A</sup>		Média ± DP	DPR(%) <sup>B</sup>
Dia 1	109,62	108,99	109,91 ± 0,76	0,70
	109,43	110,92		
	109,77	110,78		
Dia 2	110,14	110,77	110,09 ± 0,60	0,54
	110,36	110,10		
	110,20	108,98		
Dia 3	109,95	110,11	109,98 ± 0,62	0,56
	109,91	110,33		
	110,70	108,86		
<b>Precisão interdia (n=18)</b>				
<b>Média (%)</b>	110,0			
<b>DPR<sup>B</sup></b>	0,57			

<sup>A</sup> Cada valor representa a média de três determinações.<sup>B</sup> DPR (%) = Desvio padrão relativo percentual.

Observando os valores apresentados na Tabela 7, obteve-se valores de desvio padrão relativo na faixa de 0,54 – 0,70%, sendo considerados adequados para método analítico (< 5 %) (BRASIL, 2013). Estes valores caracterizam a adequada repetibilidade do método. No que se refere à precisão

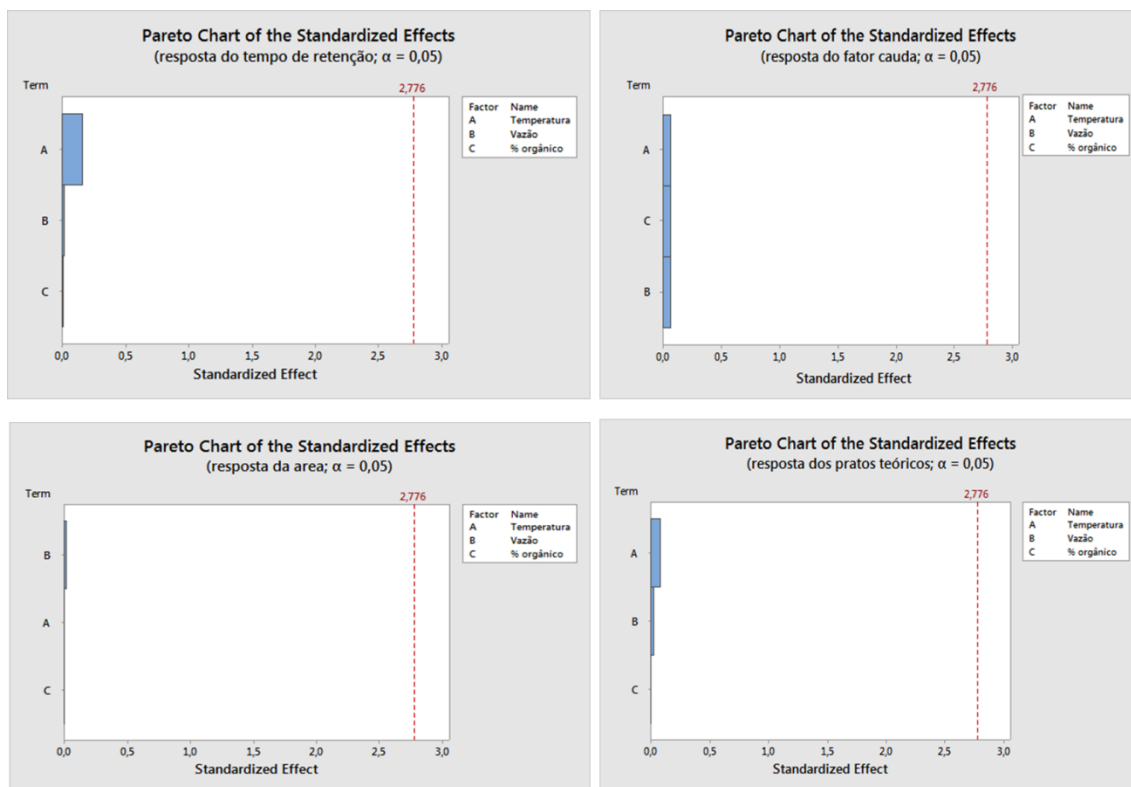
intermediária, o valor de DPR foi de 0,93, mostrando a elevada precisão do método.

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida, cujos resultados apresentam média de 100,68 %, como demonstrado na Tabela 8.

**Tabela 8:** Resultado da determinação do teste de recuperação de CEF por CLAE.

<b>Quantidade de Ceftarolina SQR adicionada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Quantidade de Ceftarolina recuperada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Percentual de recuperação <math>\pm</math> DPR</b>
10,0	10,46	100,8 $\pm$ 1,50
15,0	15,44	100,35 $\pm$ 1,04
20,0	20,54	100,9 $\pm$ 1,27

A robustez do método analítico, determinada, utilizando o desenho experimental de Plackett-Burman, permitiu a avaliação do efeito de diversos fatores na análise cromatográfica. No experimento realizado, os efeitos de cada parâmetro estudado (percentual de orgânico, vazão e temperatura), não foram significativos, pois os efeitos calculados foram menores do que o valor crítico de t ( $\alpha = 5\%$ ), demonstrando a robustez do método. O software Minitab foi usado para desenvolver os efeitos e gerar os gráficos de Pareto, onde foram avaliados tempo de retenção, fator cauda, área e pratos teóricos, mostrados na Figura 6.



**Figura 6:** Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis para avaliação da robustez do método analítico, usando desenho experimental Plackett-Burman.

## 4.2 ENSAIO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR-CILINDROS EM PLACA.

Medicamento que não podem ser caracterizados pelas propriedades físico-químicas ou ainda em situações na qual a dose ineficaz e a dose tóxica são muito próximas é utilizado o doseamento microbiológico para analisar sua eficácia terapêutica. O ensaio microbiológico de difusão em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é utilizado como revelador. O método emprega um meio de cultura sólido inoculado com o microrganismo em um sistema de bicamada, através da qual a substância teste se difunde. É indispensável que se trabalhe com um número significativo de placas de forma a reduzir o erro inerente ao ensaio (PINTO *et al.*, 2010). O mesmo é uma exigência de controle de qualidade de diversas farmacopeias (FARMACPÉIA BRASILEIRA, 2010; JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2011; USP, 2016).

No ensaio microbiológico, a atividade do antibiótico é definida pela dose que inibe o crescimento de um microrganismo sensível a este antibiótico. O ensaio é realizado comparando a inibição do crescimento do microrganismo por concentrações conhecidas de um padrão de referência com a inibição por diluições da substância testada (DART, 1996; WHO, 2013).

Foi um marco importante para o controle microbiológico a harmonização entre Farmacopeias Americana, Japonesa e todos países que participaram do International Council on Harmonization (ICH), bem como o grupo de discussão da padronização dos métodos. Assim passou-se a ter métodos padronizados, modernizando os métodos microbiológicos clássicos (REBELLO, 2015).

Deste modo, o ensaio microbiológico sendo realizado em condições padronizadas e controladas fornece adequada determinação da potência, além de apresentar a possibilidade da verificação da perda de atividade do antibiótico (ABDELAZIZ *et al.*, 2012; DAFALE *et al.*, 2012; CAZEDEY e SALGADO, 2013).

#### **4.2.1 Materias e métodos**

Para a quantificação da ceftarolina (CEF) foram desenvolvidos vários ensaios preliminares, mudando alguns parâmetros como concentração da substância de referência e da amostra (2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 µg/mL), temperatura de incubação ( $30 \pm 2$  e  $35 \pm 2$  °C), solução diluente (água destilada esterilizada e água mili-Q) e concentração de inóculo (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 %) no meio, a fim de determinar qual seria a condição experimental ideal.

A partir destes resultados foi possível estabelecer os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico que estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Parâmetros usados na determinação de Ceftarolina Fosamila em ensaio microbiológico.

<b>Parâmetros</b>	<b>Descrição</b>
Microrganismo	<i>Kochuria rhizophila</i> ATCC 9341
Meio de cultura (camada base e inóculo)	Meio n°11 de Grove -Randall
Meio de cultura (manutenção)	Meio n° 1 de Grove-Randall
Solução diluente	Água estéril
Concentração da solução padrão	2,0; 4,0; 8,0 µg/mL
Concentração do inóculo	1%
Tempo de incubação	18 – 24 horas
Temperatura de incubação	35 ± 2 °C

- **Meios de cultura**: foram utilizados meios de cultura Grove-Randall n° 1 para manutenção e repique do microrganismo, e n°11 como constituinte para camada base e inóculo com microrganismo teste. Todos os meios utilizados foram pesados conforme a especificação no rótulo do fabricante (Merck), dissolvidos em água mili-Q e esterilizados em autoclave (Webeco C) a 121 °C, durante 15 minutos.

- **Inóculo**: o microrganismo foi repicado com alça de platina para meio inclinado n°1 de Grove-Randall e mantido por 24 horas antecedentes à realização do experimento em estufa microbiológica (Biomatic) em temperatura entre 35-37°C para seu crescimento. Após o crescimento bacteriano, o inóculo foi padronizado em espectrofotômetro Analyser modelo 800M em comprimento de onda de 580 nm, obtendo transmitância de 25% ± 2%. Uma alíquota foi retirada deste inóculo para obter uma concentração de 1% e transferida para meio n° 11 de Grove-Randall e mantida em banho-maria (Biopar BMD01ESP) a 47 ± 2 °C. O meio de cultura foi preparado e utilizado imediatamente.

- **Preparo da substância química de referência**: a substância química de referência (SQR), foi adquirida (25 mg) da empresa A ChemTek (USA), com o nome de TAK 599, como pureza declarada de 98%. Foi recebida em um eppendorf lacrado, com pó de coloração amarelo claro. Pesou-se o equivalente



a 1mg da SQR de Ceftarolina Fosamila Acetato, foi transferido para balão volumétrico de 25 mL com 10 mL de água mili-Q (solução diluente), e levado a banho ultrassônico durante 10 minutos para completa solubilização. Após, completou-se o volume com solução diluente e com auxílio de micropipeta automática (Transferpette, Brand) foram transferidas alíquotas para balões de 20 mL obtendo-se as concentrações finais de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL de SQR, (P1, P2 e P3, respectivamente).

- **Preparo das amostras**: as amostras de CEF foram adquiridas através da empresa Victória Comércio de Produtos Hospitalares (Porto Alegre - RS), na embalagem comercializada do medicamento Zinfo<sup>®</sup>, a qual continha 10 frascos devidamente lacrados com 600 mg de CEF. Pesou-se o equivalente a 10 mg de amostra, esta foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 50 mL de solução diluente e foi levado a banho ultrassônico durante 10 minutos. Após foi completado o volume com solução diluente e retiradas alíquotas para balões de 10 mL, obtendo concentração final de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL de CEF,( A1, A2 e A3, respectivamente).

- **Procedimento**: Foram utilizadas 6 placas de Petri previamente esterilizadas (20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro) para cada ensaio, adicionados 20 mL de meio n° 11 para camada base. Após a solidificação, em cada placa foram adicionados 5 mL de meio n° 11 com inóculo a 1%. Após a solidificação da camada semeada, foram distribuídos 6 cilindros de aço inoxidável (6,0 mm de diâmetro interno x 8,0 mm de diâmetro externo x 10mm de altura) mantendo uma distância equivalente entre eles. Após, com auxílio de uma micropipeta automática, foram adicionados, de modo aleatório, 200 µL das soluções amostra e SQR nos cilindros. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica (Biomatic) à temperatura 35-37°C durante 18-24 horas. Após o respectivo tempo, os diâmetros dos halos foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo<sup>®</sup>, Toquio, Japão).

#### 4.2.2 VALIDAÇÃO

- **Especificidade**: foi verificada se a quantificação de CEF sofreria interferência de prováveis produtos de degradação formados pela luz UVC e pela degradação térmica a 60°C. As soluções amostras de CEF foram preparadas na concentração de 40 µg/mL, como no item 4.1 – preparo das amostras. Foram submetidas à luz UVC por 90 minutos, sendo realizadas coletas nos tempos: 5, 20, 30, 45, 80 e 90 minutos e para a condição térmica por 120 minutos, sendo coletados nos tempos: 5, 20, 45, 60, 90 e 120 minutos. Após foram transferidas alíquotas para obter a concentração de 2,0; 4,0; 8,0; µg/mL. O diâmetro do halo foi comparado com a SQR nas mesmas concentrações.

- **Linearidade**: foram utilizados três pontos (2, 4 e 8 µg/mL), como preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010) para o delineamento 3x3. A curva analítica final foi construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, cada uma composta por seis placas com a solução SQR P1, P2 e P3. Os dados obtidos foram avaliados pelos parâmetros de inclinação, desvio de paralelismo e coeficiente de correlação. A validade dos dados foi feita através da análise de variância (ANOVA) e a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados.

- **Precisão**: os ensaios foram realizados com amostras de CEF, A1, A2 e A3, durante 3 dias diferentes, utilizando seis placas em cada ensaio, por dia. A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas por meio do desvio padrão relativo (DPR) dos valores de atividade percentual da CEF.

- **Exatidão**: foi realizada através do teste de recuperação, onde adicionou-se soluções de SQR em uma solução amostra de CEF a fim de obter valores acima de 10% da concentração teste. A exatidão foi expressa como percentagem de recuperação da substância de referência. Neste ensaio foram preparadas em triplicata, soluções amostras (40 µg/mL) adicionadas com 1 mL de SQR (40 µg/mL), a fim de obter uma solução com concentração final de 44 µg/mL. Desta solução foram transferidas alíquotas de 500 µL, 1,0 e 2,0 mL, para R1, R2 e R3, respectivamente, completando-se o volume com solução

diluyente. As concentrações finais obtidas foram 2,2; 4,4; 8,8 µg/mL para R1, R2 e R3.

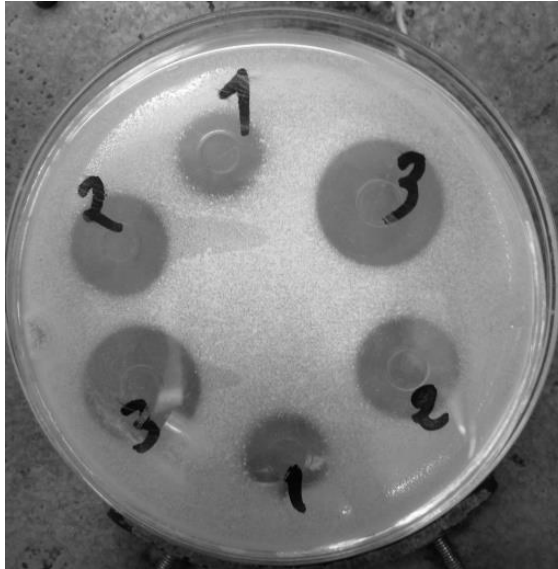
- **Robustez:** foi avaliada através da variação da concentração do meio inoculado no doseamento. Foi feita a análise da potência de CEF utilizando o meio inoculado nas concentrações de 0,8 e 1,2% e estas foram comparadas à condição normal (1%), avaliando-se a interferência das modificações no resultado final.

#### 4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes preliminares foram realizados para desenvolvimento do método. Os parâmetros avaliados foram: concentração da substância de referência e da amostra (2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 µg/mL), temperatura de incubação ( $30 \pm 2$  e  $35 \pm 2$  °C), solução diluyente (água destilada esterilizada e água mili-Q) e concentração de inóculo (1,0; 2,0; 3,0; 4,0%) do meio a fim de determinar qual seria a condição experimental ideal.

Os parâmetros definidos foram: inóculo a 1% e concentrações de CEF de 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL e a temperatura de incubação definida foi  $35 \pm 2$ °C.

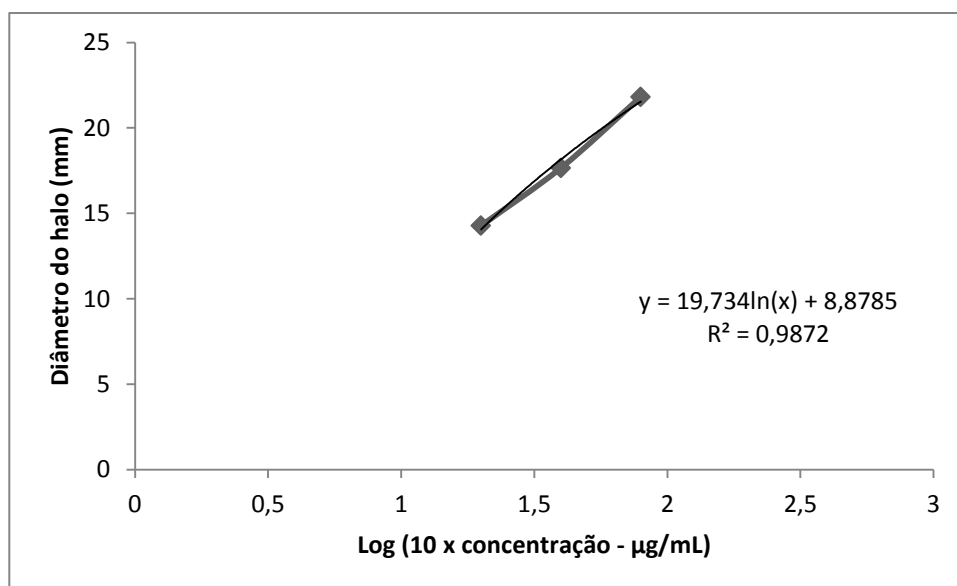
Este método foi escolhido por apresentar melhor nitidez dos halos e facilitar a leitura dos mesmos pelo paquímetro, como se pode observar na Figura 7. O tamanho dos halos de inibição não foram afetados pela composição do meio e a concentração do inóculo empregada foi suficiente para apresentar crescimento homogêneo do microrganismo, proporcionando um contraste com a zona de inibição de crescimento, sem apresentar colônias isoladas.



**Figura 7:** Placa de petri com os halos de inibição de crescimento do microrganismo *Kocuria rhizophila*, pelo método de difusão em ágar cilindros em placa para determinação de CEF.

A solução amostra foi submetida à degradação fotolítica por radiação UVC e por degradação térmica a 60 °C. Os resultados mostraram uma degradação de aproximadamente 46,26% quando exposta à radiação UVC por 90 minutos, sendo este resultado semelhante ao encontrado pelo método por CLAE quando a mesma amostra foi analisada (44,52%). Os resultados obtidos pela degradação térmica a 60 °C foi de aproximadamente 55,04%, em 120 minutos, semelhante aqueles encontrados pelo método por CLAE (55,6%). Pode-se observar que o provável produto de degradação não interferiu na determinação da CEF pelo método microbiológico.

A linearidade foi obtida através da equação da reta, pela média dos valores dos halos de inibição, calculada pelo método dos mínimos quadrados, sendo:  $y = 19,734x + 8,8785$ , com o coeficiente de determinação obtido ( $R^2$ ) 0,9872, como demonstra a Figura 8.



**Figura 8:** Curva analítica da solução SQR obtida através do método microbiológico de difusão em ágar cilindros em placa.

Os diâmetros de halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos nos três níveis de concentração de CEF analisados, podem ser observados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Diâmetro dos halos de inibição utilizados na construção da curva padrão obtidos pelo ensaio microbiológico.

Concentração (µg/mL)	Diâmetros dos halos (mm) <sup>A</sup>	Diâmetro médio (mm)	DPR <sup>B</sup> (%)
2,0	14,768	14,3	3,07
	14,151		
	13,919		
4,0	17,988	17,7	1,62
	17,463		
	17,530		
8,0	22,225	21,8	1,63
	21,583		
	21,636		

<sup>A</sup>Cada valor corresponde à média de seis determinações.

<sup>B</sup>DPR(%)= Desvio Padrão Relativo percentual.

A análise da variância (ANOVA) utilizada na elaboração da curva padrão está demonstrada na Tabela 11.

**Tabela 11:** Análise da variância dos halos de inibição determinados na obtenção da curva padrão, utilizando o método de difusão em ágar.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	2	85,471	42,735	319,572	
Regressão linear	1	545,090	545,090	4076,139 <sup>1</sup>	5,99
Desvio linearidade	1	630,561	630,561	0,00021 <sup>2</sup>	5,99
Dentro	6	0,802	0,134		
Total	8	86,273			

<sup>1</sup>Significativo para  $p < 5\%$ .

<sup>2</sup>Significativo para  $p > 5\%$ .

A linearidade do ensaio microbiológico foi demonstrada pelos valores obtidos na curva, apresentou regressão linear significativa (F calculado > F Tabelado) e desvio de linearidade não significativo (F calculado < F Tabelado) para  $p=5\%$ .

Segundo a RE 899 (Brasil, 2003), o valor recomendado de coeficiente de correlação é de 0,98 para métodos bioanalíticos e foi demonstrado valor adequado ao recomendado através da correlação linear entre o diâmetro médio do halo de inibição *versus* o log da concentração.

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), nas quais os valores são expressos como desvio padrão relativo (DPR), realizada no mesmo dia e em dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista.

A análise da repetibilidade foi comprovada pelos baixos valores de desvio padrão relativo obtidos (1,22 a 1,36) quando analisados no mesmo dia. A precisão intermediária foi determinada pela análise das amostras em três dias diferentes e obteve-se valor experimental médio de teor em relação ao valor rotulado 109,42 %, com DPR de 1,13. Os resultados obtidos na avaliação da precisão estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Resultados obtidos através do ensaio microbiológico para determinação de CEF.

<b>Precisão intradia</b>					
Dia	Ensaio	Teor (%) <sup>A</sup>	Teor médio (%)	DPR (%) <sup>B</sup>	
1	1	108,42	109,75	1,23	
	2	109,72			
	3	111,12			
2	1	110,32	109,10	1,22	
	2	107,68			
	3	109,30			
3	1	111,04	109,40	1,36	
	2	109,03			
	3	108,14			
<b>Precisão interdia</b>				Média (%)	109,42
				DPR	1,13

<sup>A</sup> Cada valor corresponde a média de 6 placas.

<sup>B</sup> DPR (%)= Desvio Padrão Relativo percentual.

A exatidão do método por doseamento microbiológico foi avaliada através do teste de recuperação, cujos resultados apresentam adequada exatidão (100,2 a 104,66%).

**Tabela 13:** Resultados obtidos no teste de recuperação de CEF pelo ensaio microbiológico.

Quantidade de CEF SQR adicionada (µg)	Quantidade de CEF recuperada (µg)	Percentual de recuperação (%)
3,60	3,61	100,20
3,60	3,68	102,10
3,60	3,77	104,66

Os valores encontrados referentes ao parâmetro de robustez, com a alteração na concentração do inóculo (0,8 e 1,2%), foram 112,12% e 110,32%, respectivamente, próximo ao encontrado pela precisão (109,42%), comprovando a robustez do método proposto.

Os parâmetros analisados no ensaio microbiológico foram satisfatórios para identificação e quantificação do fármaco em estudo, demonstrando que o ensaio microbiológico é uma ferramenta extremamente útil, substituta para alguns métodos físico-químicos no controle de qualidade, fornecendo a

potência do antimicrobiano, podendo ser alternativa na rotina do controle de qualidade. Os parâmetros avaliados pelo método de difusão em ágar atenderam ao preconizado para validação do método apresentado pela Farmacopeia Brasileira (2010) e guias internacionais, comprovando a aplicabilidade do mesmo para quantificação de CEF em sua forma farmacêutica pó para solução injetável.

### 4.3 ANÁLISES COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

Face ao objetivo do estudo de desenvolver e validar uma metodologia analítica foi realizado um comparativo entre os métodos previamente validados. Para isto foi realizada uma análise estatística utilizando como ferramenta o teste “t” de Student.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos na determinação quantitativa da amostra comercial de CEF, através dos métodos analíticos validados.

**Tabela 13:** Valores experimentais obtidos para quantificação da CEF na amostra pó para solução injetável, através dos métodos propostos validados.

	<b>Método</b>	
	<b>Microbiológico (mg/g)<sup>a</sup></b>	<b>CLAE (mg/g)<sup>b</sup></b>
	710,38	718,26
	718,10	716,98
	728,12	719,20
	722,87	714,08
	705,52	726,72
	716,18	725,80
	727,57	721,64
	714,43	723,05
	708,54	722,01
<b>Média</b>	716,85	720,86
<b>DPR</b>	1,13	0,57

<sup>a</sup> Cada valor corresponde a um ensaio com 6 placas.

<sup>b</sup> Cada valor corresponde a média de 3 determinações.

O tratamento estatístico utilizado tem a finalidade de detectar possíveis diferenças entre os valores experimentais encontrados. Os resultados desta análise não indicam diferença significativa ( $p > 5\%$ ). Este resultado comprova



que os métodos desenvolvidos são intercambiáveis, sendo adequados para determinação quantitativa da CEF na forma farmacêutica comercializada.



---

## **5. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

---



## 5.1 INTRODUÇÃO

A estabilidade é definida como o tempo pelo qual a fórmula farmacêutica ou a matéria-prima isoladamente mantem-se dentro dos limites especificados e durante seu período de estocagem e uso, tendo que apresentar as mesmas condições que possuía na sua fabricação. Pode também ser definida como o tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado e aquele que sua potência não pode estar reduzida mais do que 10 %, desde que os produtos de alteração estejam seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (TABORIANSKI, 2003; VEHABOVIC *et al.*, 2003; STULZER e SILVA, 2007).

Os estudos de degradação forçada, além de avaliarem a estabilidade intrínseca da molécula, podem também auxiliar na identificação de produtos de degradação, e estabelecer as rotas de degradação, e validar metodologias analíticas indicativas de estabilidade (ICH, 2003).

A estabilidade depende de fatores ambientais como temperatura, luz, umidade entre outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas da substância ativa e excipientes farmacêuticos, na forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

As informações obtidas neste estudo podem caracterizar as substâncias, classificando-as em termolábeis, hidrolisáveis, fotoinstáveis e oxidáveis em vários níveis. É possível também encontrar substâncias estáveis em todas as condições de estresse (ALLEN; POPOVICH e ANSEL, 2007). Assim sendo com as informações obtidas será mais fácil garantir a segurança e a eficácia do fármaco, optando por excipientes, processo de fabricação e materiais de embalagem que sejam mais adequados para cada fármaco (PANDEY; RATH; DWIVEDI, 2014).

## 5.2 PARTE EXPERIMENTAL

- **Preparo das amostras**: pesou-se em balança analítica (AND modelo HN 202) o equivalente a 50 mg de amostra de CEF e transferiu-se para um balão de 100 mL. Adicionou-se 50 mL da solução diluente (água mili-Q) e esta

solução foi levada a banho ultrassônico, durante 10 minutos. O volume foi completado com solução diluente obtendo-se uma solução de concentração 500 µg/mL.

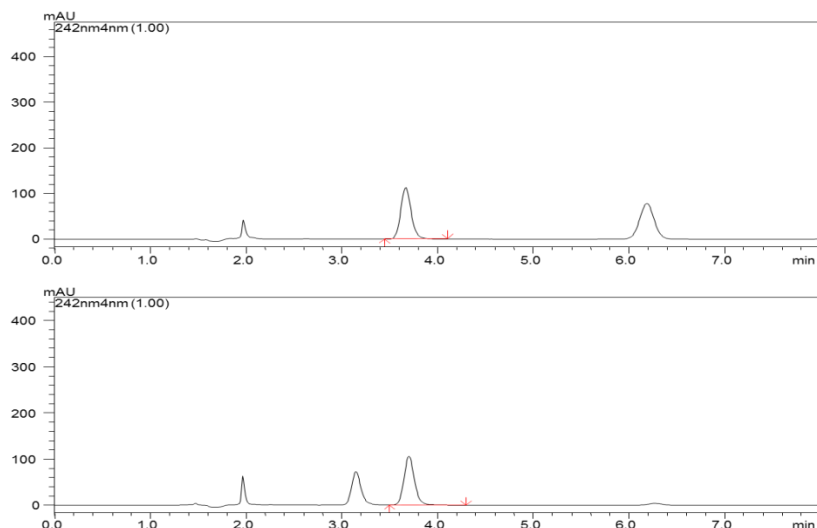
- **Condições do estudo**: este teste teve como objetivo avaliar o decaimento do teor de CEF em relação ao tempo de degradação e uma possível formação de produtos de degradação. O monitoramento foi feito por CLAE e pelo método microbiológico através da metodologia previamente validada.

- **Degradação térmica**: alíquotas de 1 mL da solução amostra na concentração de 500 µg/mL (solução estoque) foram adicionadas em 28 cubetas descartáveis vedadas com parafilme e levadas a estufa com temperatura monitorada a 60°C, por 120 minutos. Após cada tempo estabelecido para CLAE: 5, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos e para o ensaio microbiológico: 5, 20, 45, 60, 90, e 120 minutos, retirou-se, com auxílio de um pipetador automático, 800 µL da amostra da cubeta que foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com solução diluente obtendo uma concentração final de 40 µg/mL e feita determinação por CLAE. Para avaliar a degradação pelo método microbiológico a amostra foi diluída com água milli-Q para as concentrações de 2,0, 4,0, 8,0 µg/mL.

- **Degradação fotoquímica UVC**: alíquotas de 1 mL retiradas da solução estoque foram adicionadas em 28 cubetas descartáveis e vedadas com parafilme, após foram expostas à luz ultravioleta (lâmpada germicida Daylight F30T8 UV-C 254nm com potência de 30 watts) em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm) a uma distância de 10 cm. Após os tempos determinados para CLAE: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 80 e 90 minutos e para o ensaio microbiológico: 5, 20, 30, 45, 80 e 90 minutos foram retiradas alíquotas de 800 µL para balão volumétrico de 10 mL, estabelecendo uma concentração de 40 µg/mL e feita determinação por CLAE. Para o acompanhamento da degradação através do microbiológico a amostra foi diluída com água milli-Q nas concentrações de 2,0, 4,0, 8,0 µg/mL.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados obtidos por meio de ensaio microbiológico foram monitorados por CLAE, previamente validado. Os cromatogramas obtidos por CLAE para soluções amostra submetidas à degradação UVC e térmica 60 °C estão apresentados na Figura 9.



**Figura 9:** Cromatogramas representativos obtidos através da análise por CLAE das amostras de CEF: (A) 60 °C 120 minutos; (B) UVC 90 minutos.

Analisando o ensaio de degradação frente à luz UVC observa-se em 90 minutos uma rápida degradação, assim sendo foi um dos fatores de escolha para realizar o acompanhamento microbiológico. Foi possível observar que houve a formação de um pico adicional de um produto de degradação quando a CEF foi submetida à fotodegradação UVC.

Quando avaliados em 90 minutos pelo método cromatográfico a amostra submetida à degradação UVC teve decaimento para 44,52%, enquanto que no teste microbiológico observou-se resultado semelhante com teor degradado para 46,26%, como demonstrado na Tabela 14.

**Tabela 14:** Teores obtidos após a degradação frente à luz UVC avaliados por CLAE e método microbiológico.

CLAE		MICROBIOLÓGICO	
Tempo (Minutos)	Teor CEF (%)	Tempo (Minutos)	Teor CEF (%)
5	92,74	5	92,16
10	86,20	-	-
20	85,40	20	87,20
30	76,90	30	78,82
45	75,88	45	71,81
60	72,46	-	-
80	49,65	80	50,67
90	44,52	90	46,26

Quando a amostra foi submetida à temperatura de 60°C, após 120 minutos, o teor de CEF decaiu para 55,05% quando avaliado pelo CLAE, este mesmo valor foi observado pelo método microbiológico, 55,60%, como é demonstrado na Tabela 15.

**Tabela 15:** Teor de CEF após a degradação térmica 60°C avaliados por CLAE e método microbiológico.

CLAE		MICROBIOLÓGICO	
Tempo (Minutos)	Teor CEF (%)	Tempo (Minutos)	Teor CEF (%)
5	100,03	5	98,60
15	98,16	-	-
20	96,17	20	93,73
30	88,24	-	-
45	80,01	45	82,77
60	71,25	60	75,22
90	64,35	90	65,13
120	55,05	120	55,60



## 5.4 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

É importante que o fabricante preveja com precisão a estabilidade em prateleira de um novo produto a partir de resultados de estabilidade acelerada. As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Estas são dependentes de vários fatores como: concentração do reagente, temperatura, pH, radiação ou presença de catalizadores. Conseqüentemente, para que o estudo seja efetivo, é necessário aplicar princípios de cinética química. O tempo necessário para que 10% do fármaco se degrade é um parâmetro importante, pois representa o limite aceitável para a degradação da substância ativa (LACHMAN, 2001).

A ordem da reação pode ser definida como a variação da velocidade de reação com a concentração dos reagentes. Assim sendo a cinética de reações com decomposição de fármacos pode ser classificada da seguinte maneira: reação de ordem zero, reações de primeira ordem e segunda ordem (SALVIO NETO, 2010).

Reação de ordem zero: quando a velocidade da reação é independente da concentração da substância reativa, assim não depende deste reagente, ou seja, ocorre quando a perda ou decomposição do fármaco independe da concentração do reagente e é constante em relação ao tempo. Neste tipo de reação o fator limitante é outro que não a concentração, como a solubilidade ou absorção da luz (LACHMAN, 2001; SALVIO NETO, 2010).

Reação de primeira ordem: é caracterizada quando a velocidade de reação depende da concentração do reagente, ou seja, a degradação do fármaco é diretamente proporcional à concentração remanescente com relação ao tempo (LACHMAN, 2001; SALVIO NETO, 2010).

Reação de segunda ordem: é verificada quando a velocidade de reação for proporcional ao quadrado da concentração atual do produto, ou seja, se a velocidade da reação depende da concentração dos dois reagentes. Uma reação de pseudoprimeira ordem pode ser definida como reação de segunda ordem, ou reação biomolecular. É verificada quando um dos reagentes se encontra presente em grande excesso, ou é mantido a uma concentração constante, comparativa com o outro reagente. A velocidade da reação é determinada por um dos reagentes, mesmo que estejam presentes dois

reagentes, uma vez que a segunda substância não implica uma mudança significativa na concentração do produto durante a reação de degradação (LACHMAN, 2001; SALVIO NETO, 2010).

Os métodos cinéticos podem contribuir para a elucidação de alguns mecanismos de reação, facilitando na investigação de novos métodos de análise ou até para descoberta de novas tecnologias (MARIAN *et al.*, 2013).

O objetivo deste estudo foi determinar a ordem da cinética de degradação da CEF, por CLAE e método microbiológico de difusão em ágar-cilindros em placa, e, assim, calcular a constante de velocidade de reação e o tempo de vida útil do produto visando auxiliar no monitoramento do produto acabado.

- **Degradação térmica**: transferiu-se 1 mL da solução amostra de CEF na concentração de 500 µg/mL (solução estoque) para 28 cubetas de descartáveis vedadas com parafilme e levadas à estufa com temperatura monitorada a 60°C por até 120 minutos. Após cada tempo estabelecido (microbiológico e CLAE) 800 µL da cubeta foram transferidos com auxílio de um pipetador automático para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com solução diluente obtendo uma concentração final de 40 µg/mL e feita determinação por CLAE. Para avaliar a degradação pelo método microbiológico a amostra foi diluída para concentrações de 2,0, 4,0, 8,0 µg/mL.

- **Degradação fotoquímica UVC**: Alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução estoque e adicionadas em 28 cubetas de descartáveis e vedadas com parafilme, após foram expostas à luz ultravioleta lâmpada germicida (Daylight F30T8 UV-C 254nm com potência de 30 watts), em câmara espelhada internamente (100x16x16 cm) a uma distância de 10 cm. Após os tempos determinados totalizando 90 minutos, foram retiradas alíquotas de 800 µL para balão volumétrico de 10 mL, estabelecendo uma concentração de 40 µg/mL e feita determinação por CLAE. Para o acompanhamento da degradação através do método microbiológico a amostra foi diluída na concentrações de 2,0, 4,0 e 8,0 µg/mL.

### 5.4.1 CÁLCULOS CINÉTICOS

A ordem de reação para cinética de degradação foi obtida representando a concentração do fármaco residual em função do tempo (reação de ordem zero), log da concentração em função do tempo (reação de primeira ordem) e inverso da concentração em função do tempo (segunda ordem).

Os coeficientes de regressão linear ( $r$ ) foram obtidos sendo que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem da reação.

Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação ( $k$ ), e o período de vida útil  $t_{90\%}$  (tempo em que 90% da concentração do fármaco encontra-se na forma inalterada) foram obtidos.

As seguintes equações representam o modelo cinético do estudo:

Reação de ordem zero:  $C = C_0 - kt$

Reação de primeira ordem:  $\ln C = \ln C_0 - kt$

Reação de segunda ordem:  $1/C = 1/C_0 - kt$

Onde:

$C_0$ : concentração no tempo zero.

$C$ : concentração após a reação no tempo  $t$ .

$k$ : constante de velocidade da reação.

### 5.4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

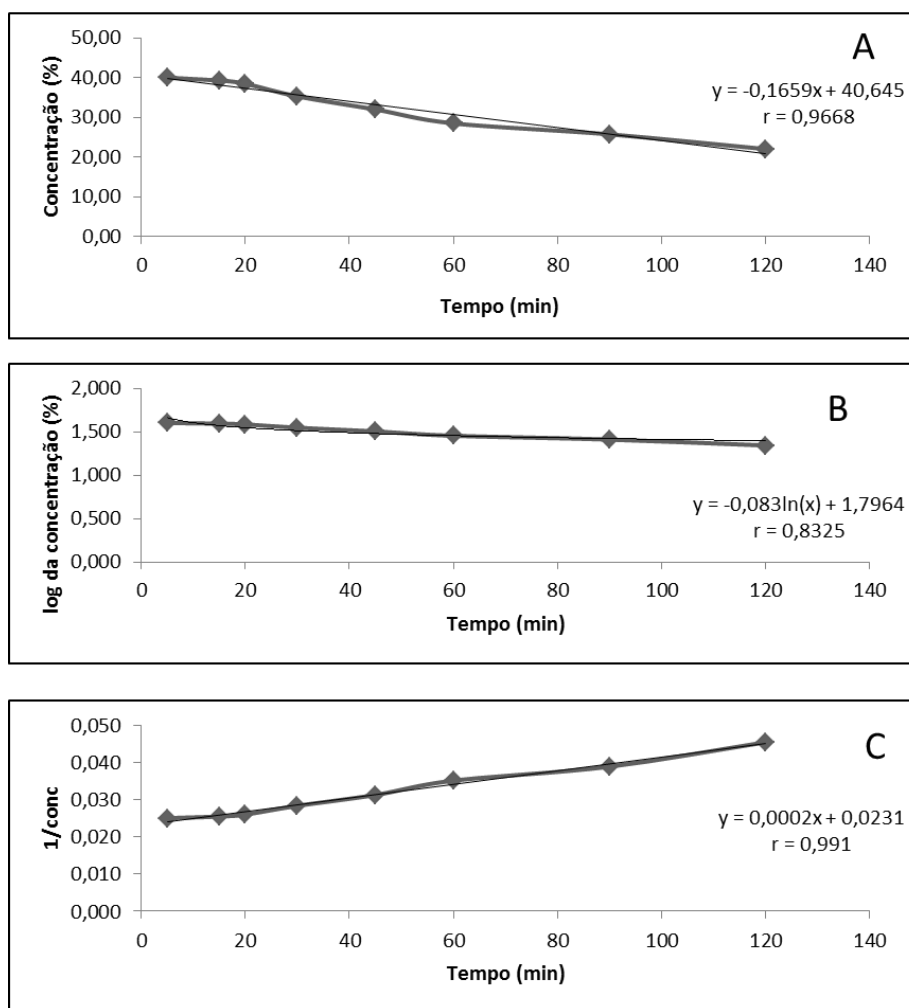
A partir dos resultados obtidos no estudo preliminar de estabilidade de CEF, optou-se por verificar a cinética de degradação frente à luz UVC e térmica a 60 °C por ambas terem degradado próximo de 50%.

Todos os resultados obtidos por meio do ensaio microbiológico foram monitorados por CLAE previamente validado.

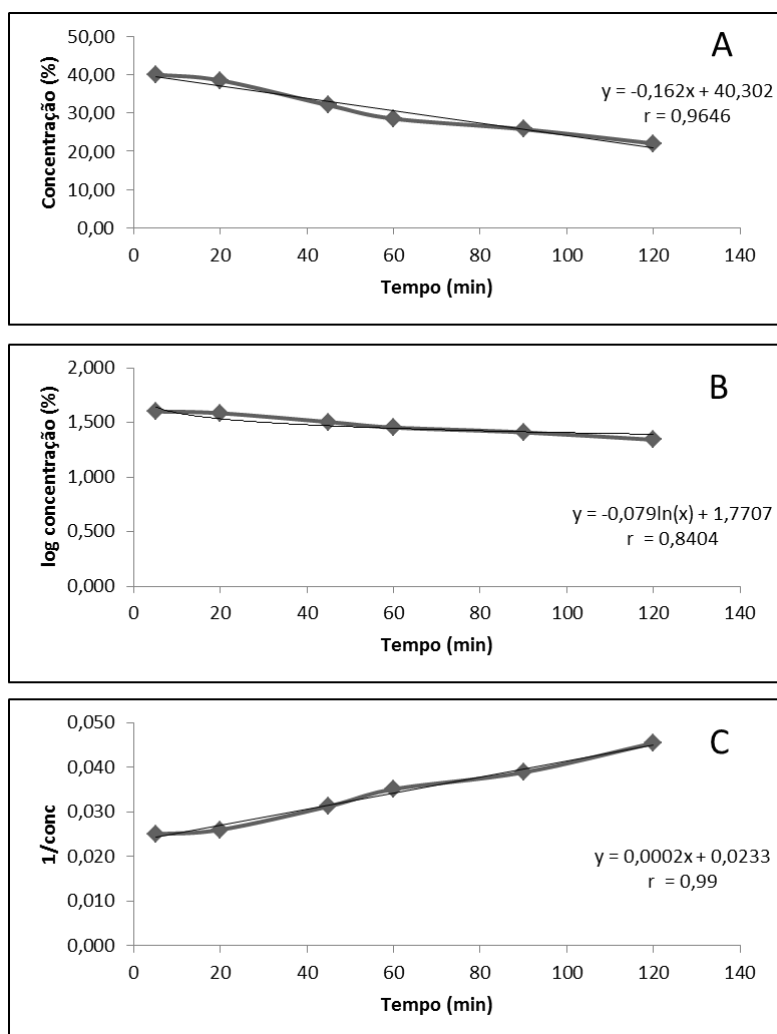
Os valores dos teores residuais das soluções amostras de CEF foram plotados em gráficos de concentração versus o tempo, log da concentração versus tempo e o inverso da concentração versus o tempo. Após avaliou-se o

coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e aquele que mais se aproximou de 1,0 corresponde à cinética de degradação seguida.

A Figura 10 apresenta os gráficos de concentração do fármaco residual (%) na amostra degradada a temperatura de 60 °C pelo ensaio por CLAE e a Figura 11 apresenta os gráficos do ensaio microbiológico na degradação 60 °C, bem como as equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação.



**Figura 10:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem da degradação térmica a 60° C de CEF monitorada por CLAE.



**Figura 11:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem submetida à degradação térmica a 60° C de CEF monitorada pelo método microbiológico.

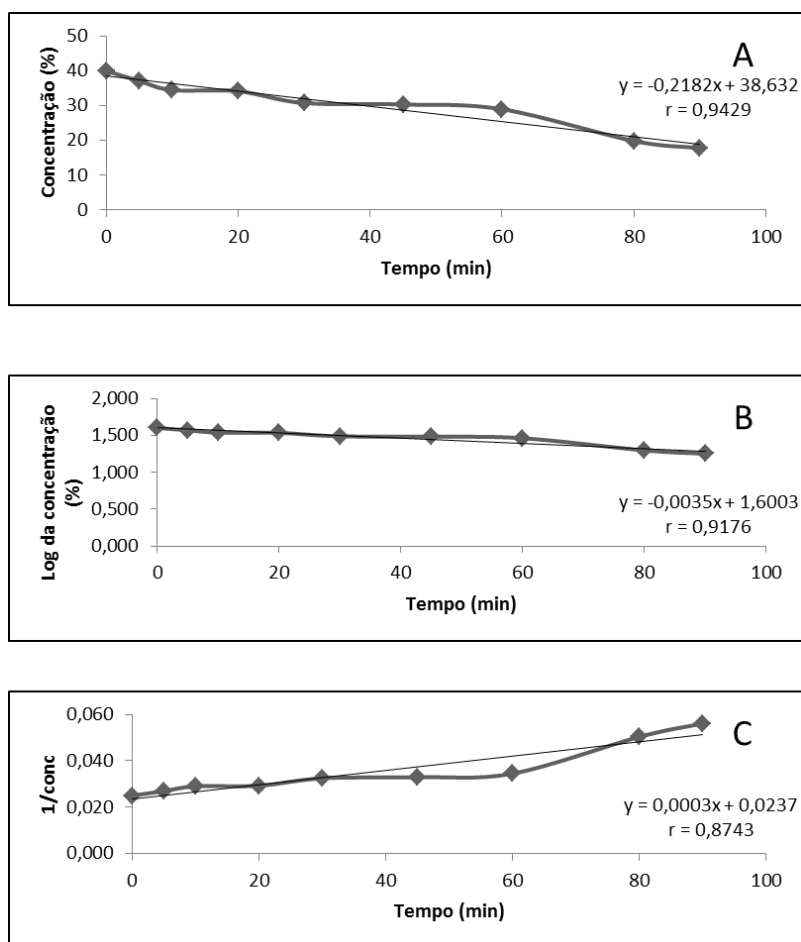
Observando o coeficiente de correlação das retas dos gráficos C(segunda ordem) nas Figuras 10 e 11, verifica-se que a cinética de degradação da CEF, quando submetida à degradação térmica a 60 °C, obedece a uma reação de segunda ordem.

Após obter esta informação, através de cálculos matemáticos, determinou-se a constante da velocidade de reação (k) e o tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ). As constantes de reação da CEF quando submetida à degradação térmica a 60 °C, apresentaram valores médios de  $0,0001177 \text{ h}^{-1}$  e  $0,000136 \text{ h}^{-1}$ , quando avaliadas pelo método cromatográfico e microbiológico, respectivamente.

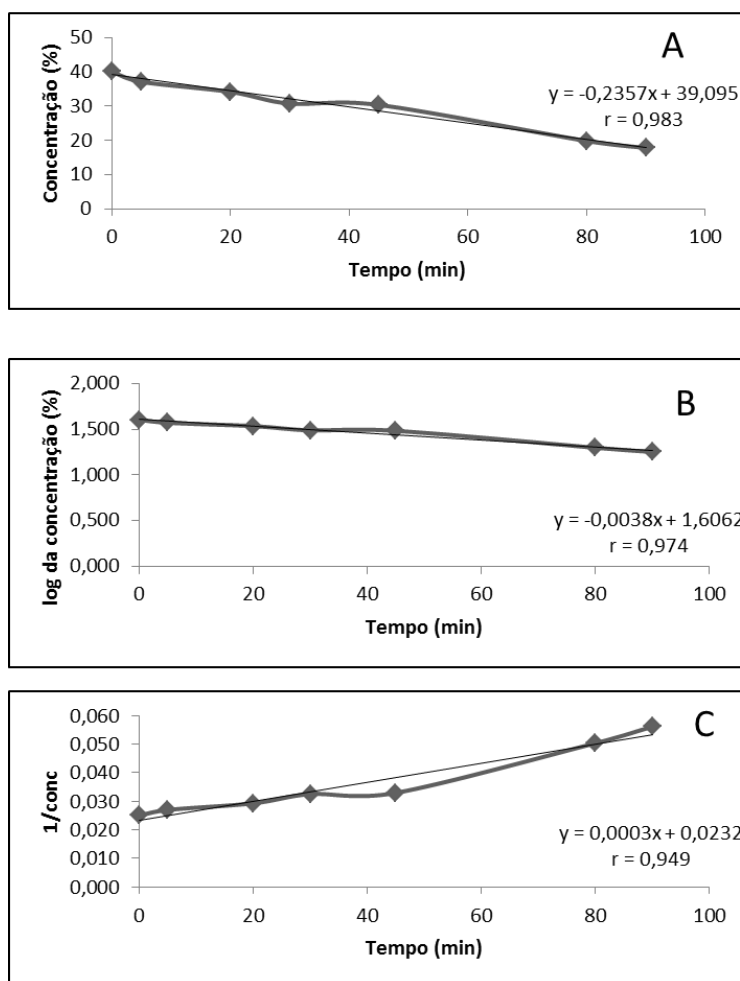
Através da constante de degradação (k) pode-se calcular o tempo necessário para que 10% do fármaco se degrade ( $t_{90\%}$ ). Quando calculado para

CEF apresentou valores de 23,57 e 20,37 minutos, quando avaliados pelo método cromatográfico e microbiológico, respectivamente.

A Figura 12 representa os gráficos da degradação UVC por CLAE e a Figura 13 os gráficos da degradação por UVC avaliada pelo método microbiológico, bem como as equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação.



**Figura 12:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem submetida à degradação UVC de CEF monitorada pelo CLAE.



**Figura 13:** Gráficos da concentração: (A) reação de ordem zero, (B) reação de primeira ordem, (C) reação de segunda ordem da degradação UVC de CEF monitorada pelo método microbiológico.

Analisando o coeficiente de correlação das retas dos gráficos A nas Figuras 12 e 13, observa-se que a cinética de degradação da CEF, quando submetida à degradação fotoquímica UVC, obedecem a uma reação de ordem zero.

Após a determinação da ordem de reação, através de cálculos matemáticos determinou-se a constante da velocidade de reação ( $k$ ) e o tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ). As constantes de reação da CEF quando submetida à degradação UVC, apresentaram valores médios de  $0,2983 \text{ h}^{-1}$  e  $0,1875 \text{ h}^{-1}$ , quando avaliadas pelo método cromatográfico e microbiológico, respectivamente.

Através da constante de degradação ( $k$ ) pode-se calcular o tempo necessário para que 10% do fármaco se degrade ( $t_{90\%}$ ). Quando calculado para

CEF apresentou valores de 12,43 e 19,78 minutos, quando avaliados pelo método cromatográfico e microbiológico, respectivamente.







## 6.1 INTRODUÇÃO

Com grandes protestos mundiais sobre o uso de animais para testes toxicológicos em produtos cosméticos, é de suma importância a implantação de novas alternativas, surgidas, inicialmente na Europa, por meio de organizações com apoio governamental e logo alcançaram os demais continentes. Assim, os diversos setores da indústria farmacêutica migram para esta tendência mercadológica que visa a avaliação de produtos por meio de metodologias que diminuam o número de animais e até elimine-os dos testes de eficácia e segurança (ANDERSEN *et al.*, 2004).

A toxicidade pode ser determinada pela capacidade da substância causar danos aos seres vivos. Os sistemas de cultura celular assumem grande importância nos testes de toxicidade devido à sensibilidade e reprodutibilidade, que facilitam o gerenciamento dos testes e diminuem os custos (PINTO, KANEKO, OHARA, 2010).

A avaliação da citotoxicidade da CEF foi realizada através do ensaio da atividade metabólica mitocondrial (MTT). A técnica de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazolium MTT. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da enzima succinato desidrogenase, fornecendo então uma medida da função mitocondrial (MOSMANN, 1983; LOBNER, 2000).

Assim sendo, o objetivo foi avaliar a toxicidade da CEF em pó para solução injetável, bem como de seu provável produto de degradação formado, quando exposta à degradação fotoquímica UVC e degradação térmica 60°C.

## 6.2 PARTE EXPERIMENTAL

- **Preparo das amostras:** para o preparo da amostra, nomeada condição normal, foi pesado 1 g de CEF, colocado em um balão de 20 mL e, em seguida, 10 mL de água mili-Q foram adicionadas e levado ao banho ultrassônico, por 10 minutos, após completou-se o volume com o mesmo diluente, obtendo solução com concentração de 50 mg/mL. Desta foram

retiradas alíquotas para eppendorf, a fim de obter as concentrações de trabalho de: 1,0, 10,0, 50,0 e 100,0 µg/mL, e completado o volume com água milli-Q.

- **Degradação térmica**: alíquotas de 1 mL da solução amostra na concentração de 50 mg/mL (solução estoque) foram adicionadas em duas cubetas descartáveis vedadas com parafilme e levadas à estufa com temperatura monitorada a 60°C por até 120 minutos, após realizou-se as diluições a fim de obter as concentrações 1,0, 10,0, 50,0 e 100,0 µg/mL.

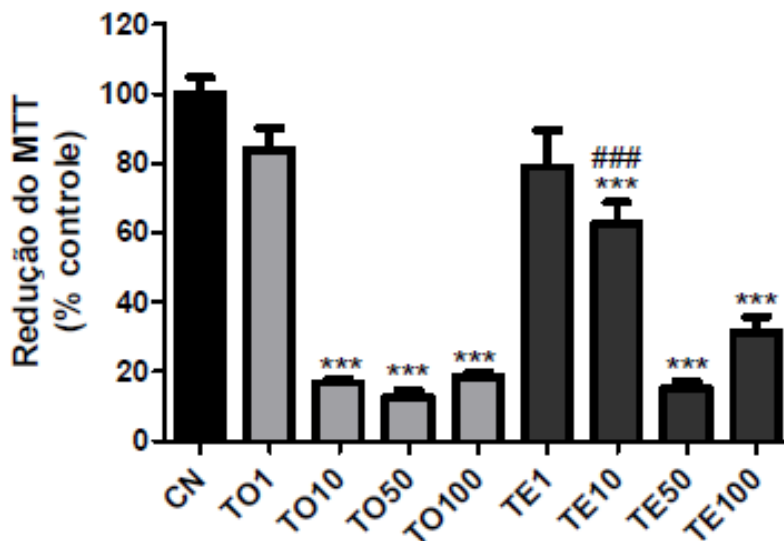
- **Degradação fotoquímica UVC**: alíquotas de 1 mL na concentração de 50 mg/mL foram retiradas da solução estoque e colocadas em duas cubetas descartáveis e vedadas com parafilme, sendo então expostas à luz ultravioleta (lâmpada germicida Daylight F30T8 UV-C 254 nm com potência de 30 watts), em câmara espelhada internamente (100X16X16 cm) a uma distância de 10 cm. Após 90 minutos foram retiradas da exposição e realizadas diluições a fim de obter concentrações 1,0,10,0, 50,0 e 100,0 µg/mL.

- **Procedimento**: o ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar se as estruturas degradadas frente à luz UVC e à degradação térmica possuíam algum efeito adverso em comparação com a molécula intacta de CEF. Este estudo foi realizado no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para avaliação da citotoxicidade foi realizado o ensaio de redução de MTT para mensurar a atividade da desidrogenase, a qual pode indicar a viabilidade celular. Foi utilizada linhagem celular 3T3 do fibroblasto de camundongos, onde estas foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (atmosfera: 5% CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>). As células foram semeadas a uma densidade de 35000 células/mL em 48 poços de uma microplaca (volume final de 250 µL; ~8000 células/cm<sup>2</sup>). As células foram nutridas a cada 2-3 dias e sub-cultivadas quando a confluência de 70-80% fosse atingida. As curvas de concentração *versus* resposta foram obtidas pela incubação das células com 1,0 – 100,0 µg/mL por 24 horas a 37 °C. Foi utilizado Triton X – 100 1% como

controle positivo (100% de morte celular), e como controle negativo foi utilizado meio de cultura e água. Após o período de incubação, o meio foi removido e substituído por meio fresco contendo 0,5 mg de MTT. Assim as células foram incubadas a 37 °C por mais 4 horas. Após a incubação o meio de cultura celular foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância foi determinada a 550 nm em um leitor de placas (BioTek instruments, Vermont, EUA). A análise pela ANOVA, seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para a comparação das médias dos testes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 5\%$ .

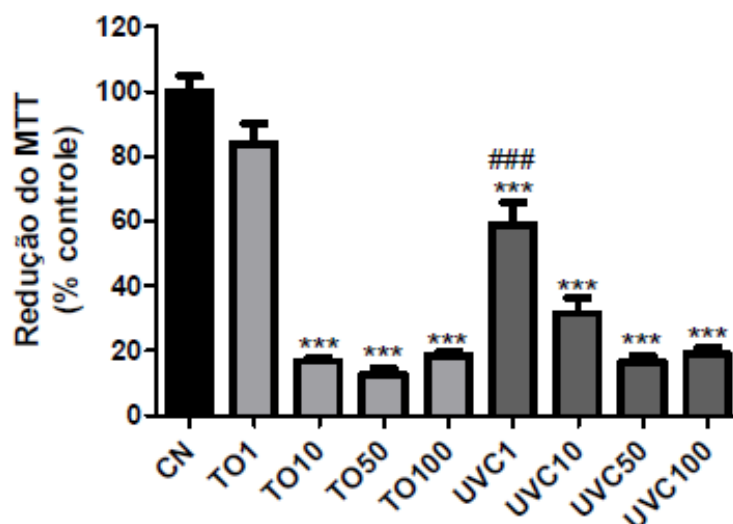
### **6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com os resultados expostos na Figura 14, a amostra submetida à degradação térmica a 60 °C na concentração de 1 µg/mL não apresentou diferença significativa quando comparada com o controle negativo e com a amostra na condição normal na mesma concentração. Entretanto, as amostras submetidas à degradação e à condição normal nas concentrações 10, 50 e 100 µg/mL, apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle negativo; portanto tanto as amostras na condição normal e as degradadas apresentaram significativa morte celular.



**Figura 14:** Resultados obtidos para amostra de CEF na condição normal (T0) e submetida à degradação térmica 60 °C (TE) através do ensaio da atividade metabólica mitocondrial (MTT). Valores de 100% indicam viabilidade total (CN). \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao controle negativo (CN). ### P < 0,001 comparando cada concentração de TO com a concentração correspondente de TE.

Na Figura 15 está demonstrado o resultado do estudo de citotoxicidade quando a amostra foi submetida à degradação fotolítica frente à luz UVC. Pode-se observar que amostra na condição normal na concentração de 1,0 µg/mL, não apresentou diferença significativa de viabilidade celular quando comparada com o CN. Já a amostra nesta mesma concentração submetida à degradação apresentou diferença significativa em relação ao CN e à amostra na condição normal. Quando as demais concentrações foram comparadas entre a condição normal e a condição degradada não apresentaram diferença significativa, com isso apresentam o mesmo perfil de morte celular.



**Figura 15:** Resultados obtidos para amostra de CEF na condição normal (T0) e submetida à degradação fotolítica UVC (UVC) através do ensaio da atividade metabólica mitocondrial (MTT). Valores de 100% indicam viabilidade total (CN).  
\*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao controle negativo (CN).  
###  $P < 0,001$  comparando cada concentração de TO com a concentração correspondente de TE.









- O ensaio microbiológico realizado pelo método de difusão em ágar-cilindros em placa, nas condições experimentais estabelecidas, foi validado adequadamente demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto para quantificar a Cefatarolina Fosamila na forma farmacêutica em pó para solução injetável;
- A metodologia analítica desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência foi validada para quantificação da Cefatarolina Fosamila na forma farmacêutica em pó para solução injetável e demonstrou ter adequada especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e sensibilidade;
- A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa da Cefatarolina Fosamila na forma farmacêutica em pó para solução injetável, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas;
- O estudo preliminar de estabilidade da Cefatarolina Fosamila na forma farmacêutica em pó para solução injetável mostrou instabilidade do fármaco quando submetido à radiação UVC, à temperatura de 60 °C, à hidrólise ácida e à oxidação;
- Os resultados obtidos na avaliação da cinética de estabilidade térmica a 60°C indicam tratar-se de uma reação de segunda ordem e para estabilidade fotolítica UVC indicam tratar-se de uma reação de ordem zero. Estes resultados foram obtidos tanto pelo método microbiológico quanto para o método cromatográfico;
- O ensaio de citotoxicidade realizado com o fármaco degradado frente à luz UVC e não degradado apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (1,0, 10,0, 50,0 e 100,0 µg/mL). Quando a amostra foi submetida à degradação térmica a 60° C e a não degradada apresentaram citotoxicidade nas concentrações 10, 50 e 100 µg/mL. Este resultado sugere que o fármaco, mesmo apresentando citotoxicidade frente ao ensaio realizado, há necessidade da execução

de outros testes *in vitro* para uma conclusão mais efetiva deste parâmetro analisado.

---

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



ABDELAZIZ, A. A.; ELBANNA, T. E.; GAMALELDEEN, N. M. Validated microbiological and HPLC methods for the determination of moxifloxacin in pharmaceutical preparations and human plasma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n.4, p.1291–1301, 2012.

ALI, F.; SINGH, G. N.; SAHU, P. L.; KUMAR, R.; TRIVEDI, M. M. Development and validation of analytical method for the estimation of ceftaroline fosamil in bulk and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 8, p. 929-938, 2015.

ALLEN, Jr. L. V; POPOVICH, N. C; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Ed. 2007.

ALMEIDA, J.R; FERREIRA FILHO, O, F. Pneumonias adquiridas na comunidade em pacientes idosos: aderência ao Consenso Brasileiro sobre pneumonias. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 3, p. 229-36, 2004.

ANDERSEN, M. L., D'ALMEIDA, V., KO. G. M., KAWAKAMI, R., MARTINS, P. J. F. Ética na experimentação animal. **Princípios éticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Cromosete gráfica e editora, p. 2-9, 2004.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography, B: Analytical in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, p. 2224 – 2234, 2009.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico das estafilococcias: revisão. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 67, n. 1, p. 160-92, 1994.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF; 2003 de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização dos estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília/DF, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relaciona á Assistência á Saúde**. In: PIGNATARI, A. C. C.; MAMISUKA, E. M. Cap 3. Infecções da pele e tecido subcutâneo. ANVISA, p. 37-54. 2013.

BRUCE, AARON M.; SPENCER, JAMES M. Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a private dermatology office. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 7, n. 8, p. 751-755, 2008.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

BUTLER, M. S.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. **Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 413-425. 2011.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação**. São Carlos: EduFSCar, 2001.

CAZEDEY, E. C. L.; SALGADO, H. R. N. A novel and rapid microbiological assay for ciprofloxacin hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 5, p. 382-386. 2013.

CDC CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (CDC *et al.* Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 48, n. 32, p. 707, 1999.

CORRÊA, R. D. A.; LUNDGREN, F. L. C.; PEREIRA-SILVA, J. L.; SILVA, R. L. F.; CARDOSO, A. P.; LEMOS, A. C. M.; ROSSI, F.; MICHEL, G.; RIBEIRO, L.; CAVALCANTI, M. A. N.; DE FIGUEIREDO, M. R. F.; HOLANDA, M. A.; VALERY, M. I. B. A.; AIDÊ, M. A.; CHATKIN, M. N.; MESSEDER, O.; TEIXEIRA, P. J. Z.; MARTINS, R. L. M.; ROCHA, R. T. Brazilian guidelines for community-acquired pneumonia in immunocompetent adults-2009. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 6, p. 574-601, 2009.

DAFALE, N. A.; SEMWAL, U. P.; AGARWAL, P. K.; SHARMA, P.; SINGH, G. N. Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. **Analytical Methods**, v. 4, p. 2490-2498. 2012.

DART, R. K. Microbiology for the analytical chemist. **The Royal Society of Chemistry**. 1996.

DE ALENCAR, J. R. B.; RAMOS, S. V. V.; MACHADO, L. B.; OLIVEIRA, A. T. C.; MONTEIRO, D. B.; de MEDEIROS, F. P. M.; Neto, P. J. R. Validação de limpeza de zidovudina: estratégia aplicada ao processo de fabricação de medicamentos anti-retrovirais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 1-8, 2004.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N.; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. Supplement 2, p. S114-S132, 2001.



DINUBILE, M. J.; LIPSKY, B. A. Complicated infections of skin and skin structures: when the infection is more than skin deep. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. ii37-ii50, 2004.

DOS SANTOS, S. R.; PASSADORE, L. F.; TAKAGI, E. H.; FUJII, C. M.; YOSHIOKA, C. R.; GILIO, A. E.; MARTINEZ, M. B. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**, v. 31, n. 51, p. 6150-6154, 2013.

DRYDEN, M.S. Complicated skin and soft tissue infections caused by MRSA: epidemiology, risk factors and presentation. **Surgical Infections**, v. 9, p. 3-10, 2008.

DUFOUR, P.; GILLET, Y.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; FLORET, D.; RICHEL, H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, p. 819-824, 2002.

DUNKLE, L. M.; NAQVI, S. H.; MCCALLUM, R.; LOFGREN, J. P. Eradication of epidemic methicillin-gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care nursery. **The American Journal of Medicine**, v. 70, n. 2, p. 455-458, 1981.

EDELSBERG, J.; TANEJA, C.; ZERVOS, M.; HAQUE, N.; MOORE, C.; REYES, K.; OSTER, G. Trends in US hospital admissions for skin and soft tissue infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1516, 2009.

EISENSTEIN, B. I. Treatment challenges in the management of complicated skin and soft-tissue infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. s2, p. 17-25, 2008.

EPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 38, n. 4, p. 212-228, 2004.

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

FARHA, T.; THOMSON, A. H. The burden of pneumonia in children in the developed world. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 6, n. 2, p. 76-82, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5. ed. Brasília. 2010.

FERNANDES, R.; VIEIRA, M.; FERRAZ, R.; PRUDÊNCIO, C. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae: report from two Portuguese hospitals. *J. Hosp. Infect.* 70: 93-95, 2008.

FERREIRA, M. S.; GONÇALVES, E. G.; ASSIS, V. D. P. Como diagnosticar e tratar infecções estafilocócicas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 42, n. 6, p. 179-89, 1985.

FILE, T. M.; MARRIE, T. J. Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. **Postgraduate Medicine**, n. 122, p. 130-41, 2010.

FRANCISCO, F. L.; SAVIANO, A. M.; PINTO, T. J. A.; LOURENÇO, F. R. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay of neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 104-111, 2014.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A. C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

GE, Y.; BIEK, D.; TALBOT, G. H.; SAHM, D. F. *In vitro* profiling of ceftaroline against a collection of recent bacterial clinical isolates from across the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3398-3407, 2008.

GELATTI, L. C.; SUKIENNIK, T.; BECKER, A. P.; INOUE, F. M.; CARMO, M. S. D.; CASTRUCCI, F. M. D. S.; AZEVEDO, P. A. D. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 458-60, 2009.

GOTTARDI, W.; PFLEIDERER, J.; NAGL, M. The integral Method, a new approach to quantify bactericidal activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 115, p. 71-78, 2015.

GRANDO, I. M.; MORAES, C.; FLANNERY, B.; RAMALHO, W. M.; HORTA, M. A.; PINHO, D. L. Impacto da vacina pneumocócica conjugada 10-valente na meningite pneumocócica em crianças com até dois anos de idade no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 31, p. 276-84, 2015.

GROOM, A. V.; WOLSEY, D. H.; NAIMI, T. S.; SMITH, K.; JOHNSON, S.; BOXRUD, D.; CHEEK, J. E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. **Jama**, v. 286, n. 10, p. 1201-1205, 2001.

GRUNDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **The Lancet**, v. 368, n. 9538, p. 874-885, 2006.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical methods text and methodology Q2 (R1)**. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

IIZAWA, Y.; NAGAI, J.; ISHIKAWA, T.; HASHIGUCHI, S.; NAKAO, M.; MIYAKE, A.; OKONOGI, K. *In vitro* antimicrobial activity of T-91825, a novel anti-MRSA cephalosporin, and *in vivo* anti-MRSA activity of its prodrug, TAK-599. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 3, p. 146-156, 2004.

JAPANESE Pharmacopoeia. **The Society of Japanese Pharmacopoeia**. 16 ed. Tokio. 2011.

JEVONS, M.P. Celbenin-resistant staphylococci. **British Medicine Journal**, v. 1, p. 124 - 125, 1961.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.

KARLOWSKY, J. A.; BIEDENBACH, D. J.; BOUCHULLON, S. K.; HACKEL, M.; IACONIS, J. P.; SAHM, D. F. *In vitro* activity of Ceftaroline against bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue and respiratory tract infections in African and Middle Eastern countries: AWARE global surveillance program 2012–2014. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 194-199, 2016.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, v. 2, p. 1277-355, 2001.

LEAL, R.; KISSMAN, G.; FRANCO, C. A. B. Pneumonias adquiridas na comunidade. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 100, n. 5, p. 7-14, 2012.

LICHTENFELS, E.; LUCAS, M. L.; WEBSTER, R.; D'AZEVEDO, P. A. Profilaxia antimicrobiana em cirurgia vascular periférica: cefalosporina ainda é o padrão-ouro?. **Jornal Vascular Brasileiro**. Porto Alegre, v. 6, n. 4, p. 378-387, 2007.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. **Journal of neuroscience methods**, v. 96, n. 2, p. 147-152, 2000.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

LUNA, C. M.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, P. 119-127, 2010.

MARIAN, E.; TITA, B.; JURCA, T.; FULIAS, A.; VICAS, L.; TITA, D. Thermal behaviour of erythromycin-active substance and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 2, p. 1025-1031, 2013.

MARÍN, M; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n. 1, p. 42-55, 2003.

MEYER, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 72, n. 11, p. 1239-1240, 2010.

MOET, G. J.; JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J.; STILWELL, M. G.; FRITSCH, T. R. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 1, p. 7-13, 2007.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MPENGE, M. A.; MACGOWAN, A. P. Ceftaroline in the management of complicated skin and soft tissue infections and community acquired pneumonia. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 11, p. 565, 2015.

NAIR, G.B. NIEDERMAN, M.S. Community-acquired pneumonia: An unfinished battle. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 6, p. 1143-1161, 2011.

NIEDERMAN, M. S. Challenges in the management of community-acquired pneumonia: the role of quinolones and moxifloxacin. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. 2, p. 158-166, 2005.

NOVAES, H. M. D.; SARTORI, A. M. C.; SOÁREZ, P. C. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004-2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 3, p. 539-547, 2011.

OBARO, S. K.; MADHI, S. A. Bacterial pneumonia vaccines and childhood pneumonia: are we winning, refining, or redefining?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 150-161, 2006.

PALLIN, D. J.; EGAN, D. J.; PELLETIER, A. J.; ESPINOLA, J. A.; HOOPER, D. C.; CAMARGO, C. A. Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals of Emergency Medicine**, v. 51, n. 3, p. 291-298, 2008.

PANDEY, A.; RATH, B.; DWIVEDI, A. K. Enhancement of dissolution rate and bioavailability of Paliperidone by Hot Melt Extrusion technique. 2014.

- PARISOTTO, G.; de SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C.; MOLZ, R. F. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 4, 2005.
- PEREA, J. A.; PÉREZ, J. H.; BOY, R. C. R. A. Farmacología clínica de las cefalosporinas. **Revista de Medicina de la Universidad de Navarra**, v. 27, n. 2, p. 39, 2016.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3. Ed. São Paulo: **Atheneu**. 2010.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- RATHORE, M. H.; KLINE, M. W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 8, n. 9, p. 645-647, 1989.
- REBELLO, F. R. **Otimização e Verificação dos Métodos Microbiológicos Empregados no Controle de Qualidade de Medicamentos de Uso Oral**. Dissertação. (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica). Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2015.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- SADER, H. S.; FRITSCH, T. R.; KANIGA, K.; GE, Y.; JONES, R. N. Antimicrobial activity and spectrum of PPI-0903M (T-91825), a novel cephalosporin, tested against a worldwide collection of clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3501-3512, 2005.
- SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; JONES, R. N. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centres. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 28-32, 2010.
- SALVIO NETO, H. **Estudo de Compatibilidade Fármaco-Escipiente e de Estabilidade do Prednicarbonato por Meio de Técnicas Termoanalíticas, e Encapsulação do Fármaco em Sílica Mesoporosa do tipo SBA-15**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SCOTT, R. P. W. **Principles and Practice of Chromatography**. 2003. Disponível em: <http://www.farmatel.yolasite.com/resources/Principles%20and%20practice%20of%20LC.pdf> acessado em 02/02/2017.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, R. M.; OLIVEIRA, F. H.; STTRATMENN, R. R.; PIMENTEL, M. F.; MEDEIROS, F. P.; ALBUQUERQUE, M. M.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para doseamento da matéria-prima e de cápsula de sulfato de indinavir por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires**, v. 25, n. 4, p. 578-82, 2006.

SILVA, P. D. **Determinação de Compostos Fenólicos por HPLC**. Dissertação. (Mestrado em Química Industrial). Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

SILVA, L. M.; SALGADO, H. E. N. Rapid turbidimetric assay to potency evolution of tigecycline in lyophilized poder. **Journal of Microbiological Methods**, v. 110, p. 49-53. 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676, 2002.

**SBOC Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, [ANVISA aprova Zinforo \(ceftarolina fosamila\) para infecções complicadas de pele e tecidos moles e pneumonia adquirida na comunidade](http://www.svoc.org.br/anvisa-aprova-zinforo-ceftarolina-fosamila-para-infecoes-complicadas-de-pele-e-tecidos-moles-e-pneumonia-adquirida-na-comunidade). Disponível em <http://www.svoc.org.br/anvisa-aprova-zinforo-ceftarolina-fosamila-para-infecoes-complicadas-de-pele-e-tecidos-moles-e-pneumonia-adquirida-na-comunidade/>. Acessado em 01 de maio de 2015.

STEED, M. E.; RYBAK, M. J. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity Against Resistant Gram-Positive Pathogens. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 30, n. 4, p. 375-389, 2010.

STEVENS D. L; BISNO A.L; CHAMBERS H. F. *et al.* IDSA guidelines: practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, p. 1373-1406, 2005.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo captopril. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 497, 2007.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SUNEETHA, A.; CHINA VENKANNA, K. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for estimation of ceftaroline fosamil in bulk and its parenteral dosage forms. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, 2013.

TABORIANSKI, A. M. **Validação de Métodos para Análise e Estudos de Estabilidade de Anti-retrovirais em Preparações Farmacêuticas**. Dissertação. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2003.

USP. **United States Pharmacopoeial Convention**. 39 ed. Rockville. 2016.

VEHABOVIC, M.; HADZOVIC, S.; STAMBOLIC, F.; HADZIC A.; VRANJES, E.; HARACI, E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n. 1, p. 109-115, 2003.

VIOLI, F.; CANGEMI, R.; CALVIERI, C. Pneumonia, thrombosis and vascular disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, n. 9, p. 1391-1400, 2014.

VIOLI, F.; CARNEVALE, R.; CALVIERI, C.; NOCELLA, C.; FALCONE, M.; FARCOMENI, A.; TALIANI, G.; CANGEMI, R. Nox2 up-regulation is associated with an enhanced risk of atrial fibrillation in patients with pneumonia. **Thorax**, v. 70, n. 10, p. 961-966, 2015.

WATKINS, R. R.; LEMONOVICH, T. L. Diagnosis and management of community-acquired pneumonia in adults. **Mortality**, v. 100, p. 12, 2011.

WEISS, M. E.; ADKINSON, N. F. Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 18, n. 6, p. 515-540, 1988.

WENZEL, R. P.; NETTLEMAN, M. D.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and effective control measures. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. S221-S227, 1991.

WHITE, B.; SEATON, R. A. Complicated skin and soft tissue infections: literature review of evidence for and experience with daptomycin. **Infection and Drug Resistance**, v. 4, p. 115, 2011.

WHO. The International Pharmacopoeia. **World Health Organization**. 4 ed., 3<sup>rd</sup> Supplement. 2013.

YEE, C.; BIEK, D.; KRAUSE, K.; WILLIAMS, G. Ceftaroline: a Cephalosporin with Anti-MRSA Activity. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, n. 21, p. 161-169, 2011.