

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

JEFFERSON ANNUNCIATTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CEFOPERAZONA E PREDNISOLONA EM  
POMADA OLEOSA INTRAMAMÁRIA POR CLAE-DAD**

CAMPO GRANDE, MS

2017

JEFFERSON ANNUNCIATTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CEFOPERAZONA E PREDNISOLONA EM  
POMADA OLEOSA INTRAMAMÁRIA POR CLAE-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Najla Mohamad Kassab

CAMPO GRANDE, MS

2017

JEFFERSON ANNUNCIATTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CEFOPERAZONA E PREDNISOLONA EM  
POMADA OLEOSA INTRAMAMÁRIA POR CLAE-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Najla Mohamad Kassab (Presidente)  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Dra. Marcela Nogueira R. Alves  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof. Dr. João Batista Gomes de Souza  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Profa. Dra. Camila Guimarães  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CAMPO GRANDE, MS

2017

*Confie em seu coração se os mares explodirem em chamas.  
Viva pelo amor, mesmo que as estrelas se movam para trás.*

*e. e. Cummings*

*Aos meus pais, **Gilberto e Luzia**, ao meu  
irmão **Gilberto Júnior** e a minha esposa **Luana**,  
pelo amor e carinho depositados em mim.*

## *Agradecimentos*

*Deus obrigado por me discernir, dar forças, sabedoria e persistência.  
Obrigado pelas adversidades e barreiras encontradas e vencidas, pois elas me  
fizeram melhor que antes.*

*Aos meus pais Gilberto e Luzia por me apoiar nas decisões que não pareciam as  
melhores, por entenderem minha ausência e meus sonhos, por confiarem sempre na  
minha capacidade até mesmo quando eu deixei de confiar.*

*A minha orientadora, Professora Dra. Nájla Mohamad Kassab que me aceitou como  
seu aluno e me ajudou no desenvolvimento pessoal e científico, e em todos os  
momentos soube repassar seu conhecimento nunca me deixando desamparado.*

*A minha esposa Luana que sempre me apoiou e incentivou a seguir, mostrando o  
quanto acreditava em mim, sendo minha companhia nos momentos árduos e  
difíceis.*

*Aos amigos e técnicos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Rubia, Aline,  
James, Michelle e Vanderlei que sempre tiveram a boa vontade de me ajudar,  
socorrer e aconselhar nos obstáculos encontrados durante a realização do trabalho.*

*Aos colegas de trabalho que incentivaram, acreditaram e me forneceram apoio  
suficiente para essa conquista, em especial Renée, Rogério e Alice.*

*Ao Luiz, secretário do programa, pela disposição, boa vontade e apoio que nunca  
faltaram, sempre fazendo além de sua atribuição.*

*Ao laboratório Ceva, pelo padrões de referência gentilmente doados.*

*Serão sempre lembrados por tudo, muitíssimo obrigado!*

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico (TERCIO, 2007).

Figura 2. Estrutura química da cefoperazona sódica (HOANG et al., 2015)

Figura 3. Estrutura química do fármaco prednisolona (Fonte: DRUGBANK, 2017)

Figura 4. Cromatograma dos padrões de referência cefoperazona (2,67 min) e prednisolona (4,20 min) com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos com coluna Acclaim® C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , fase móvel acetonitrila : água pH 3,0 (70:30), vazão de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Analisado em 240 nm por CLAE acoplado a DAD.

Figura 5. Cromatograma dos padrões de referência cefoperazona (2,67 min) e prednisolona (4,20 min) com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos com coluna Acclaim® C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , fase móvel acetonitrila : água pH 3,0 (70:30), vazão de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Analisado em 260 nm por CLAE acoplado a DAD.

Figura 6. Curva de calibração analítica de cefoperazona obtida com coluna Acclaim® C18; fase móvel acetonitrila:água (70:30 v/v) pH 3,0 fluxo de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ .

Figura 7. Curva de calibração analítica de prednisolona obtida com coluna Acclaim® C18; fase móvel acetonitrila:água (70:30 v/v) pH 3,0 fluxo de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ .

Figura 8. Cromatogramas obtido para determinação do teor de CPZ em amostra de pomada oleosa intramamária por CLAE, onde "(A) ilustra os padrões de referência na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ e PRED, "B" o cromatograma da amostra, e "C" a sobreposição dos cromatogramas.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparo das soluções de cefoperazona para o ensaio de recuperação do método por CLAE.

Tabela 2. Preparo das soluções de prednisolona para o ensaio de recuperação do método por CLAE.

Tabela 3. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden

Tabela 4. Parâmetros analíticos e seus níveis de alterações utilizados no ensaio de robustez do método para CPZ e PRED por CLAE.

Tabela 5. Influência da fase estacionária nos parâmetros cromatográficos sob o desenvolvimento e otimização do método analítico por CLAE acoplado ao DAD.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos influenciados pela fase móvel do método em estudo. Utilizando a coluna Acclaim® C18, em modo isocrático de solventes e fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup>.

Tabela 7. Determinação da concentração percentual de CPZ e PRED no produto acabado pelo método validado por CLAE.

Tabela 8. Exatidão de método analítico aplicado para recuperação de CPZ por CLAE.

Tabela 9. Exatidão do método analítico aplicado a recuperação de PRED por CLAE.

Tabela 10. Resultado do ensaio de precisão do método de análise simultânea de CPZ associada à PRED por CLAE.

Tabela 11. Teores da CPZ e PRED determinados na análise da robustez do método por CLAE.



Tabela 12. Efeitos sobre o teste de Youden aplicado a validação do método para CPZ e PRED por CLAE.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPZ	Cefoperazona
DAD	Detector de Arranjos de Diodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
POI	Pomada oleosa intramamária
PRED	Prednisolona
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
T <sub>MAX</sub>	Tempo para alcançar a concentração máxima
WHO	<i>World Health Organization</i>

ANNUNCIATTO, Jefferson. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de cefoperazona e prednisolona em pomada oleosa intramamária por CLAE-DAD. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

## RESUMO

A cefoperazona é uma cefalosporina de terceira geração empregada no tratamento alopático da mastite bovina, doença que acomete de forma relevante a pecuária nacional, uma vez que o animal corre risco de perder o teto infectado. Além, de ser afastado da produção pelo período de tratamento e carência pós terapia para evitar a disseminação de metabólitos dos fármacos utilizados e também prejudicar os produtos intermediários derivados do leite e carne com cepas bacterianas. A associação de um anti-inflamatório esteroidal nesse processo infeccioso demonstra melhores resultados frente aos tratamentos de forma individual com antimicrobiano, fazendo jus a associação para melhor resposta clínica e menor perda de produção. Até o momento não foi encontrado na literatura um método capaz de analisar de forma simultânea os fármacos de interesse deste estudo. Avaliando este contexto, a necessidade de desenvolver um método analítico capaz de determinar de forma simultânea a associação entre cefoperazona (CPZ) e prednisolona (PRED) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector DAD (CLAE-DAD) fez-se relevante. O método foi desenvolvido e validado em pomada oleosa intramamária, apresentado linearidade para CPZ de 0,25 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0,9999$ ) e para PRED de 0,75 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0,9997$ ), com baixos limites de detecção e quantificação. O método demonstrou-se preciso através da repetibilidade e precisão intermediária, com coeficientes de variação menores que 2%. Na exatidão apresentou recuperação próximo a 100% para ambos fármacos, além de demonstrar a sua robustez pelo teste de Youden, que se avaliou os efeitos e concluiu que os parâmetros alterados no teste não foram suficientes para alterar os valores obtidos nas determinações. O teste também foi aplicado na amostra comercial com vistas ao controle de qualidade, onde apresentou eficiência de extração de 69,66% para CPZ e 72,36% para PRED. Sendo assim o método desenvolvido está passível de ser aplicado, pois foi validado e aprovado para análise isolada ou simultânea dos fármacos estudados.

**Palavras chave:** cefoperazona, cefalosporinas, CLAE-DAD, validação

ANNUNCIATTO, Jefferson. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cefoperazone and prednisolone in intramammary balm by HPLC-DAD. 2017. Dissertation (Master degree in Pharmacy). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS

### **ABSTRACT**

Cefoperazone is a third generation cephalosporin used in the allopathic treatment of bovine mastitis, it is a disease that affects relevantly the national livestock sector once that the animal is at risk of losing the infected udder. In addition, being separated from the production by the period of treatment and deficiency post-therapy, to prevent the spread of drugs' metabolites used and also to harm the intermediary products derived from milk and meat with bacterial strains. The association of a steroidal anti-inflammatory in this infectious process demonstrates better results on the treatments done individually with antimicrobial, justifying the association for better clinical response and reduced loss of production. Up to now, there has not been found in literature a method capable of simultaneously analyze the drugs of interest of this study. Evaluating this context, the need to develop an analytical method capable to determine simultaneously the association between cefoperazone and prednisolone by high performance liquid chromatography coupled to the DAD detector (HPLC-DAD) became relevant. The method was developed and validated in sample intramammary balm, presenting linearity for cefoperazone from 0.25 to 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0.9999$ ) and for PRED from 0.75 to 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0.9997$ ), with lower limits of detection and quantification. The method was shown to be accurate through intermediate repeatability and precision, with coefficients of variation lower than 2%. In exactness, it presented recovery close to 100% for both drugs, besides demonstrating its robustness by the test of Youden that evaluated the effects and concluded that the altered parameters in the test were not enough to change the values obtained in the determinations. The test was also applied in the commercial sample for quality control, where it showed an efficiency of extraction of 69.66% for CPZ and 72.36% for PRED. Therefore, the method developed is capable to be applied, because it has been validated and approved for isolated or simultaneous analysis of the drugs studied.

**Key words:** cefoperazone, cephalosporins, HPLC-DAD, validation

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Antimicrobianos .....	16
2.2. Cefalosporinas .....	16
2.3. Cefoperazona.....	18
2.3.1. Propriedades farmacológicas .....	18
2.3.1.1. Farmacocinética.....	18
2.3.1.2. Farmacodinâmica e aplicações clínicas .....	19
2.3.2. Mastites bovina .....	19
2.3.3. Associações cefoperazona e prednisolona.....	20
2.3.4. Prednisolona.....	21
2.3.4.1. Aspectos farmacológicos da prednisolona .....	21
2.4. Resistência bacteriana .....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo geral .....	24
3.2. Objetivos específicos .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1. Material.....	25
4.1.1. Reagentes e solventes .....	25
4.1.2. Padrões de referência e amostra comercial.....	25
4.1.3. Equipamentos, acessórios e vidrarias.....	25
4.2. Métodos .....	26
4.2.1. Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas.....	26
a) A determinação dos espectros de absorção:.....	26
b) Comprimento de onda: .....	26
c) Colunas cromatográficas:.....	26
d) Fase móvel: .....	26
e) Volume de injeção:.....	26
4.2.2. Escolha dos parâmetros cromatográficos .....	27
4.2.3. Validação do método por CLAE-DAD .....	27
4.2.3.1. Preparo das soluções padrão.....	27
4.2.3.2. Construção das curvas de calibração e linearidade .....	28
4.2.3.3. Preparo da amostra comercial .....	28
4.2.3.3.1. Solução de trabalho de CPZ .....	28
4.2.3.3.2. Solução de trabalho de PRED .....	28

4.2.3.4.	Determinação do teor de CPZ e PRED na amostra comercial (Cefavet®)	29
4.2.3.5.	Parâmetros da validação.....	29
4.2.3.5.1.	Teste de interferência dos excipientes .....	29
4.2.3.5.2.	Teste de recuperação: exatidão .....	30
4.2.3.5.3.	Teste de precisão .....	32
4.2.3.5.4.	Teste de robustez .....	32
4.2.3.5.5.	Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1.	Desenvolvimento do método analítico .....	35
5.1.1.	Escolha da fase estacionária.....	35
5.1.2.	Escolha da fase móvel.....	35
5.1.3.	Cromatograma do método analítico .....	36
5.2.	Validação do método .....	38
5.2.1.	Curvas de calibração e linearidade .....	38
5.2.2.	Determinação do teor da CPZ e PRED no produto acabado.....	39
5.2.3.	Teste de interferência dos excipientes: seletividade. ....	40
5.2.4.	Teste de recuperação: exatidão.....	41
5.2.5.	Teste de precisão .....	42
5.2.6.	Teste de robustez.....	43
5.2.7.	Limites de detecção e quantificação .....	44
6.	CONCLUSÃO .....	45
7.	REFERÊNCIAS .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

O controle de qualidade dos produtos farmacêuticos é um dos meios de assegurar que o efeito terapêutico esperado aconteça, minimizando a injúria e promovendo a saúde e bem-estar dos seus usuários. Na última década muitos foram os guias de harmonização produzidos para transmitir os elevados padrões de produção e controle de qualidade local para a esfera global utilizando compêndios referenciais como *Food and Drug Administrations* (FDA), *World Health Organization* (WHO) e *International Conference Harmonization* (ICH) (HALEEM *et al.*, 2015).

As análises farmacológicas envolvem modelos analíticos distintos, padronizáveis, reproduzíveis e aplicáveis na maioria dos ambientes laboratoriais, com intuito de acrescentar uma forma de identificação e determinação para a rotina de análise. Fármacos pertencentes a mesma classificação terapêutica, com propriedades físico-químicas cada vez mais semelhantes, requerem métodos mais sensíveis e seletivos. As técnicas de separações cromatográficas ganham destaque pelo alto poder de aplicabilidade nas mais diversas áreas analíticas (SILVA; COLINS, 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica relevante entre os métodos analíticos qualitativo e quantitativo, considerada uma técnica de separação, confirmação e quantificação bastante difundida e aplicada no âmbito do controle de qualidade de produtos em desenvolvimento e acabados (MALDANER *et al.*, 2010; SILVA; COLINS, 2011).

Dentre as distintas classes de fármacos, os antimicrobianos merecem um destaque especial. Várias gerações já foram beneficiadas com seu uso, aumentando consideravelmente a expectativa de vida desde a descoberta da penicilina a cerca de 80 anos atrás, impactando de forma direta no desenvolvimento social e econômico (GUEGAN, 2010).

Os antimicrobianos estão envolvidos em um problema relevante de resistência aos patógenos tratados - a resistência bacteriana - que contribui para o aumento da morbidade e mortalidade humana e animal. (JEAN *et al.*, 2015). Esse fato crítico é ainda mais relevante quando estudos demonstram que novos antimicrobianos estão sendo desenvolvidos em proporção inferior ao crescimento de bactérias resistentes, causando déficit de avanço terapêutico onde a indústria farmacêutica luta com

dificuldade para acompanhar o surgimento dos novos patógenos. (MOTA *et al.*, 2005; WHITE, 2011).

Na medicina veterinária, é notado o crescimento da resistência antimicrobiana, com atenção as bactérias gram-negativas, as quais têm apresentado maior resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro (TORNEKE *et al.*, 2015). O uso indiscriminado dos antimicrobianos contribuiu de forma significativa para aumentar a resistência microbiana levando ao aumento de doses usuais, aumento de resíduos na carne e no leite e, utilizando fármacos de gerações superiores com maior frequência gera maiores resistências bacterianas e maior número de mortes animais (MOTA *et al.*, 2005). Pode-se observar essa prática para o tratamento de mastites (infecção bacteriana intramamária) onde a cefoperazona, uma cefalosporina de terceira geração tornou-se a primeira escolha terapêutica (FEBLER *et al.*, 2012).

A terapia antimicrobiana geralmente ocorre de maneira associada, a corticoides potentes ou anti-inflamatórios não esteroidais, que possam atuar como coadjuvantes aos quadros inflamatórios que acompanham o processo infeccioso, melhorando consideravelmente a resposta terapêutica (NAKARA *et al.*, 2014).

A importância de um método que seja eficaz para a determinação desses fármacos é relevante pois são fármacos amplamente utilizados na medicina veterinária no tratamento da mastite. Doença que causa redução significativa na produção pecuária devido o tempo de afastamento do animal tratado e o tempo de carência do antimicrobiano. Se esses intervalos não são respeitados os resíduos dos fármacos podem contaminar em grande escala os derivados de leite e carne, levando grande prejuízo para a economia mundial (FEBLER *et al.*, 2014)

Assim, o objetivo dessa pesquisa foi o desenvolvimento e validação de um método analítico empregando a CLAE para determinação simultânea e quantitativa de cefoperazona associada a prednisolona em pomada oleosa intramamária para uso animal, indicada para o tratamento de mastite. Considerando ainda que até o momento não foi encontrada na literatura nenhum método analítico validado utilizando a CLAE para determinação simultânea desses compostos em formulas farmacêuticas. A determinação desses compostos através de um único método reduz o tempo de análise e diminui o uso de solventes orgânicos. Sendo assim o desenvolvimento do método analítico apresentado neste trabalho tem potencial de acrescentar um método inovador para a análises cromatográficas aplicadas ao controle de qualidade dos medicamentos citados de forma isolada ou em associação.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Antimicrobianos

Historicamente a injúria física é uma das principais causas de morte para o homem, em que um dano tecidual ocasione de alguma forma a falência por aumento incontrolável de micro-organismos patogênicos. Então, através da indagação de alguns estudiosos como Jenner e Pasteur, o “invisível” à olho nu passou a ser pesquisado, nos beneficiando primeiramente com as vacinas e posteriormente com os antimicrobianos. Em 1928, Alexandre Fleming notou que ao contaminar uma de suas culturas de bactérias com o fungo *Penicilium notatum*, o mesmo causava lise nas bactérias, descobrindo assim a substância antimicrobiana penicilina G, que pertence à classe de antimicrobianos com maior uso e aplicações desde seu descobrimento (TERCIO, 2007).

A benzilpenicilina ou penicilina G foi descrita em 1929 como antimicrobiano e utilizada como forma terapêutica em 1940, como alvo principal de infecções por bactérias gram-positivas. Neste período, até 1960 vários outros antimicrobianos foram descobertos utilizando a triagem de produtos naturais e poucos derivados sintéticos. No período de 1960 a 1980, ampliaram-se os estudos também para bactérias gram-negativas, onde a maioria deles foram obtidos a partir de protótipos naturais microbianos, como os derivados  $\beta$ -lactâmicos. As duas décadas seguintes foram marcadas devido a busca de novos antimicrobianos através da genômica, de maneira não equiparada ao surgimento de novos patógenos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana contribui para o aumento da morbidade e mortalidade humana e animal (SHENG *et al.*, 2015). Esse fato crítico é ainda mais relevante quando estudos demonstram que novos antimicrobianos estão sendo desenvolvidos em proporção inferior ao crescimento de bactérias resistentes, causando um *déficit* no desenvolvimento de alternativas terapêuticas onde a indústria farmacêutica luta com dificuldade para acompanhar o surgimento dos novos patógenos (GUIMARÃES *et al.*, 2010; WHITE, 2011)

### 2.2. Cefalosporinas

Após cultivar culturas de *Cephalosporium acremonium*, em 1945 em Sardenha na Itália, Giusepp Brotzu isolou o fungo. Observou que a atividade antimicrobiana apresentava uma relação química com as penicilinas e maior resistência à enzima

beta-lactamase, enzima esta que degrada de forma significativa as penicilinas através da clivagem do anel beta-lactâmico presente na estrutura tanto das penicilinas quanto das cefalosporinas. O ácido 7-aminocefalosporânico (Figura 1) está presente na estrutura básica das cefalosporinas, onde a partir dele origina-se as demais gerações de cefalosporinas. Inicialmente existiam três tipos de cefalosporinas: C, N e P. Posteriormente, apenas a cefalosporina C foi considerada uma nova forma terapêutica, uma vez que a cefalosporina N foi considerada quimicamente relacionada com a penicilina e, a P possui estrutura esteroide. A partir de então, surgiram diversos fármacos, que foram agrupados por gerações de acordo com a atividade antimicrobiana e seu espectro de ação (TERCIO, 2007).

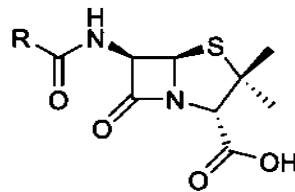


Figura 1. Estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico (TERCIO, 2007).

As cefalosporinas de primeira geração possuem um estreito espectro de ação principalmente sobre as bactérias gram-positivas e pouca atividade em gram-negativas. Essa classe é representada pela cefalexina, cefadroxila, cefaclor, cefazolina, cefalotina, cefadrina, cefacetila e cefapirina. A segunda geração de cefalosporinas apresenta melhor ação sobre bactérias entéricas gram-negativas, e nessa classe estão incluídas a cefuroxima, cefoxitina, cefamandol e ceforanida. Já a terceira geração apresenta maior atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e, além disso, são fármacos mais estáveis a luz e mais resistentes a beta-lactamases. Essa última geração de cefalosporinas é representada pela cefotaxima, ceftriaxona, cefmenoxima, cefotetana, moxolactama, e alguns de ação anti-*Pseudomonas sp.* como a ceftazidima, cefoperazona e cefaloridina. Ainda existem as cefalosporinas de quarta geração, entre elas a cefpime e cefpiroma, que são fármacos ativos contra bastonetes gram-negativos e outras bactérias gram-positivas (SILVA, 2010).

## 2.3. Cefoperazona

Após 1977 surgiram os primeiros relatos na França e na Alemanha Ocidental sobre um fármaco com atividade contra *Pseudomonas aeruginosas* chamado HR756, e a partir dele obteve-se a cefoperazona sódica, sintetizada pela Toyama Chemical Co. em Tóquio no Japão (JONES & BARRY, 1983). A cefoperazona (CPZ) é um antimicrobiano de uso animal de amplo espectro, demonstrando maior atividade em bactérias gram-negativas onde inibe a biossíntese de parede celular antimicrobiana (HOANG *et al.*, 2015; JONES & BARRY, 1983; NAGUIB & DARWISH, 2016)

A CPZ é denominado quimicamente por (6R,7R)-7-[[[(2R)-2-[[[(4-etil-2,3-dioxopiperazin-1-il)carbonil]amino]-2-(4-hidroxifenil) acetil]amino]-3-[[[(1-metil-1H-tetrazol-5-il) sulfanil] metil]-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo [4,2,0] oct-2-ene-2-carboxilato de sódio, e possui a fórmula empírica  $C_{25}H_{26}N_9NaO_8S_2$  e peso molecular  $667,65 \text{ g mol}^{-1}$ . (ELKADY & ABBAS, 2011). Apresenta-se como um pó branco cristalino, muito solúvel em água, acetonitrila e metanol e pouco solúvel em acetona e éter. A Figura 2 apresenta a estrutura molecular da cefoperazona sódica (HEYMES *et al.*, 1977)

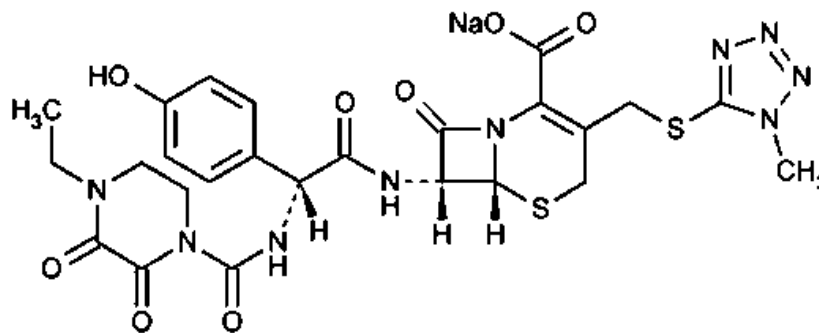


Figura 2. Estrutura química da cefoperazona sódica (HOANG *et al.*, 2015)

### 2.3.1. Propriedades farmacológicas

#### 2.3.1.1. Farmacocinética

A CPZ é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal e por isso sua principal utilização ocorre pelas vias: parenterais, intramuscular, intravenosa e intramamária. A CPZ apresenta volume de distribuição aparente de 10 a 13L, relativamente rápido, com tempo de meia-vida de 1,6 a 2,4 horas e *clearance* sérico entre 75 e 96 mL/min. A farmacocinética por via parenteral após administração de 20mg/kg IM em cabras,

alcançou concentração máxima de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  no tempo de 0,58h e aproximadamente 20,34% do CPZ se liga a proteínas plasmáticas (ATTIA *et al.*, 2015).

A administração intramamária em vacas com veículos oleosos teve um tempo de meia de 6,73h, e os níveis plasmáticos que inibiam o crescimento bacteriano se estendiam por mais de 12h após a aplicação de 300mg de CPZ. A principal via de excreção da CPZ é a bile, seguido da urina em menor quantidade (CAGNARDI *et al.*, 2010).

### **2.3.1.2. Farmacodinâmica e aplicações clínicas**

No cuidado animal, seja de produção ou de companhia a aplicação de CPZ como infusão intramamária para tratamento de mastites é relevante uma vez que controla infecções por *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* e *Escherichia coli*, com doses de 250 mg em intervalos de 24h. Durante o tratamento, o uso da produção do animal deve ser suspenso para evitar danos aos consumidores e contaminação dos demais laticínios da cadeia de produção (FEBLER *et al.*, 2012).

A CPZ exerce atividade bactericida através da inibição da síntese de parede celular de peptidoglicanas inibindo as enzimas nos processos de transpeptidação, por ligação de uma ou mais proteínas de ligação a penicilina de células que se dividem ativamente (WANG *et al.*, 2015). Também propõem que a cefalosporinas diminuem a disponibilidade de um inibidor da mureína hidrolase, enzima envolvida na divisão celular (MOTESISSA *et al.*, 2003).

Podemos atribuir a maior parcela de participação no tratamento da mastite aos  $\beta$ -lactâmicos e cefalosporinas. A CPZ é um fármaco antimicrobiano que apresenta atividade contra a maioria dos patógenos causadores da mastite em bovinos, sendo um dos antimicrobianos mais aplicados para essa terapia (FEBLER *et al.*, 2012).

### **2.3.2. Mastites bovina**

A mastite bovina é uma doença que acomete vacas matrizes em grande proporção. Trata-se de uma infecção bacteriana no teto do animal lactante, que torna impróprio o leite para o consumo (LE MARECHAL *et al.*, 2011). É um processo inflamatório e infeccioso que acomete o teto do animal em período de lactação, e frequentemente são causados por *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* e *Escherichia coli*. Existe duas formas de mastites bovina, a forma clínica onde visivelmente o úbere e os tetos estão inflamados, com baixa produção

leiteira e sintomas comuns como febre e dor no animal. Já a forma subclínica se ausenta dos sinais de inflamação, porém apresenta ligeira diminuição da produção de leite (FEBLER *et al.*, 2012)

Dentre os fármacos de uso veterinário e humano, os antimicrobianos são extensamente empregados em diversas formas e terapias, associados ou não com anti-inflamatórios e analgésicos (OLIVER & MURINDA, 2012).

O tratamento de mastite geralmente envolve a associação de um anti-inflamatório ou um inibidor da enzima  $\beta$ -lactamase à um antimicrobiano eficaz. Contribuindo para os demais sintomas inflamatórios, reações alérgicas e quadros de dor, e melhorando a resposta do antimicrobiano frente a sua resistência à degradação enzimática. Dentre essa classe de medicamentos podemos destacar a prednisolona por ser extensamente empregada e muito efetiva nas mais diversas terapias associadas (SPIKA *et al.*, 2013).

### **2.3.3. Associações cefoperazona e prednisolona**

Os glicocorticoides como a prednisolona (PRED) são conhecidos pela capacidade de aumentar a integridade da barreira do sangue-leite e restabelecer rapidamente a baixa qualidade do leite associada ao quadro infeccioso devido a mastite (WALL *et al.*, 2016).

Sipka *et al.* (2013) estudou o efeito do sinergismo de uma associação semelhante à descrita anteriormente, onde a prednisolona foi associada a cefapirina e o resultado foi que os tetos tratados com a associação obtiveram uma melhor recuperação e retorno produtivo frente aos tratados com os fármacos de maneira individual, o que fortalece o objetivo da associação entre fármacos desta classe terapêutica.

A associação entre antimicrobianos e corticoides foi descrita por Brady *et al.*, (1981) sendo analisada de forma positiva, onde nota-se um tratamento com menor número de infecções reincidentes, melhor resposta clínica do paciente e outros aspectos relevantes. Outro estudo adicionando um inibidor da  $\beta$ -lactamase, com a PRED e um antimicrobiano demonstra maior eficácia no tratamento. (LI *et al.*, 2012).

### 2.3.4. Prednisolona

Dentre os fármacos associados com a CPZ os glicocorticoides são de grande importância, uma vez que regulam vários processos fisiológicos, suprimem a inflamação e seus principais efeitos celulares são: indução de apoptose, inibição de citocinas e outros mediadores da cadeia inflamatória. Os glicocorticoides foram sintetizados pela primeira vez no final da década de 30 por Edward Kendall e Tadeus Reichstein e na próxima década já haviam isolados outros 28 esteroides adrenais. Porém, a maioria das terapias são recomendadas por via tópica, tendo em vista que a via sistêmica apresenta diversos efeitos adversos (TORRES *et al.*, 2012).

#### 2.3.4.1. Aspectos farmacológicos da prednisolona

A prednisolona (Figura 3) quimicamente chamado de 11,17-di-hidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidrociclopenta [a] fenantren-3-ona, possui fórmula molecular  $C_{21}H_{28}O_5$  e massa molar de 360,444 g/mol. É um glicocorticoide sintético que possui atividade anti-inflamatória de ação intermediária (12 a 36 horas) e sua estrutura básica é semelhante aos demais glicocorticoides, caracterizando-se pelo ciclopentanoperidrofenantreno. A PRED é bem absorvida ( $t_{MAX} = 1$  a 2 horas) por via oral e após sua administração 90 a 95% se liga a proteína plasmáticas, geralmente albumina. (SAGCAL-GIROLNELLA *et al.*, 2011)

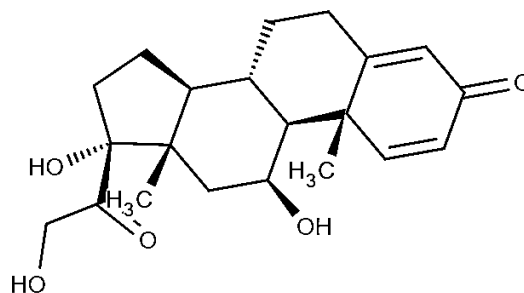


Figura 3. Estrutura química do fármaco prednisolona (Fonte: DRUGBANK, 2017)

Uma vez iniciados, os efeitos podem durar horas ou dias após o desaparecimento do glicocorticoide no sangue e isso se deve ao fato de que as mudanças fisiológicas acontecem em nível de RNAs e síntese proteica. A PRED ligada à albumina e a fração livre são mais vulneráveis a biotransformação hepática,

onde após a biotransformação são inativadas e assim eliminadas principalmente através dos rins. Os efeitos da PRED são observados em quase todo organismo uma vez que influenciam funções na maioria das células. (SILVA, 2010).

#### **2.4. Resistência bacteriana**

Nas diversas linhas de tratamento onde envolve o uso de antimicrobianos, é notado o crescimento da resistência de espécies bacterianas, com atenção as gram-negativas, as quais têm apresentado maior resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro (TORNEKE *et al.*, 2015). O uso de forma inadequada dos antimicrobianos contribuiu de forma significativa para aumentar a resistência antimicrobiana levando ao aumento de doses terapêuticas e utilizando fármacos de gerações superiores com maior frequência. Observa-se essa prática para o tratamento de mastites, onde a cefoperazona, uma cefalosporina de terceira geração tornou-se a primeira escolha terapêutica (SILVA *et al.*, 2005).

O mal-uso de cefalosporinas seja como terapia de infecção aguda ou como promotor de crescimento pode resultar em resíduos nos produtos de origem animal, carne, leite e seus derivados, levando ao aparecimento de possíveis reações alérgicas e tóxicas (LI *et al.*, 2016).

Medicamentos de uso veterinário possuem um importante papel na saúde e no estar bem animal, assim como na qualidade e segurança dos alimentos de sua origem. Os produtos farmacêuticos veterinários, sejam eles parasiticidas, vacinas, quimioproliféricos ou aditivos alimentares buscam proporcionar a saúde e o bem animal tanto de produção como de qualidade de vida dos animais de companhia (BARRETO, 2013).

Para o uso humano o controle de qualidade exigido através das legislações que nos direcionam a ter padrões de qualidade aceitáveis comprovados por estudos clínicos e certificados de qualificação exigidos para a comercialização dos produtos. O mesmo é aplicado aos medicamentos de uso animal, o Decreto no. 5.053 de 22 de abril de 2004, estabelece que fica facultado ao fabricante a terceirização do controle de qualidade em laboratórios cadastrados no ministério da agricultura.

Um dos comércios que movem a economia mundial é a pecuária leiteira e de corte, através do comércio nacional e internacional de leite, carne e seus derivados. Os antimicrobianos são a principal classe farmacêutica utilizados como promotores de crescimento, agentes profiláticos e para fins terapêuticos. Quando utilizado de

forma correta, deve-se respeitar um tempo de carência até que o animal que o utilizou possa ser útil novamente para a produção. Se este tempo não é respeitado, pode-se contaminar com os fármacos e seus metabólicos os produtos de todo o rebanho e afetando o consumidor final (McGRATH *et al.*, 2015; OLIVER & MURINDA, 2012; PACHECO-SILVA *et al.*, 2014).

A importância do controle e garantia da qualidade tange toda a economia do processo. O consumo de alimentos com resíduos de antimicrobianos pode causar sensibilização, reações alérgicas e desequilíbrio da microbiota intestinal, gerando risco para a saúde além de prejuízo financeiro substancial para o setor alimentício (McGRATH *et al.*, 2015).

Analisando este cenário nota-se a importância de um método analítico que determine de forma quantitativa os fármacos de uma formulação de pomada oleosa intramamária com vistas ao controle de qualidade. Sendo assim, o presente estudo buscou o desenvolvimento e a validação de um método analítico utilizando a CLAE para determinação qualitativa e quantitativa, de forma simultânea, da associação farmacêutica contendo CPZ e PRED, uma vez que até o momento não foi encontrado na literatura científica nenhum método para a análise simultânea desses fármacos.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar método analítico para determinação simultânea de cefoperazona associada à prednisolona em pomada oleosa intramamária por CLAE-DAD e aplicar o método em amostra comercial.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver e otimizar um método analítico por CLAE para determinação simultânea de cefoperazona associada a prednisolona;
- Validar o método analítico de acordo com a Resolução 166 de julho de 2017 da ANVISA cumprindo os critérios como linearidade, precisão, seletividade, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação;
- Aplicar o método na amostra comercial Cefavet® (250mg cefoperazona e 4mg de prednisolon) contendo os fármacos acima mencionados, empregando o método analítico desenvolvido e validado.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Reagentes e solventes**

Os reagentes utilizados no desenvolvimento, otimização e validação do método foram de grau HPLC com pureza analítica acima de 99,5%: acetonitrila, ácido o-fosfórico e água ultrapura obtida pelo sistema Direct-Q® 3UV MilliPak® Express 20 da Merck.

#### **4.1.2. Padrões de referência e amostra comercial**

Os padrões de referência foram gentilmente doados pelo laboratório de pesquisa e desenvolvimento da empresa CEVA, com o respectivo laudo emitido pela Sigma-Aldrich®: cefoperazona (lote: SZBF103XV, válido até 13/04/2019, pureza 99,8%), prednisolona (lote: SZBD009XV, válido até 09/01/2018, pureza 98,2%). A amostra comercial CEFAVET® foi gentilmente cedida pelo laboratório fabricante (CEVA Saúde Animal Ltda) registrado sobre lote 031/15, válido até 08/2018 contendo 250 mg de CPZ e 4 mg de PRED.

#### **4.1.3. Equipamentos, acessórios e vidrarias**

Os equipamentos foram utilizados dentro dos laboratórios do núcleo de ensino e pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), segue abaixo os equipamentos utilizados:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex® Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) acoplado com detector de arranjo de diodos (DAD) Ultimate 3000 RS Variable Wavelength e bomba Ultimate 3000 Pump, tratado pelo Software Chromeleon 7.1.
- Peagâmetro de bancada MS TECNOPON mPA210
- Balança analítica Shimadzu AUY220
- Banho de ultrassom UNIQUE USC 1400A
- Colunas cromatográficas: Acclaim® C18 da Thermo Scientific, Kinetex® C18 da Phenomenex, VertiSep C18 da Vertical®;
- Membranas de filtração Millipore® de 0,22 µm;

- Vidrarias volumétricas (balões, buretas, pipetas e provetas).

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas

Com a finalidade de padronizar uma metodologia eficiente para a análise de formulações farmacêuticas, foram desenvolvidos alguns testes preliminares para a seleção do comprimento de onda mais adequado para cada fármaco, escolha do sistema eluente, do pH e das concentrações dos padrões a serem empregadas.

a) A determinação dos espectros de absorção:

Foram determinados a partir de uma solução contendo CPZ e PRED nas concentrações de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  com pH ajustado para 3,0 com ácido o-fosfórico;

b) Comprimento de onda:

Foram definidos com base nos espectros obtidos através do item a.

c) Colunas cromatográficas:

No desenvolvimento do método por CLAE foram testadas três colunas cromatográficas de fase reversa C18 também utilizadas nos estudos de Li *et al.* (2016). Wang *et al.*, (2015) e Zhou *et al.*, (2010): 1) Kinetex C18 - Phenomenex®; 2) VertiSep C18 - Vertical®; e 3) Acclaim® C18 – Thermo Scientific. Em todos os testes foram empregadas a fase móvel acetonitrila:água pH 3,0 (60:40 v/v) com fluxo de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  (coluna 1),  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  (coluna 2) e  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  (coluna 3), operando em modo isocrático de solvente.

d) Fase móvel:

Diferentes sistemas eluentes foram aplicados diversificando a proporção de acetonitrila e água em pH 3,0 (CAGNARDI *et al.*, 2010) com o intuito de reduzir de forma significativa o consumo de solventes orgânicos. Assim também a vazão da fase móvel foi variada de acordo com o interesse do método. Utilizando a coluna cromatográfica eleita no desenvolvimento do método no item “C” e seu respectivo fluxo.

e) Volume de injeção:

O volume de injeção não foi modificado em nenhuma das etapas de desenvolvimento, otimização e validação, usando o *loop* fixo de 20 µL de amostra devido as limitações do sistema injetor utilizado.

#### **4.2.2. Escolha dos parâmetros cromatográficos**

Para a escolha das melhores condições cromatográficas alguns parâmetros analíticos foram eleitos: a resolução cromatográfica, que corresponde a distância do pico posterior em relação ao pico anterior da corrida cromatográfica. Sendo aceitável uma resolução maior que 2,0 pelo ICH. Também, o número de pratos foi determinante na escolha, sendo aceitável acima de 2000. E por último a assimetria de pico, que analisa o quanto simétrico foi a eluição do fármaco e quanto mais próxima de 1,0 melhor é o parâmetro (PAPADOYANNIS & SAMANIDOU, 2004).

#### **4.2.3. Validação do método por CLAE-DAD**

Os parâmetros do método analítico desenvolvido foram validados conforme as orientações da Resolução no. 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Também as recomendações da *Association of Official Analytical Chemists International* e do *ICH (International Conference Harmonisation)* (AOAC, 2016; ICH 2005).

O método foi validado empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Ultimate 3000 acoplado com detector de arranjos de diodos (DAD) Ultimate 3000 RS e bomba quaternária Ultimate 3000. O software Chromeleon® 7.1 foi utilizado para o processamento de dados. Os ensaios de desenvolvimento foram realizados em temperatura ambiente, utilizando as colunas cromatográficas em fase reversa e mistura isocrática de fase móvel de acetonitrila e água ácida. Como fase móvel utilizou-se acetonitrila (Tedia®) e água obtida por filtração Mili-Q® acidificada na faixa de pH 3,0 com ácido *o*-fosfórico de grau analítico. O volume de injeção foi de 20 µL e os comprimentos de onda utilizados foram 240 e 260 nm para PRED e CPZ, respectivamente e o tempo total da corrida foi de cinco minutos.

##### **4.2.3.1. Preparo das soluções padrão**

As soluções padrão foram preparados pesando quantitativamente 10,0 mg de cada padrão de referência de CPZ e PRED e transferidos para balões volumétricos

de 100 mL individuais. O volume foi completado com acetonitrila resultando na concentração final de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estas soluções compuseram a solução de estoque, armazenadas em refrigerador ( $2-4^{\circ}\text{C}$  por 30 dias), as quais foram utilizadas para o desenvolvimento, otimização e validação do método. Todo o desenvolvimento e validação foi realizado após a associação dos fármacos, adicionando no mesmo balão volumétrico concentrações conhecidas de cada fármaco, essas soluções foram armazenadas sob refrigeração por 10 dias, sem congelamento.

#### **4.2.3.2. Construção das curvas de calibração e linearidade**

Foi determinada através da obtenção de curvas de calibração analítica a partir de diluições das soluções padrão preparadas de forma simultânea. Utilizou-se as concentrações de CPZ de 0,25; 0,75; 1,25; 2,50; 5,0; 15,0 e  $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e PRED entre 0,75; 1,25; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e  $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as determinações foram realizadas em triplicadas e sob temperatura ambiente ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

#### **4.2.3.3. Preparo da amostra comercial**

##### **4.2.3.3.1. Solução de trabalho de CPZ**

Transferiu-se de modo quantitativo  $100 \mu\text{L}$  da pomada oleosa intramamária (POI) (Cefavet® lote 031/15) para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetonitrila, resultando assim, em soluções de trabalho com  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CPZ. Foi submetido ao banho de ultrassom por cinco minutos e em seguida as soluções de análise foram filtradas com membrana  $0,22 \mu\text{m}$  separando o botão formado pela POI no solvente polar antes de injeção ao cromatógrafo.

##### **4.2.3.3.2. Solução de trabalho de PRED**

Transferiu-se quantitativamente  $200 \mu\text{L}$  de POI para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetonitrila, resultando em uma solução de trabalho com  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PRED. Foi submetido ao banho de ultrassom por cinco minutos e em seguida duplamente filtrada em membrana  $0,22 \mu\text{m}$  separando o botão formado pela POI no solvente polar antes de injeção no cromatógrafo.

#### 4.2.3.4. Determinação do teor de CPZ e PRED na amostra comercial (Cefavet®)

O teor dos fármacos no produto acabado foi determinado através da aplicação do método validado na análise da POI, registrado como Cefavet® fabricada pelo Laboratório CEVA sob registro no lote 031/15, fabricado em agosto de 2015 e com vencimento para agosto de 2018, contendo o equivalente a 233,149 mg de CPZ e 4,0 mg de PRED em 10mL de POI. As equações 1 e 2, apresentadas abaixo, foram utilizadas para o cálculo de recuperação da eficiência de extração do método na matriz aplicada.

Equação 1. 
$$CP = \frac{AP \times CSQR}{ASQR}$$

Em que:

CP = Concentração de CPZ / PRED na POI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

AP = Área do pico de CPZ / PRED na POI

CSQR = Concentração da substância química de referência

ASQR = Área da substância química de referência

Equação 2. 
$$CP (\%) = \frac{CP \times 100}{CT}$$

Em que:

CP (%) = Concentração percentual de CPZ / PRED na POI (%)

CP = Concentração dos fármacos (CPZ e/ou PRED) no produto acabado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

CT = Concentração teórica dos fármacos (CPZ e/ou PRED) no produto acabado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Para a realização deste ensaio foram preparadas soluções de CPZ e PRED conforme descrito anteriormente no item 4.2.3.3.1 e 4.2.3.3.2, em triplicada. Após preparo as soluções foram diluídas em fase móvel (acetonitrila e água pH 3,0), resultando em concentrações de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ e  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  para PRED.

#### 4.2.3.5. Parâmetros da validação

##### 4.2.3.5.1. Teste de interferência dos excipientes

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio de sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na

presença de componentes que possam estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (RDC 166/2017). Para a realização deste ensaio seria ideal aplicar o método em validação numa amostra que contenha todos os componentes exceto os analitos de interesse, porém o fabricante da amostra comercial não fornece essas informações. Sendo assim, foi preparado uma mistura com proporção 1:1 v/v de lanolina e vaselina, sem adição de conservantes e submetido ao método em validação.

#### **4.2.3.5.2. Teste de recuperação: exatidão**

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação onde quantidades conhecidas de CPZ e PRED padrão de referência foram adicionadas as soluções de amostras cujas as concentrações eram fixas. Avaliou-se em três níveis de recuperação, compreendendo a linearidade do método, 10, 15 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  como R1, R2 e R3, respectivamente. A exatidão é um importante parâmetro da validação pois demonstra a proximidade dos resultados obtidos pelo método desenvolvido em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2017; ICH 2005).

Soluções estoque de CPZ e PRED padrão de referência foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3.3.1 e 4.2.3.3.2. Foram realizadas diluições quantitativas para obter a concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de padrão CPZ, diluindo 5 mL de solução estoque para balão volumétrico de 10 mL de acetonitrila. Posteriormente foram realizadas diluições para obter soluções com concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , transferindo 1mL de soluções estoque para balões volumétricos de 10 mL onde o volume foi acertado com fase móvel (acetonitrila e água, 70:30 v/v pH 3,0 ajustado com ácido o-fosfórico). Nos demais balões volumétricos de 10mL identificados como 2, 3 e 4 foram transferidas alíquotas de 1mL da solução estoque do produto acabado e 1, 2 e 3 mL da solução estoque de CPZ padrão de referência, respectivamente, e os volumes completados com fase móvel para obter soluções com concentração de 10, 15 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de acordo com a Tabela 1. Todas as determinações foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A porcentagem da CPZ recuperada foi calculada por meio da equação 3 apresentada abaixo (AOAC, 2016):

Equação 3. 
$$\% R = \frac{(Ca - Cna)}{Cp} \times 100$$

Onde:

Ca = Concentração de fármaco encontrada na amostra de padrão;

Cna = Concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão;

Cp = Concentração teórica de padrão.

Tabela 1. Preparo das soluções de cefoperazona para o ensaio de recuperação do método por CLAE.

Balões volumétricas (10mL)	Padrão CPZ* (mL) [50,0 µg mL <sup>-1</sup> ]	Amostra comercial [50,0 µg mL <sup>-1</sup> ] (mL)	Concentração final (µg mL <sup>-1</sup> )
1	1,0	-	5,0
2	1,0	1,0	10,0
3	2,0	1,0	15,0
4	3,0	1,0	20,0
5	-	1,0	5,0

\*CPZ SQR: cefoperazona substância química de referência.

Para o ensaio de recuperação da PRED (Tabela 2) foram preparadas soluções estoque conforme o item 4.2.3.3.1 e 4.2.3.3.2. Posteriormente, foram realizadas diluições para obter a concentração de 1,6 µg mL<sup>-1</sup> de PRED SQR, transferindo quantitativamente 0,160 µL de solução de trabalho de PRED SQR para balões de 10 mL onde o volume foi acertado com fase móvel (acetonitrila e água, 70:30 v/v, pH 3,0 ajustado com ácido o-fosfórico) no balão número 1.

Tabela 2. Preparo das soluções de prednisolona para o ensaio de recuperação do método por CLAE.

Balões volumétricos (10mL)	Padrão PRED* (µL) [50,0 µg mL <sup>-1</sup> ]	Amostra comercial [1,60 µg mL <sup>-1</sup> ] (mL)	Concentração final (µg mL <sup>-1</sup> )
1	160	-	1,6
2	400	9,6	5,6
3	600	9,4	7,6
4	800	9,2	9,6
5	-	10,0	1,6

\*PRED SQR: prednisolona substância química de referência.



Nos demais balões de 10 mL identificados como 2, 3 e 4 foram transferidas alíquotas de 0,400, 0,600 e 0,800 mL da solução estoque PRED SQR, respectivamente, e os volumes completados com a solução de PRED amostra comercial ( $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), resultando na concentração de 5,6, 7,6 e  $9,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PRED. A porcentagem de recuperação de PRED foi calculada por meio da equação 3 descrita anteriormente para o ensaio de recuperação de CPZ.

#### 4.2.3.5.3. Teste de precisão

A precisão foi determinada através do ensaio intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Ambos os parâmetros foram avaliados em três níveis de concentração como preconiza a RDC 166/2017, com concentrações de 1,0, 5,0 e  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ + PRED, ou seja, dentro do intervalo de linearidade com um nível baixo, médio e alto da curva de calibração. Para a repetibilidade foram preparadas triplicatas das soluções e analisadas no mesmo dia, com curto intervalo de tempo e pelo mesmo analista. Para precisão intermediária, foram preparadas triplicatas de soluções de por analistas diferentes, e analisadas em dias diferentes. Esse ensaio foi realizado durante três dias consecutivos e os resultados foram expressos em termos DPR através da equação 4:

Equação 4: 
$$DPR = \left(\frac{SD}{\bar{X}}\right) \times 100$$

Onde: SD é o desvio padrão do intercepto e  $\bar{X}$  é a média das determinações.

#### 4.2.3.5.4. Teste de robustez

A robustez do método foi analisada pelo Teste de Youden (YOUTEN; STERINER, 1975), por meio de doseamento utilizando as soluções de CPZ e PRED SQR preparadas no item 3.3, com posteriores diluições em fase móvel (acetonitrila e água, 70:30 v/v, pH 3,0 ajustado com ácido o-fosfórico) para a concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ SQR e  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  para PRED SQR. São avaliados pelo Teste de Youden sete variáveis, combinadas entre si em oito experimentos distintos, onde as condições nominais (normais) são representadas por letras maiúsculas do alfabeto latino e as condições alteradas por letras minúsculas do mesmo alfabeto, conforme demonstrado no Tabela 3. As condições alteradas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 3. Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden

Variáveis	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
V1	A	A	A	A	a	a	a	a
V2	B	B	b	b	B	B	b	b
V3	C	c	C	c	C	c	C	c
V4	D	D	d	d	d	d	D	D
V5	E	e	E	e	e	E	e	E
V6	F	F	f	F	F	f	f	F
V7	G	G	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: YOUDEN; STERINER, 1975.

Tabela 4. Parâmetros analíticos e seus níveis de alterações utilizados no ensaio de robustez do método para CPZ e PRED por CLAE.

Variável	Nível de alteração
V1 pH da fase móvel	A: 3,0 a: 2,8
V2 Proporção da FM (acetonitrila e água pH 3,0, v/v)	B: 70:30 (v/v) b: 72:28 (v/v)
V3 Comprimento de onda (nm)	C: 240 (PRED) e 260 (CPZ) c: 242 (PRED) e 258 (CPZ)
V4 Vazão (mL.min <sup>-1</sup> )	D: 0,90 mL.min <sup>-1</sup> d: 0,92 mL.min <sup>-1</sup>
V5 Temperatura da sala (°C)	E: 25 e: 27
V6 Marca da acetonitrila	F: Tedia f: Biosolvent
V7 Tempo de banho ultrassônico (min.)	G: 0 g: 5

A eficácia do Teste de Youden permite avaliar não só a robustez do método, mas também como cada parâmetro influencia nas determinações analíticas. Por isso dispõe de várias mudanças simultâneas sobre a metodologia, de maneira que os

efeitos nas alterações individuais possam ser observados (YOUNDEN, STEINER, 1975).

#### **4.2.3.5.5. Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)**

Segundo a RDC 166 de julho de 2017, o LD deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e não necessariamente quantificado. Assim, para obtenção do LD foram feitas diluições sucessivas a partir da solução de estoque de modo a alcançar a menor quantidade detectável com aceitável desvio padrão relativo (DPR). Os valores experimentais foram confrontados com aqueles obtidos teoricamente empregando as equações 5, sugerida pela RDC 166/2017.

O LQ diferente do LD é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada, com precisão e exatidão aceitável sob as condições experimentais estabelecidas, assim também é obtido através da RDC 166/2017 através da equação 6.

Equação 5: 
$$LD = \frac{3.3 \times SD}{a}$$

Equação 6: 
$$LQ = \frac{10 \times SD}{a}$$

Onde: SD é o desvio padrão do intercepto e  $\alpha$  = inclinação reta da curva de calibração.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento do método analítico

Foi utilizado para decisão das etapas de otimização e desenvolvimento do método analítico os marcadores do sistema cromatográficos que definem a qualidade da análise, características como resolução com respostas  $>2.0$ , assimetria o mais próximo de 1,0 e número de pratos  $>2000$  (ERMER & MILLER, 2005) foram aplicadas como critério de seleção para a etapa posterior do desenho analítico.

#### 5.1.1. Escolha da fase estacionária

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a coluna cromatográfica que proporcionou melhor separação entre os dois fármacos citados foi a Acclaim<sup>®</sup> C18. Essa coluna apresentou melhor desempenho dos parâmetros cromatográficos recomendados pelos compêndios internacionais de validação (ERMER & MILLER, 2005). Esse tipo de coluna tem demonstrado uma série de vantagens, como seletividade e capacidade de separação e aplicação em compostos farmacêuticos (MALDANER *et al.*, 2010).

Tabela 5. Influência da fase estacionária nos parâmetros cromatográficos sob o desenvolvimento e otimização do método analítico por CLAE acoplado ao DAD.

Fármacos	Parâmetros cromatográficos								
	Resolução			Número de Pratos teóricos			Fator de assimetria		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>CPZ</b>				2514	1689	3207	1,18	1,16	1,03
<b>PRED</b>	2,52	2,33	5,54	4585	4111	6672	0,98	1,01	0,97

Fases estacionárias: 1- Kinetex C18; 2- VertiSep GES C18; 3- Acclaim<sup>®</sup> C18. Fase móvel: acetonitrila:água pH 3,0 (60:40 v/v). Fluxo: 0,30 mL.min<sup>-1</sup> (coluna 1); 0,50 mL.min<sup>-1</sup> (coluna 2); 1,0 mL.min<sup>-1</sup> (coluna 3). Volume de injeção 20 µL, temperatura ambiente 24 ± 2°C.

#### 5.1.2. Escolha da fase móvel

Foram experimentadas algumas proporções de fase móvel contendo os solventes acetonitrila:água pH 3,0 na coluna Acclaim<sup>®</sup> C18, obtendo uma melhor resolução, pratos teóricos e assimetria para o método proposto. A Tabela 6 apresenta

as variações da fase móvel e sua influência nos parâmetros cromatográficos do método proposto.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos influenciados pela fase móvel do método em estudo. Utilizando a coluna Acclaim® C18, em modo isocrático de solventes e fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup>.

Fármacos	Parâmetros cromatográficos								
	Resolução			Número de Pratos teóricos			Fator de assimetria		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>CPZ</b>				3201	6694	1887	1,15	0,99	0,82
<b>PRED</b>	2,83	10,03	11,05	7283	9519	5581	0,81	0,97	1,15

Onde: **A**- acetonitrila:água (60:40 v/v); **B**- acetonitrila:água pH 3,0 (70:30 v/v); **C**- acetonitrila:água pH 3,0 (80:20 v/v).

A fase móvel testada mais promissora foi composta por acetonitrila:água (70:30 v/v) pH 3,0, onde todos os parâmetros cromatográficos, resolução, número de pratos teóricos e fator assimetria foram alcançados de forma satisfatória. Apesar da fase móvel C ter apresentado uma alta resolução para a prednisolona, apresentou baixo número de pratos teóricos para cefoperazona e assimetria insuficiente. Já o método A, composto por uma fase móvel não acidificada apresentou baixa assimetria e menor resolução para prednisolona, sendo assim foi desconsiderado da série de otimizações.

Visando reduzir o uso de solventes orgânicos e verificar a robustez do método, o fluxo da fase móvel selecionada durante a otimização do método analítico foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, porém os resultados não foram satisfatórios, alterando de forma significativa os parâmetros cromatográficos.

### 5.1.3. Cromatograma do método analítico

Após as diversas combinações fase estacionária, misturas de fase móvel e proporções com melhor performance cromatográfica o método analítico proposto para análise simultânea dos fármacos CPZ e PRED foi validado. Utilizando a coluna cromatográfica Acclaim® C18, fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup> da fase móvel acetonitrila:água na proporção 70:30 v/v em pH 3,0, com modo isocrático de solvente foram obtidos os

cromatogramas em 240 nm (Figura 4) para quantificação da PRED e em 260 nm (Figura 5) para a CPZ.

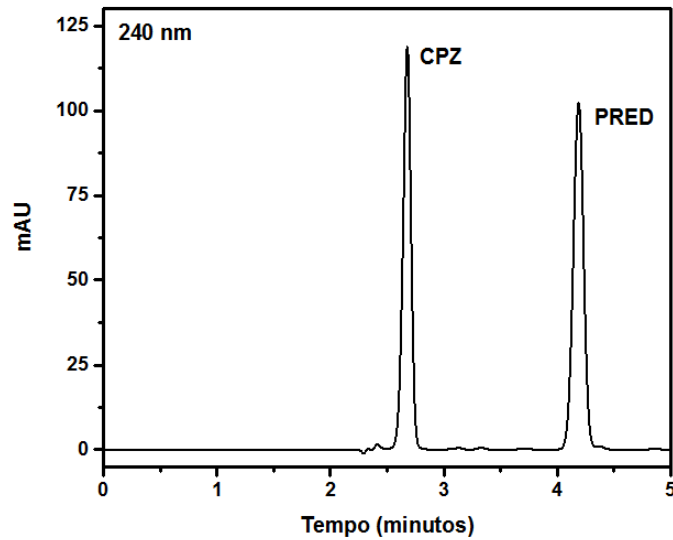


Figura 4. Cromatograma dos padrões de referência cefoperazona (2,67 min) e prednisolona (4,20 min) com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos com coluna Acclaim® C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , fase móvel acetonitrila : água pH 3,0 (70:30), vazão de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ . Analisado em 240 nm por CLAE acoplado a DAD.

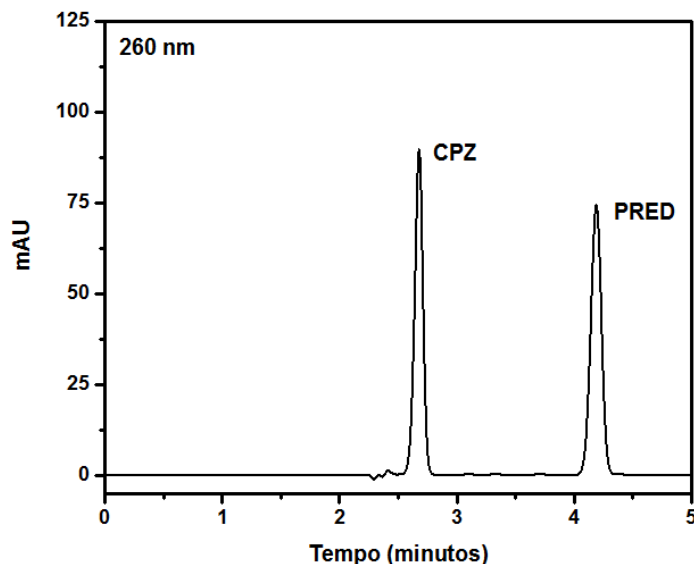


Figura 5. Cromatograma dos padrões de referência cefoperazona (2,67 min) e prednisolona (4,20 min) com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos com coluna Acclaim® C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , fase móvel acetonitrila : água pH 3,0 (70:30), vazão de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ . Analisado em 260 nm por CLAE acoplado a DAD.

## 5.2. Validação do método

### 5.2.1. Curvas de calibração e linearidade

As curvas de calibração analíticas obtidas para CPZ e PRED estão representadas pelas Figuras 6 e 7 respectivamente, ambas apresentaram correlação linear entre a concentração teórica do fármaco e a área do pico cromatográfico.

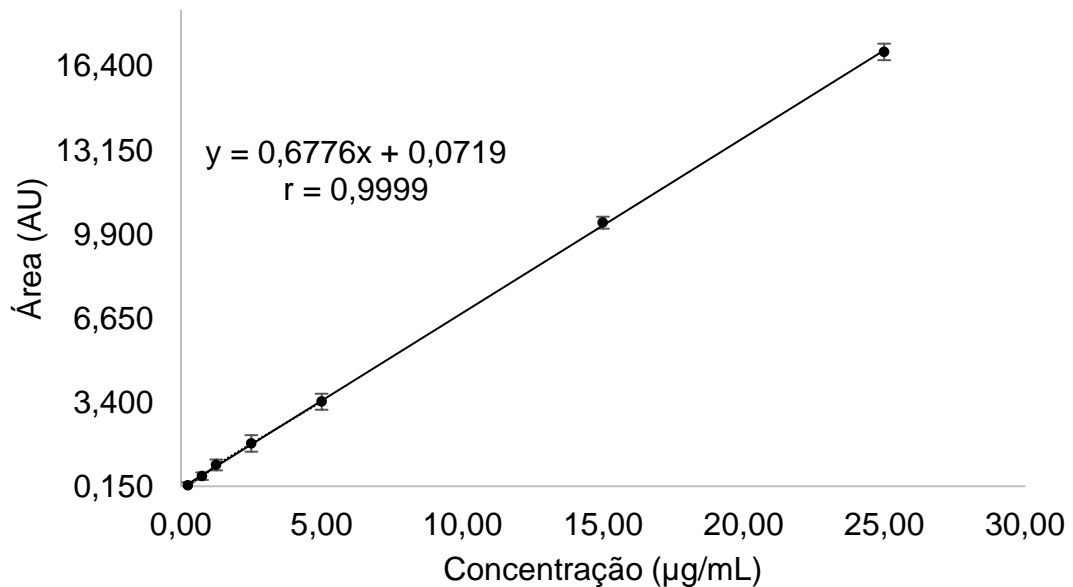


Figura 6. Curva de calibração analítica de cefoperazona obtida com coluna Acclaim® C18; fase móvel acetronitrila:água (70:30 v/v) pH 3,0 fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção 20 µL.

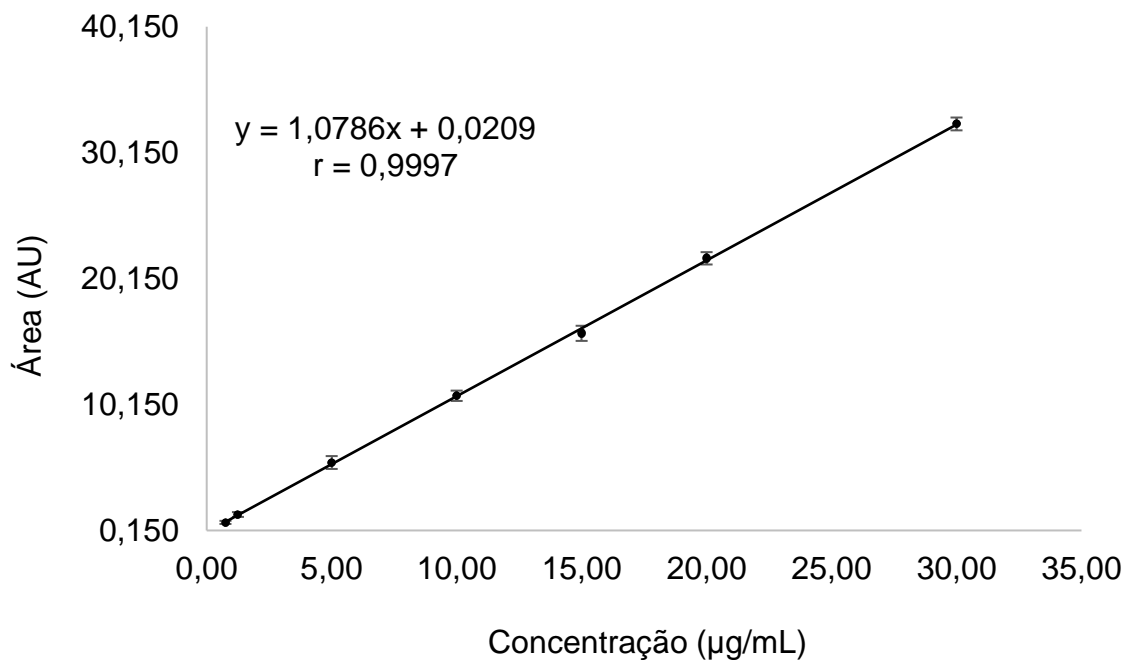


Figura 7. Curva de calibração analítica de prednisolona obtida com coluna Acclaim® C18; fase móvel acetronitrila:água (70:30 v/v) pH 3,0 fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção 20 µL.

As curvas de calibração foram obtidas de modo simultâneo, onde as concentrações estudadas para a CPZ compreenderam a linearidade de 0,25 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0,9999$  e  $y = 0,6776x + 0,0719$ ) e para PRED de 0,75 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r = 0,9997$  e  $y = 1,0786x + 0,0209$ ).

### 5.2.2. Determinação do teor da CPZ e PRED no produto acabado

A Figura 8 ilustra os cromatogramas obtidos para a determinação do teor de CPZ e PRED, onde "a" representa os padrões de referência com concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ambos fármacos, "b" a corrida cromatográfica da amostra comercial também na concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ e "c" a sobreposição dos espectros.

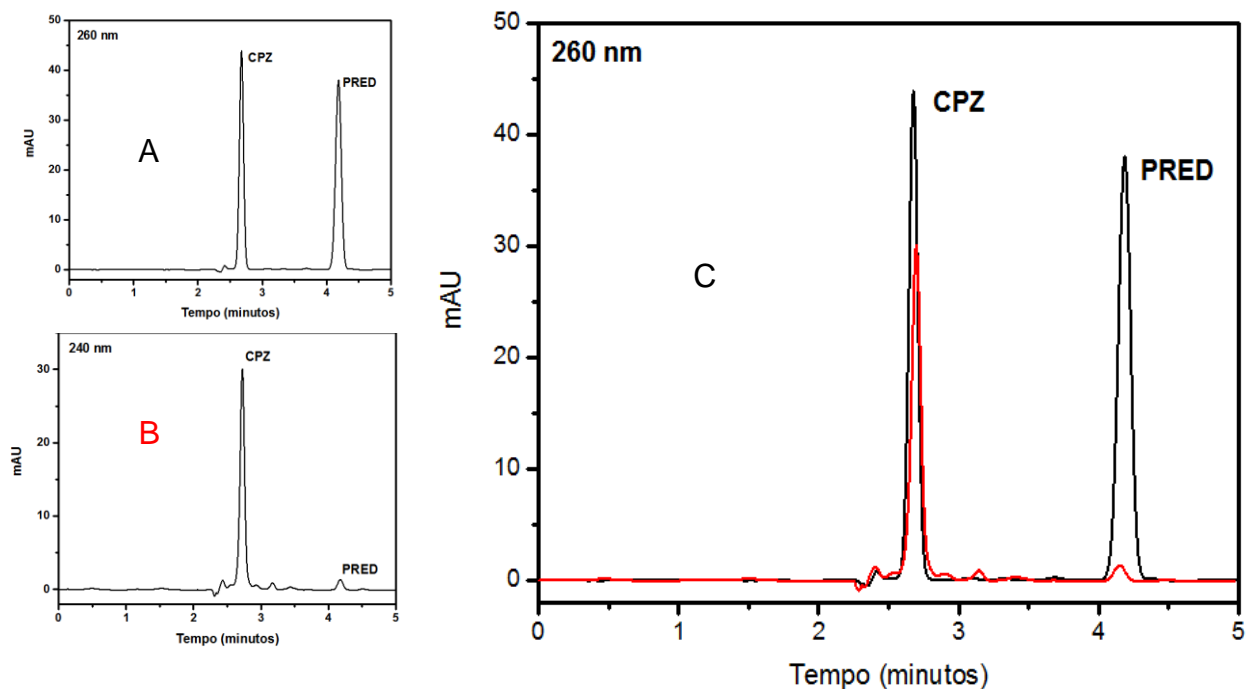


Figura 8. Cromatogramas obtido para determinação do teor de CPZ em amostra de pomada oleosa intramamária por CLAE, onde "(A) ilustra os padrões de referência na concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ e PRED, "B" o cromatograma da amostra, e "C" a sobreposição dos cromatogramas.

O teor obtido para CPZ se encontra abaixo do estimado pela Farmacopeia Japonesa em sua XIV edição (2001), onde observa-se que o método desenvolvido e validado chega à proximidade do valor esperado, o que demonstra sua aplicabilidade na matriz estudada. Para a PRED o preconizado pelo Farmacopeia Japonesa JPXIV, citado anteriormente corresponde o intervalo de 97% a 102%, também abaixo do teor extraído. Na Tabela 7, estão apresentados os resultados obtidos sobre a eficiência de extração do método analítico validado, aplicado na pomada oleosa intramamária para



análise da concentração percentual (teor) presente dos fármacos CPZ e PRED em sua formulação.

Tabela 7. Determinação da concentração percentual de CPZ e PRED no produto acabado pelo método validado por CLAE.

	Área CPZ SQR	Área CPZ produto acabado	C <sub>P</sub> (%)*
	7,4690	4,8018	68,79
	7,4523	4,8957	70,28
	7,4664	4,8777	69,90
<b>Média</b>	<b>7,4626</b>	<b>4,8584</b>	<b>69,66</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,12</b>	<b>1,03</b>	<b>1,11</b>
	Área PRED SQR	Área PRED produto acabado	C <sub>P</sub> (%)
	1,732	1,2483	72,07
	1,741	1,2553	72,10
	1,698	1,2381	72,91
<b>Média</b>	<b>1,7234</b>	<b>1,2472</b>	<b>72,36</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,32</b>	<b>0,69</b>	<b>0,66</b>

\*C<sub>P</sub> : concentração percentual de cefoperazona aplicado o fator de correção 1,07 sobre a análise do sal cefoperazona sódico presente na amostra analisada equivalente a 233,149 mg cefoperazona base; DPR : desvio padrão relativo.

Contudo, a análise simultânea de fármacos em matrizes complexas tem demonstrado eficiência de extração inferiores as requisitadas, apesar de utilizar técnicas sensíveis como a cromatografia líquida. Alguns autores como Tang *et al.* (2012) analisaram amostras de leite fresco e o resultado foi de 66,6 a 75,7% entre os níveis estudados para analisar a CPZ associadas a outros antimicrobianos. Han *et al.* (2015) obteve recuperação de 74% no menor nível analisado em amostras de leite. Outro trabalho demonstrou uma eficiência de extração superior de 87,77% porém com uma margem de erro <20% nos níveis estudados (LIU *et al.*, 2014).

### 5.2.3. Teste de interferência dos excipientes: seletividade.

A Figura 9 representa o cromatograma da pomada formulada com lanolina e vaselina, onde observa-se que no tempo de retenção dos fármacos CPZ e PRED não

foram visualizados picos contaminantes, ou impurezas que sobreponham o sinal dos fármacos em estudo.

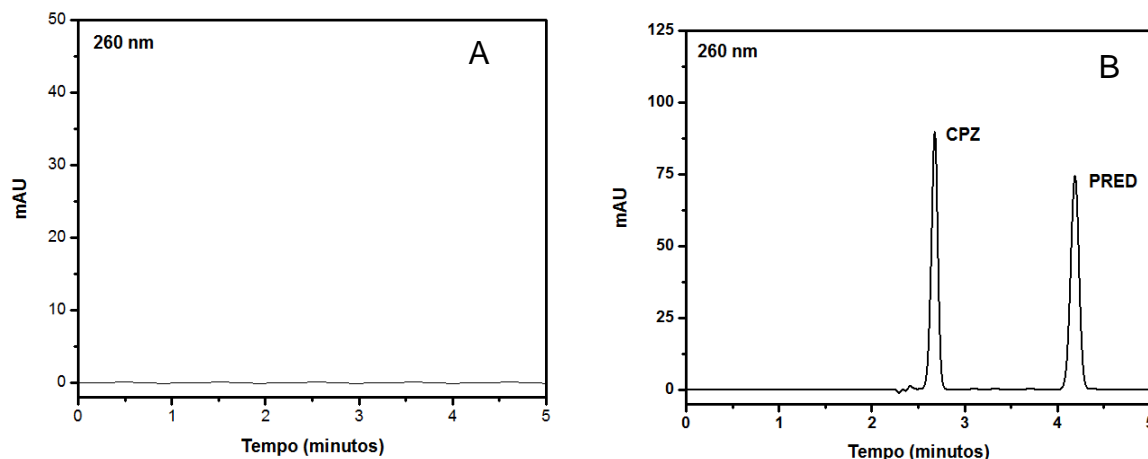


Figura 9. Cromatograma (A) da pomada formulada com lanolina e vaselina para o teste de interferência de excipiente e impureza, e (B) os padrões de referência de cefoperazona e prednisolona, obtidos com coluna Acclaim® C18 e fase móvel acetonitrila : água pH 3,0 (70:30) analisado em 260 nm por CLAE – DAD.

#### 5.2.4. Teste de recuperação: exatidão

A recuperação média no ensaio de exatidão para a CPZ foi de 100,59%, onde os resultados de cada nível de recuperação estão demonstrados na Tabela 8. Para a PRED a recuperação média foi de 100,34%, conforme apresentado na Tabela 9.

O parâmetro de exatidão foi demonstrado válido frente o intervalo de recuperação requerido pelos compêndios oficiais, onde exige recuperação não inferior a 98% e não superior a 102%, assim o método proposto neste estudo apresenta exatidão satisfatória para ambos fármacos analisados, onde a CPZ apresentou 100,59% e a PRED 100,34%.

Tabela 8. Exatidão de método analítico aplicado para recuperação de CPZ por CLAE.

	Concentração final esperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração final encontrada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	10,0	9,97	99,69		
R2	15,0	15,26	101,67	100,59	0,99
R3	20,0	20,08	100,41		

\*Média de três determinações. DPR: desvio padrão relativo

Tabela 9. Exatidão do método analítico aplicado a recuperação de PRED por CLAE.

	Concentração final esperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração final encontrada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	5,60	5,63	100,53		
R2	7,60	7,51	98,84	100,34	1,41
R3	9,60	9,76	101,66		

\*Média de três determinações; DPR: desvio padrão relativo

### 5.2.5. Teste de precisão

Os valores obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária foram expressos em termos de DRP na Tabela 10. O método foi preciso pois apresentou nos três níveis estudados os valores de DPR inferiores a 2%. Campos (2015) obteve DPR superiores aos encontrados no método proposto, onde os parâmetros da precisão foram menores que 5% de variação para prednisolona, variação superior à do presente estudo, tanto para a repetibilidade (DPR de 1,84%) quanto para a precisão intermediária (1,13%), demonstrando que o método proposto é preciso através dos níveis analisados.

Tabela 10. Resultado do ensaio de precisão do método de análise simultânea de CPZ associada à PRED por CLAE.

Fármacos	Concentração teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração analisada ( $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DPR}\%$ )			
		Repetibilidade <sup>a</sup>			Precisão intermediária <sup>b</sup>
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	
CPZ	1,0	0,9613 $\pm$ 0,33	0,9539 $\pm$ 1,48	0,9464 $\pm$ 1,74	0,954 $\pm$ 1,33
	5,0	4,9346 $\pm$ 0,15	5,0516 $\pm$ 1,07	5,0327 $\pm$ 0,15	5,006 $\pm$ 1,22
	20,0	18,911 $\pm$ 0,74	18,763 $\pm$ 0,49	18,916 $\pm$ 1,71	18,863 $\pm$ 1,04
PRED	1,0	0,9851 $\pm$ 0,16	0,9792 $\pm$ 0,65	0,9771 $\pm$ 0,09	0,981 $\pm$ 0,50
	5,0	4,8881 $\pm$ 0,12	4,8923 $\pm$ 1,84	4,8602 $\pm$ 1,13	4,880 $\pm$ 1,13
	20,0	19,687 $\pm$ 0,70	19,559 $\pm$ 0,25	19,617 $\pm$ 1,62	19,621 $\pm$ 0,93

<sup>a</sup>Média de três determinações realizadas em três níveis (triplicata de cada nível); <sup>b</sup>Média de nove determinações realizadas em três níveis de concentração em dias diferentes. Condições cromatográficas: coluna Acclaim<sup>®</sup> C18, fase móvel acetonitrila:água pH3,0 (70:30 v/v), fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ ; DPR: desvio padrão relativo

### 5.2.6. Teste de robustez

Os teores de CPZ e PRED determinados nos experimentos estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Teores da CPZ e PRED determinados na análise da robustez do método por CLAE.

Experimento	Teores (%)	
	CPZ	PRED
1	100,87	99,40
2	100,90	100,72
3	100,12	99,00
4	100,34	100,18
5	100,32	97,55
6	99,45	100,40
7	101,47	100,35
8	97,50	101,44
Média	100,12	99,88
Desvio Padrão	1,22	1,21

E na Tabela 12 demonstra os efeitos entre o método padronizado e o método alterado para a análise simultânea dos fármacos CPZ e PRED

Tabela 12. Efeitos sobre o teste de Youden aplicado a validação do método para CPZ e PRED por CLAE.

Variável	Efeitos *	
	CPZ	PRED
pH	0,88	0,11
Proporção da FM	0,53	0,73
Comprimento de onda	1,15	1,02
Vazão	0,13	1,20
Temperatura da sala	1,27	0,36
Marca acetonitrila	0,26	0,47
Banho ultrassônico	0,82	0,41

\*Nível de significância <0,05

No teste apresentado nenhum efeito foi considerado significativo frente as alterações propostas, pois todas as alterações para CPZ obtiveram efeitos menores que 1,73 e para PRED os efeitos também foram inferiores a 1,70, valores estes correspondentes a duas vezes o desvio padrão de todas as médias dos respectivos experimentos. Para a CPZ o maior efeito observado foi sobre a temperatura da sala (1,27) e para a PRED foi a vazão do solvente (1,20).

#### **5.2.7. Limites de detecção e quantificação**

A partir da menor concentração das curvas de calibração o LD e o LQ experimentais foram de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 6,1\%$  e o LOQ foi de  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 0,76\%$  para a CPZ. Para a PRED foram obtidos os limites experimentais de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 8,5\%$  e  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 0,3\%$ , para detecção e quantificação respectivamente. Os valores teóricos foram calculados conforme as equações 5 e 6 anteriormente mencionadas e os valores encontrados de LD para a CPZ foi  $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para a PRED  $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e os LQ foram  $1,11 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $0,54 \mu\text{g mL}^{-1}$  para CPZ e PRED, respectivamente. Em um estudo realizado por Campos (2015), utilizando CLAE – DAD para análise de prednisolona, foram observados LD e LQ teóricos equivalentes ao método proposto, com linearidade entre 2,0 e 22,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , inferior à linearidade obtida nesse estudo.

## 6. CONCLUSÃO

O método foi desenvolvido e validado por cromatografia de alta eficiência, para determinar de forma simultânea e quantitativa, a cefoperazona associada a prednisolona em pomadas oleosas intramamária. Os melhores resultados para a separação cromatográfica dos analitos foram obtidos com a coluna Acclaim<sup>®</sup>, fase móvel acetonitrila e água pH 3,0 (70:30 v/v) sob vazão de 0,9 mL min<sup>-1</sup>, empregando detector de arranjos diodos em 240 e 260 nm.

O método demonstrou ser linear na faixa de 0,25 a 25 µg mL<sup>-1</sup> (r= 0,9999) para CPZ e de 0,75 a 30 µg mL<sup>-1</sup> (r = 0,9997) para PRED. Com baixos limites de detecção e quantificação. O método demonstrou ser preciso através da repetibilidade e precisão intermediária, com coeficientes de variação inferiores a 2,0%. No teste de exatidão o método apresentou valores de recuperação com proximidade ao valor verdadeiro, portanto com boa exatidão.

Através do estudo de robustez, podemos observar que as pequenas variações ocasionadas eventualmente na rotina de aplicação do método, como diferença de temperatura, alterações de pH, marca de acetonitrila, proporção de fase móvel, vazão de solvente e comprimento de onda não alteraram de forma significativa os resultados obtidos, demonstrando assim a robustez do método.

Na análise do teor de cefoperazona e prednisolona conclui-se que o método é rápido, por ter uma separação completa dos fármacos em tempo inferior a 5 minutos. É também, relativamente barato, pois utiliza uma simples extração líquido-líquido de simples realização. Condiz com o interesse da indústria pois pode ser aplicado para melhorar ainda mais o controle de qualidade dos produtos farmacêutico de uso animal, levando em consideração que os antimicrobianos constituem uma importante classe farmacológica e de impacto sobre a resistência bacteriana.

## 7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Validação de métodos analíticos**. Resolução no. 166, de 24 de julho de 2017.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*, 20<sup>a</sup> ed. Washington, DC. 2016.

ATTIA, T.; KOMY, A.; HEWAITY, M.; LATIF, A. A.; HANBALLY, S. Comparative pharmacokinetics of cefoperazone following intravenous and intramuscular administration in goats. **International Journal of Veterinary Science and medicine**, vol.3, p21-25, 2015.

BARRETO, W. D. **Processo de desenvolvimento de fármacos veterinários**. Trabalho de curso. USP – Lorena, 2013.

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

BRADY, M.T.; KAPLAN, S. L.; TABER, L. H. Association between persistence of pneumococcal meningitis and dexamethasone administration. **The journal of pediatrics**, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 5053 de 22 de abril de 2004, aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências. **Publicado no D.O.U.** de 23.04.2004.

CAGNARDI, P.; VILLA, R.; GALLO, M.; LOCATELLI, C.; CARLI, S.; MORONI, P.; ZONCA, A. Cefoperazone sodium preparation behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. **Journal Dairy Science**, vol. 93, p.4105-4110, 2010.

CAMPOS, J. M. B. **Detecção e quantificação de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana durante o processo de estocagem com vistas ao uso agrícola**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2015.

DOKLADALOVA, J.; QUERCIA, G. T.; STANKEWICH, J. P. High-performance liquid chromatographic determination of cefoperazone in human serum and urine. **Journal of Chromatography**, vol. 276, p. 129-137, 1983.

DRUG BANK. **Open data drug & drug target database**. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/> . Acesso em: 20 de junho de 2017.

ELKADY, E. F. & ABBAS, S. S. Development and validation of a reversed-phase column liquid chromatographic method for the determination of five cephalosporins in pharmaceutical preparations. **Journal of AOAC International**, vol. 94, no. 5, 2011.

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

FEBLER, A. T.; KASPAR, H.; LINDEMAN, C. J.; STEGEMANN, M. R.; PETERS, T.; MANKERTZ, J.; WATTS, J. L.; SCHWARZ, S. A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.157, p.226-231, 2012.

GUEGAN, W. The pharmaceutical industry and development of antimicrobials. **Journal of infection prevention**, vol. 11, no.4, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, vol. 33, no. 3, p. 667-679, 2010.

HALEEM, R. M.; SALEM, M. Y.; FATAHALLAH, F.A.; ABDELFATTAH, L. E. Quality in the pharmaceutical industry. **Sudi pharmaceutical journal**, vol. 23, p.463-469, 2015.

HAN, R. W. ZHENG, N.; YU, A. N.; XU, X. M.; QU, X. Y.; LI, S. L.; ZHANG, Y, D.; WANG, J. Q. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, no.181, p. 119-126, 2015.

HEYMES, R.; LUIZ, A.; SCHINNER, E. Experimental evaluation of HR756, a new cephalosporin derivative: pre-clinical study. **Infection**, vol.5. no.4, 1977.

HOANG, V. D.; NGUYEN, T. L.; THO, V. T.; NGUYEN H. M. T. UV spectrophotometric simultaneous determination of cefoperazone and sulbactam in pharmaceutical formulations by derivative, Fourier and Wavelet transforms. **Spectrochimica Acta Part A**. vol.121, p704-714, 2014.

ICH Q2 (R1). International Conference on Harmonisation. **Validations of Analytical Procedures: Text of Methodology**. Estados Unidos da América, 2005.



JEAN, S.; LIAO, C. H.; SHENG, W. H.; LEE, W. S.; HSUEH, P. R. Comparison of commonly used antimicrobial susceptibility testing methods for evaluating susceptibilities of clinical isolates of Enterobacteriaceae and nonfermentative Gram-negative bacilli to cefoperazone-sulbactam. **Journal of microbiology immunology and infections**, vol.1, p.1-10, 2015.

JONES, R. N. & BARRY, A. L. Cefoperazone: a review of its antimicrobials spectrum, beta-lactamase stability, enzyme inhibition, and other in vitro characteristics. **Review Infectious Diseases**, vol.5, 1983.

LE MARECHAL, C.; JARDIN, J.; JAN, G.; EVEN, S.; PULIDO, C.; GULBERT, J. M.; HERNANDEZ, D.; FRANCOIS, P.; SCHRENZEL, J.; DEMON, D.; MEYER, E.; BERKOVA, N.; VAUTOR, E.; LE LOIR, Y. Staphylococcus aureus seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. **Veterinary Research**, p.35-42, 2011.

LI, H.; XIA, X.; XUE, Y.; SHUSSHENG, T. XIAO, X.; LI, J.; SHEN, J. Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, vol. 900, p. 59-63, 2012.

LI, W.; SHEN, H.; HONG, Y.; YUAN, Z.; YUAN, F.; ZHANG, F. Simultaneous determination of 22 cephalosporins drug residues in pork muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B.**, vol.1022, p.298-307, 2016.

LIU, X.; YU, Y.; ZHAO, M.; ZHANG, H.; LI, Y.; DUAN, G. Solid phase extraction using core mesoporous shell microspheres with C18-modified interior pore-walls for residue analysis of cephalosporins in milk by LC – MS/MS. **FOOD Chemistry**, vol. 150, 206-212, 2014.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H. JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v.33, no.7, p.1559-1568, 2010.

McGRATH, T. F.; McCLINTOCK, L.; DUNN, J. S.; HUSAR, G. M.; LOCHHEAD, M. J.; SARVER, R. W.; KLEIN, F. E.; RICE, J. A.; CAMPBELL, K.; ELLIOTT, C. T. Development of a rapid multiplexed assay for the direct screening of antimicrobial residues in raw milk. **Research Paper, Anal Bioanal Chem**, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2015.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W. J.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Journal Veterinario Resamin Sci**. Vol.42, no.6, p.465-470, 2005.

NAGUIB, I. A. & DARWISH, H. W. Determination of cefoperazone sodium in presence of related impurities by improved classical least squares chemometric methods: A comparative study. **Journal of Chemistry**, 2016.

NAKARA, M.; MIWA, Y.; TSUBOI, M.; UCHIDA, K. Mycobacteriosis in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). **Journal of Veterinary Medicine Science**, vol.76, no.5, p.705-709, 2014.

OLIVER, S. P. & MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Vet Clin Food Animal**, v.28, p.165-185, 2012.

PACHECO-SILVA, E. SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v.37, no.1, p.111-122, 2014.

PAPADOYANNIS, I. N.; SAMANIDOU, V. F. Validation of HPLC instrumentation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, vol. 27, no. 5, p. 753-783, 2004.

RANJALE, A. R. & JAIN, H. K. Development and method validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of cefoperazone and tobozactam. **Int. Journ. Pharm. And Pharmac. Science**, vol.6, no.8, 2014.

SAGCAL-GIRONELLA, A. C. P.; SHERWIN, C. M. T.; TIRONA, R. G.; RIEDER, M. J.; BRUNNER, H. I.; VINKS, A. A. Pharmacokinetics of prednisolone at steady state in young patients with systemic lupus erythematosus on prednisone therapy: an open-label, single-dose study. **Clinical Therapeutics**, vol. 33, no. 10, 2011.

SHENG, Y.; YANG, X.; PAL, D.; MITRA, A. K. Prodrug approach to improve absorption of prednisolone. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 487, p. 242-249, 2015.

SILVA, C. G. A. & COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v.34, no.4, p.665-676, 2011.

SILVA, Penildon, 1921 – **Farmacologia/Penildon Silva** – 8ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.975, 2010.

SIPKA, A.; GURJAR, A.; KLAESSIG, S.; DUHAMEL, G.; SKIDMORE, A.; SWINKELS, J.; COX, P.; SCHUKKEN, Y. Prednisolone and cefapirin act synergistically in resolving experimental Escherichia coli mastites. **Journal Dairy Science**. v.96, p.4406-4418, 2013.

SVERSUT, R. A. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação simultânea de fluorquinolonas e corticosteroides em formulações oftálmicas e avaliação de estabilidade**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

TANG, Y.; LU, H.; LIN, H.; SHIH, Y.; HWANG, D. Multiclass analysis of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, vol. 881-882, p. 12-19, 2012.

TERCIO PASCHKE OPPE. **Cefpiroma: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Faculdade de farmácia, 2007.

TOLEDO-PINTO, E. A; MENEZES, M. L.; PEREIRA, O. C. M. Desenvolvimento de um método analítico rápido e eficiente para a determinação de corticosteróides plasmáticos por injeção direta em coluna cromatográfica ISRP-C<sub>18</sub> por CLAE. **Eclética Química**, vol. 35, no. 2, p. 51-61, 2010.

TORNEKE, K.; TORREN-BDO, J.; GRAVE, K.; MACKAY, D. K. J. The management of risk arising from the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in EU/EEA countries – a review. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, vol.38, p.519-528, 2015.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R; CARVALHO, V. F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticóides. **Corpus et Scientia**, vol. 8, no. 2, p. 36-51, 2012.

WALL, S. K.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; AHMADPOUR, A.; BRUCKMAIER, R. M.; WELLNITZ, O. Differential glucocorticoid-induced closure of the blood-milk barrier during lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, no. 9, p. 7544-7553, 2016.

WANG, Q.; WU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, J. Drug concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of patients treated with cefoperazone/sulbactam after craniotomy. **Anesthesiology**, p.15-33, 2015.

WHITE, A. R. Effective antibacterials: at what cost? The economics of antibacterial resistance and its control. **Journal Antimicrobial Chemotherapy Advance Access**, 2011.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. Statistical Manual of AOAC – Association of Official **Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 88 p., 1975.

ZHOU, Y.; ZHANG, J.; GUO, B.; YU, J.; SHI, Y.; WANG, M.; ZHANG, Y. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of cefoperazone and sulbactam in plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, vol. 878, p. 3119-3124, 2010.