

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
MILTON ELIEZER BERSAN

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE UM MÉTODO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS NO ANTIBIÓTICO CEFTAZIDIMA POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA.

Rio de Janeiro
2013

MILTON ELIEZER BERSAN

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE UM MÉTODO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS NO ANTIBIÓTICO CEFTAZIDIMA POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA.

Monografia apresentada ao Curso de
Pós-Graduação *Lato Sensu* como requisito para
obtenção do título de Especialista em
Tecnologias Industriais Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Laís Bastos da Fonseca, Dr^a.

Co-orientador: Prof. Marcelo R. R. Tappin, Dr.

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

B535d

Bersan, Milton Eliezer

Desenvolvimento e validação analítica de um método para
quantificação de impurezas no antibiótico Ceftazidima por cromatografia
líquida de ultra eficiência. / Milton Eliezer Bersan. – Rio de Janeiro,
2013.

xxii, 101 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr^a. Laís Bastos da Fonseca

Co-orientador: Dr. Marcelo Raul Romero Tappin

TCC (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-
Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais
Farmaceuticas, 2013.

Bibliografia: f. 100-101

1. CLUE. 2. Validação analítica e Ceftazidima Pentaidratada. I.
Título.

CDD 615.1

Milton Eliezer Bersan

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE UM MÉTODO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS NO ANTIBIÓTICO CEFTAZIDIMA POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA.**

Monografia de Especialização
apresentada ao Curso de
Especialização em Tecnologias
Industriais Farmacêuticas, Fiocruz,
Farmanguinhos, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Especialista em Tecnologias
Industriais Farmacêuticas.

Orientadores:



Prof. Laís Bastos da Fonseca, Dra.
Presidência - Fiocruz

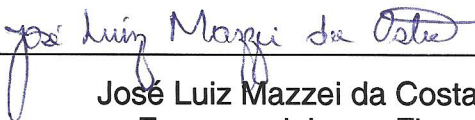


Prof. Dr. Marcelo R. R. Tappin, Dr.
Farmanguinhos - Fiocruz

Banca Examinadora:



Leonardo Lucchetti C. da Silva, Dr.
Farmanguinhos - Fiocruz



José Luiz Mazzei da Costa, Dr.
Farmanguinhos - Fiocruz

Dedico este trabalho

Aos meus pais José Bersan (in memorian) e Maria de Jesus pelo amor, carinho e exemplo de vida.

A minha esposa, amiga e companheira Jéssica pela paciência, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me dar forças, perseverança e estímulo.

A minha esposa e amiga Jéssica pela paciência, apoio e compreensão, sem os quais, eu não conseguiria ter chegado até aqui.

A minha mãe Maria por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus orientadores Laís e Marcelo pela orientação e idéias.

A coordenação da pós-graduação Carmen e Fernando e a secretária Beth pela ajuda e compreensão.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Ao meu amigo Éder pela amizade e companheirismo durante o curso.

Aos meus amigos Rodrigo e Patrícia pela importante ajuda na elaboração deste trabalho.

A Antibióticos do Brasil Ltda., representada pela minha coordenadora Patrícia que tornou possível a realização deste trabalho ao conceder minha liberação para a realização da pós-graduação.

A todos os colegas de curso pelo companheirismo e amizade.

RESUMO

A ceftazidima é uma cefalosporina semi-sintética de terceira geração com amplo espectro de ação antimicrobiana e muito utilizada no tratamento de infecções bacterianas frequentes, incluindo espécies de *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa* e é considerada fármaco de escolha para infecções graves causadas por espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Haemophylus*. Entre as infecções causadas por estas espécies se destacam: infecções biliares, ósseas e nas articulações, fibrose cística (infecções do trato respiratório), endoftalmites, infecções em pacientes imunodeprimidos (neutropênicos), meningite, peritonite, pneumonia, septicemia, infecções da pele (queimaduras e ulcerações) e infecções do trato urinário. Apesar da ceftazidima ser bem estudada no que se refere à atividade terapêutica e uso clínico, não há um método oficial farmacopéico para quantificação de impurezas. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações das impurezas de um fármaco em preparações farmacêuticas é um pré-requisito essencial para controlar a qualidade. Na maioria dos casos a técnica utilizada para este controle é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); no entanto, o advento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) permitiu a análise em tempos menores com conseqüente economia de solvente. Assim, a transferência de métodos analíticos de CLAE para CLUE tem se tornado uma tendência importante na indústria farmacêutica. O objetivo deste estudo foi transferir e validar um método analítico de CLAE para a determinação de impurezas presentes em solução injetável de ceftazidima para CLUE, com base em um método interno de CLAE já existente. A transferência incluiu uma adaptação do volume de injeção, do fluxo de fase e do gradiente de fase móvel utilizado. O novo método foi devidamente validado mostrando-se satisfatório em relação à linearidade, seletividade/especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão do método, robustez, exatidão e avaliação da adequação do sistema. Esse método poderá ser empregado no laboratório de controle de qualidade, a fim de elucidar possíveis fontes de agravo à saúde,

relacionada às impurezas presentes na solução injetável de ceftazidima, gerando resultados capazes de auxiliar tanto na proteção como na promoção da saúde da população.

ABSTRACT

Ceftazidime is a third generation semi-synthetic cephalosporin with a broad-spectrum of antimicrobiological activity, widely used in the treatment of common bacterial infections, including *Proteus* species and *Pseudomonas aeruginosa*. It is also considered the drug of choice for serious infections caused by species of *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* and *Haemophylus*. Among the infections caused by these microbiological agents are biliary infections, bone and joints infections, cystic fibrosis (respiratory tract infections), endophthalmitis infections in immunocompromised patients (neutropenics), meningitis, peritonitis, pneumonia, septicemia, skin infections (ulcerations and burns) and tract infections urinary. Despite the fact of ceftazidime been deeply studied, regarding its therapeutic activity and clinical use, there is no pharmacopeial official method for the determination of Ceftazidime impurities. The development of suitable analytical methods to determine impurities in pharmaceutical drug preparations is an essential prerequisite for their quality control. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is the most widely used technique for such analysis, however the advent of Ultra High Performance Liquid chromatography (UHPLC) allowed shorter analysis time and mobile phase solvent economy. Therefore there is a significant trend in the pharmaceutical industry to transfer HPLC analytical methods to UHPLC. The objective of this study was to transfer and validate an already existing internal HPLC analytical method for the determination of Ceftazidime impurities present in injectable solutions of the drug to UHPLC. The transfer included an adaptation of sample injection volume, mobile phase flow and gradient. This method was validated and demonstrated to be satisfactory regarding linearity, selectivity/specificity, limits of detection and quantification, precision of the method, robustness, accuracy and system suitability evaluation. Thus this method can be employed in laboratory quality control, in order to elucidate possible sources of harm to health related to impurities present in ceftazidime injectable solutions, generating results that can assist in both the protection and the promotion of health.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estrutura química do antibiótico ceftazidima pentaidratado.....	23
Figura 2. Estrutura química das impurezas de processo.....	28
Figura 3. Estrutura química da impureza de degradação.....	29
Figura 4. Cromatograma das impurezas com a coluna Shim-pack® XR-ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,2 µm de tamanho de partícula.....	63
Figura 5. Cromatograma das impurezas com a coluna Ascentis® Express ODS.....	65
Figura 6. Cromatograma da amostra contendo as impurezas com a coluna Ascentis® Express ODS.....	65
Figura 7. Cromatograma da amostra contendo as impurezas com a coluna Shim-pack® XR-ODS.....	67
Figura 8. Cromatograma da amostra controle.....	68
Figura 9. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra controle.....	69
Figura 10. Cromatograma da amostra exposta a luz.....	70
Figura 11. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a luz...70	
Figura 12. Cromatograma da amostra exposta a temperatura de 80°C.....	71

Figura 13. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a temperatura de 80°C.....	71
Figura 14. Cromatograma da amostra exposta à hidrólise ácida HCl 1 normal.....	72
Figura 15. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a hidrólise ácida HCl 1 normal.....	73
Figura 16. Cromatograma da amostra exposta à hidrólise básica NaOH 0,1 normal.....	74
Figura 17. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta à hidrólise básica NaOH 0,1 normal.....	74
Figura 18. Cromatograma da amostra exposta à oxidação peróxido de hidrogênio 0,3%.....	75
Figura 19. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta à oxidação peróxido de hidrogênio 0,3%.....	76
Figura 20. Cromatograma da solução contendo carbonato de sódio.....	78
Figura 21. Cromatograma da solução contendo as impurezas.....	78
Figura 22. Resultado do composto 7-ACA na robustez.....	89
Figura 23. Resultado do composto piridina na robustez.....	90
Figura 24. Resultado do composto 7-PYCA na robustez.....	91
Figura 25. Resultado do composto TAEM na robustez.....	92

Figura 26. Resultado do composto butazidima na robustez.....93

Figura 27. Cromatograma das solução amostra de ceftazidima contendo as impurezas a 1%, utilizada na exatidão.....96

Figura 28. Cromatograma da solução referência de ceftazidima utilizada na adequação do sistema.....98

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Poder de resolver picos em função do tamanho da partícula e do comprimento da coluna.....	42
Gráfico 2. Curva analítica nº 1 de ceftazidima.....	82
Gráfico 3. Curva analítica nº 2 de ceftazidima.....	83
Gráfico 4. Curva analítica nº 3 de ceftazidima.....	84

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Características requeridas para validação pela RE nº 899.....	32
Tabela 2. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.....	36
Tabela 3. Metodologia interna desenvolvida pela Antibióticos do Brasil.....	40
Tabela 4. Proporções das fases móveis A e B do método rápido (teórico).....	45
Tabela 5. Metodologia final CLUE utilizada para quantificar impurezas no antibiótico ceftazidima.....	46
Tabela 6. Variações das condições analíticas do estudo de robustez.....	59
Tabela 7. Metodologia final CLUE utilizada para quantificar impurezas no antibiótico ceftazidima.....	62
Tabela 8. Volume de tubos capilares.....	64
Tabela 9. Método ultra eficiente após ajustes.....	67
Tabela 10. Resultados obtidos na especificidade.....	77
Tabela 11. Resultado da relação sinal/ruído do pico de ceftazidima na solução limite de detecção.....	80
Tabela 12. Resultado da relação sinal/ruído do pico de ceftazidima na solução limite de quantificação.....	80

Tabela 13. Concentrações das soluções de trabalho das curvas analíticas em mg/ml.....	81
Tabela 14. Resultados da 1ª curva analítica.....	82
Tabela 15. Resultado dos resíduos da 1ª curva analítica.....	82
Tabela 16. Resultados da 2ª curva analítica.....	83
Tabela 17. Resultados dos resíduos da 2ª curva analítica.....	84
Tabela 18. Resultados da 3ª curva analítica.....	85
Tabela 19. Resultado dos resíduos da 3ª curva analítica.....	85
Tabela 20. Resultado do intervalo do método analítico.....	86
Tabela 21. Resultado da repetibilidade (analista 1).....	86
Tabela 22. Resultado da precisão intermediária (analista 2).....	87
Tabela 23. Resultado da repetibilidade + precisão intermediária.....	87
Tabela 24. Resultado do teor do composto 7-ACA na robustez.....	89
Tabela 25. Resultado do teor do composto piridina na robustez.....	90
Tabela 26. Resultado do teor do composto 7-PYCA na robustez.....	91
Tabela 27. Resultado do teor do composto TAEM na robustez.....	92
Tabela 28. Resultado do teor do composto butazidima na robustez.....	93

Tabela 29. Resultado de assimetria e resolução na robustez e adequação do sistema.....	94
Tabela 30. Recuperação para cada nível de concentração.....	95
Tabela 31. Resultado da adequação do sistema (<i>system suitability</i>).....	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7-ACA – Ácido 7 – aminocefalosporânico

7-PYCA – composto químico utilizado na síntese da ceftazidima

A – Coeficiente

A_{impureza} – Área da impureza

$A_{\text{padrão}}$ – Área do padrão

B – Coeficiente

bar – Unidade de pressão

C – Coeficiente

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

C18 - Octadecilsilano (cadeia de 18 carbonos)

cm – Centímetros

CMD – Concentração média determinada

D – Duração do segmento

d_{c1} – Diâmetro interno da coluna original

d_{c2} – Diâmetro interno da nova coluna

d_i – Diâmetro interno

D_M – Coeficiente de difusão do analito

d_p – Diâmetro da partícula

DPa – Desvio Padrão do intercepto (eixo y)

DPR – Desvio Padrão Relativo

F – Fluxo

F_1 – Fluxo original

F_2 – Novo fluxo

g – Gramas

H – Altura do prato

H_p – Altura do pico

hr – Altura do ruído

IC – Inclinação da Curva

l – Litros

L_1 – Comprimento original da coluna
 L_2 – Comprimento da nova coluna
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
m – Metros
 M_{amostra} – Massa amostra
mg – Miligramas
min – Minutos
ml – Mililitro(s)
mm – Milímetros
 $M_{\text{padrão}}$ – Massa padrão
N – Número de pratos teóricos
 Na_2CO_3 – Carbonato de Sódio
nm – Nanômetros
ODS – Octadecilsilano (cadeia de 18 carbonos)
pH – Potencial Hidrogênioônico
 $P_{\text{padrão}}$ – Potência padrão
PTFE – Politetrafluoroetileno
r – Coeficiente de correlação
 r^2 – Coeficiente de determinação
 r_i – Raio da coluna
R – Resolução
(R) – Razão entre volumes
RE – Resolução (legislação)
VEC – Volume Extra Coluna
 V_c – Volume da coluna
 V_{i1} – Volume original de injeção
 V_{i2} – Novo volume de injeção
TAEM – 2-Mercaptobenzothiazol
 KH_2PO_4 – Fosfato de Potássio Monobásico
 μ - Velocidade linear da fase móvel
 μl – Microlitros

μm – Micrômetros

k' – Fator de capacidade

π – Pi (3,14)

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. O antibiótico ceftazidima.....	23
1.2. Cromatografia líquida.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1. Metodologia analítica.....	27
2.2. Transferência do método analítico.....	27
2.2.1. Ajuste do fluxo.....	27
2.2.2. Ajuste do volume de injeção.....	28
2.2.3. Ajuste do perfil do gradiente.....	28
2.3. Impurezas de processo e impurezas de degradação.....	28
2.4. Validação analítica do método.....	31
3. OBJETIVO.....	37
3.1. Objetivos específicos.....	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Aquisição dos materiais de referência e amostras.....	38
4.2. Equipamento, materiais e reagentes.....	38
4.2.1. Equipamentos.....	38
4.2.2. Materiais e reagentes.....	38
4.3. Preparação das fases móveis.....	39
4.4. Condições cromatográficas do método original.....	40
4.5. Preparação das soluções.....	40
4.5.1. Mistura das impurezas 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima com o ativo ceftazidima.....	40
4.5.2. Preparo da solução amostra contendo as impurezas.....	41
4.6. Proposta para transferência e desenvolvimento do método.....	42
4.6.1. Escolha da coluna.....	42
4.6.2. Ajuste do fluxo.....	43
4.6.3. Ajuste do volume de injeção.....	43
4.6.4. Ajuste do perfil do gradiente.....	43
4.6.5. Colunas cromatográficas.....	45

4.7. Condições cromatográficas do método ultra eficiente.....	46
4.8. Validação analítica do método CLUE.....	46
4.8.1. Especificidade/seletividade.....	46
4.8.2. Limite de detecção e quantificação.....	49
4.8.2.1. Confeção da curva analítica.....	50
4.8.2.2. Avaliação das curvas analíticas.....	50
4.8.3. Linearidade.....	51
4.8.3.1. Confeção das curvas analíticas.....	52
4.8.4. Intervalo.....	54
4.8.5. Precisão do método.....	54
4.8.5.1. Repetibilidade.....	54
4.8.5.2. Precisão intermediária.....	56
4.8.6. Robustez.....	57
4.8.7. Exatidão.....	59
4.8.8. Adequação do sistema (<i>system suitability</i>).....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. Transferência e desenvolvimento do método analítico ultra eficiente.....	62
5.1.1. Verificação das condições analíticas do método.....	62
5.1.1.1. Testes utilizando a coluna Shim-pack® XR-ODS.....	62
5.1.1.2. Testes utilizando a coluna Ascentis® Express ODS.....	63
5.1.1.3. Ajuste no gradiente de proporção das fases móveis.....	66
5.2. Validação do método analítico de CLUE.....	68
5.2.1. Especificidade/seletividade.....	68
5.2.2. Limites de detecção e quantificação.....	79
5.2.3. Linearidade.....	80
5.2.3.1. Avaliação da 1ª curva analítica para Ceftazidima.....	81
5.2.3.2. Avaliação da 2ª curva analítica para Ceftazidima.....	83
5.2.3.3. Avaliação da 3ª curva analítica para Ceftazidima.....	84
5.2.4. Intervalo.....	85
5.2.5. Precisão do método.....	86
5.2.5.1. Repetibilidade.....	86

5.2.5.2. Precisão intermediária.....	87
5.2.6. Robustez.....	88
5.2.7. Exatidão.....	95
5.2.8. Adequação do sistema (<i>system suitability</i>).....	96
6. CONCLUSÃO.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1. INTRODUÇÃO.

1.1. O antibiótico ceftazidima.

Ceftazidima pentaidratada é um antibiótico semi-sintético beta-lactâmico de amplo espectro (Figura 1). Apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, pouco solúvel em água e metanol, praticamente insolúvel em acetona e álcool. Dissolve-se em soluções ácidas e alcalinas. A fórmula molecular é $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2 \cdot 5H_2O$ e o peso molecular é 636,65 g/mol. Sua nomenclatura química é (6R,7R)-7-[[*Z*]-2-(2-amino-4-tiazol)-2-[(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-8-oxo-3-[(1-piridínio)metil]-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]2-octeno-2-carboxilato pentaidratado.

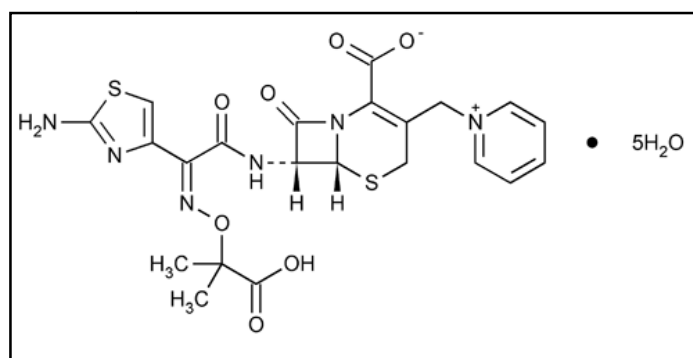


Figura 1. Estrutura química do antibiótico ceftazidima pentaidratada.

A ceftazidima é utilizada clinicamente na forma de solução injetável, administrada por via intravenosa ou intramuscular. Este fármaco não é metabolizada no organismo, sendo excretada pela urina sob a forma ativa, através da filtração glomerular. Ela atravessa a placenta rapidamente e é excretada no leite materno. Na ausência de inflamação a ceftazidima não atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica. Todavia, na presença de inflamação das meninges, são atingidos níveis terapêuticos de 4 a 20 mg/L ou mais, no líquido cefalorraquidiano (Kefadim).

A ceftazidima é bactericida, exercendo seu efeito através da inibição de enzimas responsáveis pela síntese da parede celular, tendo atividade *in vitro* contra uma ampla variedade de microrganismos gram-negativos incluindo cepas resistentes à gentamicina e a outros aminoglicosídeos. A

ceftazidima demonstrou ainda atividades contra microrganismos gram-positivos (Kefadim).

Esse fármaco é indicado no tratamento das seguintes infecções: Infecções do trato respiratório, da pele, do trato urinário, ginecológicas, do sistema nervoso central e em casos de septicemia (Kefadim).

1.2. Cromatografia líquida.

A CLAE, abreviação de cromatografia líquida de alta eficiência, é uma das mais importantes técnicas analíticas utilizadas atualmente. Ela tem se firmado nas últimas décadas como uma técnica altamente vantajosa na quantificação de diversos compostos, em diferentes matrizes. Compostos de alta ou baixa massa molecular, polímeros ou biopolímeros (proteínas) podem ser analisados por CLAE, devido ao grande número de combinações possíveis entre a fase móvel e a fase estacionária. Esta técnica também é de grande importância no controle da qualidade na indústria farmacêutica, sendo utilizada principalmente na quantificação de fármacos e suas impurezas em matérias-primas e formulações farmacêuticas (DONGRE, *et al.*, 2007; WREN, 2006).

Hoje, um dos maiores objetivos dos laboratórios analíticos de controle da qualidade farmacêutica é o desenvolvimento de procedimentos mais rápidos e eficientes para realização de análises qualitativa e quantitativa. Os tempos de análises por CLAE convencional de matérias-primas e medicamentos na maioria das vezes são maiores que 10 minutos por injeção. Como são necessárias várias injeções por amostra preparada e pelo menos duas amostragens de cada lote, o tempo total de análise frequentemente é maior que uma hora. No entanto, várias análises são realizadas além do teor. Por exemplo, o lote de um medicamento para ser liberado deve ser submetido pelo menos aos seguintes ensaios quantitativos: teor, uniformidade de conteúdo e dissolução. Esses ensaios geram um total de aproximadamente 70 injeções no cromatógrafo, não contemplando re-análise. Considerando uma corrida de 10 minutos são 12 horas de análise no equipamento, não contando o tempo de preparo de

amostra. Portanto, o desenvolvimento de métodos rápidos ou ultra-rápidos com tempos de análises inferiores a 10 minutos por injeção é de grande relevância (PEREIRA, 2008; NGUYEN, *et al.*, 2006). Com a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é possível reduzir pelo menos à metade o tempo necessário de análise o que, para uma indústria, significa que o produto vai chegar mais rápido ao mercado.

A cromatografia líquida de ultra eficiência é uma nova técnica de separação baseada no princípio da cromatografia líquida, cuja característica mais marcante é a redução do tempo de retenção dos analitos mantendo a resolução entre eles. A redução nos tempos de retenção é atingida pela utilização de colunas curtas e fases estacionárias com partículas esféricas que variam em torno de 1,7 μm a 3,0 μm de diâmetro, portanto menores que as partículas utilizadas normalmente em CLAE (KRISHNAIAH, *et al.*, 2010).

Colunas preenchidas com partículas de diâmetro inferiores a 3 μm oferecem vantagens sobre as colunas tradicionais com partículas de 3 a 10 μm , como menor tempo de análise, maior resolução e maior capacidade de picos. A equação van Deemter, descreve a relação entre eficiência, expressa pela altura de prato (H), velocidade linear da fase móvel (μ) e tamanho da partícula (d_p):

$$H = A d_p + \frac{B D_M}{\mu} + \frac{C d_p^2 \mu}{D_M}$$

Onde D_M = coeficiente de difusão do analito e A, B e C são coeficientes.

O termo do coeficiente A refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito. Esse termo pode ser minimizado usando-se colunas de tamanho reduzido, com diâmetros internos menores, com enchimentos eficientes e partículas uniformes. O termo do coeficiente B está relacionado à difusão longitudinal ou difusão do soluto na fase móvel e este termo pode ser minimizado com o uso de altas velocidades lineares da fase móvel. O termo do coeficiente C descreve a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária (MALDANER e JARDIM, 2009).

O mínimo da curva de Van Deemter representa a vazão ótima para se obter a eficiência máxima da coluna. Isto é um compromisso entre os termos B e C. Os termos A e C são influenciados pelo tamanho das partículas. As partículas menores tendem a reduzir a altura do prato e, dessa forma, são obtidas colunas com um número de pratos maiores, ou seja, mais eficientes. As partículas pequenas tendem a permitir trocas do soluto na fase móvel e nos poros das partículas mais rapidamente devido à menor profundidade dos poros. Assim, o soluto gasta um tempo menor entre a fase móvel e a fase estacionária, eluindo em picos estreitos (MALDANER e JARDIM, 2009).

Uma coluna menor permite separações mais rápidas, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna. Além disso, uma coluna menor, comparada a uma maior, empregando-se a mesma vazão de fase móvel, gasta uma menor quantidade de solvente (MALDANER e JARDIM, 2009).

A proposta deste trabalho é desenvolver e validar um método analítico por CLUE para quantificação de impurezas no antibiótico ceftazidima, visando facilidade operacional e diminuição de custo e tempo de análise.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. Metodologia analítica.

Os compêndios oficiais examinados para este trabalho se referem apenas a métodos utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de substâncias relacionadas da ceftazidima. A farmacopéia americana USP (*United State Pharmacopeia*) 36 de 2013, apresenta monografia para a ceftazidima matéria-prima e na forma farmacêutica de injetável e pó para injeção. Entretanto, as metodologias apresentadas não abordam a análise de impurezas ou substâncias relacionadas. Também não foram encontradas metodologias existentes para análise de impurezas no antibiótico cefatzidima na literatura científica. Isto é uma dificuldade para os produtores do medicamento ceftazidima, uma vez que os mesmos têm, perante a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a necessidade de apresentar tal metodologia. Sendo assim, foi necessário desenvolver uma metodologia para quantificação de impurezas, que é o objetivo deste trabalho.

Para transferir o método para a coluna de geometria menor, preenchida com partículas inferiores a 3 μm e garantir a equivalência cromatográfica, é necessário diminuir proporcionalmente o fluxo, o volume de injeção e o gradiente. Os passos para a transferência de métodos são a escolha da coluna o ajuste do fluxo de fase móvel, o ajuste do volume de injeção e o ajuste do gradiente da fase móvel (PEREIRA, 2008).

2.2. Transferência do método analítico

2.2.1. Ajuste do fluxo.

Pereira (2008) sugeriu para a adaptação do novo fluxo da fase móvel do método CLUE a expressão A (descrita na seção 4.6) que relaciona o novo fluxo ao fluxo original, diâmetros internos da nova coluna e coluna original e aos tamanhos de partícula da nova coluna e da coluna original.

2.2.2. Ajuste do volume de injeção.

Pereira (2008) sugeriu para a adaptação do novo volume de injeção do método CLUE a expressão B (descrita na seção 4.6.) que relaciona o novo volume de injeção ao volume de injeção original, diâmetros internos da nova coluna e coluna original e aos comprimentos da nova coluna e da coluna original.

2.2.3. Ajuste do perfil do gradiente.

Pereira (2008) sugeriu para a adaptação do novo perfil do gradiente da fase móvel do método CLUE a expressão C (descrita na seção 4.6.) que relaciona o volume da fase móvel a volumes das colunas original e sub-3 μm e duração de cada segmento do método CLUE.

2.3. Impurezas de processo e impurezas de degradação.

Existem dois tipos de impurezas presentes em fármacos: as impurezas de processo e impurezas de degradação. As impurezas de processo resultam da síntese do fármaco; portanto, o conhecimento deste processo é fundamental para o controle das impurezas. Uma modificação neste procedimento pode levar ao aparecimento de impurezas não previstas, portanto, qualquer modificação no processo de síntese deve ser feita com cautela e acompanhada de perto pelo controle da qualidade. As impurezas de processo do antibiótico ceftazidima são: ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), acapy (7-PYCA), TAEM (2-Mercaptobenzothiazol) e butazidima; portanto, o método analítico deve ser capaz de identificá-las e quantificá-las.

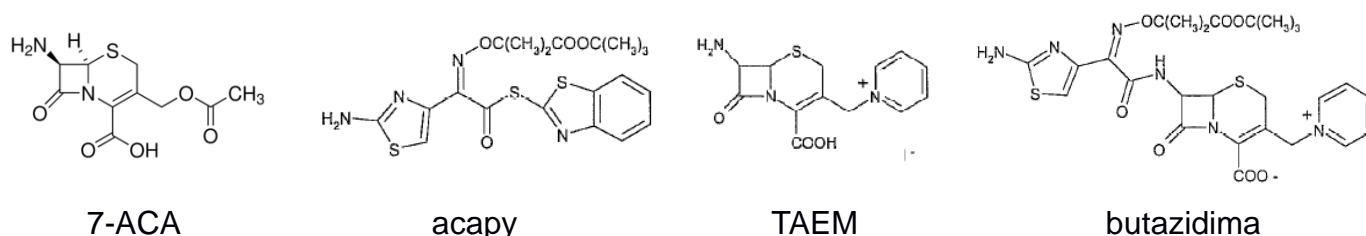
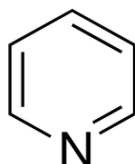


Figura 2. Estrutura química das impurezas de processo.

Já as impurezas de degradação são aquelas provenientes da decomposição química do fármaco, ou seja, são impurezas resultantes de processos degradativos como aquecimento, hidrólise, fotólise e oxidação. No caso do antibiótico ceftazidima somente a piridina é conhecida; portanto, o método analítico deve ser capaz de identificá-la e quantificá-la (MORENO, 2007).



piridina

Figura 3. Estrutura química da impureza de degradação.

A possibilidade de ocorrer modificações ou decomposições em medicamentos acabados e, conseqüentemente prejudicar a qualidade do medicamento a ser dispensado, mesmo dentro de seu prazo de validade, deve ser levada em consideração e estudada pelos fabricantes.

Como citado acima as impurezas de degradação resultam da decomposição do fármaco e a maioria dos fármacos está sujeita a alguma forma de decomposição química, particularmente em formulações líquidas. Uma das conseqüências da degradação é que preparações medicamentosas envelhecidas não apresentam mais a atividade desejada por apresentarem uma dose diminuída do fármaco. Manifestações físicas de decomposição também podem ocorrer como descoloração que frequentemente segue a fotodegradação (MORENO, 2007).

O aumento da temperatura normalmente causa um aumento significativo na velocidade de hidrólise de fármacos em solução. A temperatura acelera todos os tipos de reações químicas e no caso de formulações líquidas, podem causar evaporação e, conseqüentemente, concentração ou sedimentação do fármaco no medicamento. Oscilações de temperatura podem ainda viabilizar mudanças de retículo cristalino decorrentes de polimorfismo. De modo geral, a velocidade da reação de degradação de um fármaco duplica ou triplica para cada 10° C de aumento

da temperatura (MORENO, 2007). Por estes motivos são fundamentais os estudos de estabilidade acelerada nos quais se utilizam temperaturas elevadas favorecendo o aparecimento de substâncias de degradação que deverão ser monitoradas (MORENO, 2007).

Existem vários mecanismos de degradação das moléculas dos fármacos, todavia os processos de instabilidade mais comuns são por hidrólise, oxidação, decomposição, pirólise, fotólise, interações e efeitos de substituintes, entre outros. Além disso, os processos degradativos também podem ocorrer devido ao meio de reação, ou seja, as reações podem ser em fase homogênea (fase gasosa, em solução ou estado sólido) ou em fase heterogênea (gás-líquido, líquidos imiscíveis, gás-sólido, líquido-sólido, mistura de sólidos). Embora muitos desses processos possam ser observados através de mudanças de coloração, formação de precipitados e evolução de gases, a maioria das incompatibilidades químicas resultantes de interações que promovem alterações ou rearranjos moleculares não são visivelmente observáveis (MORENO, 2007).

A hidrólise é um processo de solvólise no qual a molécula de uma substância interage com moléculas de água, degradando-a; envolve o ataque pela água das ligações lábeis de moléculas do fármaco dissolvidas, resultando em mudanças moleculares. O processo hidrolítico é provavelmente a causa mais importante e frequente de degradação de fármacos, devido ao grande número de fármacos com grupamentos funcionais susceptíveis, principalmente ésteres e amidas. Obviamente, o volume de água presente pode exercer um efeito profundo na taxa de uma reação de hidrólise, frequentemente catalisada por íons hidrogênio ou hidroxila (MORENO, 2007).

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

antioxidantes, chamados catalisadores negativos; são muito eficazes na estabilização de produtos que sofrem uma reação em cadeia mediada por radicais livres (MORENO, 2007).

Essas substâncias podem sofrer degradação preferencial ou agir como inibidores de cadeias de radicais livres por apresentarem um potencial de oxidação menor que o ingrediente ativo. Substâncias fenólicas, aminas aromáticas e esteroides estão entre os fármacos mais susceptíveis de sofrerem hidrólise (MORENO, 2007).

A fotodegradação é a catálise pela luz de reações de degradação tais como a oxidação ou a hidrólise. A captação de luz por uma molécula produz sua ativação a partir da qual a molécula ativada pode emitir energia de frequência diferente da recebida (fluorescência ou fosforescência) ou ainda provocar a decomposição das moléculas (fotólise) (MORENO, 2007).

As reações de fotodegradação dependem da intensidade e do comprimento de onda da luz; quanto maior a intensidade e o comprimento de onda, maiores serão a velocidade e o grau de fotodegradação; portanto, a luz ultravioleta é mais deletéria que a luz visível (MORENO, 2007).

Os compostos mais sensíveis à fotodegradação são aqueles que apresentam grupos cromóforos como nitro, nitroso, cetona, sulfona, dupla ou tripla ligação. A sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número desses cromóforos na molécula e, especialmente, se estiverem conjugados, permitindo a interação com os elétrons livres. As reações catalisadas por radiações envolvem rupturas de ligações, oxidações, isomerizações, polimerizações, rearranjos e racemizações (MORENO, 2007).

2.4. Validação analítica do método (BRASIL RE 899, 2003).

A validação de métodos analíticos, parte integrante das boas práticas de laboratório surge como uma peça chave para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos e assim garantir a qualidade dos produtos.

No Brasil só foi dado à validação a devida importância a partir da edição, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, da resolução 391 de

9 de agosto de 1999. Esta resolução normatiza, disciplina e regulamenta critérios para registro de medicamentos genéricos no Ministério da Saúde, qualificando a validação analítica como um dos pré-requisitos para o registro. Desde então foram emitidas e revogadas várias legislações sempre com o intuito de complementar e aprofundar as legislações anteriores. A legislação em vigor no Brasil é a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, segundo a qual a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (LOWEN, 2003). De acordo com a tabela 1, diferentes métodos de análise requerem diferentes esquemas de validação, e estão divididos em quatro categorias. No presente trabalho utilizaremos a categoria II que se refere aos métodos analíticos para determinação de impurezas da substância ou composto de degradação em produtos farmacêuticos acabados.

Tabela 1. Características requeridas para validação pela RE nº 899.

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

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade, não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Categoria I – Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima.

Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matéria-prima.

Categoria III – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).

Categoria IV – Testes de identificação.

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Portanto, para esse trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros de acordo com a tabela 1: seletividade e especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. A seguir, a descrição de cada parâmetro avaliado.

- ⇒ Seletividade e especificidade: É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- ⇒ Linearidade: É a capacidade de uma metodologia analítica de responder à concentração do analito na amostra de acordo com um modelo linear, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. No caso do nível de impurezas deve-se demonstrar até 120% do limite máximo especificado.
- ⇒ Intervalo: É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. É derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

- ⇒ Precisão: A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Está é considerada em 3 níveis.
 - ⇒ Repetibilidade (precisão intra-corrída): Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou no mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.
 - ⇒ Precisão Intermediária (precisão intercorrída): Concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
 - ⇒ Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): Concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como estudos colaborativos, geralmente aplicados a padronização de metodologias analíticas, por exemplo, para inclusão de metodologias em farmacopéias.
- ⇒ Limite de detecção: É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável ou pela avaliação do ruído da linha de base.
- ⇒ Limite de quantificação: É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Geralmente é o limite inferior da curva de calibração.

- ⇒ Exatidão: A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.
- ⇒ Robustez: A robustez de um método analítico é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos durante o uso normal. A avaliação da robustez é realizada através pequenas variações deliberadas dos parâmetros analíticos comparando o resultado com análises realizadas de acordo com o método estabelecido.

A tabela 2 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 2. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico (BRASIL RE 899, 2003).

Preparo das amostras	<ul style="list-style-type: none">• Estabilidade das soluções analíticas• Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none">• Variação do pH da solução• Temperatura• Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	<ul style="list-style-type: none">• Variação do pH da fase móvel• Variação na composição da fase móvel• Diferentes lotes ou fabricantes de colunas• Temperaturas• Fluxo da fase móvel
Cromatografia gasosa	<ul style="list-style-type: none">• Diferentes lotes ou fabricantes de colunas• Temperaturas• Velocidade do gás de arraste

3. OBJETIVO.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia líquida de ultra eficiência, aplicável para determinação de impurezas no antibiótico Ceftazidima.

3.1. Objetivos específicos.

- ⇒ Apresentar orientações práticas de como transferir um método analítico de CLAE convencional para CLUE.
- ⇒ Validar a metodologia analítica de CLUE visando à aplicação em um laboratório de controle de qualidade.
- ⇒ Comparar o impacto das diferentes técnicas analíticas, CLAE *versus* CLUE.

4. METODOLOGIA.

4.1. Aquisição dos materiais de referência e amostras.

Os materiais de referência, excipiente e amostras foram doados pelo fabricante Antibióticos do Brasil. Os materiais de referência foram armazenados sob refrigeração e o excipiente e as amostras foram armazenados em local seco e ao abrigo da luz.

4.2. Equipamento, materiais e reagentes.

4.2.1. Equipamentos.

- ⇒ Balanças semi-analítica (modelo BP3100S), analítica (modelo CP2245) e micro-analítica (modelo XP6), fabricantes Sartorius e Mettler Toledo.
- ⇒ Potenciômetro medidor de pH com resolução de 3 casas decimais, fabricante Orion (modelo 3 Star).
- ⇒ Banho ultrassônico, fabricante Unique Clean.
- ⇒ Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Millipore (modelo Advantage A10).
- ⇒ Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência modelo 1260, fabricante Agilent, equipado com bomba quaternária com limite de pressão de até 600 bar, injetor automático refrigerado, compartimento para coluna com sistema peltier e detector de arranjos de fotodiodos.
- ⇒ Estufa com vácuo, fabricante Fischer Scientific (modelo 285).
- ⇒ Câmara de fotoestabilidade, fabricante Nova Ética.

4.2.2. Materiais e reagentes.

- ⇒ Amostra: ceftazidima pentaidratada para injeção.
- ⇒ Materiais de referência certificado (*Working standard*):
 - ⇒ Ceftazidima pentahidratada, teor 85,8%, lote WS00010.
 - ⇒ Piridina, teor 97,8%, lote 001/12.
 - ⇒ 7-PYCA (Acapy), teor 65,6%, lote WS00012.
 - ⇒ 7-ACA teor 97,8%, lote WS00012.

- ⇒ TAEM, teor 97,9%, lote WS00012.
- ⇒ Butazidima, teor 92,8%, lote WS00010.
- ⇒ Excipiente: Carbonato de sódio (Na_2CO_3) (merck).
- ⇒ Reagentes: Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (merck), octanosulfonato de sódio (panreac), ácido fosfórico (J.T.baker), hidróxido de sódio (merck), metanol grau HPLC (merck).
- ⇒ Vidrarias classe A calibradas.
- ⇒ Coluna: Shim-pack® XR-ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,2 μm de tamanho de partícula (Shimadzu).
- ⇒ Coluna Ascentis® Express ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,7 μm de tamanho de partícula (superficialmente porosa) (Supelco).

4.3. Preparação das fases móveis.

- ⇒ Fase móvel A: Pesou-se 6,5008 gramas de octanosulfonato de sódio e 2,8002 gramas de fosfato de potássio monobásico e transferiu-se para um béquer de 5 litros. Adicionou-se 2800 ml de água purificada e agitou-se até completa dissolução, ajustou-se o pH da solução para 2,00 utilizando 3,7 ml de ácido fosfórico. Em seguida adicionou-se 1200 ml de metanol e agitou-se a solução até completa homogeneização, filtrou-se a solução através de uma membrana de PTFE de 0,22 μm de porosidade.
- ⇒ Fase móvel B: Pesou-se 6,5000 gramas de octanosulfonato de sódio e 2,7994 gramas de fosfato de potássio monobásico e transferiu-se para um béquer de 5 litros. Adicionou-se 1600 ml de água purificada e agitou-se até completa dissolução, ajustou-se o pH da solução para 2,00 utilizando 2,0 ml de ácido fosfórico. Em seguida adicionou-se 2400 ml de metanol e agitou-se a solução até completa homogeneização, filtrou-se a solução através de uma membrana de PTFE de 0,22 μm de porosidade.
- ⇒ Diluente: Pesou-se 3,4975 gramas de fosfato de potássio monobásico e transferiu-se para um béquer de 5 litros, ajustou-se o

pH da solução para 6,55 utilizando 1,5 ml de hidróxido de sódio 30%. Filtrou-se a solução através de uma membrana de PTFE de 0,22 µm de porosidade.

4.4. Condições cromatográficas do método original.

As condições cromatográficas empregadas na metodologia original desenvolvida pela empresa Antibióticos do Brasil. estão apresentadas abaixo na tabela 3.

Tabela 3. Metodologia interna desenvolvida pela Antibióticos do Brasil.

Coluna	Kromasil C18 4,6 mm x 150 mm 3,5 µm
Gradiente	0 minutos – A 65 % – B 35 %
	40 minutos – A 25 % – B 75 %
	40 minutos – A 65 % – B 35 %
	60 minutos – Estabilização
Fluxo	0,50 ml/minuto
Volume de Injeção	10 µl
Temperatura da coluna	40° C
Detecção	235 nm

4.5. Preparação das soluções.

4.5.1. Mistura das impurezas 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima com o ativo ceftazidima.

As soluções estoque de cada substância de referência foram preparadas da seguinte maneira:

⇒ Solução estoque 7-PYCA: Pesou-se 3,80 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).

- ⇒ Solução estoque 7-ACA: Pesou-se 2,70 mg do material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução estoque TAEM: Pesou-se 2,80 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com acetonitrila.
- ⇒ Solução estoque butazidima: Pesou-se 2,70 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque piridina: Pipetou-se 10 µl do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico 200 ml em seguida, diluiu-se para o volume com água purificada.
- ⇒ Solução estoque ceftazidima: Pesou-se 2,90 mg do material de referência ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com uma solução diluente.

Pipetou-se 1 ml de cada solução estoque contendo os materiais de referência, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 ml em seguida, diluiu-se para o volume com diluente. Após a preparação a solução final foi analisada.

4.5.2. Preparo da solução amostra contendo as impurezas.

- ⇒ Solução estoque 7-PYCA: Pesou-se 3,81 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque 7-ACA: Pesou-se 2,52 mg do material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução estoque TAEM: Pesou-se 2,71 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com acetonitrila.

- ⇒ Solução estoque butazidima: Pesou-se 2,70 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico 50 ml em seguida, diluiu-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque piridina: Pipetou-se 10 µl do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico 200 ml em seguida, diluiu-se para o volume com água purificada.
- ⇒ Solução amostra de ceftazidima: Pesou-se 50,21 mg de amostra de ceftazidima e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, em seguida, adicionou-se 10 ml de cada solução estoque das impurezas. Em seguida, diluiu-se para o volume com diluente. Após a preparação a solução final foi analisada.

4.6. Proposta para transferência e desenvolvimento do método.

4.6.1. Escolha da coluna.

O gráfico 1 demonstra o poder de resolver picos nas colunas cromatográficas em função do tamanho da partícula e do comprimento da coluna. Em uma transferência analítica é fundamental a equivalência de colunas em relação ao poder de resolver picos.

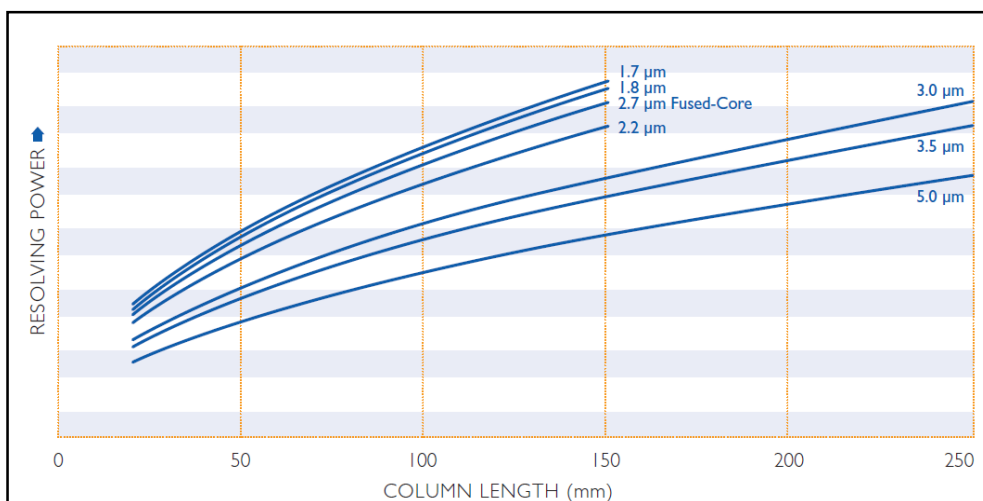


Gráfico 1. Poder de resolver picos em função do tamanho da partícula e do comprimento da coluna (MAC MOD ANALYTICAL, 2012).

4.6.2. Ajuste do fluxo (expressão A).

Abaixo segue a equação utilizada para calcular o novo fluxo da fase móvel do método (PEREIRA, 2008).

$$F_2 = F_1 \times \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \times \frac{d_{p1}}{d_{p2}}$$

F_1 = fluxo original (ml/min)

F_2 = novo fluxo (ml/min)

d_{c1} = diâmetro interno da coluna original (mm)

d_{c2} = diâmetro interno da nova coluna (mm)

d_{p1} = tamanho da partícula (μm)

d_{p2} = tamanho da nova partícula (μm)

4.6.3. Ajuste do volume de injeção (expressão B).

Abaixo segue a equação utilizada para calcular o novo volume de injeção do método (PEREIRA, 2008).

$$V_{i2} = V_{i1} \times \frac{d_{c2}^2 \times L_2}{d_{c1}^2 \times L_1}$$

V_{i1} = volume original de injeção (μl)

V_{i2} = novo volume de injeção (μl)

d_{c1} = diâmetro interno da coluna original (mm)

d_{c2} = diâmetro da nova coluna (mm)

L_1 = comprimento original da coluna (mm)

L_2 = comprimento da nova coluna (mm)

4.6.4. Ajuste do perfil do gradiente (expressão C).

⇒ Cálculo do volume da fase móvel, a partir do fluxo e da duração de cada segmento.

$$V_{FM} = F \times D$$

V_{FM} = volume de fase móvel (ml)

F = fluxo (ml/min)

D = duração do segmento (min)

⇒ Cálculo do volume da coluna do método original.

$$V_c = 0,68 \times \pi \times r_i^2 \times L$$

V_c = volume da coluna (ml)

L = comprimento da coluna (cm)

r_i = raio da coluna (cm)

Valor 0,68 = fator que corrige o volume da coluna, levando em conta seu volume morto.

$\pi = 3,14$.

⇒ Cálculo da razão (R) entre os volumes de fase móvel e volume da coluna do método original.

$$(R) = \frac{V_{FM}}{V_c}$$

V_{FM} = Volume de fase móvel

V_c = Volume da coluna do método original

⇒ A partir da razão (R) calculada e do volume da coluna sub-3 μm escolhida, o volume de fase móvel em cada segmento do método CLUE deve ser calculado.

$$V_{FM} = (R) \times V_c$$

V_{FM} = volume de fase móvel

(R) = razão entre volume de fase móvel e volume da coluna original

V_c = volume da coluna sub-3 μm

⇒ Cálculo da duração em cada segmento em unidade de tempo.

$$\text{Duração em Minutos} = \frac{V_{FM}}{F}$$

V_{FM} = Volume de fase móvel calculado em cada segmento

F = Fluxo em ml/minuto do método rápido calculado no item

4.6.2.

Tabela 4. Proporções das fases móveis A e B do método rápido (teórico).

Tempo	% de Fase Móvel A	% de Fase Móvel B
0,00	65	35
7,10	25	75
7,20	65	35
11,00	65	35

4.6.5. Colunas cromatográficas.

⇒ **Coluna Shim-pack® XR-ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,2 µm de tamanho de partícula (Shimadzu).**

Definido as condições analíticas e a coluna a ser utilizada, preparou-se uma solução mistura das impurezas de 7-ACA, piridina, 7-PYCA, ceftazidima, TAEM e butazidima na concentração 0,005 mg/ml em diluente conforme descrito no item 4.5. Realizou-se a injeção da solução mistura das impurezas no equipamento a fim de assegurar que os parâmetros calculados para o método rápido e a coluna escolhida eram ideais para a separação das impurezas.

⇒ **Coluna Ascentis® Express ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,7 µm de tamanho de partícula (superficialmente porosa) (Supelco).**

Em outro dia se preparou uma outra solução mistura das impurezas de 7-ACA, piridina, 7-PYCA, ceftazidima, TAEM e butazidima na concentração 0,005 mg/ml em diluente conforme descrito no item 4.5. Realizou-se a injeção da solução mistura das impurezas no equipamento a fim de avaliar a performance de uma segunda coluna na separação das impurezas.

4.7. Condições cromatográficas do método ultra eficiente.

Na tabela 5 estão descritas as condições cromatográfica do método ultra eficiente calculado conforme demonstrado no item “4.6. Proposta para transferência e desenvolvimento do método”.

Tabela 5. Metodologia final CLUE utilizada para quantificar impurezas no antibiótico ceftazidima.

Coluna	Shim-pack® XR-ODS de 100 mm x 3,0 mm e 2,2 µm.
	0,0 minutos – A 65 % – B 35 %
	9,5 minutos – A 25 % – B 75 %
Gradiente	11,0 minutos – A 25 % – B 75 %
	11,1 minutos – A 65 % – B 35 %
	15,0 minutos – Estabilização
Fluxo	0,60 ml/minuto
Volume de Injeção	3 µl
Temperatura da coluna	40° C
Detecção	235 nm

4.8. Validação analítica do método CLUE.

4.8.1. Especificidade/seletividade.

Na especificidade/seletividade as amostras foram submetidas às condições de degradação como: exposição à luz branca e ultravioleta, exposição à alta temperatura, exposição à hidrólise ácida, básica e oxidação. Após as exposições as amostras foram analisadas a fim de avaliar a capacidade do método em separar as impurezas conhecidas e desconhecidas (impurezas de degradação) do produto e também avaliar a pureza espectral e do pico de ceftazidima através da leitura na faixa de 200 a 400 nm.

⇒ **Exposição à luz.**

Os frascos de amostras contendo 1000 mg de ceftazidima foram expostas às condições de 1,2 milhão lux. hora de luz branca fria e 200 watt hora/m² de luz ultravioleta simultaneamente.

⇒ **Exposição à temperatura.**

Os frascos de amostras contendo 1000 mg de ceftazidima foram expostas a uma temperatura de 80°C por 7 dias.

⇒ **Exposição à hidrólise ácida.**

Na hidrólise ácida testou-se a amostra em duas concentrações de ácido clorídrico 0,1 normal e 1 normal. Pesou-se 500,1 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 5 ml de ácido clorídrico 0,1 normal e manteve-se o balão em repouso por 24 horas. Após as 24 horas neutralizou-se a reação de hidrólise com adição de 5 ml de hidróxido de sódio 0,1 normal ao balão contendo a amostra em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a neutralização a amostra foi analisada.

Novamente pesou-se 500,2 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 5 ml de ácido clorídrico 1 normal e manteve-se o balão em repouso por 24 horas. Após as 24 horas neutralizou-se a reação de hidrólise com adição de 5 ml de hidróxido de sódio 1 normal ao balão contendo a amostra em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a neutralização a amostra foi analisada.

⇒ **Exposição à hidrólise básica.**

Na hidrólise básica testou-se a amostra em dois tempos de exposição, 24 horas e 3 horas. Pesou-se 500,0 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 5 ml de hidróxido de sódio 0,1 normal e manteve-se o balão em repouso por 24 horas. Após as 24 horas neutralizou-se a reação de hidrólise com adição de 5 ml de ácido clorídrico

0,1 normal ao balão contendo a amostra em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a neutralização a amostra foi analisada.

Novamente pesou-se 500,1 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 5 mL de hidróxido de sódio 0,1 normal e manteve-se o balão em repouso por 3 horas. Após as 3 horas neutralizou-se a reação de hidrólise com adição de 5 ml de ácido clorídrico 0,1 normal ao balão contendo a amostra em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a neutralização a amostra foi analisada.

⇒ **Exposição à oxidação.**

Na oxidação testou-se a amostra em dois tempos de exposição, 24 horas e 3 horas. Pesou-se 500,2 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 5 ml de peróxido de hidrogênio 0,3% e manteve-se o balão em repouso por 24 horas em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a exposição, a amostra foi analisada.

Novamente pesou-se 500,1 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, adicionou-se 5 ml de peróxido de hidrogênio 0,3% e manteve-se o balão em repouso por 3 horas em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a exposição à amostra foi analisada.

⇒ **Amostra controle.**

Pesou-se 500,2 mg de amostra de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a preparação a amostra foi analisada. Utilizou-se a amostra controle para calcular a porcentagem de degradação das amostras expostas ao estudo de luz, aquecimento, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação.

⇒ **Placebo (Excipiente).**

Pesou-se 60,1 mg de amostra de carbonato de sódio, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 ml em seguida

dilui-se para o volume com diluente. Após a preparação a amostra foi analisada.

⇒ **Mistura das impurezas 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima com o ativo ceftazidima.**

Pesou-se 3,81 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50), Pesou-se 2,70 mg da material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente, Pesou-se 2,80 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com acetonitrila, Pesou-se 2,71 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50), Pipetou-se 10 µl do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico de 200 ml em seguida dilui-se para o volume com água purificada, Pesou-se 2,91 mg do material de referência ceftazidima, e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

Pipetou-se 1 ml de cada solução estoque contendo os materiais de referência, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a preparação a amostra foi analisada.

4.8.2. Limite de detecção e quantificação.

Para verificação dos limites de detecção e quantificação preparou-se uma solução estoque do material de referência ceftazidima, na concentração de 1,0 mg/ml e a partir desta preparou-se 5 níveis de concentração. As concentrações utilizadas no estudo foram 0,00015

mg/ml, 0,00025 mg/ml, 0,00040 mg/ml, 0,00050 mg/ml e 0,00060 mg/ml. A análise foi realizada injetando-se cada concentração em triplicata.

4.8.2.1. Confeção da curva analítica.

- ⇒ Solução estoque de ceftazidima: Pesou-se 24,03 mg do material de referência de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 20 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,00015 mg/ml: Pipetou-se 15 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,00026 mg/ml: Pipetou-se 25 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,00041 mg/ml: Pipetou-se 40 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,00052 mg/ml: Pipetou-se 50 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,00062 mg/ml: Pipetou-se 60 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.

4.8.2.2. Avaliação das curvas analíticas.

- ⇒ **Solução limite de detecção.**
- ⇒ Solução estoque de ceftazidima: Pesou-se 7,70 mg do material de referência de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução limite de detecção de ceftazidima: Pipetou-se 40 µl da solução estoque de ceftazidima, transferiu-se para um balão

volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução limite de detecção de ceftazidima nº 2: Pipetou-se 100 µl da solução estoque de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

Após a preparação a solução limite de detecção foi analisada 3 vezes.

⇒ **Solução limite de quantificação.**

⇒ Solução limite de quantificação de ceftazidima: Pipetou-se 100 µl da solução estoque de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução limite de quantificação de ceftazidima nº 2: Pipetou-se 200 µl da solução estoque de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

Após a preparação a solução limite de quantificação foi analisada 6 vezes.

4.8.3. Linearidade.

Para verificação da linearidade preparou-se 3 soluções estoque do material de referência ceftazidima, na concentração de 0,05 mg/ml e a partir destas soluções preparou-se 6 níveis de concentração. As concentrações utilizadas no estudo foram 0,00013 mg/ml, 0,0015 mg/ml, 0,0025 mg/mL, 0,0040 mg/ml, 0,0050 mg/ml e 0,0060 mg/ml, o que corresponde às concentrações de 0,026%, 0,3%, 0,5%, 0,8%, 1,0% e 1,2% da concentração nominal da amostra. Após a preparação as soluções foram analisadas.

4.8.3.1. Confeção das curvas analíticas.

⇒ Linearidade nº 1.

⇒ Solução estoque de ceftazidima: Pesou-se 5,85 mg do material de referência de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,00013 mg/ml: Pipetou-se 260 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0015 mg/ml: Pipetou-se 3 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0025 mg/ml: Pipetou-se 5 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0040 mg/ml: Pipetou-se 8 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0050 mg/ml: Pipetou-se 10 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0060 mg/ml: Pipetou-se 6 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Linearidade nº 2.

⇒ Solução estoque de ceftazidima: Pesou-se 5,89 mg do material de referência de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,00013 mg/ml: Pipetou-se 260 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

- ⇒ Solução 0,0015 mg/ml: Pipetou-se 3 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0025 mg/ml: Pipetou-se 5 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0040 mg/ml: Pipetou-se 8 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0051 mg/ml: Pipetou-se 10 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0061 mg/ml: Pipetou-se 6 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ **Linearidade nº 3.**
- ⇒ Solução estoque de ceftazidima: Pesou-se 5,86 mg do material de referência de ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,00013 mg/ml: Pipetou-se 260 µl da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0015 mg/ml: Pipetou-se 3 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0025 mg/ml: Pipetou-se 5 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução 0,0040 mg/ml: Pipetou-se 8 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0050 mg/ml: Pipetou-se 10 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.

⇒ Solução 0,0060 mg/ml: Pipetou-se 6 ml da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.

⇒ **Avaliação das curvas analíticas.**

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), utilizou-se uma planilha do Excel®, onde foram imputados os dados adquiridos (concentrações do analito x áreas) para obter os valores do coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2), coeficiente linear (intersecção com o eixo y), coeficiente angular, soma residual dos quadrados e desvio padrão relativo da curva.

4.8.4. Intervalo.

Será avaliado através do parâmetro de linearidade, exatidão e precisão.

4.8.5. Precisão do método.

A precisão do método foi realizada através da repetibilidade e precisão intermediária.

4.8.5.1. Repetibilidade.

⇒ **Preparo da solução padrão de ceftazidima.**

Pesou-se 58,0 mg do material de referência ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.

⇒ **Preparo da solução amostra contendo as impurezas.**

⇒ Solução estoque 7-PYCA: Pesou-se 3,80 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida diluiu-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).

- ⇒ Solução estoque 7-ACA: Pesou-se 2,62 mg do material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução estoque TAEM: Pesou-se 2,80 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com acetonitrila.
- ⇒ Solução estoque butazidima: Pesou-se 2,73 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque piridina: Pipetou-se 10 µl do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico de 200 ml em seguida dilui-se para o volume com água purificada.
- ⇒ Solução amostra de ceftazidima: Pesou-se 49,2 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 1), pesou-se 50,8 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 2), pesou-se 50,0 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 3), pesou-se 50,0 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 4), pesou-se 50,2 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 5) e pesou-se 51,2 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 6) e transferiu-se para 6 balões volumétricos de 100 ml separadamente, em seguida adicionou-se 10 ml de cada solução estoque das impurezas em cada balão. Em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a preparação as amostras foram analisadas.

$$\% \text{ da impureza} = \frac{A_{\text{impureza}}}{A_{\text{padrão}}} \times \frac{M_{\text{padrão}}}{100 \text{ ml}} \times P_{\text{padrão}} \times \frac{100 \text{ ml}}{M_{\text{amostra}}} \times 100\%$$

Onde:

A_{impureza} = Área da impureza.

$A_{\text{padrão}}$ = Área do padrão.

$M_{\text{padrão}}$ = Massa do padrão.

M_{amostra} = Massa da amostra.

$P_{\text{padrão}}$ = Potência do padrão.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100\%$$

Onde:

DP = Desvio Padrão.

CMD = Concentração Média Determinada.

4.8.5.2. Precisão intermediária.

⇒ **Preparo da solução padrão de ceftazidima.**

Pesou-se 58,0 mg do material de referência ceftazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.

⇒ **Preparo da solução amostra contendo as impurezas.**

⇒ Solução estoque 7-PYCA: Pesou-se 3,80 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida diluiu-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).

⇒ Solução estoque 7-ACA: Pesou-se 2,73 mg do material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida diluiu-se para o volume com diluente.

⇒ Solução estoque TAEM: Pesou-se 2,77 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida diluiu-se para o volume com acetonitrila.

⇒ Solução estoque butazidima: Pesou-se 2,72 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida diluiu-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).

⇒ Solução estoque piridina: Pipetou-se 10 µl do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico de 200 ml em seguida diluiu-se para o volume com água purificada.

⇒ Solução amostra de ceftazidima: Pesou-se 51,7 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 1), pesou-se 50,1 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 2), pesou-se 49,7 mg de amostra de

ceftazidima (Preparação 3), pesou-se 49,9 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 4), pesou-se 50,4 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 5) e pesou-se 50,0 mg de amostra de ceftazidima (Preparação 6) e transferiu-se para 6 balões volumétricos de 100 ml separadamente, em seguida adicionou-se 10 ml de cada solução estoque das impurezas em cada balão. Em seguida dilui-se para o volume com diluente. Após a preparação as amostras foram analisadas.

$$\% \text{ da impureza} = \frac{A_{\text{impureza}}}{A_{\text{padrão}}} \times \frac{M_{\text{padrão}}}{100 \text{ ml}} \times P_{\text{padrão}} \times \frac{100 \text{ ml}}{M_{\text{amostra}}} \times 100\%$$

Onde:

A_{impureza} = Área da impureza.

$A_{\text{padrão}}$ = Área do padrão.

$M_{\text{padrão}}$ = Massa do padrão.

M_{amostra} = Massa da amostra.

$P_{\text{padrão}}$ = Potência do padrão.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100\%$$

Onde:

DP = Desvio Padrão.

CMD = Concentração Média Determinada.

4.8.6. Robustez.

Para realização da robustez, preparou-se uma solução do material referência de ceftazidima a 100% da concentração do teste, contendo quantidades conhecidas das impurezas: 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima na concentração de 1,0% da concentração nominal da amostra, o que equivale à concentração máxima permitida pela especificação do produto. Realizou-se injeções dessa solução em triplicata, nas condições analíticas descritas na tabela 6.

- ⇒ **Preparo da solução de referência contendo as impurezas.**
- ⇒ Solução estoque 7-PYCA: Pesou-se 3,82 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque 7-ACA: Pesou-se 2,61 mg do material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução estoque TAEM: Pesou-se 2,55 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com acetonitrila.
- ⇒ Solução estoque butazidima: Pesou-se 2,72 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque piridina: Pipetou-se 10 µl do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico de 200 ml em seguida dilui-se para o volume com água purificada.
- ⇒ Solução do material de referência de ceftazidima: Pesou-se 58,0 mg do material de referência de ceftazidima e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, em seguida adicionou-se 10 ml de cada solução estoque das impurezas. Em seguida dilui-se para o volume com diluente.

Tabela 6. Variações das condições analíticas do estudo de robustez.

Condições	PARÂMETRO			
	Fluxo	Forno	pH fase móvel	Coluna
Original (E)	0,6 ml/min.	40°C	2,00	A
Condição A	0,6 ml/min.	44°C	2,00	A
Condição B	0,6 ml/min.	36°C	2,00	A
Condição C	0,66 ml/min.	40°C	2,00	A
Condição D	0,54 ml/min.	40°C	2,00	A

A: Coluna Shim-pack® XR-ODS 3,0 x 100 mm 2,2 µm.

As alterações nas condições analíticas estão descritas em negrito.

⇒ Equação utilizada para quantificação das impurezas na amostra.

$$\% \text{ da impureza} = \frac{A_{\text{impureza}}}{A_{\text{padrão}}} \times \frac{M_{\text{padrão}}}{100 \text{ ml}} \times P_{\text{padrão}} \times \frac{100 \text{ ml}}{M_{\text{amostra}}} \times 100\%$$

Onde:

A_{impureza} = Área da impureza.

$A_{\text{padrão}}$ = Área do padrão.

$M_{\text{padrão}}$ = Massa do padrão.

M_{amostra} = Massa da amostra.

$P_{\text{padrão}}$ = Potência do padrão.

4.8.7. Exatidão.

Para determinação da exatidão preparou-se 9 soluções de amostras de ceftazidima a 100% da concentração do teste contendo quantidades conhecidas das impurezas: 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima na concentração de 0,8%, 1,0% e 1,2% da concentração nominal da amostra (concentração baixa, média e alta) o que equivale à concentração de 80%, 100% e 120% da concentração nominal das impurezas de 1%. Preparou-se também uma solução amostra controle que foi analisada no equipamento. A amostra controle foi injetada somente uma alíquota. As demais soluções realizou-se injeções em triplicata.

⇒ **Preparo da solução amostra contendo as impurezas.**

- ⇒ Solução estoque 7-PYCA: Pesou-se 3,93 mg do material de referência 7-PYCA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque 7-ACA: Pesou-se 2,59 mg do material de referência 7-ACA, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução estoque TAEM: Pesou-se 2,54 mg do material de referência TAEM, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com acetonitrila.
- ⇒ Solução estoque butazidima: Pesou-se 2,72 mg do material de referência butazidima, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml em seguida dilui-se para o volume com uma solução de acetonitrila:água (50:50).
- ⇒ Solução estoque piridina: Pesou-se 24,3 mg do material de referência piridina, transferiu-se para um balão volumétrico de 500 ml em seguida dilui-se para o volume com água purificada.
- ⇒ Solução padrão de trabalho: Pipetou-se 1 ml de cada solução estoque das impurezas e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 ml, em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução amostra de ceftazidima 80%: Pesou-se 50,1 mg de amostra de ceftazidima e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, em seguida adicionou-se 8 ml de cada solução estoque das impurezas. Em seguida dilui-se para o volume com diluente.
- ⇒ Solução amostra de ceftazidima 100%: Pesou-se 50,1 mg de amostra de ceftazidima e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, em seguida adicionou-se 10 ml de cada solução estoque das impurezas. Em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução amostra de ceftazidima 120%: Pesou-se 49,9 mg de amostra de ceftazidima e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, em seguida adicionou-se 12 ml de cada solução estoque das impurezas. Em seguida dilui-se para o volume com diluente.

⇒ Solução amostra controle de ceftazidima: Pesou-se 60,1 mg de amostra de ceftazidima e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml, em seguida dilui-se para o volume com diluente.

Após a aquisição dos dados (cromatogramas) avaliou-se a recuperação de cada composto nas amostras utilizando a equação abaixo.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100\%$$

4.8.8. Adequação do sistema (*system suitability*).

Realizou-se o teste de adequação do sistema injetando 5 vezes uma solução de referência de ceftazidima a 100% da concentração do teste, contendo quantidades conhecidas das impurezas: 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima na concentração de 1,0% da concentração nominal da amostra e avaliando o desvio padrão analítico (DPR) para o pico de ceftazidima e a resolução entre os picos de 7-ACA, piridina, 7-PYCA, ceftazidima, TAEM e butazidima. A solução de referência analisada no teste de adequação do sistema foi à mesma utilizada do parâmetro da robustez.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1. Transferência e desenvolvimento do método analítico ultra eficiente.

Na transferência e desenvolvimento do método, objetivou-se encontrar condições analíticas que permitissem uma separação adequada em um tempo inferior ao método original para uso em rotina. Como pode ser observado no item 4.6., realizou-se a avaliação das colunas com tamanho de partícula inferior a 3 μm a serem utilizadas e os cálculos necessários para obter as novas condições analíticas do método, que encontram-se listadas na tabela 7.

Tabela 7. Metodologia final CLUE utilizada para quantificar impurezas no antibiótico ceftazidima.

Coluna	Shim-pack® XR-ODS de 100 mm x 3,0 mm e 2,2 μm .
	0,0 minutos – A 65 % – B 35 %
Gradiente	7,1 minutos – A 25 % – B 75 %
	7,2 minutos – A 65 % – B 35 %
	15,0 minutos – A 65 % – B 35 %
Fluxo	0,60 ml/minuto
Volume de Injeção	3 μl
Temperatura da coluna	40° C
Detecção	235 nm

5.1.1. Verificação das condições analíticas do método.

5.1.1.1. Testes utilizando a coluna Shim-pack® XR-ODS.

Realizou-se injeção da solução mistura das impurezas e no equipamento contendo a coluna Shim-pack® XR-ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,2 μm de tamanho de partícula (Shimadzu), a fim de assegurar que os parâmetros calculados para o método rápido e a coluna escolhida eram ideais para a

separação das impurezas. Após o término da análise observou-se que o composto butazidima estava eluindo muito próximo ao final do gradiente das fases móveis, e que a separação entre os compostos 7-ACA e piridina não estava boa, conforme pode ser observado na figura 4.

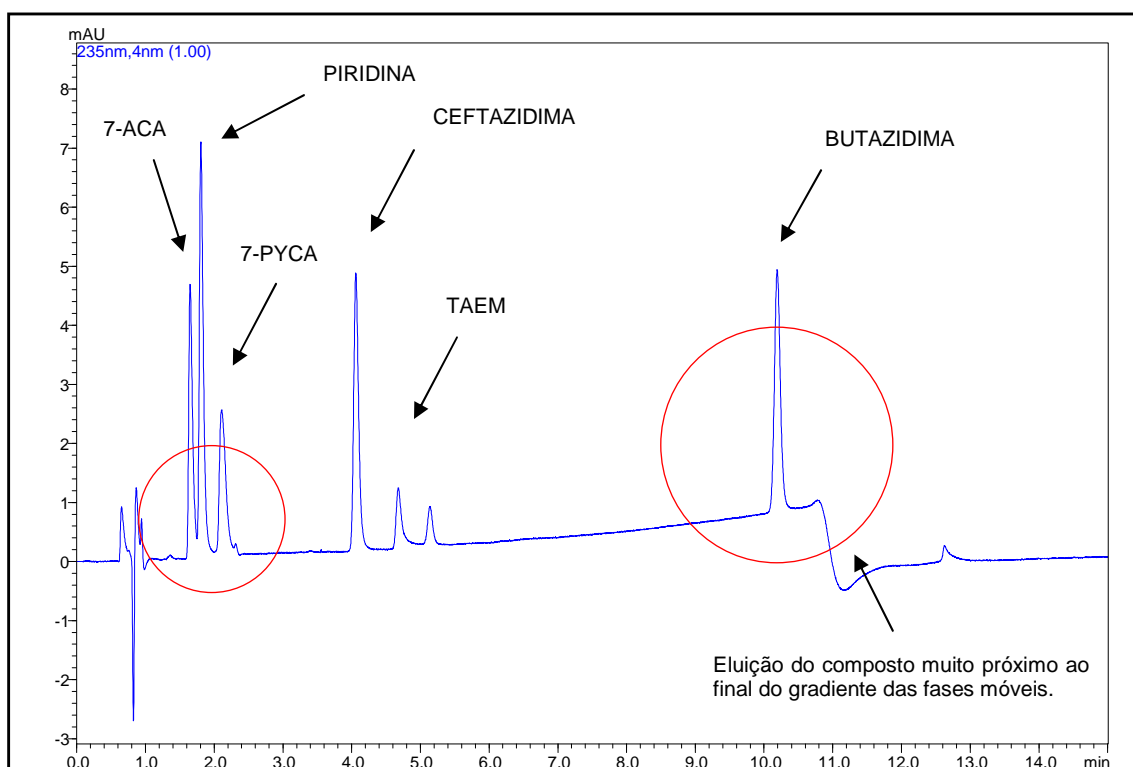


Figura 4. Cromatograma das impurezas com a coluna Shim-pack® XR-ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,2 µm de tamanho de partícula.

5.1.1.2. Testes utilizando a coluna Ascentis® Express ODS.

Preparou-se uma nova solução mistura das impurezas e instalou-se uma nova coluna no equipamento, Ascentis® Express ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,7 µm de tamanho de partícula (superficialmente porosa) (Supelco), e realizou-se a injeção da solução no equipamento. Após o término da análise observou-se que o problema da eluição da impureza butazidima foi solucionado, porém, a separação entre os compostos 7-ACA e piridina piorou

conforme figura 5. Então suspeitou-se que o problema na resolução entre os compostos 7-ACA e piridina estaria relacionado ao volume extra coluna causado pelo excesso de tubulação entre a saída da coluna e a entrada do detector. O comprimento da tubulação localizada entre a saída da coluna e entrada do detector era de aproximadamente 500 mm e diâmetro interno de 0,3 mm. Realizando o cálculo do volume dessa tubulação utilizando como base os valores da tabela 8, chega-se ao valor de aproximadamente 26 µl, Foi então realizada a substituição da tubulação por outra própria para uso em CLUE de comprimento de 180 mm e diâmetro interno de 0,13 mm; o volume dessa tubulação foi calculado em 2,3 µl, ou seja, uma redução maior que 90% no volume.

Após os ajustes na tubulação uma nova injeção foi realizada no equipamento, agora utilizando uma preparação da amostra a 100% da concentração do teste, contendo quantidades conhecidas das impurezas: 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima na concentração de 1,0% da concentração nominal da amostra, com o objetivo de avaliar a separação dos compostos em meio contendo amostra. Após o término da análise observou-se que os compostos 7-ACA e piridina não obtiveram separação satisfatória, e que o composto TAEM estava co-eluído com o pico de ceftazidima conforme figura 6, então concluiu-se que mesmo após os ajustes na tubulação, a coluna Ascentis® Express ODS não demonstrou ser adequada para essa análise com o gradiente programado.

Tabela 8. Volume de tubos capilares (MAC MOD ANALYTICAL, 2012).

D.I. (polegadas)	D.I. (mm)	µl/cm
0,005	0,127	0,13
0,007	0,178	0,25
0,009	0,229	0,41
0,010	0,254	0,51

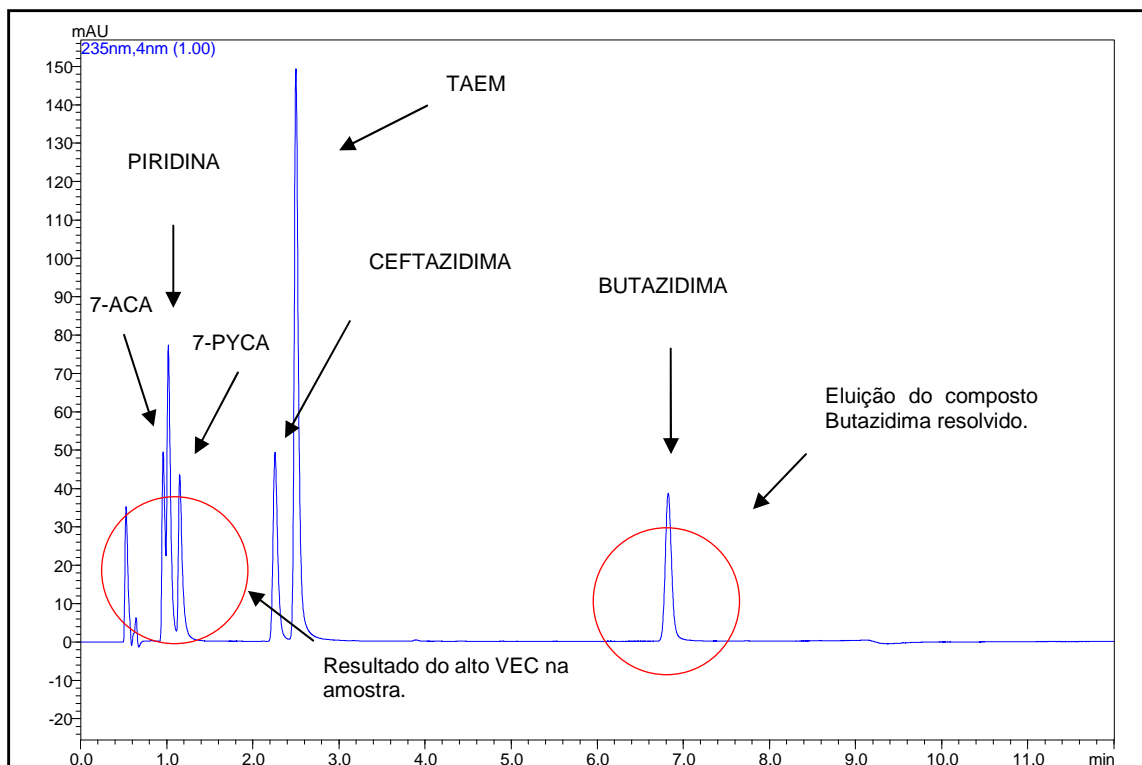


Figura 5. Cromatograma das impurezas com a coluna Ascentis® Express ODS.

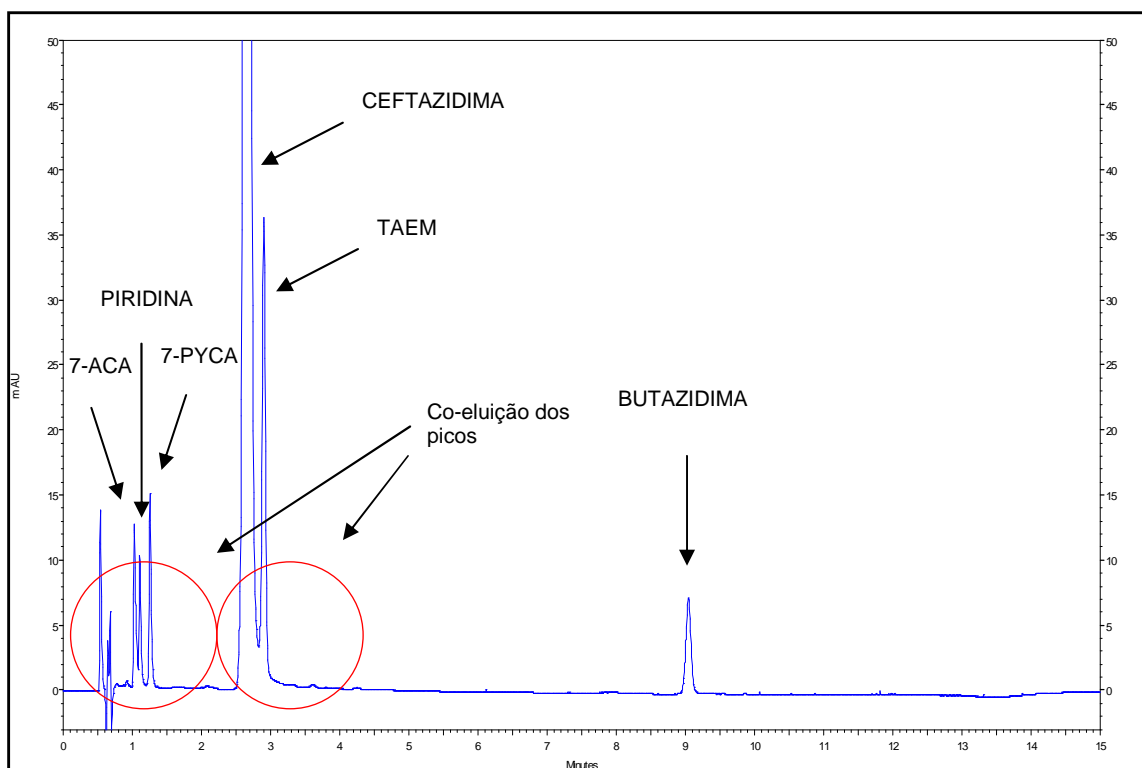


Figura 6. Cromatograma da amostra contendo as impurezas com a coluna Ascentis® Express ODS.

5.1.1.3. Ajuste no gradiente de proporção das fases móveis.

Para o teste utilizando a coluna Shim-pack® XR-ODS, além da substituição da tubulação, realizou-se também ajustes no gradiente de proporção das fases móveis. O gradiente foi ajustado de modo a evitar que o pico da impureza butazidima eluísse próximo ao final da corrida cromatográfica. Após os ajustes realizou-se uma nova injeção da amostra a 100% da concentração do teste, contendo quantidades conhecidas das impurezas: 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima na concentração de 1,0% da concentração nominal da amostra, voltando a utilizar a coluna Shim-pack® XR-ODS de 100 mm comprimento x 3,0 mm de diâmetro interno, 2,2 µm de tamanho de partícula. Após o término da análise observou-se que os compostos 7-ACA e piridina obtiveram separação completa, e que o composto butazidima eluiu em tempo ideal como apresentado na figura 7. Portanto, após os ajustes na tubulação e no gradiente da fase móvel a coluna Shim-pack® XR-ODS demonstrou resultados mais promissores para essa análise.

Na tabela 9, é descrito o método de CLUE final proposto para quantificação de impurezas no antibiótico ceftazidima.

Tabela 9. Método ultra eficiente após ajustes.

Coluna	Shim-pack® XR-ODS de 100 mm x 3,0 mm e 2,2 µm.
Gradiente	0,0 minutos – A 65 % – B 35 %
	9,5 minutos – A 25 % – B 75 %
	11,0 minutos – A 25% – B 75 %
	11,1 minutos – A 65 % – B 35 %
	15,0 minutos – A 65 % – B 35 %
Vazão	0,60 ml/minutos
Volume de Injeção	3 µl
Temperatura da coluna	40° C
Deteccão	235 nm

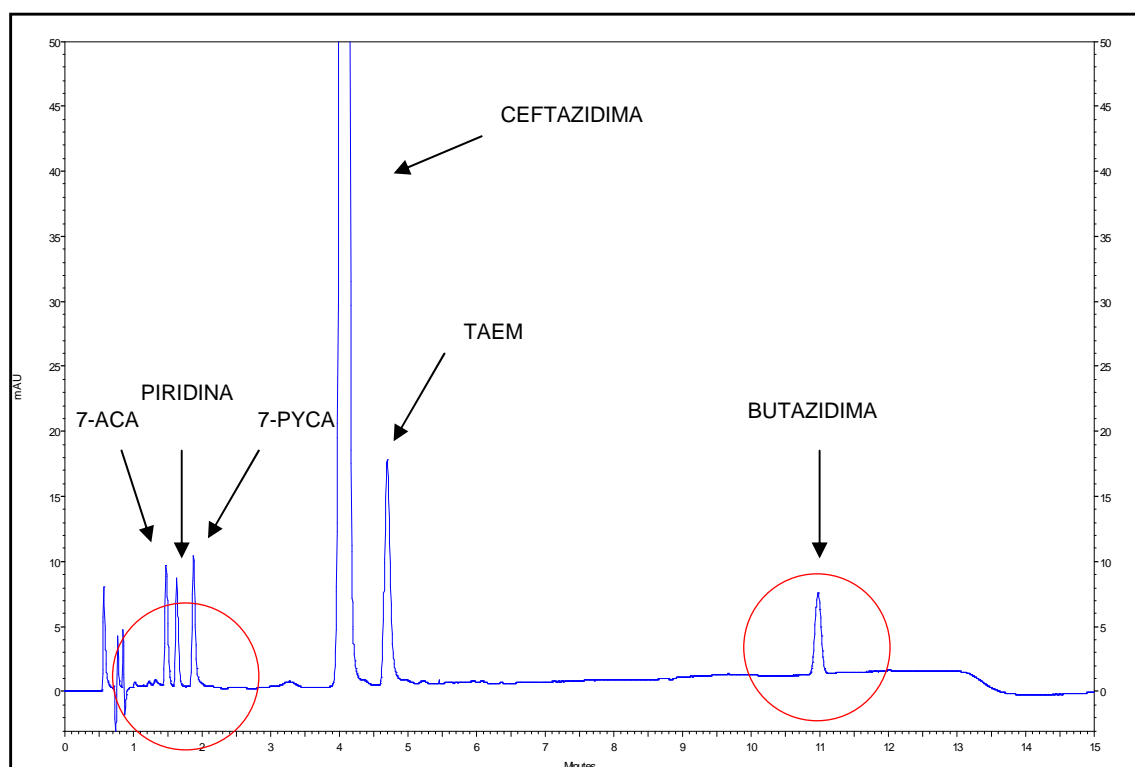


Figura 7. Cromatograma da amostra contendo as impurezas com a coluna Shim-pack® XR-ODS.

5.2. Validação do método analítico de CLUE.

Os parâmetros avaliados durante o processo de validação foram aqueles exigidos para testes quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas. Mesmo que o limite de detecção não seja exigido, foi avaliado como um parâmetro a mais. Foram avaliados os parâmetros seletividade/especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, intervalo, precisão do método, robustez, exatidão e adequação do sistema (*system suitability*).

5.2.1. Especificidade/seletividade.

Analisou-se uma preparação da amostra de ceftazidima armazenada em condições normais como amostra controle a fim de utilizá-la para calcular a porcentagem de degradação das amostras expostas as condições de degradações, e avaliar o seu perfil cromatográfico conforme figura 8. O espectrograma da ceftazidima é ilustrado na figura 9.

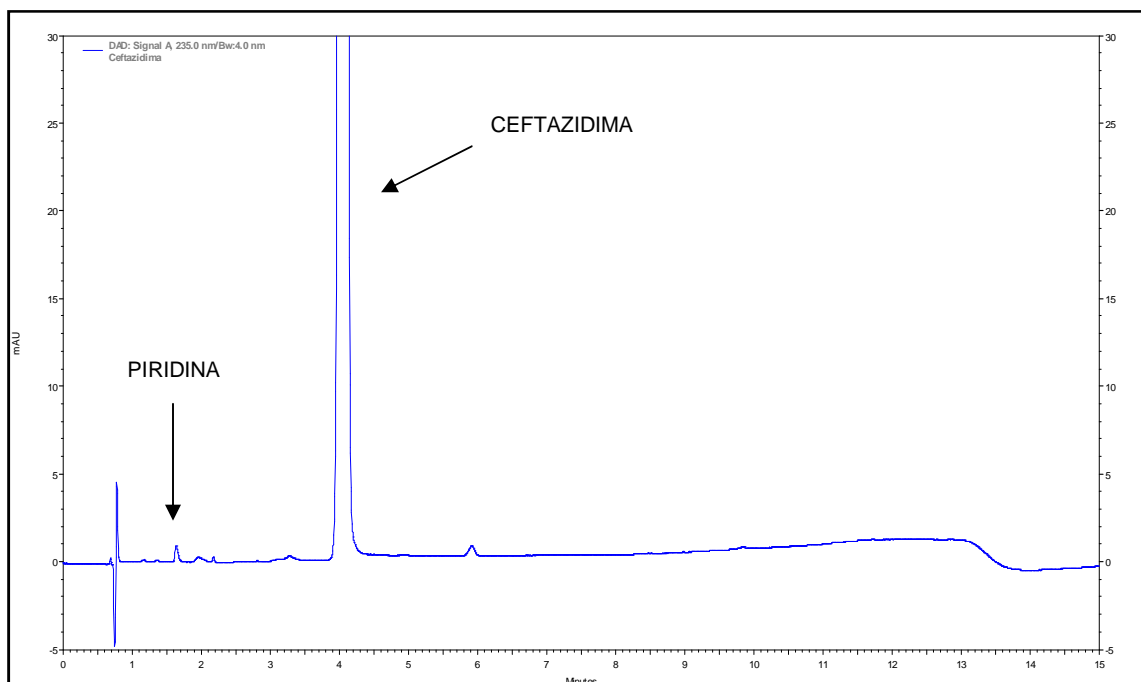


Figura 8. Cromatograma da amostra controle.

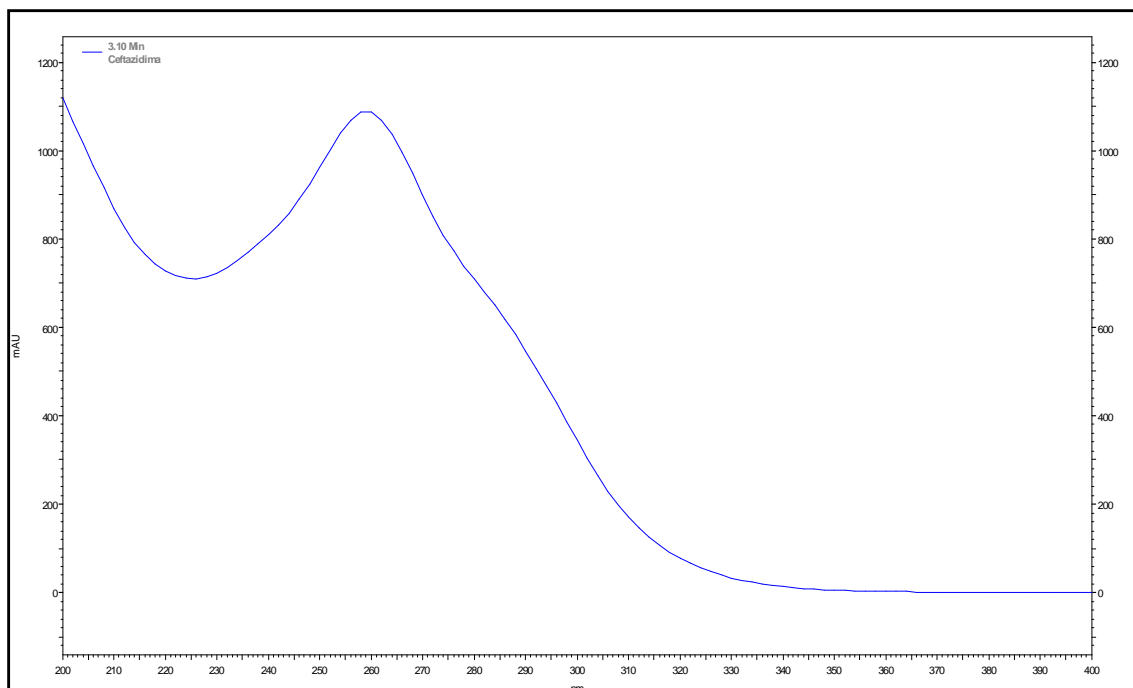


Figura 9. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra controle.

⇒ **Exposição à luz.**

O pico de ceftazidima na amostra exposta a condições de 1,2 milhões lux. horas de luz branca fria e 200 watt horas/m² de luz ultravioleta não sofre interferência das impurezas de degradação como pode ser observado na figura 10, e o espectrograma do pico mantém-se similar ao da amostra controle, figura 11.

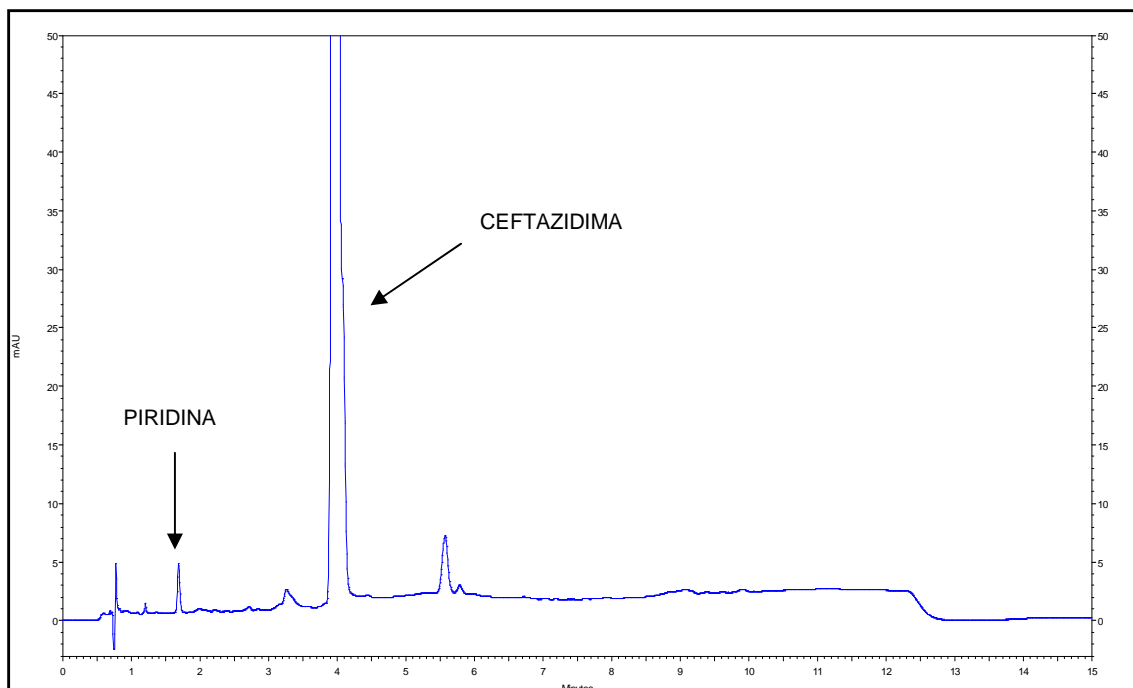


Figura 10. Cromatograma da amostra exposta a luz.

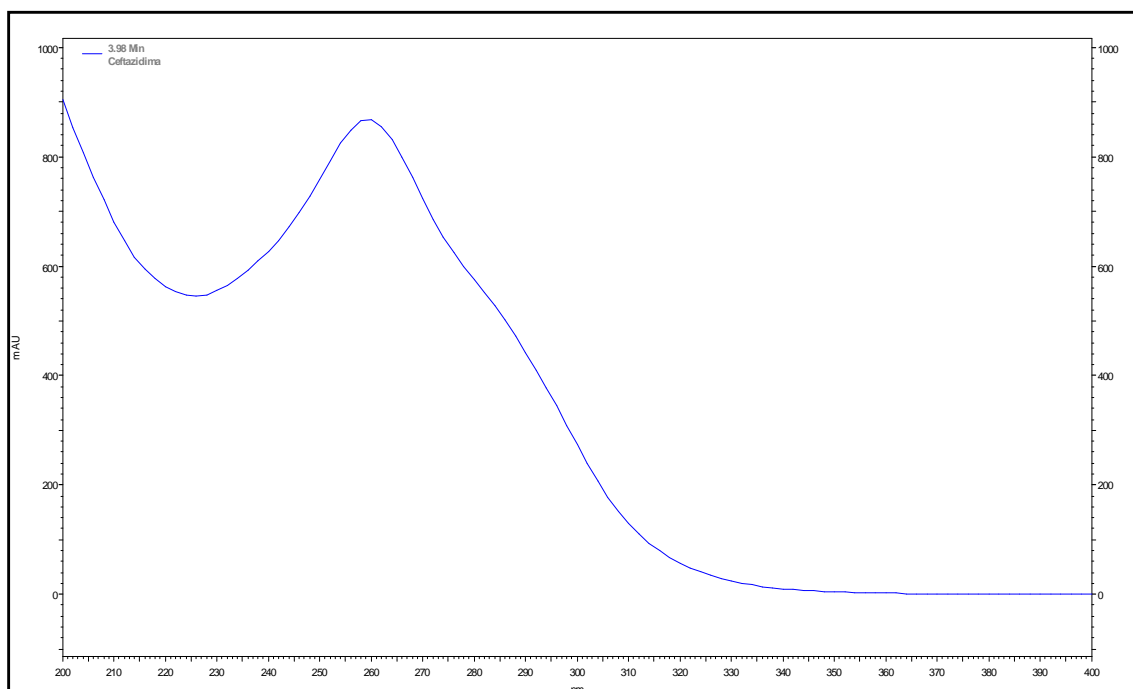


Figura 11. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a luz.

⇒ **Exposição à temperatura.**

O pico de ceftazidima na amostra exposta a temperatura de 80°C por 7 dias não sofre interferência das impurezas de

degradação como pode ser observado na figura 12, e o espectrograma do pico mantém-se similar ao da amostra controle, figura 13.

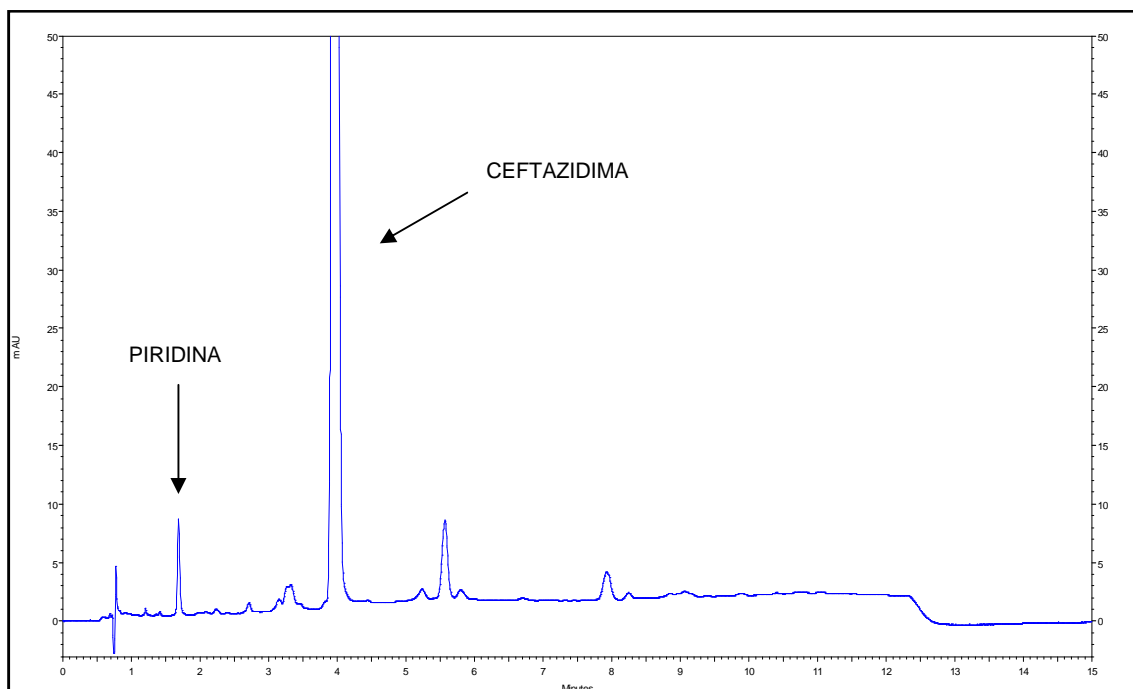


Figura 12. Cromatograma da amostra exposta a temperatura de 80°C.

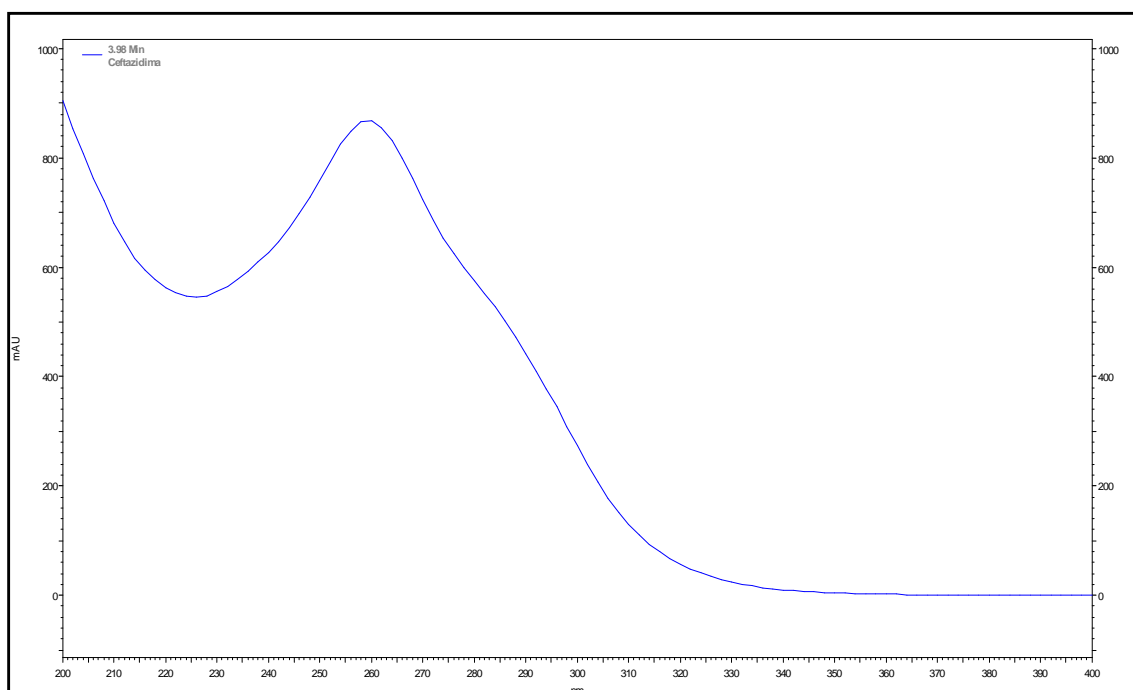


Figura 13. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a temperatura de 80°C.

⇒ **Exposição à hidrólise ácida.**

O pico de ceftazidima na amostra exposta a hidrólise ácida HCl 1 normal não sofre interferência das impurezas de degradação como pode ser observado na figura 14, e o espectrograma do pico mantém-se similar ao da amostra controle, figura 15.

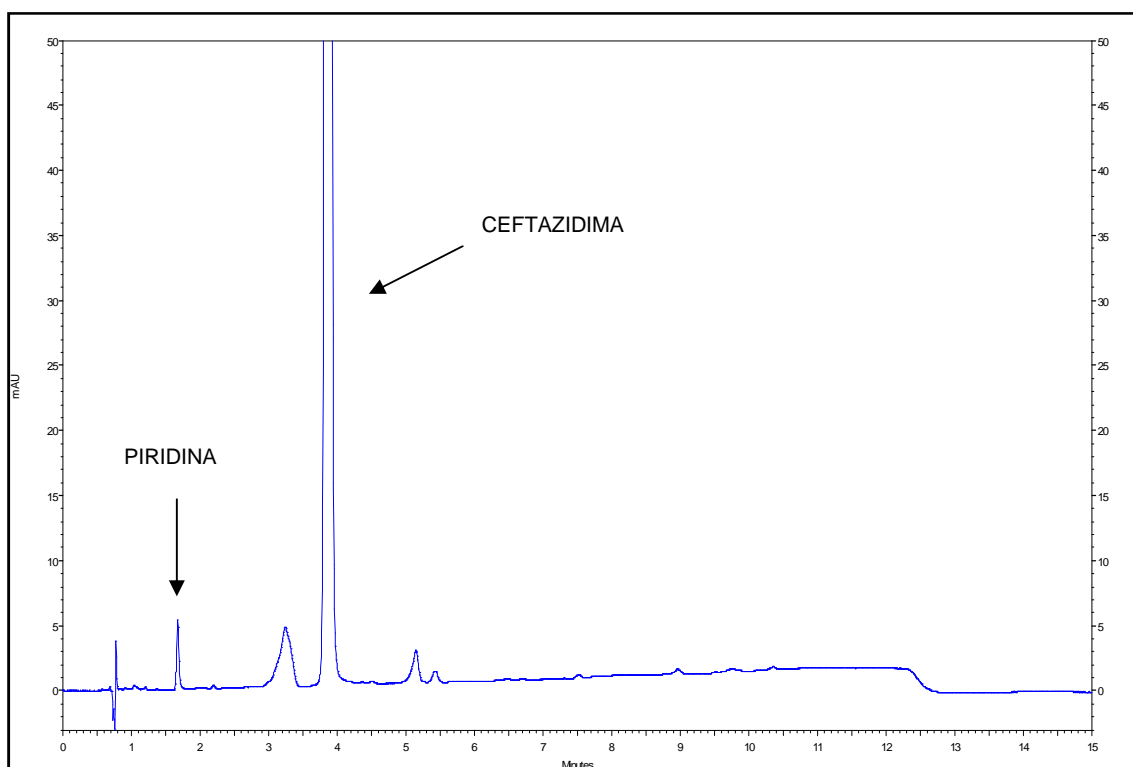


Figura 14. Cromatograma da amostra exposta a hidrólise ácida HCl 1 normal.

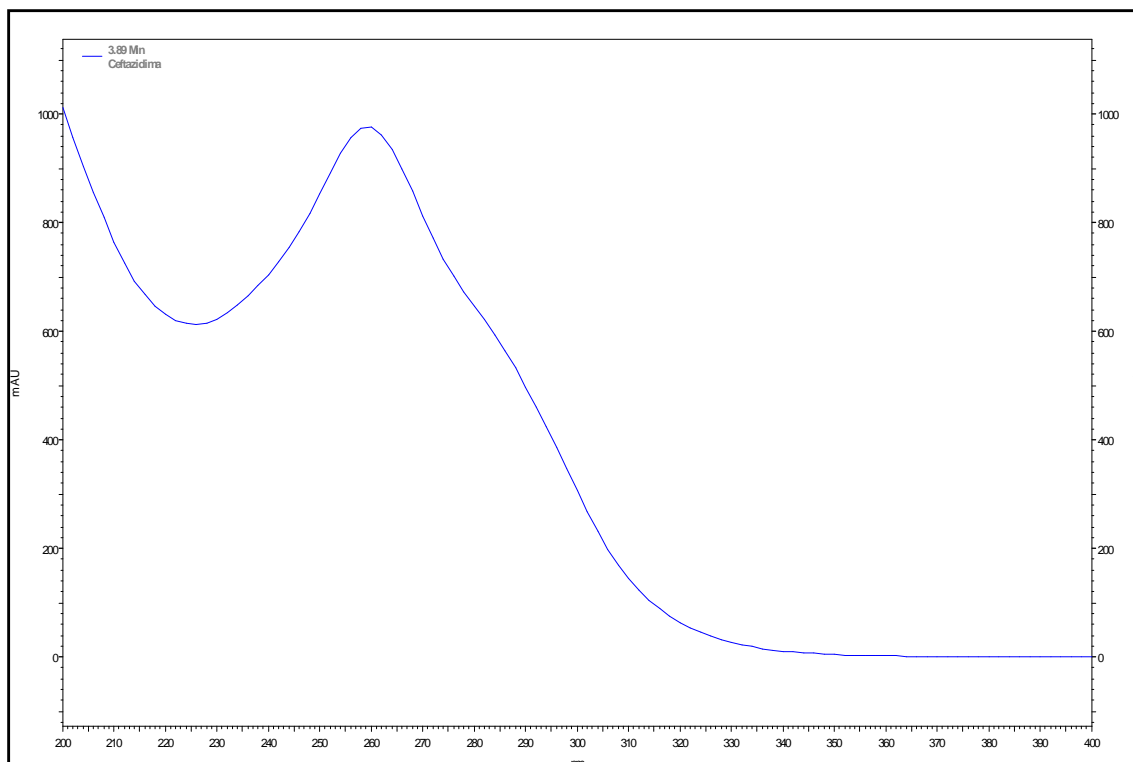


Figura 15. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a hidrólise ácida HCl 1 normal.

⇒ **Exposição à hidrólise básica.**

Na figura 16, é demonstrado o cromatograma da amostra exposta a hidrólise básica NaOH 0,1 normal. O espectrograma do pico mantém-se similar ao da amostra controle, figura 17. Apesar da separação dos picos das impurezas de degradação e do pico de ceftazidima estar prejudicada, o método é capaz de separar e quantificar a impureza caso essa seja detectada na rotina do controle de qualidade.

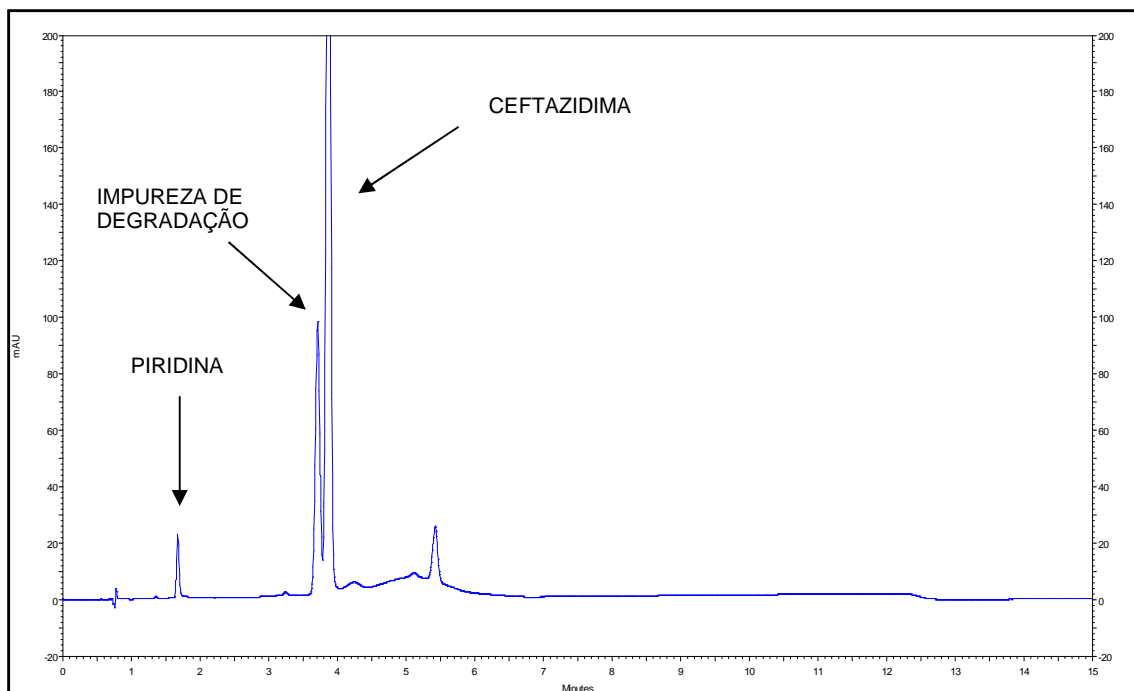


Figura 16. Cromatograma da amostra exposta a hidrólise básica NaOH 0,1 normal.

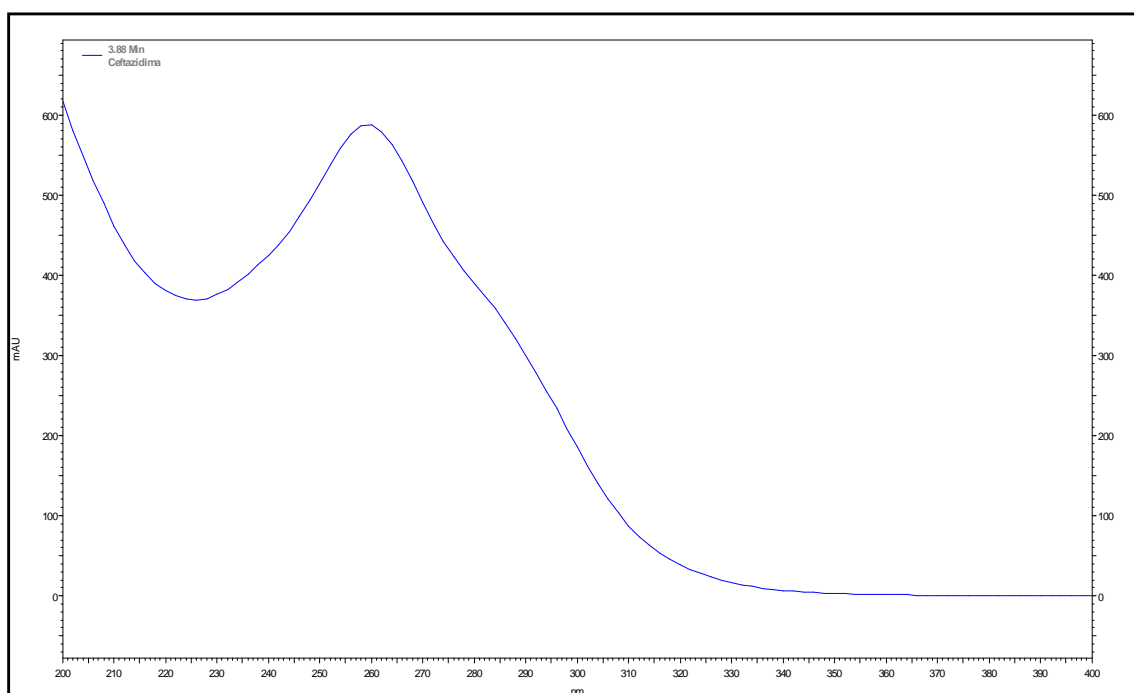


Figura 17. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a hidrólise básica NaOH 0,1 normal.

⇒ **Exposição à oxidação.**

O pico de ceftazidima na amostra exposta a oxidação peróxido de hidrogênio 0,3% não sofre interferência das impurezas de degradação como pode ser observado na figura 18, e o espectrograma do pico mantém-se similar ao da amostra controle, figura 19.

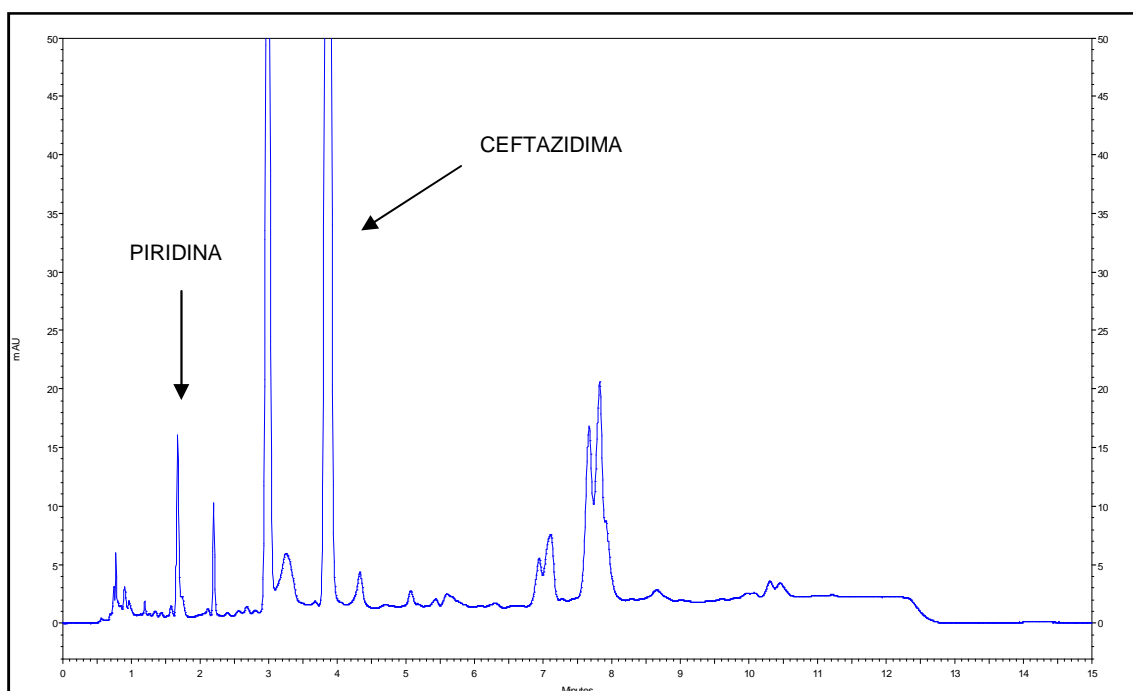


Figura 18. Cromatograma da amostra exposta a oxidação peróxido de hidrogênio 0,3%.

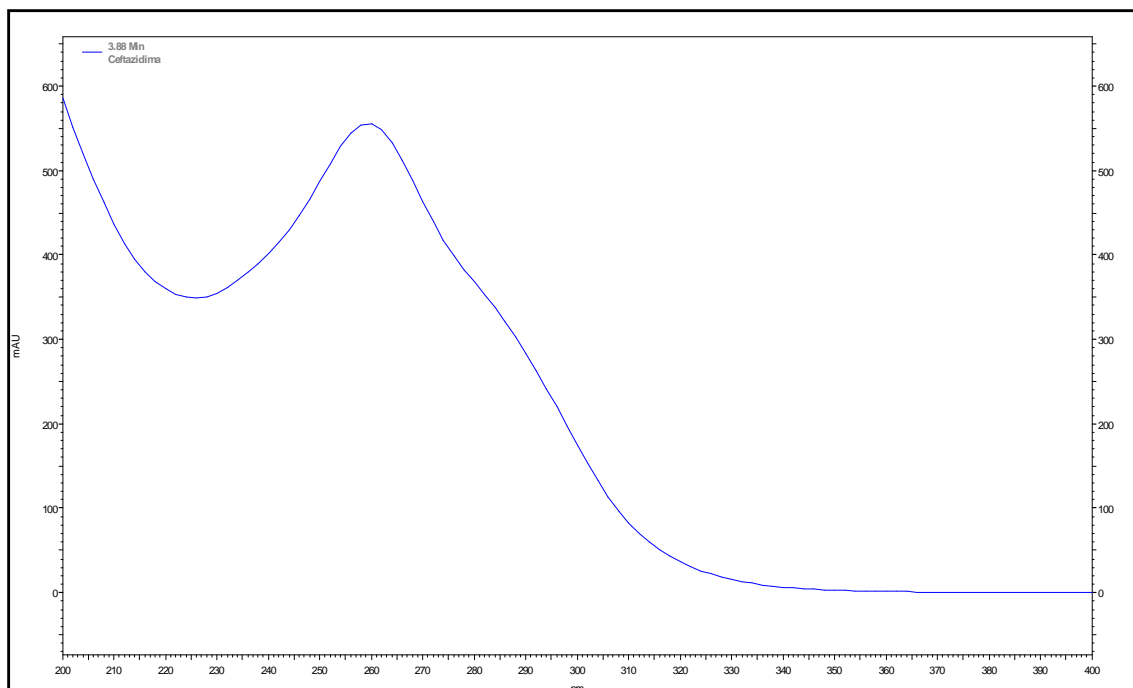


Figura 19. Espectrograma do pico de ceftazidima da amostra exposta a oxidação peróxido de hidrogênio 0,3%.

Observou-se durante o estudo de degradação forçada do produto que, o pico do ceftazidima manteve-se puro em todas as condições de estresse, ou seja, acima de 0,950 ou 95,0% de pureza conforme tabela 10 e que os espectrogramas do pico de ceftazidima mantiveram-se similares ao espectrograma do pico de ceftazidima da amostra controle. Os resultados obtidos durante a avaliação do parâmetro de seletividade/especificidade do método analítico demonstraram que nenhum componente, como, impurezas de degradação ou excipiente eluem no mesmo tempo do ceftazidima. Isso demonstra que o método analítico é seletivo/específico e indicador de estabilidade.

Tabela 10. Resultados obtidos na especificidade.

Condições de estresse	Porcentagem de degradação	Pureza do pico de ceftazidima
Amostra controle	Não aplicado	1,0000
Fotolítica	2,6%	1,0000
Temperatura	5,5%	1,0000
Hidrólise ácida	3,3%	1,0000
Hidrólise básica	43,1%	1,0000
Oxidação	42,9%	1,0000

⇒ **Placebo**

Analisou-se uma preparação contendo carbonato de sódio (excipiente) e uma preparação contendo as impurezas 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima e o ativo ceftazidima, a fim de avaliar a seletividade do método analítico.

Não foi observado nenhum pico proveniente da preparação contendo carbonato de sódio (excipiente), conforme figura 20 e os picos das impurezas e do ativo eluíram em diferentes tempos, conforme figura 21.

Portanto, o método analítico demonstrou ser seletivo/específico na presença de impurezas de degradação e excipientes, ou seja, foi satisfatório quanto ao parâmetro de seletividade/especificidade.

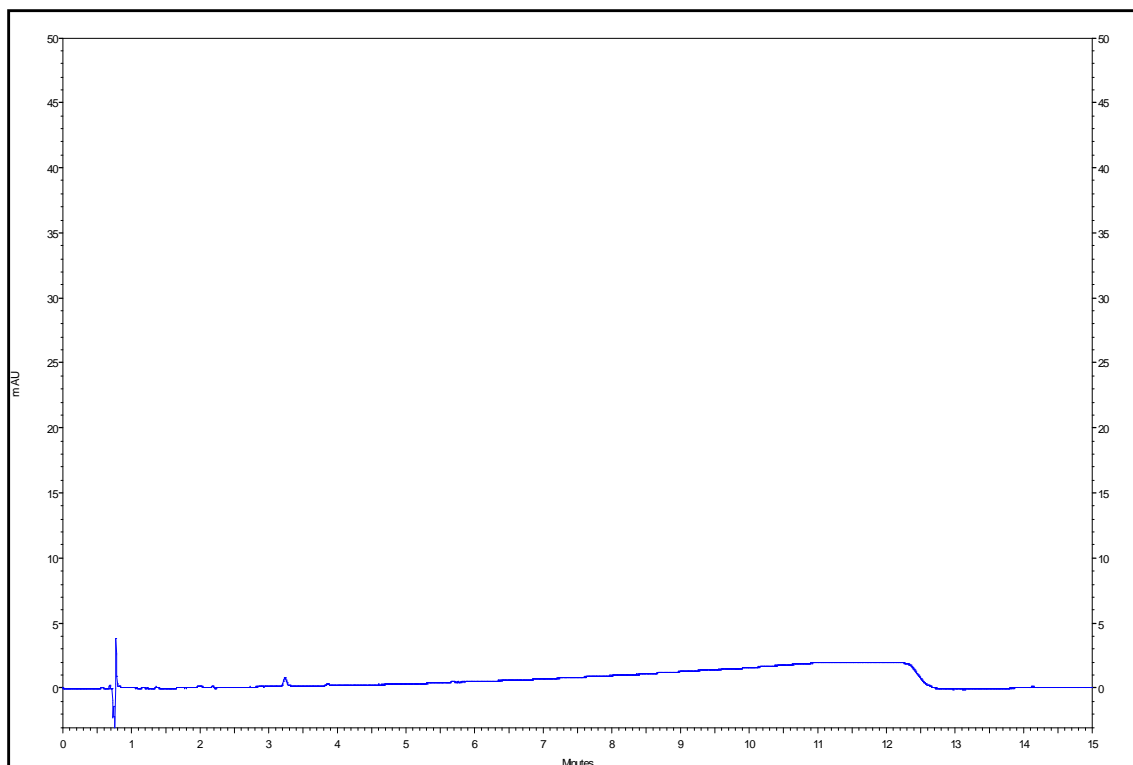


Figura 20. Cromatograma da solução contendo carbonato de sódio.

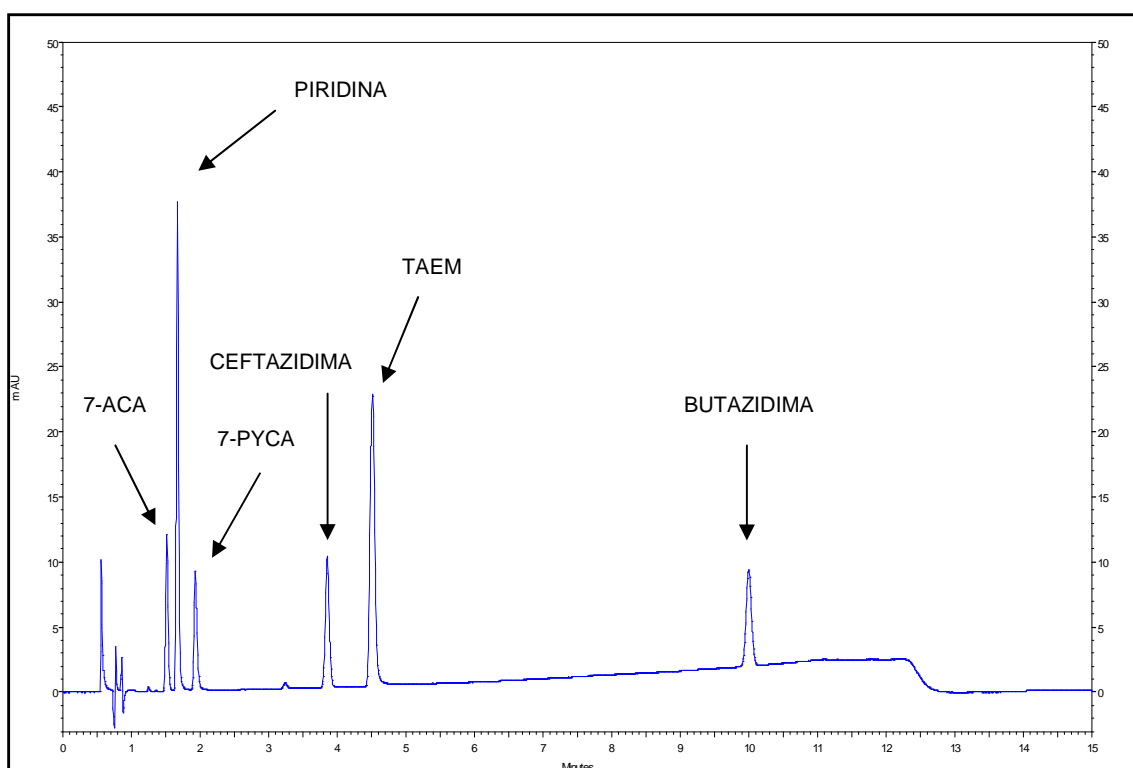


Figura 21. Cromatograma da solução contendo as impurezas.

5.2.2. Limites de detecção e quantificação.

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), utilizou-se uma planilha do Excel®, onde foram introduzidos os dados adquiridos (concentrações do analito x áreas) para obter os valores do desvio padrão da média do intercepto com o eixo Y das 3 curvas analíticas (DPa) e a média da inclinação das 3 curvas analíticas (IC). De posse desses dados, utilizou-se as equações descritas abaixo para obter a concentração estimada dos limites de detecção e quantificação.

$$\text{Concentração estimada LD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}}$$

$$\text{Concentração estimada LD} = \frac{5583 \times 3}{924768104}$$

$$\text{Concentração estimada LD} = 0,00002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentração estimada LQ} = \frac{\text{DPa} \times 10}{\text{IC}}$$

$$\text{Concentração estimada LQ} = \frac{5583 \times 10}{924768104}$$

$$\text{Concentração estimada LQ} = 0,00007 \text{ mg/ml}$$

Após a análise da solução limite de detecção e quantificação, observou-se que a relação sinal/ruído ficou abaixo de 3 e 10, então preparou-se uma segunda solução limite de detecção e quantificação mais concentrada. Verificou-se os limites de detecção e quantificação através de soluções preparadas na concentração de 0,00007 mg/ml (0,014%) para detecção e 0,00013 mg/ml (0,026%) para quantificação. Em seguida calculou-se a relação sinal/ruído do pico de ceftazidima utilizando a equação abaixo.

$$\text{sinal/ruído} = \frac{2 \times H}{h}$$

Onde:

Hp = É a altura do pico medido a partir do vértice do pico até a linha de base extrapolada (USP 36, 2013).

hr = É a diferença entre os valores de ruído maiores e menores observados (USP 36, 2013).

Nas tabelas 11 e 12 estão descritos os resultados dos limites de detecção e quantificação do método analítico. O limite de detecção encontrado para o método analítico é de 0,00007 mg/ml ou seja, 0,014% da concentração nominal da amostra; já o limite de quantificação para o método analítico é de 0,00013 mg/ml ou seja, 0,026% da concentração nominal da amostra.

Tabela 11. Resultado da relação sinal/ruído do pico de ceftazidima na solução limite de detecção.

Alíquota	Sinal/ruído (aceitabilidade ≥ 3)
A	6
B	5
C	5

Tabela 12. Resultado da relação sinal/ruído do pico de ceftazidima na solução limite de quantificação.

Alíquota	Sinal/ruído (aceitabilidade ≥ 10)
A	13
B	11
C	12
D	13
E	13
F	12
DPR das áreas do pico	2,3%

5.2.3. Linearidade.

Avaliou-se a linearidade do método a partir da elaboração de 3 curvas analíticas, onde y é a variável dependente que corresponde a resposta medida (área do pico de ceftazidima no cromatograma) e x é a variável independente que corresponde à concentração do padrão de

referência de ceftazidima utilizada na análise. Na tabela 13 estão descritas as concentrações de cada nível da linearidade.

Tabela 13. Concentrações das soluções de trabalho das curvas analíticas em mg/ml.

Ceftazidima mg/ml	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
1ª curva	0,00013	0,0015	0,0025	0,0040	0,0050	0,0061
2ª curva	0,00013	0,0015	0,0025	0,0040	0,0051	0,0061
3ª curva	0,00013	0,0015	0,0025	0,0040	0,0050	0,0060

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), realizou-se uma inspeção visual a partir da construção de um gráfico de concentração (eixo x) versus áreas obtidas após injeção das soluções (eixo y). A linearidade dos dados experimentais foi avaliada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, utilizando uma planilha do Excel®. Através da planilha realizou-se a estimativa do coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2), coeficiente linear (intersecção com o eixo y), coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos, soma residual total, resíduos e desvio padrão relativo da curva.

O coeficiente de correlação linear (r) expressa a relação de x e y na curva: quanto mais próximo de 1 maior é a probabilidade de existir uma relação linear definida. O coeficiente de determinação é uma indicação da adequação do modelo aos resultados.

5.2.3.1. Avaliação da 1ª curva analítica para ceftazidima.

Confirmou-se a linearidade da 1ª curva analítica a partir da concentração versus área, conforme gráfico 2. Os resultados da 1ª curva analítica estão descritos na tabela 14 e 15.

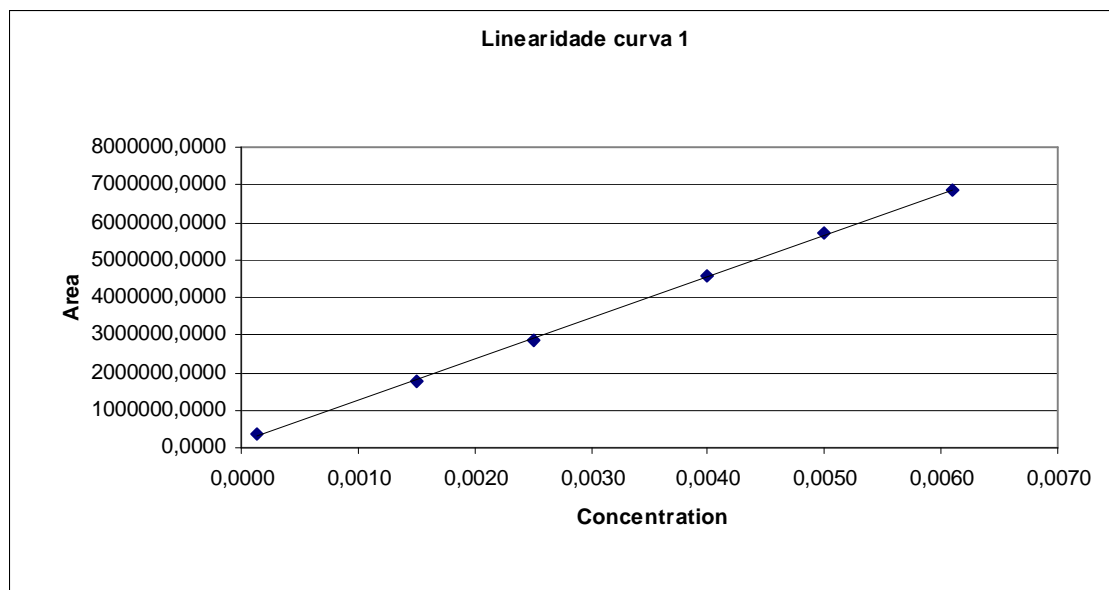


Gráfico 2. Curva analítica nº 1 de ceftazidima.

Tabela 14. Resultados da 1ª curva analítica.

Parâmetros	Limites	Resultados
Coeficiente de correlação (r)	≥ 0,99	0,9998
Coeficiente de determinação (r ²)	Informativo	0,9996
Coeficiente linear	Informativo	164825
Coeficiente angular	Informativo	1097404816
Soma dos quadrados dos resíduos	Informativo	11098691475
Soma dos quadrados totais	Informativo	3,02326 x 10 ¹³
DPR da curva analítica	Informativo	1,4%

Tabela 15. Resultados dos resíduos da 1ª curva analítica.

Nível	Área prevista (y)	Resíduos
1	307488	58586
2	1810933	-68808
3	2908337	-26750
4	4554445	6785
5	5651849	44372
6	6858995	-14185

5.2.3.2. Avaliação da 2ª curva analítica para ceftazidima.

Confirmou-se a linearidade da 2ª curva analítica a partir da concentração versus área, conforme gráfico 3. Os resultados da 2ª curva analítica estão descritos na tabela 16 e 17.

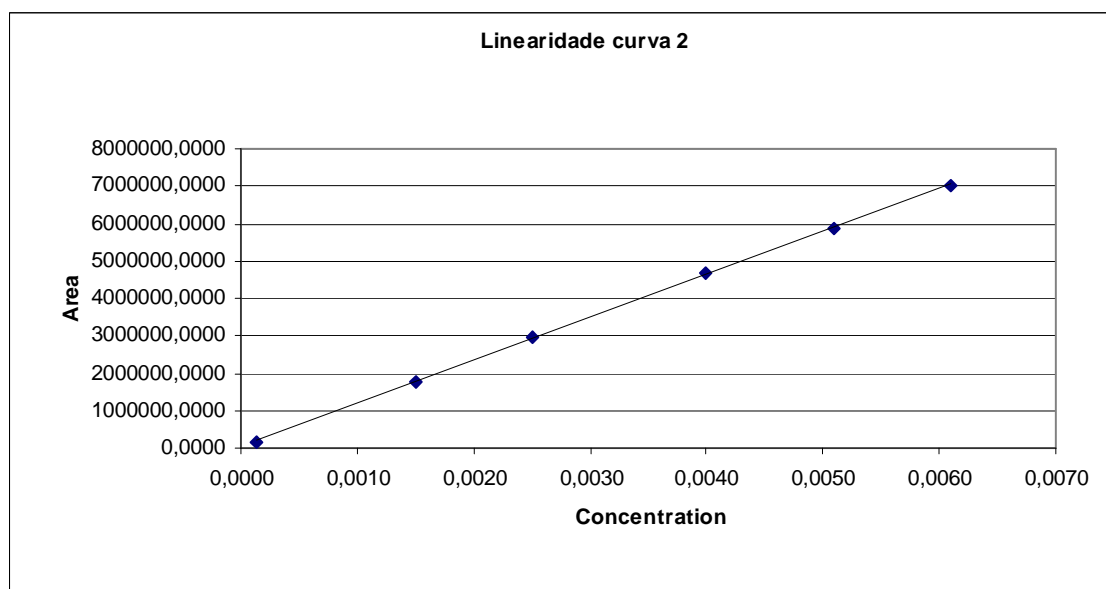


Gráfico 3. Curva analítica nº 2 de ceftazidima.

Tabela 16. Resultados da 2ª curva analítica.

Parâmetros	Limites	Resultados
Coeficiente de correlação (r)	≥ 0,99	0,9998
Coeficiente de determinação (r ²)	Informativo	0,9996
Coeficiente linear	Informativo	50417
Coeficiente angular	Informativo	1140450463
Soma residual dos quadrados	Informativo	14406990845
Soma dos quadrados totais	Informativo	3,31311 x 10 ¹³
DPR da curva analítica	Informativo	1,6%

Tabela 17. Resultados dos resíduos da 2ª curva analítica.

Nível	Área prevista (y)	Resíduos
1	198676	-31315
2	1761093	-23458
3	2901544	58540
4	4612219	71226
5	5866715	-65459
6	7007165	-9533

5.2.3.3. Avaliação da 3ª curva analítica para ceftazidima.

Confirmou-se a linearidade da 3ª curva analítica a partir da concentração versus áreas, conforme gráfico 4. Os resultados da 3ª curva analítica estão descritos na tabela 18 e 19.

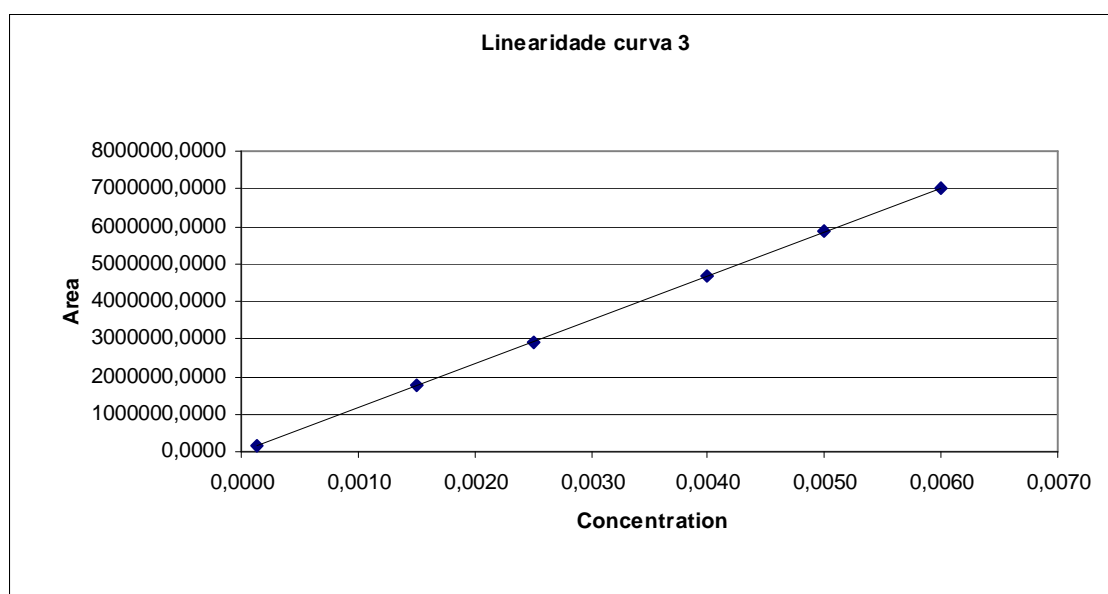


Gráfico 4. Curva analítica nº 3 de ceftazidima.

Tabela 18. Resultados da 3ª curva analítica.

Parâmetros	Limites	Resultados
Coeficiente de correlação (r)	$\geq 0,99$	1,0000
Coeficiente de determinação (r^2)	Informativo	1,0000
Coeficiente linear	Informativo	5884
Coeficiente angular	Informativo	1166267676
Soma residual dos quadrados	Informativo	1298162394
Soma dos quadrados totais	Informativo	$3,33585 \times 10^{13}$
DPR da curva analítica	Informativo	0,5%

Tabela 19. Resultados dos resíduos da 3ª curva analítica.

Nível	Área prevista (y)	Resíduos
1	157499	1795
2	1755286	-12688
3	2921553	-2400
4	4670955	19471
5	5837222	16015
6	7003490	-22193

O coeficiente de correlação (r) obtido foi $\geq 0,99$ nas 3 curvas analisadas, indicando que há uma relação linear entre as variáveis. Quanto maior o coeficiente, maior será a linearidade das respostas. O coeficiente de determinação também foi $\geq 0,99$ nas 3 curvas analisadas, indicando que há uma adequação da regressão aos dados.

5.2.4. Intervalo.

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico (BRASIL RE899, 2003).

Estabeleceu-se o intervalo do método analítico através do item linearidade. Na tabela 20 é apresentado o intervalo do método.

Tabela 20. Resultado do intervalo do método analítico.

Composto	Intervalo inferior	Intervalo superior
Ceftazidima	0,00013 mg/ml ou 0,026%	0,0060 mg/ml ou 1,2%

5.2.5. Precisão do método.

Avaliou-se a precisão do método através da repetibilidade e precisão intermediária.

5.2.5.1. Repetibilidade.

Avaliou-se os resultados da repetibilidade através do desvio padrão relativo (DPR) para os compostos 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima individualmente e também para o total de impurezas, sendo considerado satisfatório o desvio padrão relativo $\leq 5\%$. Segundo a literatura o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração da amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL RE899, 2003).

Tabela 21. Resultado da repetibilidade (analista 1).

Amostras	Compostos					
	7-ACA	Piridina	7-PYCA	TAEM	Butazidima	Totais
A	0,6298%	0,4550%	0,7487%	2,4176%	0,8496%	5,1807%
B	0,6066%	0,4575%	0,7614%	2,3409%	0,8028%	5,1155%
C	0,6076%	0,4558%	0,7712%	2,3127%	0,8556%	5,1568%
D	0,6092%	0,4552%	0,7729%	2,3217%	0,8326%	5,1633%
E	0,6009%	0,4416%	0,7590%	2,3139%	0,8490%	5,0949%
F	0,5889%	0,4356%	0,7452%	2,2522%	0,8287%	4,9689%
DPR	2,2%	2,0%	1,5%	2,3%	2,3%	1,5%

Observando a tabela 21, verificou-se que os valores dos desvios padrões relativos encontrados são inferiores a 5%, portanto os resultados da repetibilidade foram considerados satisfatórios.

5.2.5.2. Precisão intermediária.

Avaliou-se os resultados da precisão intermediária realizada por um segundo analista para os compostos 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima individualmente e também para o total de impurezas.

Tabela 22. Resultado da precisão intermediária (analista 2).

Amostras	Compostos					Totais
	7-ACA	Piridina	7-PYCA	TAEM	Butazidima	
A	0,5640%	0,4531%	0,7188%	2,3085%	0,8324%	5,0271%
B	0,5811%	0,4669%	0,7406%	2,3786%	0,8577%	5,1799%
C	0,5962%	0,4691%	0,7766%	2,4313%	0,8539%	5,3272%
D	0,5823%	0,4791%	0,7684%	2,3188%	0,8554%	5,1688%
E	0,5669%	0,4644%	0,7505%	2,3832%	0,8367%	5,1507%
F	0,5706	0,4674%	0,7553%	2,3987%	0,8421%	5,1840%
DPR	2,1%	1,8%	2,7%	2,0%	1,3%	1,9%

Tabela 23. Resultado da repetibilidade + precisão intermediária.

DPR dos analistas	Compostos					Totais
	7-ACA	Piridina	7-PYCA	TAEM	Butazidima	
1 + 2	3,4%	2,6%	2,2%	2,3%	1,9%	1,7%

A precisão de um método analítico permite avaliar o grau de dispersão dos resultados obtidos, ou seja, como os resultados estão distribuídos em relação à média obtida, expresso como desvio padrão relativo (DPR). Portanto quanto menor o DPR obtido menor a variação analítica. Nas tabelas 21, 22 e 23, constam os valores dos DPR obtidos para cada análise. Podemos observar que todos os valores encontrados são inferiores a 5%, portanto a precisão analítica do método é satisfatória.

5.2.6. Robustez.

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal.

Realizou-se 3 injeções do material de referência em 4 diferentes condições analíticas conforme tabela 6 e avaliou-se a influência de cada injeção no resultado final. Comparou-se os resultados obtidos no item 5.2.5.1. repetibilidade com os resultados obtidos nesse parâmetro. As tabelas 24, 25, 26, 27 e 28 e as figuras 22, 23, 24, 25 e 26 mostram os resultados obtidos.

O primeiro gráfico onde se localiza os losangos verdes ilustram a ANOVA. Losangos que não estão no mesmo nível horizontal são significativamente diferentes, a largura dos losangos é proporcional ao número de dados. Os resultados da análise de variância (ANOVA) estão descritos logo abaixo do gráfico.

O teste t é ilustrado pelos círculos. Quando os círculos se sobrepõem não há diferença entre as condições. Os resultados do teste t estão descritos abaixo dos resultados do ANOVA. Os resultados devem ser realizados comparando a condição original indicada pela letra "E" com as demais condições indicadas pelas letras "A, B, C e D" conforme a tabela 6.

O método original para quantificação de impurezas em ceftazidima, afirma que a variação máxima permitida para o pH nas fases móveis é de $\pm 0,05$. Sendo assim, utilizou-se os dados obtidos no desenvolvimento e validação analítica do método original.

Tabela 24. Resultado do teor do composto 7-ACA na robustez.

Alíquota	Condições			
	A	B	C	D
1	0,5753%	0,5747%	0,5172%	0,6390%
2	0,5757%	0,5728%	0,5210%	0,6422%
3	0,5728%	0,5738%	0,5207%	0,6337%

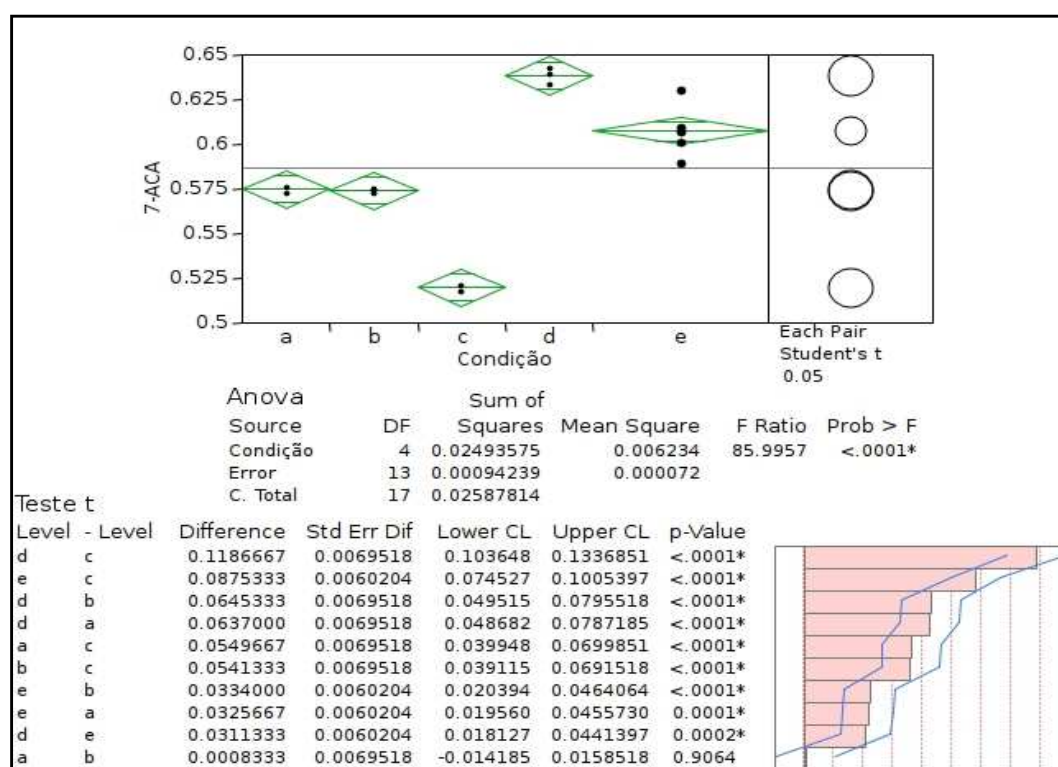


Figura 22. Resultado do composto 7-ACA na robustez.

Através da figura 22 podemos observar que em todas as condições avaliadas há uma diferença significativa quando comparadas com a condição E (original). Essa diferença é demonstrada pelo desalinhamento horizontal entre os losangos das condições avaliadas e também pela não sobreposição dos círculos. Apesar do método não responder de maneira igual quando alteramos as suas condições analíticas, o fluxo e a temperatura são calibrados na qualificação do equipamento, sendo assim, a chance de ocorrer uma variação dessa magnitude em um equipamento qualificado é muito pequena.

Tabela 25. Resultado do teor do composto piridina na robustez.

Alíquota	Condições			
	A	B	C	D
1	0,4074%	0,4137%	0,3802%	0,4552%
2	0,4109%	0,4092%	0,3797%	0,4643%
3	0,4066%	0,4178%	0,3751%	0,4489%

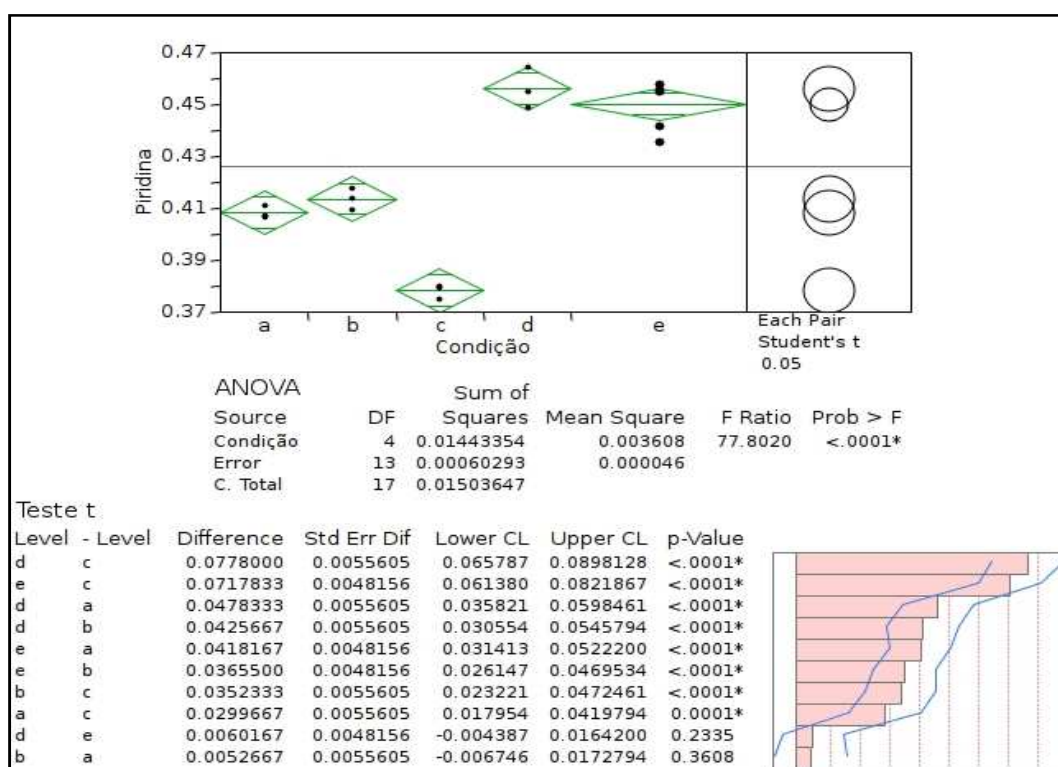


Figura 23. Resultado do composto piridina na robustez.

Avaliando a figura 23 do composto piridina, observamos que nas condições A, B e C há uma diferença significativa quando comparado com a condição E (original), essa diferença é demonstrada pelo desalinhamento horizontal entre os losangos das condições avaliadas e também pela não sobreposição dos círculos. Como descrito anteriormente essas diferenças de respostas são suportadas pelas calibrações realizadas durante a qualificação do equipamento.

Tabela 26. Resultado do teor do composto 7-PYCA na robustez.

Alíquota	Condições			
	A	B	C	D
1	0,6737%	0,7412%	0,6851%	0,7965%
2	0,6808%	0,7523%	0,7007%	0,7992%
3	0,6746%	0,7618%	0,6742%	0,7871%

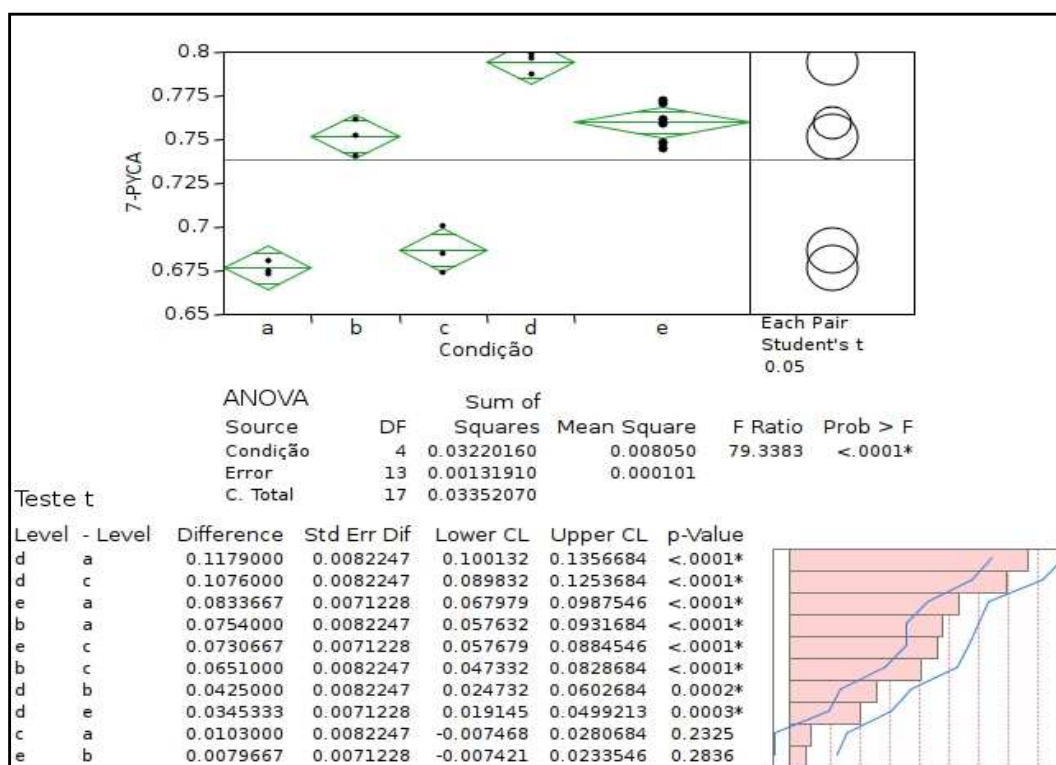


Figura 24. Resultado do composto 7-PYCA na robustez.

Avaliando a figura 24 do composto 7-PYCA, observamos que na condição A onde é alterada a temperatura da coluna de 40 para 44°C há uma diferença significativa quando comparado com a condição E (original), essa diferença é demonstrada pelo desalinhamento horizontal entre os losangos das condições avaliadas e também pela não sobreposição dos círculos. Já para a condição B onde é alterada a temperatura da coluna de 40 para 36°C não há diferença significativa. Observamos também que os losangos e os círculos estão melhores alinhados. No caso da condição C onde é alterado o fluxo da fase móvel,

comparado a condição E (original) observamos também que há uma diferença significativa, como também acontece com a condição D, porém em menor intensidade.

Tabela 27. Resultado do teor do composto TAEM na robustez.

Alíquota	Condições			
	A	B	C	D
1	2,1503%	2,2253%	1,9600%	2,3945%
2	2,1863%	2,2309%	1,9670%	2,4076%
3	2,1808%	2,2296%	1,9658%	2,3985%

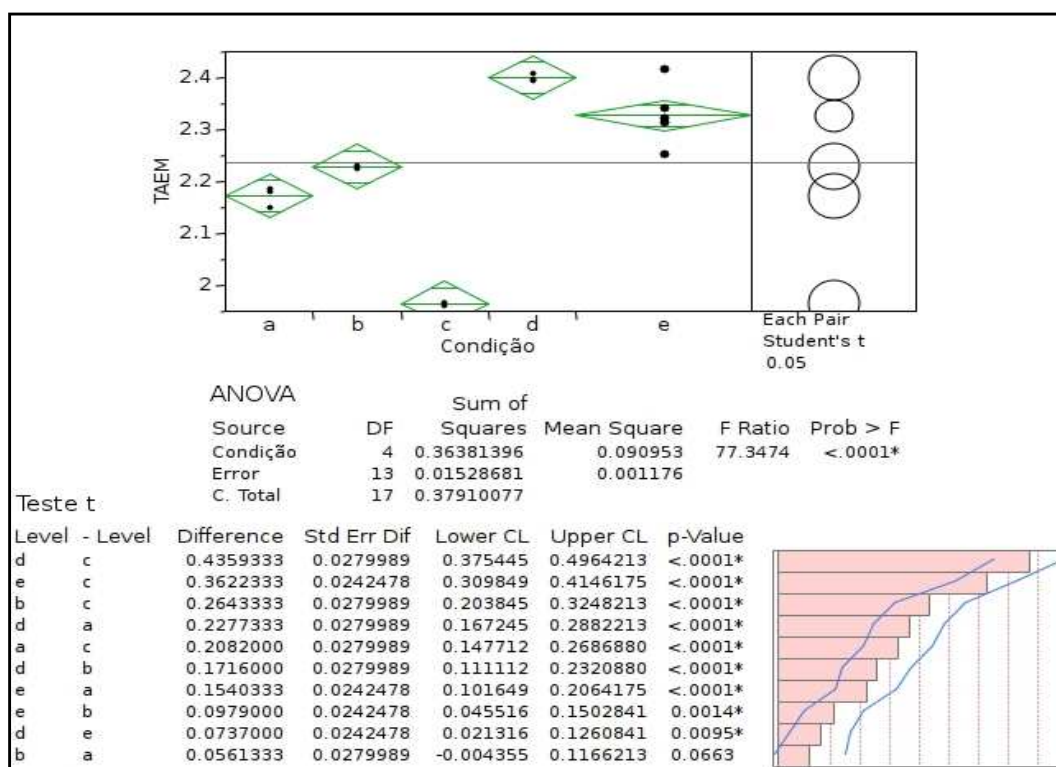


Figura 25. Resultado do composto TAEM na robustez.

Avaliando a figura 25 do composto TAEM, podemos dizer que nas condições A e B onde é alterada a temperatura da coluna, há uma diferença significativa quando comparado com a condição E (original), essa diferença é demonstrada pelo desalinhamento horizontal entre os losangos das condições avaliadas e também pela não sobreposição dos

círculos. O mesmo pode ser afirmado para a condição C que varia o fluxo da fase móvel. Para a condição D onde é alterado o fluxo da fase móvel de 0,60 para 0,54 ml/min. a diferença é bem menor como pode ser observado nos gráficos mas ainda assim é significativa.

Tabela 28. Resultado do teor do composto butazidima na robustez.

Alíquota	Condições			
	A	B	C	D
1	0,8230%	0,8189%	0,7446%	0,9233%
2	0,8189%	0,8386%	0,7565%	0,9266%
3	0,8214%	0,8344%	0,7521%	0,9192%

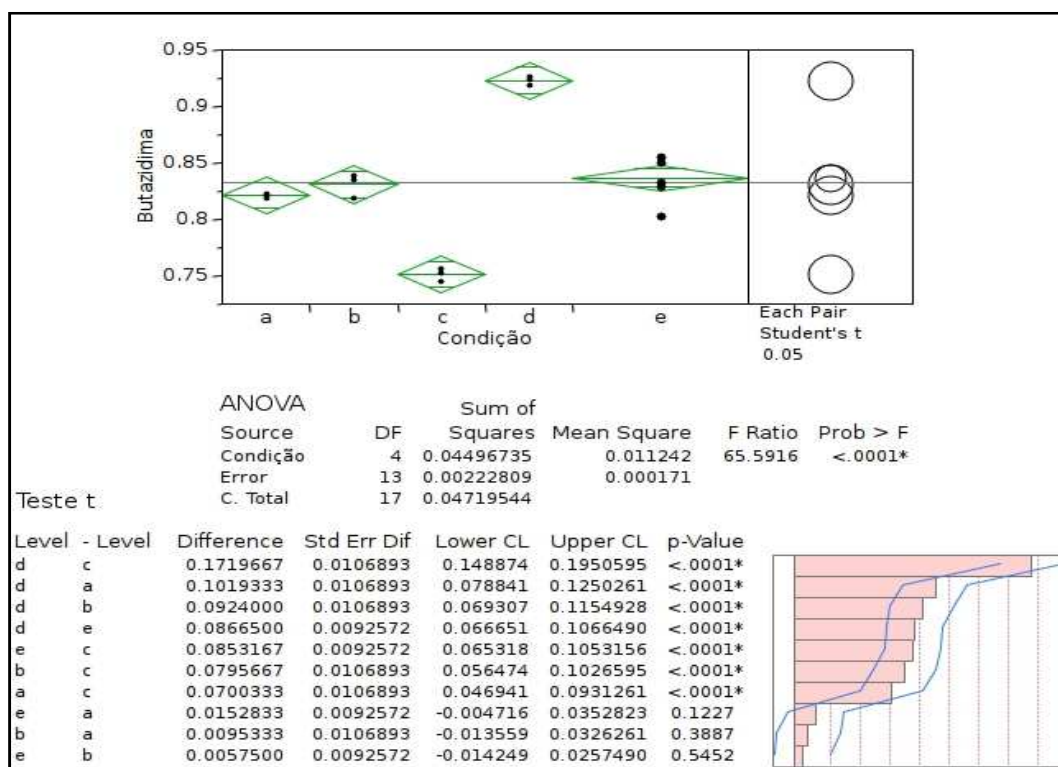


Figura 26. Resultado do composto butazidima na robustez.

Avaliando a figura 26 do composto butazidima, observamos que nas condições A e B onde é alterada a temperatura da coluna não há uma diferença significativa quando comparado com a condição E (original), isso é demonstrado pela ausência do asterisco nos resultados

e pelo alinhamento horizontal entre os losangos das condições avaliadas. O mesmo não acontece quando comparamos a condição C e D onde é alterado o fluxo da fase móvel com a condição E (original). Neste caso observamos uma diferença significativa entre os resultados.

Como pôde ser observado a robustez varia conforme o contaminante. Para alguns o fluxo altera completamente o resultado e para outros ocorre o mesmo com a temperatura. Assim foram avaliadas a resolução e a assimetria dos picos de cada contaminante nas diferentes condições de robustez comparando a uma análise nas condições originais de fluxo e temperatura obtidas no parâmetro de adequação do sistema. Os resultados são apresentados na tabela 29. Fica evidente que o pico mais afetado pelas modificações é o correspondente ao TAEM. Assim para resguardar os resultados incluiu-se, na análise de adequação do sistema que a assimetria de TAEM não deve ser superior a 1,3 e sua resolução com relação à Ceftazidima deve estar entre 3,9 e 4,1.

Tabela 29. Resultado de assimetria e resolução na robustez e adequação do sistema.

Composto	Parâmetro	Condição A	Condição B	Condição C	Condição D	Original E
7-ACA	Resolução	-	-	-	-	-
	Assimetria	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Piridina	Resolução	2,0	1,7	1,9	1,9	2,2
	Assimetria	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
7-PYCA	Resolução	2,3	3,1	2,7	2,7	3,1
	Assimetria	1,2	1,2	1,4	1,4	1,3
Ceftazidima	Resolução	15,1	18,8	17,1	16,9	19,2
	Assimetria	0,9	1,0	0,9	1,0	0,9
TAEM	Resolução	5,1	2,1	3,4	3,6	4,0
	Assimetria	1,7	1,6	1,6	1,7	1,3
Butazidima	Resolução	32,5	33,3	33,6	31,6	40,0
	Assimetria	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0

5.2.7. Exatidão.

Antes das injeções das amostras para avaliar o parâmetro da exatidão, foi injetada uma amostra controle. Essa amostra é necessária para que no momento do cálculo de recuperação dos compostos, possamos subtrair qualquer quantidade residual desses compostos na amostra. A análise foi conduzida em triplicata de injeção em cada nível de concentração e a avaliação estatística foi executada através do cálculo do percentual recuperado, ou seja, a relação percentual entre a concentração de cada impureza encontrada, em cada nível de concentração, e a concentração esperada.

Tabela 30. Recuperação para cada nível de concentração.

Concentração		Composto				
		7-ACA	Piridina	7-PYCA	TAEM	Butazidima
0,8% (80%)	Teórica	0,8182%	0,7583%	0,8182%	0,7982%	0,7982%
	Experimental	0,8146%	0,7827%	0,8356%	0,8026%	0,8140%
	Recuperação	99,6%	103,2%	102,1%	100,6%	102,0%
1,0% (100%)	Teórica	1,0180%	0,9581%	1,0379%	0,9980%	0,9980%
	Experimental	1,0147%	0,9781%	1,0390%	1,0048%	1,0111%
	Recuperação	99,7%	102,1%	100,1%	100,7%	101,3%
1,2% (120%)	Teórica	1,2215%	1,1414%	1,2415%	1,2014%	1,2215%
	Experimental	1,2072%	1,1336%	1,2167%	1,2137%	1,2168%
	Recuperação	98,8%	99,3%	98,0%	101,0%	99,6%

Os valores de recuperação do método analítico devem ser iguais a $100\% \pm 5\%$, podendo variar de 95% a 105%. Na tabela 30 estão representadas as médias obtidas das impurezas para cada concentração. A figura 27 demonstra um cromatograma da solução amostra de ceftazidima contendo as impurezas a 1%. O maior valor de recuperação encontrado foi de 103,2% e o menor de 98,0%. Sendo assim, os valores de recuperação do método analítico foram considerados satisfatórios.

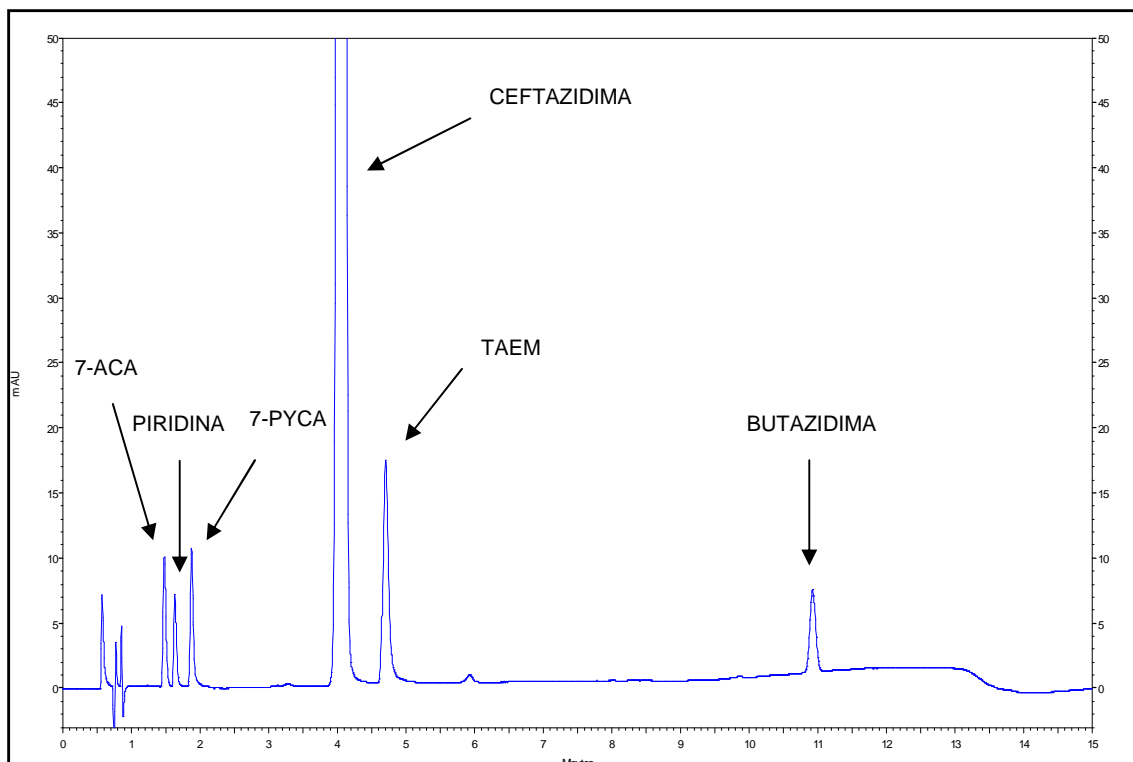


Figura 27. Cromatograma da solução amostra de ceftazidima contendo as impurezas a 1%, utilizada na exatidão.

5.2.8. Adequação do sistema (*system suitability*).

Este estudo foi realizado para assegurar o desempenho do sistema cromatográfico que será utilizado durante a realização das análises na rotina do laboratório, provendo assim dados de qualidade aceitável. O parâmetro de adequação do sistema será incluso na metodologia analítica e deverá ser realizado ao iniciar uma análise utilizando esta metodologia. Como condições de aceitabilidade para o teste de adequação do sistema serão utilizadas, além da assimetria e resolução de TAEM como já explicitado no item 5.2.7. robustez, resolução mínima entre os demais picos de 1,5 garantindo uma separação adequada e um DPR para o pico de ceftazidima inferior a 2,0%, garantindo a precisão dos resultados. Foi utilizado um DPR de 2,0% para o pico de ceftazidima, baseado nos critérios da USP 36. Na tabela 31 estão descritos os resultados encontrados no parâmetro de adequação do

sistema e na figura 28 um perfil cromatográfico da solução de referência utilizada na adequação do sistema.

Tabela 31. Resultados da adequação do sistema (*system suitability*).

Alíquota	Composto	Parâmetros		
		Resolução	Assimetria	Área
1	Ceftazidima	19,9	0,9	548265371
	7-ACA	Não aplicado	1,3	Não aplicado
	Piridina	2,0	1,3	Não aplicado
	7-PYCA	3,1	1,3	Não aplicado
	TAEM	4,1	1,3	Não aplicado
	Butazidima	40,1	1,0	Não aplicado
2	Ceftazidima	19,1	0,9	544475914
	7-ACA	Não aplicado	1,3	Não aplicado
	Piridina	2,2	1,3	Não aplicado
	7-PYCA	3,1	1,3	Não aplicado
	TAEM	4,0	1,3	Não aplicado
	Butazidima	40,0	1,0	Não aplicado
3	Ceftazidima	19,0	0,9	549179798
	7-ACA	Não aplicado	1,3	Não aplicado
	Piridina	2,2	1,3	Não aplicado
	7-PYCA	3,1	1,3	Não aplicado
	TAEM	4,0	1,3	Não aplicado
	Butazidima	40,0	1,0	Não aplicado
4	Ceftazidima	18,9	0,9	545412631
	7-ACA	Não aplicado	1,3	Não aplicado
	Piridina	2,2	1,3	Não aplicado
	7-PYCA	3,1	1,3	Não aplicado
	TAEM	4,0	1,3	Não aplicado
	Butazidima	39,9	1,0	Não aplicado
5	Ceftazidima	18,9	0,9	549562361
	7-ACA	Não aplicado	1,3	Não aplicado
	Piridina	2,2	1,3	Não aplicado
	7-PYCA	3,1	1,3	Não aplicado
	TAEM	4,0	1,3	Não aplicado
	Butazidima	39,9	1,0	Não aplicado
Desvio padrão relativo das áreas do pico de ceftazidima				0,4%

O fator de assimetria abaixo de 1,3 para os picos dos compostos 7-ACA, piridina, 7-PYCA, TAEM e butazidima, o fator de resolução maior que 1,5 entre os compostos 7-ACA, piridina e 7-PYCA, o fator de resolução entre 3,9 e 4,1 entre os compostos ceftazidima e TAEM e o fator de resolução maior que 30,0 entre os compostos TAEM e butazidima demonstram que os picos estão bem separados. O desvio padrão relativo das áreas do pico de ceftazidima foi satisfatório, situando-se abaixo do valor preconizado de 2,0%.

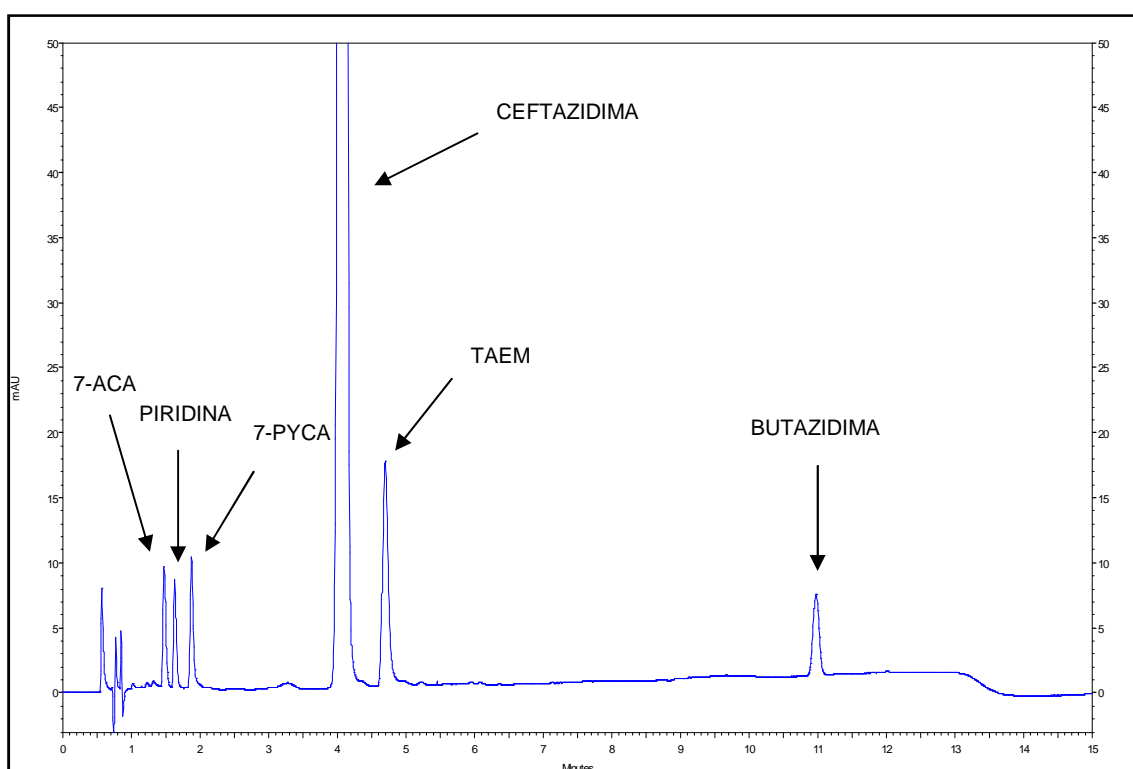


Figura 28. Cromatograma da solução referência de ceftazidima utilizada na adequação do sistema.

6. CONCLUSÃO.

- ⇒ Transferiu-se, desenvolveu-se e validou-se um método analítico para determinação de substâncias relacionadas no antibiótico Ceftazidima por cromatografia líquida de ultra eficiência com fase estacionária C18.
- ⇒ Obteve-se uma redução no tempo de análise de 45 minutos por corrida cromatográfica, utilizando o método analítico ultra eficiente. Pensando em uma rotina de controle de qualidade, onde analisa-se aproximadamente 5 a 10 lotes do produto de uma única vez, teremos aproximadamente 30 horas de análise utilizando o método convencional. Quando utilizamos o método ultra eficiente esse valor é reduzido para 7,5 horas, tendo assim, um ganho de 22,5 horas em tempo de análise. Além disso, o consumo de solvente orgânico utilizando o método convencional é de aproximadamente 400 ml, quando utilizamos o método ultra eficiente esse valor é reduzido para aproximadamente 120 ml, ou seja, uma redução de 70% no consumo de solvente orgânico. Para a indústria significa que o produto chegará mais rápido ao mercado, com um menor custo e menor geração de resíduos para o meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos: RE 899.** Brasília: ANVISA, 2003. 13 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 05 jan. 2013.
2. DONGRE, Vaijanath G. et al. Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Mumbai, p. 236-242. 16 set. 2007.
3. Kefadim Disponível em: <<http://www.ablbrasil.com.br/versao/produtos/produto.asp?plDproduto=215>>. Acesso em: 05 dez. 2011.
4. KRISHNAIAH, Ch. et al. Development of a stability-indicating UPLC method for determining olanzapine and its associated degradation products present in active pharmaceutical dosage forms. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Hyderabad, p. 667-673. 17 out. 2010.
5. LOWEN, Teresa Cristina Raposo. **Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Análise do Teor de Lamivudina e do Ensaio Limite do Enantiômero (+)BCH-189 em Comprimidos de Lamivudina.** 2003. 105 f. Dissertação (Mestre) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.
6. MAC MOD ANALYTICAL. **How to measure and reduce HPLC equipment extra column volume: Guide Ultra-Fast HPLC.** Disponível em: <<http://www.mac-mod.com/pdf/technical-report/084-ReduceExtraColumnVolumes.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2012.

7. MAC MOD ANALYTICAL. **Quick tips for converting conventional reversed-phase HPLC separations to ultra-fast separations: Guide Ultra-Fast HPLC.** Disponível em: <<http://www.mac-mod.com/pdf/technical-report/047-QuickTipsGuide.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2011.
8. MORENO, Andréia De Haro. **ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS CONTENDO CEFTAZIDIMA.** 2007. 207 f. Tese (Doutor) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Unesp, Araraquara, 2007.
9. NGUYEN, Dao T. -t. et al. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal Of Separation Science**, Genebra, p. 1836-1848. 22 maio 2006.
10. PEREIRA, Luisa (Ed.). Transferência de método HPLC para U-HPLC de maior resolução e rapidez. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 34, p.68-76, abr. 2008. Bimestral.
11. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (Estados Unidos) (Ed.). **U.S. Pharmacopeia.** 36. ed. Washington, 2013.
12. WREN, Stephen A. C.; TCHELITCHEFF, Pierre. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal Of Chromatography A.**, Uk, p. 140-146. 27 mar. 2006.