

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

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE CEFTIOFUR
SÓDICO E ESTUDO DA ESTABILIDADE

MARINÊS JOST E SOUZA

Porto Alegre, 2008.

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

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE CEFTIOFUR
SÓDICO E ESTUDO DA ESTABILIDADE

Tese apresentada por **Marinês Jost e Souza**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bergold

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 7 de outubro de 2008, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andrea Inês Horn Adams
Universidade de Passo Fundo

Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. George González Ortega
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Margareth Linde Athayde
Universidade Federal de Santa Maria

| |
|---|
| <p>S729d Souza, Marinês Jost e Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo da estabilidade / Marinês Jost e Souza – Porto Alegre: UFRGS, 2008. – xxii, 166 p.: il., tab., graf.</p> <p>Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. Ceftiofur sódico. 2. Controle de qualidade. 3. Validação: métodos de análise de fármacos. 4. Estabilidade: medicamentos. 5. Cefalosporinas. I. Souza, Marinês Jost. II. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 615.2.011</p> |
|---|

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Agradecimentos ao Laboratório de
Química Farmacêutica da UFRGS e ao Centro de Desenvolvimento de Testes e
Ensaio Farmacêuticos - CTEFAR da UFSM que disponibilizaram os
equipamentos e materiais necessários para
a realização dos experimentos.

*“Sua vida pode ser o que você quer que ela seja
Conte suas bênçãos, não seus problemas.
Você os superará, venha o que vier.
Dentro de você há muitas respostas.
Compreenda, tenha coragem, seja forte.
Não coloque limites em si mesmo.
Muitos sonhos estão esperando para serem realizados...”*

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr^a Ana Maria Bergold, pela orientação, por sua disponibilidade, incentivo, amizade, dedicação, carinho e contribuição em minha vida profissional;

Aos professores deste Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria;

As professoras Dr^a Clarice Madalena Rolim, Dr^a Simone Gonçalves Cardoso, Dr^a Andréa Inês Horn Adams pela amizade e pelos esclarecimentos prestados;

Aos inesquecíveis amigos Rosecler, Carmen, Daniele, Lucélia, Marcela, Renato e Fernando Luiz do CTEFAR da UFSM pela colaboração e apoio;

Em especial aos amigos Eliane e Pellegrini e a todos funcionários e colegas do LAPPS pela receptividade e carinho;

Aos queridos amigos da ANVISA: Raphaella, Mário Viktor, Thaís, Joana e Sônia, pelo carinho e amizade;

Aos meus pais pelo exemplo de amor. Hoje o que eu gostaria de expressar por vocês não cabe no peito, transborda nos meus olhos...

Ao meu esposo Paulo que fez de meus sonhos seu próprio objetivo, cujo amor tornou tudo possível;

Aos meus amados filhos Paulo e Juliana que nos momentos importantes suportaram a minha ausência;

As minhas irmãs Maristela e Márcia que mesmo distantes compartilharam do meu ideal;

Sei que a vitória não é só minha, porque ao meu lado caminhavam pessoas que acreditavam em mim e em meu sucesso.

A DEUS

Muito antes que todas as coisas acontecessem, estavas à minha frente, quebrando todos os obstáculos para me dar mais essa vitória.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- ✓ Introdução, contendo a apresentação do tema; Objetivos, geral e específicos;
- ✓ Revisão de Literatura;
- ✓ Capítulos: métodos de análises qualitativas, artigos publicados, artigo aceito e artigo a ser submetido à periódico que se referem às diferentes etapas do trabalho realizado;
- ✓ Discussão Geral, visando a uma compreensão global dos resultados apresentados nas diferentes etapas do trabalho;
- ✓ Conclusões;
- ✓ Referências e;
- ✓ Anexo.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | xv |
| LISTA DE TABELAS | xvii |
| RESUMO | xix |
| ABSTRACT | xxi |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS | 7 |
| 1. Objetivo Geral | 9 |
| 1.1 Objetivos Específicos | 9 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 11 |
| 1z. Considerações Gerais | 13 |
| 2. Descrição do Ceftiofur | 16 |
| 3. Mecanismo de Ação | 16 |
| 4. Espectro de Atividade | 17 |
| 4.1 Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> do Ceftiofur | 18 |
| 5. Relação Estrutura-atividade | 19 |
| 6. Perfil Farmacocinético | 21 |
| 7. Toxicidade | 21 |
| 8. Posologia | 21 |
| 9. Contra-indicações | 22 |
| 10. Advertências | 22 |
| 11. Precauções | 22 |
| 12. Determinações Quantitativas | 23 |
| 13. Validação de Métodos Quantitativos | 25 |
| 14. Estudo da Estabilidade | 26 |
| CAPÍTULO 1: Métodos de Análise Qualitativa | 33 |
| 1.1 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta (UV) | 35 |
| 1.1.1 Material | 35 |
| 1.1.2 Método | 35 |
| 1.1.3 Resultados | 35 |
| 1.1.4 Discussão | 36 |
| 1.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 36 |
| 1.2.1 Material | 36 |
| 1.2.2 Método | 37 |

| | |
|---|-----|
| 1.2.3 Resultados | 37 |
| 1.2.4 Discussão | 38 |
| 1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 41 |
| 1.3.1 Material..... | 41 |
| 1.3.2 Método | 41 |
| 1.3.3 Resultados | 42 |
| 1.3.4 Discussão | 44 |
| CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e Validação do Método por CLAE para Determinação do Ceftiofur Sódico | 45 |
| 2.1 INTRODUÇÃO | 47 |
| PUBLICAÇÃO 1: Development an Validation of an HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium. | 49 |
| CAPÍTULO 3: Desenvolvimento do Ensaio Microbiológico para Determinação da Potência do Ceftiofur Sódico. | 57 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 59 |
| PUBLICAÇÃO 2: Development of a Microbiological Assay to Determine the Potency of Ceftiofur Sodium Powder. | 61 |
| CAPITULO 4: Desenvolvimento do Método Espectrofotometria na Região do Ultravioleta para a Determinação do Ceftiofur Sódico..... | 69 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 71 |
| PUBLICAÇÃO 3: Development of a Ultraviolet Spectrophotometric Method for the Determination of Ceftiofur Sodium Powder. | 73 |
| CAPITULO 5: Photodegradation of Ceftiofur Sodium in Aqueous Solution Using a LC Method. | 101 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 103 |
| PUBLICAÇÃO 4: Photodegradation of Ceftiofur Sodium in Aqueous Solution Using a LC Method. | 105 |
| DISCUSSÃO GERAL | 129 |
| CONCLUSÕES | 137 |
| REFERÊNCIAS | 141 |
| ANEXO I | 151 |
| ANEXO 2: Pareceres da Banca Examinadora | 157 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Estrutura química do ceftiofur. | 4 |
| FIGURA 2. Mecanismo de ação dos antibióticos beta-lactâmicos | 17 |
| FIGURA 3. Estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico..... | 19 |
| FIGURA 4. Estrutura química da ceftriaxona (A), cefotaxima (B) e ceftazidima (C). 20 | |
| FIGURA 1.1. Perfil cromatográfico das amostras de ceftiofur (0,1 mg/ml) Excenel [®] - Rf 0,76, Topcef [®] Rf - 0,76 e SQR – Rf 0,76. Fase móvel: metanol, clorofórmio e acetona (9:8:1 V/V/V), após revelação com ninidrina..... | 40 |
| FIGURA 1.2. Perfil cromatográfico das amostras de ceftiofur (0,1 mg/ml) Excenel [®] - Rf 0,81, Topcef [®] - Rf 0,81 e SQR - Rf 0,81. Fase móvel: acetona e acetato de amônio a 15,4% (P/V) (3:7) pH 5,0 ajustado com ácido acético glacial, após revelação com vapores de iodo..... | 40 |
| FIGURA 1.3. Perfil cromatográfico das amostras de ceftiofur (0,1 mg/ml) Excenel [®] , Topcef [®] e SQR. Fase móvel: metanol, clorofórmio e acetona (9:8:1 V/V/V), submetidos a degradação com a luz UVC 254 nm, durante 54 horas, após revelação com ninidrina. | 40 |
| FIGURA 1.4. Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de SQR (I), Excenel [®] (II) e Topcef [®] (III), preparadas em fase móvel, à concentração de 60 µg/ml. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 1.1. | 43 |
| FIGURA 2.1. The chemical structure of ceftiofur..... | 52 |
| FIGURA 2.2. Chromatograms of ceftiofur sodium at 60 µg mL ⁻¹ . (I) Reference substance, (II) product A and (III) product B. Chromatographic conditions: column: Lichrospher [®] C ₁₈ column (250 mm x 4.6 mm i.d. 5 µm particle size); mobile phase: 0.02M di-sodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 using 85% orthophosphoric acid)-acetonitrile (78:22, v/v); flow rate: 1.0 mL min ⁻¹ ; detection wavelength, 292 nm..... | 53 |
| FIGURA 2.3. Elution profile of ceftiofur sodium at 60 µg mL ⁻¹ obtained after different stress conditions: (A) basic condition, (B) acid condition, (C) oxidation process and (D) exposition to UV radiation 254 nm for 6h..... | 55 |
| FIGURA 2.4. Overlaid diode array spectra of the ceftiofur reference substance and in the four stress conditions tested. | 55 |
| FIGURA 3.1. The chemical structure of ceftiofur..... | 64 |
| FIGURA 3.2. Agar diffusion assay (cylinder plate method) using a strain of <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 as the test microorganism, ceftiofur reference substance at concentrations 2 (S1); 4 (S2) and 8 (S3) µg mL ⁻¹ and ceftiofur sample at concentrations 2 (T1); 4 (T2) and 8 (T3) µg mL ⁻¹ | 64 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 4.1. Chemical structure of ceftiofur sodium..... | 95 |
| FIGURA 4.2. UV spectrum of ceftiofur sodium (10 µg mL ⁻¹) : (I) in methanol, (II) in 0.1 M sodium hydroxide, (III) mobile phase: 78:22(v/v) 0.02 M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid) acetonitrile, (IV) in 0.1 M hydrochloric acid..... | 96 |
| FIGURA 4.3. UV spectrum of ceftiofur reference substance in water (10 µg mL ⁻¹).. | 97 |
| FIGURA 4.4. UV spectrum of ceftiofur (reference substance, products A and B) in distilled water (10 µg mL ⁻¹)..... | 98 |
| FIGURA 4.5. Chromatograms obtained from 60 µg mL ⁻¹ ceftiofur sodium after forced degradation under different conditions: (A) basic conditions at 50 °C for 8 h, (B) acidic conditions at 50 °C for 8 h, (C) oxidation with 3% peroxide for 6 h at room temperature, (D) exposure to UV radiation at 254 nm for 6 h. Chromatographic conditions: 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, Lichrospher [®] C18 column with 78:22 (v/v) 0.02M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid)-acetonitrile as mobile phase at a flow rate: 1.0 mL min ⁻¹ ; detection wavelength 292 nm. | 99 |
| FIGURA 5.1. The chemical structure of ceftiofur. | 123 |
| FIGURA 5.2. Chromatograms of ceftiofur sodium SQR not exposed in the time 0 (I), and exposed (II) to UVC radiation, Excenel [®] (III) and Topcef [®] (IV), exposed to UVC radiation, in aqueous solution after 120 min of irradiation. Chromatographic conditions as described in the text..... | 124 |
| FIGURA 5.3. Chromatograms of ceftiofur sodium SQR not exposed in the time 0 (I), and exposed (II) to UVA radiation, Excenel [®] (III) and Topcef [®] (IV), exposed to UVA radiation, in aqueous solution after 24 h of irradiation. Chromatographic conditions as described in the text. | 125 |
| FIGURA 5.4. First-order plots for the degradation of ceftiofur sodium SQR, Excenel [®] and Topcef [®] irradiated with UVC (254 nm)..... | 126 |
| FIGURA 5.5. First-order plots for the degradation of ceftiofur sodium SQR, Excenel [®] and Topcef [®] irradiated with UVA. | 127 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1. Nomenclatura do ceftiofur..... | 16 |
| TABELA 1.1. Condições cromatográficas utilizadas na determinação de ceftiofur sódico pó para solução injetável para execução do método por CLAE..... | 42 |
| TABELA 2.1. Data obtained from commercial sample analysis by HPLC..... | 54 |
| TABELA 2.2. Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur product “A” by HPLC..... | 54 |
| TABELA 2.3. Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur product “B” by HPLC..... | 54 |
| TABELA 2.4. System suitability study..... | 55 |
| TABELA 3.1. Diameters of growth inhibition zones for ceftiofur standard solutions obtained for standard curve..... | 65 |
| TABELA 3.2. Results of the determination of ceftiofur in powder for injection (products “A” and “B”) by microbiological assay..... | 65 |
| TABELA 3.3. Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur (products “A” and “B”) by microbiological cylinder-plate assay..... | 66 |
| TABELA 3.4. Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur (products “A” and “B”) by microbiological cylinder-plate assay..... | 67 |
| TABELA 4.1. Data obtained from commercial sample analysis by UV spectrophotometric method..... | 91 |
| TABELA 4.2. Experimental values obtained in the recovery test for product “A” by UV spectrophotometric method..... | 92 |
| TABELA 4.3. Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur product “B” by UV spectrophotometric method..... | 93 |
| TABELA 4.4. Analysis of ceftiofur (products “A” and “B”) by two different methods. .. | 94 |
| TABELA 5.1. Results of the residual concentration of ceftiofur sodium SQR, Excenel [®] and Topcef [®] in aqueous solutions after photodegradation (UVC) using the LC method..... | 120 |
| TABELA 5.2. Results of the residual concentration of ceftiofur sodium SQR, Excenel [®] and Topcef [®] in aqueous solutions after photodegradation (UVA) using the LC method..... | 121 |
| TABELA 5.3. Degradation rate constant and $t_{90\%}$ for ceftiofur SQR, Excenel [®] and Topcef [®] in aqueous solution after photodegradation, determined by LC method..... | 122 |

RESUMO

Este trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ceftiofur pó para solução injetável e o estudo da fotoestabilidade do fármaco. Os métodos por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria no ultravioleta (UV) foram utilizados para análise qualitativa do fármaco na forma farmacêutica. A determinação quantitativa foi realizada através dos métodos cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta e ensaio microbiológico método de difusão em ágar - cilindros em placas, delineamento 3x3, avaliando-se os parâmetros descritos pelas guias de validação. Os resultados obtidos através destes métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA, que indicou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos. Estudo preliminar da estabilidade do ceftiofur frente a degradação alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica mostrou a oxidação, a temperatura, a luz e a condição alcalina como fatores importantes da degradação. O fármaco é instável às radiações UV-C, em maior grau, e UV-A (degradação menos intensa), em solução. A cinética de fotodegradação do ceftiofur sódico em solução aquosa demonstrou cinética de primeira ordem de reação.

Palavras-chave: ceftiofur sódico, controle de qualidade, validação de métodos analíticos, estudo de estabilidade.

ABSTRACT

Development of methodology for ceftiofur sodium analysis and stability study

The aim of this study was the development and validation of analytical methods to the determination of ceftiofur sodium in powder for injectable preparation and the photostability study of the drug after reconstitution of the pharmaceutical dosage form with injectable water. Thin-layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet spectrophotometry (UV), methods were employed to the qualitative analysis of the drug in pharmaceutical formulation. The quantitative determination was performed through the validation of HPLC, UV spectrophotometry and microbiological assay 3x3 using the cylinder plate, evaluating the guidances validation parameters. The results obtained by three methods were compared by ANOVA, which indicated that they are equivalent. Preliminary study of ceftiofur through alkaline, acid, oxidative and fotolitic degradation shows sensibility to oxidation, light and alkaline medium. The drug is unstable to UV-C and UV-A radiations, both in solution, being the degradation on UV-C more intense. The photodegradation kinetics of ceftiofur sodium solutions show first-order kinetic of reaction.

Key words: ceftiofur sodium, quality control, validation of analytical methods, stability studies.

Os antibióticos são produtos importantes, não apenas na área de saúde humana, como também em medicina veterinária. Embora a cada ano centenas de novas substâncias sejam descobertas, pouquíssimas são efetivamente aproveitadas e utilizadas como agentes antimicrobianos, visto que muitas destas não atendem aos requisitos mínimos para seu emprego terapêutico. Paralelamente, não se pode deixar de mencionar o crescente problema do surgimento de cepas bacterianas resistentes aos diferentes antibióticos. Este talvez seja o principal desafio dos pesquisadores, visto que a resistência vem se tornando diariamente mais disseminada nas populações microbianas, sejam patogênicas ou não.

A descoberta dos antibióticos é descrita como a mais importante da história da Medicina na área terapêutica. Essa classe de fármacos revolucionou a capacidade do médico de salvar vidas e controlar doenças causadas por microrganismos. Devido à capacidade de cura de doenças anteriormente fatais, especialmente quando a penicilina foi descoberta, esses fármacos foram denominados “milagrosos”. Na verdade, ainda hoje merecem destaque no arsenal terapêutico devido ao impacto positivo no tratamento de doenças infecciosas. Paradoxalmente, esse grande sucesso tem sido responsável, pelo menos em parte, pela progressiva falência desses mesmos fármacos e de seu potencial terapêutico (SADER, 2002).

As cefalosporinas, originalmente descobertas pelo professor Giuseppe Brotzu, em pesquisas na década de 1940, têm mantido sua posição como uma grande classe de antibióticos em todo o mundo, abrangendo metade dos antibióticos β -lactâmicos, sendo uma importante classe de agentes antibacterianos, tanto para uso humano como em medicina veterinária (BO, 2000).

Atualmente, as cefalosporinas são os fármacos de primeira escolha para o tratamento de muitas infecções, incluindo situações clínicas como pneumonia, meningite e infecções da pele e tecidos moles. Em comparação com outros agentes antimicrobianos, as cefalosporinas demonstram baixa toxicidade e perfil farmacocinético favorável (MARSHALL; BLAIR, 1999).

As cefalosporinas são classificadas como de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, com base nas características gerais de sua atividade antibacteriana (GILMAN *et al.*, 1996; DALHOFF, 1998; KOROLKOVAS, 2006).

Ceftiofur está descrito no THE INDEX MERCK (2001) e sua estrutura química está representada na Figura 1. É uma cefalosporina de terceira geração de uso exclusivo em medicina veterinária, a qual apresenta estrutura molecular que lhe proporciona espectro de atividade contra patógenos gram-positivos e gram-negativos, incluindo os resistentes a outros antibióticos β -lactâmicos (YANCEY *et al.*, 1987; SALMON *et al.*, 1995; WATTS *et al.*, 1994; HORNISH; KOTARSKI, 2002).

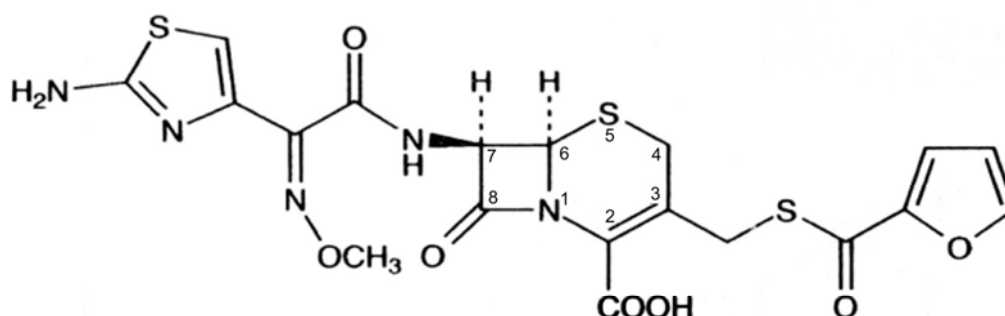


FIGURA 1. Estrutura química do ceftiofur.

O ceftiofur foi aprovado, em 1988, pela Food and Drug Administration (FDA), para ser usado no tratamento de infecções respiratórias no gado (FDA, 1988).

Em 1991, o FDA aprovou o ceftiofur para uso em vacas leiteiras e para o tratamento de infecções respiratórias em suínos associadas com *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella cholerasuis* e *Streptococcus suis* (FDA, 1991).

Atualmente o ceftiofur sódico também está indicado para ser utilizado em aves, eqüinos, cães e gatos (FDA, 1999).

No Brasil, o ceftiofur sódico é importado e comercializado pelo laboratório Pharmacia Brasil Ltda, em conjunto com o laboratório Pfizer Saúde Animal, e fabricado e comercializado pelo laboratório Eurofarma, com os nomes comerciais,

respectivamente, de Excenel[®] e Topcef[®] estando disponível na forma farmacêutica pó para solução injetável, contendo 1 g e 4 g/ frasco. O Excenel[®] é fabricado em Kalamazzo, Michigan, nos Estados Unidos pelo Laboratório Pharmacia e Upjohn Company.

O ceftiofur tem sido estudado, sob diferentes aspectos, tais como: em relação às suas propriedades farmacocinéticas (BANTING *et al.*, 1989; HALSTEAD *et al.*, 1992; DUMONCEAUX *et al.*, 2005; GOUDAH, 2007), mecanismo de ação (YEIN *et al.*, 1990), espectro de atividade antibacteriana (KLEIN *et al.*, 1985; YANCEY *et al.*, 1987; YANCEY *et al.*, 1988; ZURENKO; YAGI, 1990; SALMON *et al.*, 1993; SALMON *et al.*, 1994; SHRYOCK *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2002; AARESTRUP *et al.*, 2004; BRISSE; POST; SONGER, 2004 DUIJKEREN, 2005); sobre sua presença em plasma bovino, suíno e eqüino (HAMLOW, 1995; NAVARRE *et al.*, 1999; BAERE *et al.*, 2004; JACOBSON *et al.*, 2006; PUIG *et al.*, 2007). Estudos também foram conduzidos para detectar o seu resíduo em leite bovino (TYCZKOWSKA *et al.* 1993, STRAUB *et al.* 1994; TYCZKOWSKA *et al.* 1994; MOATS; HARIK-KHAM, 1995; KEEVER *et al.*, 1998; (HAMLOW, 1995; NAVARRE *et al.*, 1999; BAERE *et al.*, 2004; JACOBSON *et al.*, 2006; PUIG *et al.*, 2007).

Após levantamento bibliográfico, optou-se pela escolha do ceftiofur em razão de ser um membro de uma classe de antibacterianos de grande importância clínica em medicina veterinária, sendo amplamente utilizado e terapeuticamente importante.

A presente tese visa contribuir para o controle de qualidade do ceftiofur, pois, na ausência de monografia oficial, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos e garantir a estabilidade dos mesmos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia de análise para a determinação qualitativa e quantitativa do ceftiofur sódico, bem como realizar estudo da fotoestabilidade da matéria-prima e da forma farmacêutica pó para solução injetável.

1.1 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação do ceftiofur;
- ✓ Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação do ceftiofur;
- ✓ Desenvolver e validar método de análise para a determinação quantitativa do ceftiofur sódico na forma farmacêutica pó para solução injetável, através de cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Estabelecer e validar método microbiológico para doseamento do ceftiofur sódico através do método de difusão em ágar, cilindros em placa, delineamento 3x3;
- ✓ Desenvolver e validar método de análise para a determinação quantitativa do ceftiofur sódico na forma farmacêutica pó para solução injetável, através de espectrofotometria na região do ultravioleta;
- ✓ Verificar a equivalência dos métodos propostos;
- ✓ Verificar a estabilidade intrínseca do fármaco, frente a condições de degradação forçada;
- ✓ Verificar a estabilidade fotoquímica do ceftiofur matéria-prima e na forma farmacêutica em solução aquosa.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Considerações gerais

O microrganismo *Cephalosporium acremonium*, a primeira fonte das cefalosporinas, foi isolado pelo professor Giuseppe Brotzu, em 1948, das águas do mar próximas a uma saída de esgoto da costa da Sardenha. Foi constatado que os filtrados não tratados de cultura desse fungo produziam substâncias inibidoras, *in vitro*, do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas (GILMANN *et al.*, 1996; MARSHALL; BLAIR, 1999; ASBEL; LEVISON, 2000).

Em 1951, em Oxford, Inglaterra, N.G. Healtley verificou que, nos meios líquidos onde o fungo era cultivado, encontravam-se três antibióticos distintos, que foram, posteriormente, denominados cefalosporinas P, N e C. Foi isolado o ácido 7 - aminocefalosporânico, o núcleo ativo da cefalosporina C, e verificou-se que, com a adição de cadeias laterais a essa estrutura, tornava-se possível a produção de compostos semi-sintéticos dotados de atividade antibacteriana muito maior do que a da substância original (GILMAN *et al.*, 1996; MARSHALL; BLAIR, 1999; ASBEL; LEVISON, 2000).

As cefalosporinas têm sido estudadas em todo o mundo desde a década de 1960 devido ao seu excelente espectro de atividade antibacteriana e segurança clínica (NORBY, 1987; NEU, 1990).

As cefalosporinas fazem parte do numeroso grupo de antibióticos que pertence à família dos antibióticos β -lactâmicos e possuem algumas características que as destacam, tais como, grande atividade antimicrobiana, amplo espectro de ação, fácil administração, baixa toxicidade e perfil farmacocinético favorável. São consideradas agentes de primeira escolha em situações clínicas variadas como: pneumonia, meningite, septicemia e infecções da pele e tecidos moles (MARSHALL; BLAIR, 1999).

A estrutura básica das cefalosporinas consiste em um anel β -lactâmico ligado a outro anel diidrotiazínico. A introdução de substituintes nas posições 3 e 7 modifica tanto o espectro de atividade antimicrobiana, como seu perfil farmacocinético, o que explica o grande número de cefalosporinas disponíveis no mercado farmacêutico (MARSHALL; BLAIR, 1999; ASBEL; LEVISON, 2000).

As cefalosporinas são classificadas em primeira, segunda, terceira e quarta gerações, baseando-se nas características do espectro de atividade antimicrobiana entre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Tanto as cefalosporinas orais como as parenterais estão incluídas nessa mesma classificação (GILMAN *et al.*, 1996; ASBEL; LEVISON, 2000; KOROLKOVAS, 2006).

O ceftiofur é uma cefalosporina de terceira geração de uso parenteral, indicada para tratamento de infecções respiratórias no gado e em suínos caracterizando-se por possuir amplo espectro de ação (WATTS *et al.*, 1994; SALMON *et al.*, 1995; DESHPANDE *et al.*, 2000). O ceftiofur representa um importante avanço no tratamento de infecções, sendo utilizado no tratamento da mastite e quadros de septicemia no gado (ERSKINE *et al.*, 1995; STANEK; KOFLER, 1998; DESHPANDE *et al.*, 2000).

As modificações químicas no núcleo cefêmico básico resultaram em uma cefalosporina de terceira geração com vantagens sobre outros agentes de amplo espectro. A estrutura molecular do ceftiofur lhe confere estabilidade contra a hidrólise de β -lactamases. Todos esses fatores contribuem para a excelente atividade *in vitro* e eficácia clínica do ceftiofur (YANCEY, 1987).

O espectro de atividade de ceftiofur tem sido demonstrado contra bactérias gram-negativas patogênicas responsáveis por infecções respiratórias em animais como a *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica*, *Haemophilus somnus*, *Escherichia coli* (WATTS *et al.*, 1994; SALMON *et al.*, 1995) e também contra *Aeromonas sp* ampicilina-resistente isolada de peixes ornamentais (DIXON; ISSVORAN, 1992; DESHPANDE *et al.*, 2000).

A atividade *in vitro* do ceftiofur tem sido avaliada contra uma grande variedade de microrganismos entre eles: *Salmonella sp* (DUIJKEREN, 1995), *Moraxella bovis* (SHRYOCK *et al.*, 1998), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (CHANG *et al.*, 2002), *Klebsiella sp* (BRISSE; DUIJKEREN, 2005), *Clostridium difficile* (POST; SONGER, 2004), *Haemophilus parasuis* e *Histophilus somni* (AARESTRUP *et al.*, 2004).

Ceftiofur tem sido indicado para o tratamento de pneumonia no gado leiteiro, pois não há necessidade de período de quarentena antes do abate ou ordenha, quando utilizado nas dosagens recomendadas. Por esse motivo é de interesse para

o tratamento de outras infecções bacterianas no gado (OWENS *et al.*, 1990; DESHPANDE *et al.*, 2000).

A *Escherichia coli* tornou-se um importante microrganismo patogênico de interesse em medicina veterinária, freqüentemente associada com septicemias, complicações de pneumonia bovina, doenças gastrintestinais e mastite. Normalmente os bacilos entéricos, incluindo um grande número de *E. coli*, produzem β -lactamases que podem comprometer a quimioterapia com β -lactâmicos para infecções por *Enterobacteriaceae* (SANDERS; SANDERS, 1992; JONES, 1999; DESHPANDE *et al.*, 2000).

A mastite é uma das doenças mais onerosas que acomete os rebanhos leiteiros devido ao alto custo com antibióticos para o tratamento, leite descartado devido à presença de resíduos de antibiótico, comprometimento da produção de leite do animal e em situações mais extremas, a morte do animal. O tratamento da mastite envolve geralmente o uso de antibiótico intramamário, sistêmico e em alguns casos ocitocina (hormônio estimulador da secreção do leite).

Devido a sua grande importância e ao dilema presente na tomada de decisão, uma série de pesquisas estão sendo realizadas para determinação do método mais eficaz de tratamento de mastite clínica. Um estudo foi realizado em vacas com mastite clínica por *Staphylococcus aureus* para determinar a concentração de ceftiofur no leite e no tecido mamário, após tratamento intramamário e intramuscular com este fármaco (OWENS *et al.*, 1990). Foi demonstrado que vacas recebendo infusão intramamária de alta concentração (200 mg ceftiofur, 2 doses a cada 24 h) tiveram a maior concentração de antibiótico no leite (450 $\mu\text{g/ml}$ 4 a 6 h após infusão) e no tecido (0,8 $\mu\text{g/mg}$ 30 h após) quando comparadas com vacas que receberam 100 mg de ceftiofur uma única vez ou 2 injeções de 500 mg de ceftiofur por via intramuscular ou combinação de terapia intramamária (1 dose de 100 mg) com parenteral.

O uso de ceftiofur sistêmico em outros estudos mostrou que o fármaco teve pouca difusão na glândula mamária, resultando em baixas concentrações do antibiótico no leite (ERSKINE *et al.*, 1995).

2. Descrição do ceftiofur

- ✓ Ceftiofur está descrito no THE INDEX MERCK (2001).
- ✓ **Nome químico:** Ácido[6R-[6 α , 7 β (Z)]]- 7-[[[(2-amino-tiazolil) (metoxiimino) acetil]amino]-3- [[(2-furanilcarbonil)-tio]metil]-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2- carboxílico.
- ✓ **Sigla:** CM- 31916; U 64279 E.
- ✓ **Fórmula:** C₁₉H₁₇N₅O₇S₃Na.H₂O (sal monossódico) massa molecular: 545,55.
- ✓ **Categoria:** antibacteriano (cefalosporina de 3^a geração).
- ✓ **pKa:** 2,5
- ✓ **NCM-SH** - Nomenclatura Comum do Mercosul: ceftiofur, ceftiofur sodium 2941.90.39, conforme a Tabela 1 (PEREIRA, 2002).

TABELA 1. Nomenclatura do ceftiofur.

| | DCB | DCI | CAS |
|------------------|------------|------|-------------|
| Ceftiofur | 2350.01-7 | 5703 | 80370-57-6 |
| Ceftiofur sódico | 0000.00-00 | 5703 | 104010-37-9 |

DCB - Denominação Comum Brasileira
DCI - Denominação Comum Internacional
CAS - Chemical Abstracts Service- Registry Numbers

3. Mecanismo de ação

Os antibióticos beta-lactâmicos exercem a sua atividade interagindo, no interior da parede celular bacteriana, com um grupo de proteínas, conhecidas como proteínas de ligação de penicilina – PLP. As PLP são enzimas que catalisam a biossíntese da porção peptidoglicano da parede celular bacteriana. Os antibióticos betalactâmicos submetem à acilase certas PLP e interrompem a síntese da parede

celular, causando lise e morte da célula. Nas bactérias gram-positivas, os agentes betalactâmicos difundem-se através das camadas de peptidoglicano na parede celular e ligam-se às PLP. Essa atividade de ligação inibe ainda mais a síntese da parede celular e, eventualmente, causa a lise da célula (NEU, 1985; MARSHALL; BLAIR, 1999; ASBEL; LEVISON, 2000).

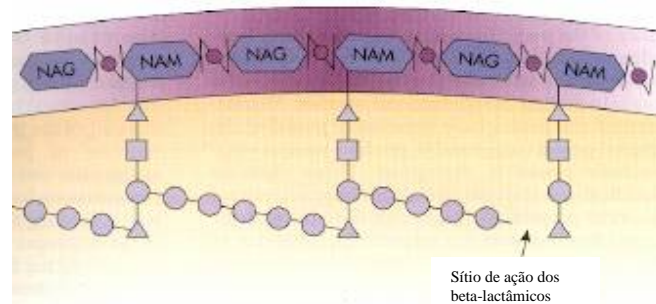


FIGURA 2 Mecanismo de ação dos antibióticos beta-lactâmicos

(Adaptado de Atlas, R.M., *Principles of Microbiology*, 1997)

Nas bactérias gram-negativas, as PLP localizam-se na membrana celular interior rodeada pelo espaço periplasmático e a membrana celular externa. O antibiótico deve primeiro penetrar a membrana celular externa através dos canais conhecidos como porinas. Uma vez que o antibiótico atinge o espaço periplasmático, as enzimas beta-lactamases têm o potencial de se ligar e/ou destruir o agente antes dele chegar às PLP alvo. A atividade de um antibiótico contra bactérias gram-negativas está relacionada à taxa de penetração através da membrana celular bacteriana externa, à sua interação com as beta-lactamases e a sua interação com as PLP alvo. (NEU, 1985; BELLIDO *et al.*, 1991; SANDERS; SANDERS, 1992; UNB, 2007).

4. Espectro de Atividade

O ceftiofur apresenta excelente atividade *in vitro* que engloba ampla variedade de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, sendo utilizado em enfermidades dos seguintes animais:

BOVINOS: para o tratamento das enfermidades respiratórias produzidas por *Pasteurella haemolytica* e *Pasteurella multocida* e no tratamento de doenças

produzidas por *Haemophilus sp*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Streptococcus sp* e *Staphylococcus sp*; *pododermatitis* infecciosa (*Fusobacterium necrophorum*, *Bacteróides melaninogenicus*), pneumonias bacterianas (KLEIN *et al.*, 1985; YANCEY *et al.*, 1988; PFIZER, 2003).

SUÍNOS: é usado para o tratamento e controle da doença respiratória bacteriana (pleuropneumonia e pneumonia bacteriana suína) associada à *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, enterites (*Salmonella choleraesuis*), meningoencefalite (*Streptococcus suis*) e infecções genitourinárias (SALMON *et al.*, 1994; PFIZER, 2003).

AVES: para o controle da mortalidade na primeira semana, associada à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* susceptíveis ao ceftiofur (SALMON *et al.*, 1993; SALMON *et al.*, 1994; PFIZER, 2003). No controle de infecções *colibacilares* em pintinhos de 1 dia de vida (morte prematura de pintos) (PFIZER, 2003).

EQÜINOS: para o tratamento de infecções respiratórias bacterianas associadas à *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi*, *Pasteurella spp*, *Staphylococcus spp* e *Escherichia coli* (KLEIN *et al.*, 1985; YANCEY *et al.*, 1988; PFIZER, 2003).

CÃES: para o tratamento de infecções urinárias associadas à *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (PFIZER, 2003).

4.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* do ceftiofur

O uso de fármacos antimicrobianos em qualquer área, incluindo a terapêutica humana ou veterinária, ultimamente mostra-se favorável ao crescimento de bactérias resistentes a esses medicamentos (WITTE, 1998).

Estudos realizados até o momento demonstraram a ação do ceftiofur frente a diferentes microrganismos, comparando sua atividade com outros antimicrobianos (DUIJKEREN; KLINGEREN 1995; SHRYOCK *et al.*, 1998; DESHPANDE *et al.*, 2000).

DUIJKEREN e colaboradores (1995) demonstraram *in vitro* a ação do ceftiofur e de mais dezessete antimicrobianos frente a 62 cepas de *Salmonella* isoladas de

cavalos, na Holanda, de 1990 a 1993. A maioria das cepas testadas foram sensíveis ao ceftiofur, ciprofloxacino, enrofloxacino, gentamicina, amicacina, canamicina, flumequina, colistina e furazolidona.

SHRYOCK e colaboradores (1998) estudaram a atividade antimicrobiana de 55 isolados clínicos da bactéria *Moraxella bovis* frente a sete antimicrobianos incluindo o ceftiofur. Os dados obtidos *in vitro* demonstraram eficácia clínica para todos os antibióticos estudados.

DESHPANDE e colaboradores (2000) avaliaram a atividade *in vitro* do ceftiofur contra isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* incluindo cepas produtoras de beta-lactamases. Ceftiofur, cefquinoma, ampicilina, gentamicina e sulfametoxazol+ trimetoprima foram testados contra 180 isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Ceftiofur demonstrou ser mais ativo *in vitro* contra *Enterobacteriaceae* o que é de grande importância em medicina veterinária.

5. Relação estrutura-atividade

Muitos derivados semi-sintéticos e análogos estruturalmente relacionados foram desenvolvidos desde a identificação da molécula básica da cefalosporina o ácido 7-amino-cefalosporânico (Figura 3), que consiste em um anel hexagonal (diidrotiazolidina) fundido a um anel beta-lactâmico (NEU, 1985; KOROLKOVAS, 2006). Substituições nas posições 3 e 7 foram efetuadas a fim de melhorar o espectro antimicrobiano e as propriedades farmacocinéticas das cefalosporinas (NEU, 1985; NEU, 1986; PRICE, MCGREGOR, 1994; KOROLKOVAS, 2006).

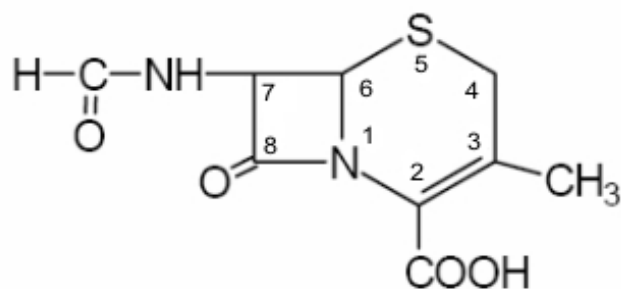
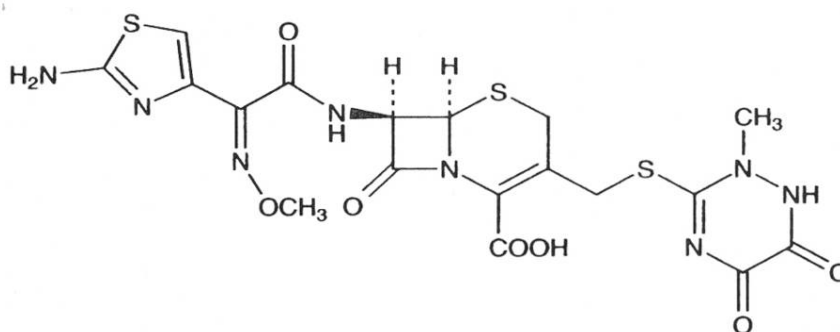


FIGURA 3. Estrutura química do ácido 7- aminocefalosporânico.

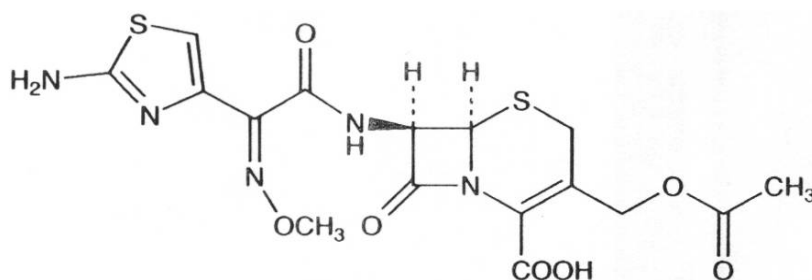
Modificações na posição 3 do núcleo cefêmico também foram efetuadas a fim de aumentar o espectro antimicrobiano das cefalosporinas originando cefalosporinas de quarta geração. Por exemplo, uma amina quaternária foi introduzida na posição 3 e uma carboxila foi adicionada à cadeia lateral da cefotaxima na posição 7, para produzir a ceftazidima (NIKAIDO *et al.*, 1991; PRICE e MCGREGOR, 1994).

Ceftriaxona e cefotaxima possuem em sua estrutura, na posição 7 do núcleo cefêmico, os grupamentos aminotiazol e metoxiimino os quais lhes conferem atividade contra *Enterobacteriaceas* e estabilidade contra a hidrólise por beta-lactamases (Figura 4). O ceftiofur também possui o grupamento aminotiazol na mesma posição, mas a metila do grupamento metoxiimino sofreu substituições.

A



B



C

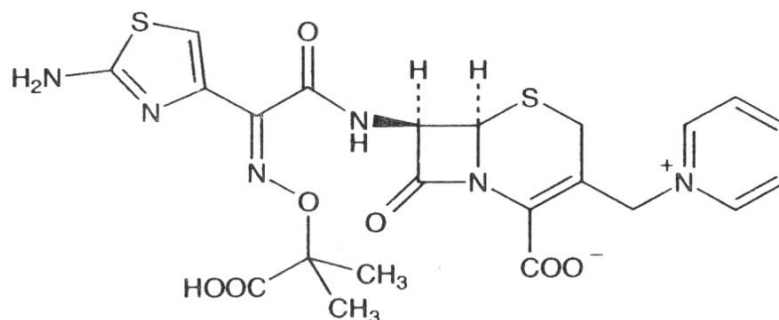


FIGURA 4. Estrutura química da ceftriaxona (A), cefotaxima (B) e ceftazidima (C).

A atividade da ceftriaxona *in vitro* é bastante similar à da cefotaxima, pois, nessa cefalosporina o grupo aminotiazólico é igual ao da cefotaxima (KOROLKOVAS, 2006), assim como na ceftazidima.

6. Perfil farmacocinético

O medicamento, para ser eficaz, deve atingir concentrações suficientemente elevadas não apenas no plasma, mas também nos tecidos alvo. Os estudos farmacocinéticos em animais, nas formas de administração intramuscular e intravenosa demonstraram que o ceftiofur é rapidamente absorvido. Esses estudos também mostraram que a farmacocinética do ceftiofur é linear e que sua principal via de eliminação é renal, mais do que 95% da dose é excretada 24 h após a administração; 60 – 80% através da urina e o restante através das fezes, como tal e na forma de metabólitos (BANTING *et al.*, 1989; HALSTEAD *et al.*, 1992; BECONI-BARKER *et al.*, 1995).

7. Toxicidade

Não é genotóxico, cancerígeno, teratogênico nem embriotóxico. Estudo realizado em camundongos apresentou DL 50 para as vias IV e IM de 2000 mg/kg e 3400 mg/kg, respectivamente (BERTHE, 1982).

8. Posologia

Administrar na dose de 1-3 mg de ceftiofur/kg de peso, ou a critério do Médico Veterinário. Repetir o tratamento, após o intervalo de 24 horas, por três dias consecutivos. Administrar por via intramuscular em bovinos, suínos e eqüinos, por via intramuscular ou subcutânea em aves e por via subcutânea em cães. Para:

- **bovinos e suínos pós-desmame:** (1mg/kg de peso corporal). Repetir o tratamento após intervalo de 24 horas por três dias consecutivos;

- **suínos em aleitamento:** (2 mg/kg de peso corporal). As dosagens e o tempo de tratamento podem ser modificados de acordo com a gravidade do caso;

- **aves:** administrar na dose de 2 mg/kg de peso corporal, para pintos de 1 dia administrar na dose de 0,08 a 0,20 mg/pinto, por injeção subcutânea na nuca;

- **eqüinos:** administrar na dose de 2 a 4 mg/kg de peso corporal a cada 24 horas. Administrar um volume máximo de 10 ml no local da injeção. O medicamento deverá ser utilizado por até 48 horas, após o desaparecimento dos sintomas.

- **cães:** administrar, por via subcutânea, nas doses de 2 mg/kg de peso corporal, a cada 24 horas. O tratamento deve ser continuado por 5 a 14 dias, a critério do Médico Veterinário (PFIZER, 2003).

9. Contra-indicações

O uso de ceftiofur é contra-indicado para animais hipersensíveis ao fármaco (PFIZER, 2003).

10. Advertências

Penicilinas e cefalosporinas podem causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Exposições tópicas a alguns antimicrobianos, inclusive ceftiofur podem causar reações alérgicas moderadas ou graves em alguns indivíduos. Exposições repetidas e prolongadas podem induzir à sensibilização. Evitar contato direto do produto com a pele, olhos, boca e roupa. Pessoas com hipersensibilidade conhecida à penicilinas ou cefalosporinas devem evitar contato com o produto. Em caso de acidentes oculares, lavar os olhos com bastante água por 15 minutos. Em acidentes tópicos lavar a pele com água e sabão (PFIZER, 2003).

11. Precauções

Ainda não foi estabelecida a segurança da utilização de ceftiofur em cães reprodutores ou cadelas prenhas (PFIZER, 2003).

12. Determinações quantitativas

Na pesquisa bibliográfica realizada foi encontrado um artigo referente à determinação de impurezas da substância em estudo, através de cromatografia líquida (DUNN; HAHN, 1992). Várias fases estacionárias foram testadas para determinar uma melhor separação cromatográfica. A coluna Lichrospher 100 Diol (250 mm x 4 mm) 5 µm foi selecionada para o desenvolvimento do ensaio. O método demonstrou linearidade, precisão e especificidade.

BECONI-BARKER e colaboradores (1995) desenvolveram um método por CLAE para determinar ceftiofur e seu metabólito desfuroilceftiofur em tecidos, rim, fígado e gordura de suínos. O método cromatográfico utilizou coluna BDS Hypersil C₁₈ (250 x 4,6 mm), o volume de injeção foi de 500 µl, a fase móvel constituiu-se de: fase móvel A: 0,1% ácido trifluoracético em água e fase móvel B: 0,1% de ácido trifluoracético em acetonitrila, sendo utilizado um sistema gradiente. O comprimento de onda foi 266 nm. O ensaio foi específico para avaliar ceftiofur e seu metabólito em suínos.

KEEVER e colaboradores (1998) utilizaram a CLAE e espectrometria de massas para quantificar ceftiofur em leite. A coluna utilizada foi Nova Pak C₁₈ (75 x 3,9 mm). A fase móvel constituiu-se de ácido acético a 1% e ácido heptafluorobutírico 25 mM, sendo utilizado um sistema gradiente e uma vazão de 1 ml/minuto. As análises indicaram que o leite coletado 32 h após a administração do ceftiofur estava de acordo com a tolerância do FDA que é de 50 ppb e que o leite coletado 48 h após a administração continha entre 24 - 31 ppb de ceftiofur. Os autores concluíram que a quantificação foi precisa.

Outro método cromatográfico por CLAE foi desenvolvido para determinar resíduo dos antibióticos cefazolina, cefoperazona, cefquinoma e ceftiofur em leite bovino. A coluna utilizada foi Nova Pak fenila (150 mm x 3,9 mm), 4 µm. A gordura do leite foi removida por centrifugação. A precipitação de material orgânico e a extração das cefalosporinas foi realizada através da adição de acetonitrila ao leite. O procedimento da extração é baseado na precipitação das proteínas e do ponto isoelétrico da caseína usando ácido acético, tampão acetato e tampão fosfato. Foi preparada uma solução de ácido octanosulfônico pH 2,52 (0,005M). A fase móvel

constituiu-se de duas soluções: a solução A foi preparada diluindo-se 100 ml de acetonitrila para 1000 ml com o ácido octanosulfônico pH 2,52. A solução B foi preparada diluindo uma mistura de 300 ml de acetonitrila e 150 ml de metanol para 1000 ml com a mesma solução de ácido octanosulfônico pH 2,52. Os compostos foram separados por um sistema gradiente com pareamento de íons. A detecção foi em 270 nm, o volume de injeção foi de 100 µl, a vazão da fase móvel foi de 1 ml / minuto e a temperatura de 20-24 °C. A média do tempo de retenção das cefalosporinas no estudo da precisão foi de 12,8 minutos para a cefazolina; 27,1 minutos para a cefoperazona; 29,1 minutos para a cefquinoma e 41,2 minutos para o ceftiofur (SÖRENSEN; SNOR, 2000).

BAERE e colaboradores (2004) aperfeiçoaram um método para determinação quantitativa de ceftiofur e seu metabólito ativo desfuroilceftiofur em plasma de cavalo e no fluido sinovial. A coluna utilizada para a CLAE foi PLPRP-S polimérica (150 x 2,1 mm) 5µm. A fase móvel (A) constituiu-se de ácido trifluoracético a 0,1% em água e a fase (B) de acetonitrila. A vazão foi de 0,4 ml/minuto. O comprimento de onda utilizado foi de 266 nm.

Um novo método para identificar e quantificar resíduos de ceftiofur em leite foi proposto por MAKESWARAN e colaboradores (2005). O método utilizou extração e CLAE acoplado à espectrometria de massas. A coluna utilizada foi Hypersil BDS C₁₈ (150 X 2 mm) 5µm. A fase móvel constituiu-se de: fase (A) ácido fórmico a 0,1% em água e fase (B) ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila. O sistema utilizado foi gradiente e o volume de injeção foi de 20 µl. As amostras foram desproteinizadas com acetonitrila para reduzir a interferência.

JACOBSON e colaboradores (2006) publicaram um método para determinação de ceftiofur em plasma bovino, por CLAE, com detector de arranjo de diodos. A coluna utilizada foi Waters Novapak C₁₈ (150 x 4,6 mm). A fase móvel constituiu-se de 75% do solvente A (ácido trifluoracético a 0,1% em água) e 25% do solvente B (ácido trifluoracético a 0,1% em acetonitrila). O volume de injeção foi de 200 µl e o comprimento de onda 265 nm. O tempo de retenção para o desfuroilceftiofur foi 16,5 – 17,5 minutos e o tempo de corrida foi de 25 minutos. Não foi relatado o tempo de corrida para o ceftiofur, pois ele foi convertido em desfuroilceftiofur.

13. Validação de métodos

A validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica. É um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e aperfeiçoamento do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal e continua na fase de experimentos e transferência do método. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidência objetiva de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido (BARROS, 2002).

No desenvolvimento de métodos analíticos deve-se levar em conta a escolha de um método adequado, tendo em vista que a falta de métodos confiáveis de avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (MEHTA, 1997).

Diversas diretrizes de orientação sobre validação de métodos encontram-se atualmente disponíveis (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH (2005), Brasil (2003) e a USP 30 (2007) e contêm os principais parâmetros de desempenho analítico a serem avaliados na validação de um método, ou seja, exatidão, precisão, linearidade, especificidade, robustez, limites de quantificação e de detecção.

Na presente tese estão apresentados os métodos que foram desenvolvidos e validados para determinação qualitativa e quantitativa do ceftiofur sódico na forma farmacêutica pó para injetável, para os produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®].

A análise qualitativa foi realizada mediante cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência.

Os métodos quantitativos que foram desenvolvidos e validados foram: cromatografia líquida de alta eficiência, microbiológico por difusão em ágar e espectrofotometria na região do ultravioleta. Nenhum desses métodos haviam sido publicados anteriormente para ceftiofur produto acabado.

A comparação dos métodos propostos, através de análise estatística está apresentada na **Tabela IV** do Anexo I.

14. Estudo da estabilidade

Os testes de estabilidade envolvem várias fases de desenvolvimento de uma especialidade farmacêutica. A estabilidade do produto final irá depender das propriedades físico-químicas dos constituintes desta formulação e dos fatores ambientais como temperatura, luz e umidade. A estabilidade intrínseca do fármaco e o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar produtos de degradação devem ser estudados. Nessa fase são utilizados testes de estabilidade em condições de estresse e acelerada (NUDELMAN, 1975; MATTHEWS, 1999).

Segundo as diretrizes do ICH-Q1A(R2) (2003), o estudo da estabilidade em condições de estresse determina a estabilidade intrínseca do fármaco estabelecendo possíveis rotas de degradação que podem seguir vários processos químicos, dos quais os mais freqüentes são, hidrólise, óxido-redução, fotólise e a racemização.

As reações mais importantes catalisadas pela luz são isomerizações, racemizações, rearranjos, dimerizações, oxidações, ruptura de ligações e polimerizações. Compostos contendo grupos cromóforos tais como cetona, nitro, nitroso, sulfona, duplas e triplas ligações são mais sensíveis à radiação luminosa. Essa sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número destes cromóforos na molécula e especialmente se estiverem conjugados, permitindo a interação dos elétrons livres (NUDELMAN, 1975).

As guias para realização de estudos de estabilidade (ICH, 2003; BRASIL, 2005), descrevem para o estudo da fotoestabilidade duas opções para fonte de luz. A primeira opção seria utilizar uma fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, como uma lâmpada fluorescente artificial combinando emissão visível e UV. D65 é o padrão internacional reconhecido para luz do dia como definido na ISO 10977(1993). ID 65 é equivalente ao padrão da luz indireta de interiores. Para fonte de luz emitindo radiação significativa abaixo de 320 nm, deverá ser utilizado filtro(s)

para eliminar tais radiações. Na segunda opção a amostra deverá ser exposta a seguinte combinação: lâmpada fluorescente branca similar à ISO 10977 (1993) e lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm (ICH, 2003).

A velocidade de degradação pode ser calculada cineticamente. O estudo da cinética é de fundamental importância para a estabilidade de preparações farmacêuticas. Através desses estudos podem-se obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação. As velocidades de degradação podem classificar-se como de ordem zero, primeira e segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes. A partir da lei da velocidade de reação química, pode-se determinar a ordem da reação, verificando a concentração das amostras retiradas no decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade da reação é independente da concentração da substância ativa. Dessa maneira, o gráfico de concentração (C x Tempo) será uma reta, cuja inclinação corresponderá à constante de velocidade (k). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação será de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ($\log C$ x Tempo). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Nesse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$ x Tempo) fornece uma reta (LACHMAN *et al.*, 2001).

A determinação da ordem da reação é realizada a partir dos procedimentos analíticos, utilizados para determinar específica e quantitativamente a concentração da substância de interesse. (NUDELMAN, 1975).

Os efeitos fototóxicos de diferentes fármacos podem ser devido às próprias substâncias ou aos produtos formados pela incidência de radiação ultravioleta. Os produtos de fotodegradação podem ser tóxicos ou instáveis ou reagir e formar derivados também tóxicos (GREENHILL, McLELLAND, 1990).

O ceftiofur sódico pó para solução injetável, conforme instrução do fabricante, deve ser conservado sob refrigeração entre 2 e 8 °C. Após sua reconstituição, o produto poderá ser mantido por sete dias à temperatura de 4 °C ou por 12 horas até 30 °C. Quando congelado o produto reconstituído é estável por oito semanas (PFIZER, 2003).

SUNKARA e colaboradores (1999) descreveram a influência do pH, da temperatura e a cinética de degradação do ceftiofur em solução aquosa. O objetivo do estudo foi verificar a estabilidade do ceftiofur 1 mg/ml em solução aquosa em diferentes valores de pH (1,0; 3,0; 5,0; 6,8; 7,4 e 10,0) e temperatura (0, 8, 25, 37 e 60 °C). As soluções de ceftiofur pH 5,0 e 7,4 e em água (pH 6,8) foram testadas em todas as temperaturas acima citadas. A CLAE foi utilizada para analisar a reação de degradação, desfuroilceftiofur. A 60 °C a degradação foi maior no pH 7,4 comparada com pH 1,0; 3,0; 5,0 e água. A 60 °C e 25 °C a degradação foi rápida em pH 10,0 e não foi detectada a presença de ceftiofur após 10 minutos de incubação. A formação de desfuroilceftiofur foi de 65% em pH 10,0. A energia de ativação para degradação do ceftiofur foi de 25, 42 e 28 kcal/mol a pH 5,0; 7,4 e 6,8, respectivamente. A formação de desfuroilceftiofur foi grande comparada com o pH ácido (SUNKARA *et al.*, 1999).

As constantes de velocidade de hidrólise observadas para o ceftiofur 1 mg/ml reconstituído em água (pH 6,8) e em tampões (pH 5,0 e 7,4) são similares em 8 °C. Esses resultados indicam que as constantes de velocidade são independentes do pH nessa faixa. A constante de velocidade também foi independente da força iônica (0,5 M para os tampões e a força iônica não foi mantida para os produtos reconstituídos em água). A máxima estabilidade para a solução ocorreu em valores de pH 5,0 e 6,8. A decomposição foi definida como um mecanismo de primeira ordem. Não houve mudanças no mecanismo de reação com as temperaturas estudadas (SUNKARA *et al.*, 1999).

O metabólito majoritário do ceftiofur, desfuroilceftiofur, eluído antes do ceftiofur em uma coluna RP₁₈ indica que o metabólito é mais hidrofílico que o composto de origem. Desse modo, compostos polares são mais prováveis de passarem rapidamente pela eliminação renal. Conseqüentemente, baixos níveis

plasmáticos de ceftiofur, após administração intravenosa, podem ser atribuídos em parte à hidrólise química do ceftiofur em desfuroilceftiofur (CRAIGMILL *et al.*, 1991).

Foi verificado que para o ceftiofur degradar, o estado de transição requer energia de ativação para a formação do produto de degradação. As energias de ativação observadas para a degradação do ceftiofur são comparáveis com as observadas para outras cefalosporinas (FABRE *et al.*, 1984; SUNKARA *et al.*, 1999).

Entre outras cefalosporinas estudadas a cefotaxima foi avaliada quanto à sua estabilidade em solução aquosa sob efeito de diferentes valores de pH, temperaturas (FABRE *et al.*, 1984; VILANOVA *et al.*, 1994) e exposição à luz ultravioleta a 254 nm (LERNER *et al.*, 1988). A cinética de decomposição foi monitorada por CLAE e microbiológico. Os resultados indicaram grande sensibilidade à luz UV, 45 minutos de exposição degradou 50% do antibiótico presente na solução e em 4 h praticamente se obteve 95% de degradação. A radiação inibiu as propriedades do antibiótico contra *Escherichia coli*. Todos os produtos formados foram inativos.

A estabilidade da cefuroxima em solução aquosa e sua cinética foram estudadas. A máxima estabilidade foi observada na região de pH 4,0 a 7,0. Na temperatura de 25 °C, durante 1,2 dias, manteve 90% de sua concentração. A sua quantificação foi através de CLAE (WANG; NOTARI, 1994).

SIWEK e ZAJAC (1995) avaliaram a hidrólise e a cinética da ceftazidima em solução aquosa. Ocorreu hidrólise competitiva da ceftazidima consistindo de dois processos: um do anel β lactâmico e o segundo do grupo metoxiimino. A cor amarela intensa corresponde à destruição do anel. A influência do pH, da temperatura, do tampão e a cinética da ceftazidima em solução aquosa, também foram estudadas. Os autores observaram que a máxima estabilidade foi conseguida na região de pH 4,5 a 6,5. Na temperatura de 30 °C as soluções de ceftazidima em tampão acetato pH 4,4 e pH 5,5 e em tampão acetato pH 6,5 mantiveram 90% de seu teor inicial por aproximadamente 1,5 dias (ZHOU; NOTARI, 1995).

RABOUAN-GUYON e colaboradores (1997) desenvolveram um estudo da estabilidade da cefepima em diferentes soluções para infusão. A formulação Axepim® foi diluída com cloreto de sódio 0,9% e com glicose 5% em bolsas de

polietileno. O estudo foi conduzido a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na luz natural e a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro. As análises foram realizadas por CLAE com um método previamente validado. Esse estudo mostrou as mudanças na estabilidade da cefepima em 48 h na temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na luz natural e 15 dias $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro. A coloração amarelada em algumas soluções, indicou visualmente uma degradação da cefepima. Os espectros no infravermelho e por ressonância magnética nuclear mostraram que essa coloração esteve ligada à destruição do anel cefema da molécula.

FUBARA e NOTARI (1998) realizaram um estudo da estabilidade da cefepima em solução aquosa, onde verificaram a influência do pH, da temperatura e da adição de tampão. Os resultados encontrados indicaram que a máxima estabilidade foi na região de pH 4,0 a 6,0. Concluíram que a solução de cefepima estocada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH entre 4,6 e 5,6 manteve 90% de sua concentração durante 2 dias.

Em 2000, ZAJAC e colaboradores determinaram a influência da umidade e da temperatura sobre a cinética da reação da cefotaxima sódica na forma sólida. A estabilidade e os parâmetros termodinâmicos da cefotaxima foram estudados para uma umidade relativa de 25,0% a 76,4% e examinado a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ e para a cefotaxima dessecada foram calculados para $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para a umidade zero (0%) e para a umidade relativa de 76,4% foram diferentes. Foi encontrado um pequeno valor para a energia de ativação na umidade relativa de 76%. Concluiu-se que o mecanismo da reação de decomposição da cefotaxima sódica dessecada é diferente do mecanismo dela na presença de umidade e que na ausência de umidade ela possui boa estabilidade.

MORSCH (2002) avaliou a sensibilidade à luz ultravioleta do cloridrato de cefetamete pivoxila em comprimidos e pó para solução oral, dentro e fora da embalagem original, empregando a CLAE, bem como pela avaliação qualitativa por CCD. Na avaliação da forma farmacêutica pó para suspensão oral, MEDIANTE CLAE, não foram observadas alterações nos teores médios após 60 dias de exposição à radiação UV.

JELINSKA e colaboradores (2004) verificaram a influência do pH, temperatura e tampões na cinética de degradação do cloridrato de cefetamete pivoxila em

solução aquosa. A máxima estabilidade foi observada na região de pH 3,0 a 5,0. O estudo foi realizado durante 240 horas.

Informações sobre a estabilidade fotoquímica dos fármacos são necessárias para determinar as condições de armazenamento a fim garantir a qualidade de produtos farmacêuticos de uso humano e veterinário. O estudo da fotoestabilidade do ceftiofur ainda não tinha sido relatado na literatura pertinente.

No capítulo 4 estão apresentados os resultados obtidos no estudo da estabilidade fotoquímica do ceftiofur sódico SQR e dos produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®], bem como o estudo da cinética de degradação.

CAPÍTULO 1: Métodos de Análise Qualitativa

1.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

1.1.1 Material

Para a identificação do ceftiofur sódico, por espectrofotometria na região do ultravioleta e com o objetivo de determinar o comprimento de absorção máxima do antibiótico, foram obtidos espectros com os seguintes solventes: metanol, ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M, água e com mistura de tampão dissódico hidrogenofosfato diidratado 0,02 M (com pH ajustado para 6,0 com ácido ortofosfórico) : acetonitrila (78:22, V/V), sendo esta a fase móvel empregada na determinação do ceftiofur por (CLAE). Os espectros foram realizados em espectrofotômetro UV/VIS UV - 1601 PC (SHIMADZU).

1.1.2 Método

Foi empregada solução na concentração de 10 µg/ml de SQR e dos produtos comerciais nos diferentes solventes. Para a determinação dos espectros dos produtos comerciais e da SQR, partiu-se de soluções estoque de 1000 µg/ml, diluídas no solvente avaliado. A partir desta solução, procederam-se as diluições de modo a obter 10 µg/ml com os respectivos solventes. Efetuou-se a varredura espectrofotométrica no comprimento de onda de 200 a 400 nm, empregando-se cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico.

A identificação do ceftiofur das amostras foi realizada mediante comparação de seu perfil característico e comprimentos de onda máximos de absorção.

1.1.3 Resultados

No artigo : Development of a Ultraviolet Spectrophotometric Method for the Determination of Ceftiofur Sodium Powder, estão apresentados os espectros de absorção na região do UV da SQR e do ceftiofur nos produtos Excenel[®] e Topcef[®] (pg. 96).

1.1.4 Discussão

A espectrofotometria do UV é um método de fácil execução que pode ser usado na identificação e também é adequado para a quantificação de fármacos em formulações.

O comprimento máximo de absorção quando da utilização da água e da fase móvel da CLAE foi de 292 nm, tendo sido verificada absorção também em 231 e 258 nm. Contudo, quando se utilizou metanol, observou-se o comprimento de onda máximo de 288 nm e absorção em 205 nm. Assim, optou-se por utilizar a água como solvente, para a realização deste método, considerando o custo e a toxicidade dos demais solventes.

Os espectros de absorção das amostras foram compatíveis com aqueles obtidos com a SQR, nos solventes utilizados. A similaridade desses espectros indica que a espectrofotometria na região do ultravioleta é adequada para a identificação de ceftiofur na forma farmacêutica pó injetável, quando houver SQR.

1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

1.2.1 Material

Para a identificação do ceftiofur sódico por CCD, utilizaram-se placas de gel de sílica Merck GF₂₅₄, com espessura da camada de sílica de 0,2 mm. Foram desenvolvidos dois sistemas para a identificação do ceftiofur.

O primeiro sistema eluente constituiu-se de uma mistura de metanol (Merck), clorofórmio (Merck) e acetona (Merck) grau analítico (9:8:1; V/V/V). Utilizou-se metanol para o preparo das amostras.

O revelador utilizado foi 0,3% de ninidrina em etanol em capela de exaustão seguido de aquecimento a 110 °C.

No segundo sistema desenvolvido empregou-se uma mistura de acetona e acetato de amônio a 15,4% (P/V) (3:7) pH 5,0 ajustado com ácido acético glacial.

O revelador utilizado foi vapor de iodo, o qual foi obtido a partir do iodo grau analítico (Merck).

1.2.2 Método

No primeiro sistema desenvolvido empregou-se fase móvel composta por metanol, clorofórmio e acetona (9:8:1; V/V/V). Foram preparadas soluções metanólicas de 1,0 mg/ml da SQR e dos produtos Excenel[®] e Topcef[®]. Prepararam-se também soluções metanólicas 1,0 mg/ml da SQR e dos dois produtos comerciais submetidos a degradação com peróxido de hidrogênio a 3%, durante 6 h e luz UVC 254 nm, durante 54 horas, a uma distância de 15 cm da lâmpada. Aplicaram-se, com microseringa, 5 µl da SQR e dos produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®], dissolvidos em metanol na concentração de 1,0 mg/ml. Transferiu-se a placa para uma cuba previamente saturada com o sistema eluente e permitiu-se o desenvolvimento do cromatograma até atingir 15 cm acima do ponto de aplicação. Após a retirada da placa e subsequente exposição ao ar para secagem, não foi possível a visualização das manchas na luz UV no comprimento de onda de 254 nm. Nebulizou-se a placa com solução etanólica de ninidrina a 0,3% e aqueceu-se em estufa 110 °C durante 15 minutos. Determinaram-se os valores do fator de retenção (Rf), através do quociente entre as distâncias de migração do eluente e de cada amostra submetida à análise.

No segundo sistema eluente testado para a identificação do ceftiofur sódico, empregou-se como fase móvel uma mistura de acetona e acetato de amônio a 15,4% (P/V) (3:7) pH 5,0 ajustado com ácido acético glacial. Foi utilizado o mesmo procedimento descrito para o primeiro sistema desenvolvido, porém, após a remoção da placa também não foi possível visualizar as manchas na luz UV 254 nm.

A placa foi exposta a vapores de iodo até o aparecimento das manchas. Determinaram-se os valores do fator de retenção (Rf) sob luz visível.

1.2.3 Resultados

Em ambos os sistemas há o aparecimento de uma mancha para os produtos Excenel[®] e Topcef[®] e para a SQR, na mesma posição, cor e intensidade. Em

metanol, clorofórmio e acetona (9:8:1 V/V/V) o Rf determinado foi de 0,76, tanto para o ceftiofur SQR quanto para as amostras. O resultado do Rf para o segundo sistema desenvolvido foi de 0,81 para a SQR e também para as amostras.

Foram realizadas três análises confirmando o resultado obtido em todas as placas.

Nas amostras e na SQR submetidas à luz UV 254 nm por 54 h a mancha apareceu em tamanho menor quando comparada à SQR não submetida nesta condição. Por outro lado, não foi possível a separação das manchas da SQR e dos produtos Excenel[®] e Topcef[®] submetidos à degradação por peróxido de hidrogênio 3%, durante 6 h, tendo ocorrido apenas a visualização do padrão que não foi submetido à degradação. Dessa forma, confirmou-se que houve degradação do ceftiofur em peróxido de hidrogênio, durante 6 horas, o que pode ser evidenciado nas análises por CLAE.

1.2.4 Discussão

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana.

A CCD permite identificar o fármaco quando este é cromatografado juntamente com a SQR, através da comparação dos valores dos Rf obtidos e também poderá ser utilizada para verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (WATSON, 2005).

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, grande reprodutibilidade e baixo custo.

Para o desenvolvimento do método por CCD foi realizada uma pesquisa na literatura, a fim de verificar a existência de trabalhos empregando esta técnica para o ceftiofur. Não foram encontrados dados com relação a essa técnica para o ceftiofur. No entanto, buscaram-se na literatura trabalhos com cefalosporinas utilizando-se esta técnica.

MORSCH (2002) desenvolveu um sistema de CCD para o cefetamet pivoxila utilizando cromatoplasmas de gel de sílica Merck GF₂₅₄, como sistema adsorvente e como sistema eluente acetato de amônio 145 g/l (pH 6,2, ajustado com ácido acético glacial) : acetona (80:20, V/V). Esse sistema foi testado para o ceftiofur mas não apresentou resultado adequado.

Analisando a estrutura do ceftiofur, foi possível verificar que se trata de um fármaco polar e, portanto, buscaram-se sistemas adequados para esta característica.

Na Farmacopéia Brasileira para a identificação da amoxicilina utiliza-se como fase móvel uma mistura de metanol: clorofórmio: água: acetona (9:8:3:1; V/V/V). Esta fase móvel foi testada, sendo que retirou-se a água para melhor adequação do sistema cromatográfico.

No primeiro sistema desenvolvido é importante que a superfície do adsorvente seja borrifada uniformemente com ninidrina. Recomenda-se que a borrifação seja feita em capela equipada com um exaustor eficiente.

Para compostos orgânicos é muito utilizada a exposição da cromatoplasma aos vapores de iodo, em recipiente fechado. A maioria delas dá manchas marrons, tanto mais escuras quanto maior o tempo de exposição. A grande vantagem do segundo método é ser mais rápido e de fácil execução, se for comparado com o primeiro método.

As soluções fotodegradadas do ceftiofur e dos dois produtos comerciais apresentaram R_f similar às amostras não submetidas à degradação, porém os sistemas eluentes não permitiram evidenciar os produtos de degradação.

Os resultados dos valores de R_f do ceftiofur SQR e dos produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®] indicam que ambos os métodos podem ser utilizados para identificação e avaliação da pureza do fármaco. Os métodos desenvolvidos por CCD demonstraram ser adequados para a identificação do ceftiofur na forma farmacêutica em estudo.



FIGURA 1.1 Perfil cromatográfico das amostras de ceftiofur (0,1 mg/ml) Excenel[®] - Rf 0,76, Topcef[®] Rf - 0,76 e SQR – Rf 0,76. Fase móvel: metanol, clorofórmio e acetona (9:8:1 V/V/V), após revelação com ninidrina.



FIGURA 1.2 Perfil cromatográfico das amostras de ceftiofur (0,1 mg/ml) Excenel[®] - Rf 0,81, Topcef[®] - Rf 0,81 e SQR - Rf 0,81. Fase móvel: acetona e acetato de amônio a 15,4% (P/V) (3:7) pH 5,0 ajustado com ácido acético glacial, após revelação com vapores de iodo.

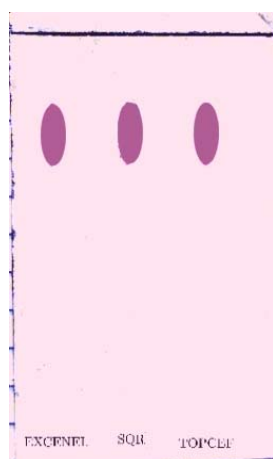


FIGURA 1.3 Perfil cromatográfico das amostras de ceftiofur (0,1 mg/ml) Excenel[®], Topcef[®] e SQR. Fase móvel: metanol, clorofórmio e acetona (9:8:1 V/V/V), submetidos à degradação com a luz UVC 254 nm, durante 54 horas, após revelação com ninidrina.

1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

1.3.1 Material

Ceftiofur SQR, ceftiofur pó para solução injetável Excenel® e Topcef® foram submetidos à análise por CLAE.

Empregou-se cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10 ADVP, detector com comprimento de onda variável modelo SPD 10AVP, UV-VIS e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M-10A VP, degaseificador DGU-14, central de controle SCL-10A e auto-injetor SIL-10 A VP. As áreas dos picos e cálculos de pureza e similaridades foram realizadas através do software CLASS – VP 6.14.

Os solventes empregados foram de grau cromatográfico, acetonitrila (Tedia, USA), hidrogenofosfato dissódico diidratado e ácido ortofosfórico 85% (Merck (Darmstadt, Alemanha) e a água foi obtida através do sistema Mili- Q RO (Millipore®).

1.3.2 Método

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão hidrogenofosfato dissódico diidratado 0,02 M (pH ajustado para 6,0 com ácido ortofosfórico 85%) e acetonitrila (78:22, V/V). O pH da fase aquosa foi ajustado com ácido ortofosfórico 85%, previamente à mistura com a fase orgânica. A fase móvel foi filtrada através de membrana com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, sob vácuo. As amostras foram preparadas empregando-se a fase móvel como diluente, a concentração final de 60 µg/ml.

Estabilizou-se o sistema através da passagem da fase móvel por 30 minutos, com vazão de 1,0 ml/minuto. Após estabilização do sistema foram injetados 20 µL das soluções da SQR e das amostras previamente filtradas em membrana com porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. As soluções foram preparadas e injetadas em triplicata. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1.1 Condições cromatográficas utilizadas na determinação de ceftiofur sódico pó para solução injetável para execução do método por CLAE.

| | |
|---------------------|--|
| Fase Móvel | Mistura de tampão hidrogenofosfato dissódico diidratado 0,02 M (pH ajustado para 6,0 com ácido ortofosfórico 85%) e acetonitrila (78:22, V/V). |
| Coluna | LiChrospher® C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm , 5 µm), lote 54000633, (Merck). |
| Comprimento de onda | 292 nm |
| Vazão | 1 ml/minuto |
| Volume de injeção | 20 µL |
| Temperatura | 20 ± 2° C |

A identificação das amostras foi realizada mediante comparação dos tempos de retenção e perfis cromatográficos obtidos na análise destas soluções com aquela preparada com ceftiofur SQR.

1.3.3 Resultados

Os cromatogramas obtidos a partir da análise do ceftiofur SQR) Excenel® e Topcef® podem ser visualizados na Figura 9.

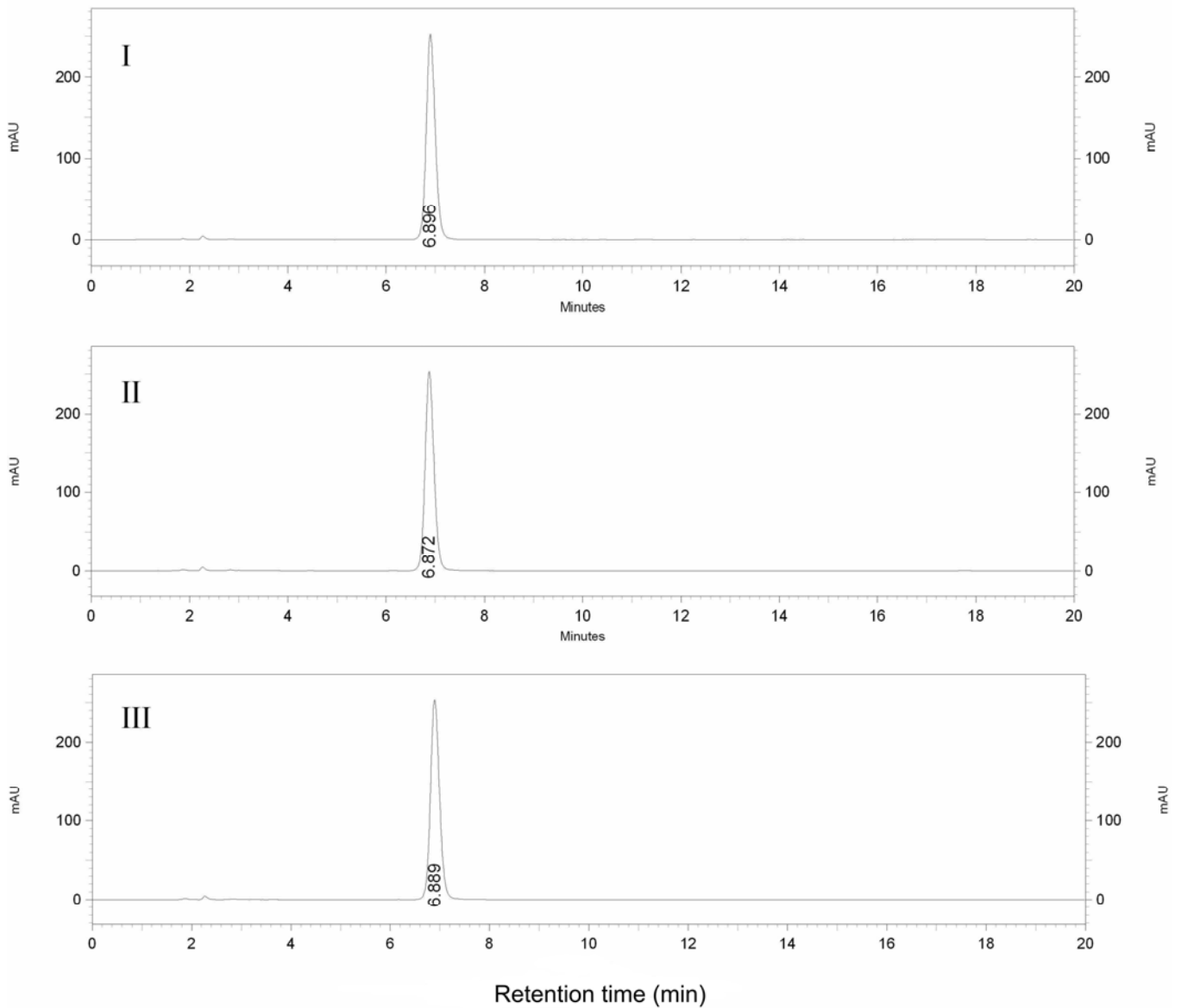


FIGURA 1.4 Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de SQR (I), Excenel[®] (II) e Topcef[®] (III), preparadas em fase móvel, à concentração de 60 µg/ml. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 1.1.

Através dos resultados pode-se constatar que o tempo de retenção de 6,8 minutos do ceftiofur e das amostras comerciais é o mesmo, indicando que as amostras possuem a mesma identidade. Da mesma forma, os perfis cromatográficos foram semelhantes para todas as amostras.

1.3.4 Discussão

A CLAE pode ser utilizada para a análise qualitativa, possibilitando a identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da substância de referência e da amostra.

O método por CLAE possibilitou a identificação do fármaco em estudo na forma farmacêutica empregada.

Diferentes sistemas eluentes e fases estacionárias foram testados para o desenvolvimento e, posterior, validação deste método.

Fases móveis compostas por metanol e água, acetonitrila e água e tampão fosfato foram testadas em diferentes proporções e pHs. A fase móvel mistura de tampão hidrogenofosfato dissódico diidratado 0,02 M (pH ajustado para 6,0 com ácido ortofosfórico 85%) e acetonitrila (78:22, V/V), descrita no capítulo 2 no artigo (Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium) demonstrou ser adequada, com um tempo de retenção de aproximadamente 6,8 minutos.

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e validação do método por clae para determinação do ceftiofur sódico.

2.1 INTRODUÇÃO

Um grande número de medicamentos de uso veterinário é utilizado para prevenir infecções em animais podendo contaminar a carne e o leite destinados ao consumo humano. Baseado nisso vários estudos para quantificar ceftiofur em leite, plasma e tecidos foram desenvolvidos, sendo a CLAE a técnica mais comumente utilizada ou essa acoplada a espectrofotometria de massas (BECONI-BARKER *et al.*, 1995; KEEVER *et al.*, 1998; SÖRENSEN; SNOR, 2000; MARKESWARAN *et al.*, 2005).

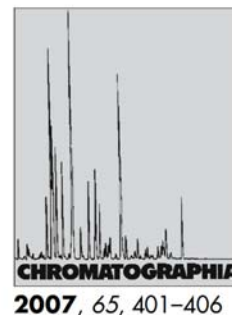
O objetivo desse estudo foi desenvolver um método simples por CLAE para análise de ceftiofur pó para solução injetável, uma vez que essa técnica não havia ainda sido relatada para a determinação dessa substância ativa na forma farmacêutica disponível.

O método desenvolvido e validado irá contribuir para o controle de qualidade desse fármaco e poderá ser utilizado nos estudos de estabilidade.

PUBLICAÇÃO 1: Development an validation of an hplc method for determination of ceftiofur sodium.

Publicado no periódico Chromatographia 2007,v. 65, p. 401-406 (Nº 7/8), 2007

Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium



M. J. e. Souza^{1,2,✉}, D. R. Nogueira², L. M. Silva², M. Z. Arend², P. S. Souza Filho³, A. M. Bergold¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre RS, Brazil; E-Mail: msouza@ccs.ufsm.br

² CTEFAR-Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, CEP 97105900, Santa Maria RS, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, UFSM, CEP 97105900, Santa Maria RS, Brazil

Received: 20 September 2006 / Revised: 15 November 2006 / Accepted: 21 November 2006
Online publication: 23 January 2007

Abstract

An isocratic high-performance liquid chromatographic method has been developed for assay of ceftiofur sodium in drug substance and in sterile powder for injection. Chromatography was performed on a 250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle, C₁₈ column with a 78:22 (v/v) mixture of 0.02 M disodium hydrogen phosphate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid) and acetonitrile as mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The separation was monitored by UV detection at 292 nm. Validation of the method for linearity and range, intra- and inter-day precision, accuracy, specificity, recovery, robustness, and limits of quantification and detection yielded good results. The calibration plot was linear from 20.0–120.0 μg mL⁻¹ and the correlation coefficient was 0.9999. It was shown that ceftiofur was degraded under acidic, alkaline, oxidative, and photolytic conditions. The method was found to be stability-indicating and could be used for routine analysis of ceftiofur sodium for injection.

Keywords

Column liquid chromatography
Quality control and validation
Cephalosporin antibiotics
Ceftiofur sodium

Introduction

Ceftiofur sodium, a third-generation cephalosporin antibiotic, is administered as an intramuscular injection for treatment of some respiratory diseases in beef cattle, dairy cattle, swine, and day-old chickens, and to treat interdigital der-

matitis in cattle [1]. It has also been assessed for treatment of mastitis and other septic conditions in cattle [2, 3]. Classification of cephalosporins is based on their antibacterial spectrum, on their metabolic stability, on their stability against hydrolysis by the β-lactamases of different organisms, or on their chemistry [4].

Because of the aminothiazole group of third-generation cephalosporins and the presence of a methoxyimino side-chain, ceftiofur is typically active against Gram-negative bacteria, has good activity against Gram-positive bacteria, and is resistant to many β-lactamases [5, 6].

Ceftiofur, (6*R*-(6*z*,7*β* (Z)))-7-((2-furanylcarbonyl)thio)methyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo(4.2.0)oct-2-ene-2-carboxylic acid [7] (Fig. 1), is not yet official in any pharmacopeia.

Several analytical HPLC methods, with different detection modes, have been published for the determination of residues of ceftiofur in bovine milk and biological fluids [8–18]. LC methods are very useful for determination of drugs. The purpose of this study was the development of a simple isocratic LC method with UV detection for analysis of ceftiofur sodium in drug substance and in sterile powder for injection, and to evaluate the stability of the drug in stress tests by use of diode-array detection. The method uses a simple mobile phase, UV-visible detection, is performed at room temperature, and does not require complicated sample preparation. The availability of this new simple yet highly sensitive and selective method will be very useful for determination of ceftiofur. The method, which was validated in accordance with the specifications of the International

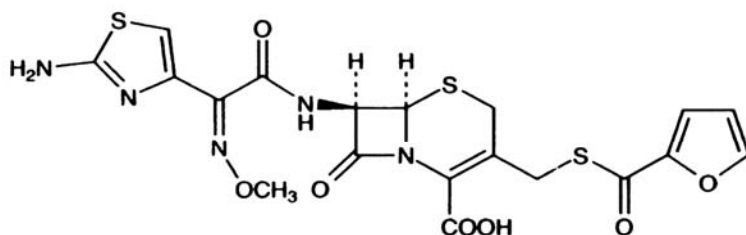


Fig. 1. The chemical structure of ceftiofur

Conference on Harmonization (ICH) [19] and the USP Pharmacopeia [20], can also be used for stability studies.

Experimental

Samples

Ceftiofur sodium reference substance was kindly supplied by Eurofarma Laboratories, São Paulo, Brazil and was certified to contain 101.2%. It was tested for purity by measuring its melting point and recording its UV and NMR spectra. No impurities were found. Pharmaceutical products A and B containing ceftiofur sodium were obtained commercially; according to the label claims the products contained 1 g ceftiofur sodium powder for injection.

Reagents and Solvents

All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. Acetonitrile was HPLC grade (Tedia, USA). Analytical reagent grade disodium hydrogen phosphate dihydrate and orthophosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade water was from a Milli-Q RO system.

Instrumentation and Analytical Conditions

HPLC was performed with a Shimadzu (Kyoto, Japan) SCL-10AVP system comprising a model LC-10 ADVP pump, an SPD 10AVP variable-wavelength UV-visible detector, an SPD-M-10A VP diode-array detector (DAD), an SCL-10A system controller, and an SIL-10 A VP auto injector. The detector was set at 292 nm and peak areas were integrated

automatically by computer by use of Class VP software.

Compounds were separated on a pre-packed 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, LiChrospher C₁₈ column from Merck. The mobile phase was a 78:22 (v/v) mixture of 0.02 M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH 6.0, adjusted by addition of 85% orthophosphoric acid) and acetonitrile; the flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 μL and sensitivity was 1.0 AUFS. HPLC was performed at room temperature (23 ± 1 °C). Before use the mobile phase was filtered through a 0.45 μm membrane filter and degassed with helium for 15 min. Quantitative analysis was performed with external standardization and measurement of peak area.

Procedure

Ceftiofur Reference Standard

An amount of ceftiofur reference standard equivalent to 25 mg ceftiofur was accurately weighed and transferred to a 25.0-mL volumetric flask. Mobile phase was added, to volume, to give a final concentration of 1,000 μg mL⁻¹. Portions (3.0 mL) of this solution were transferred to 50-mL volumetric flasks and diluted to volume with mobile phase, giving a final concentration of 60 μg mL⁻¹.

Assay of Ceftiofur Sodium

Ceftiofur sodium powder (50 mg) was accurately weighed and transferred to a 50-mL volumetric flask and mobile phase was added, to volume, to give a solution of concentration 1,000 μg mL⁻¹. Portions (3.0 mL) of this solution were transferred to 50-mL volumetric flasks and diluted to volume with mobile phase, giving a final concentration of 60 μg mL⁻¹. All determinations were performed in triplicate.

Calculations

Standard and sample solutions were injected and chromatograms were recorded under the chromatographic conditions described above (Fig. 2). Concentrations of the drug were calculated using the equation:

$$\text{Concentration of the drug} = \frac{\text{Response factor of the sample}}{\text{Response factor of the standard}} \times \text{Concentration of the standard.}$$

The quantitative relationships between these properties having been established, and knowing the predictive performance of these relationships, simple linear regression by the least-squares method was applied.

Method Validation

The method was validated by evaluation of intra- and inter-day precision, linearity and range, specificity, accuracy, ruggedness, limits of detection and quantification.

Linearity and Range

Linearity was evaluated by preparing six standard solutions of ceftiofur in the range 20.0–120.0 μg mL⁻¹. Triplicate 20-μL injections of the standard solutions were prepared to check the reproducibility of detector response at each concentration. The linearity of the calibration plot was then determined in intra-day and inter-day experiments on three different days. Peak area for ceftiofur sodium was plotted against concentration to obtain the calibration plot. The six concentrations of the standard solution were subjected to regression analysis to calculate the calibration equation and correlation coefficient.

Precision

The precision of the analytical procedure was evaluated by determination of the repeatability of the method by assaying nine samples of product A and nine samples of product B, at the same concentration, on the same day, under the same experimental conditions. The response factors of the drug peaks and the mean and percentage relative standard deviations (RSD) of the response factor

of the peaks were calculated. The intermediate precision of the method was also evaluated by performing analyses on three different days, with three different analysts, using a second LC instrument, in the same laboratory.

Accuracy

To confirm the accuracy of the method, recovery was determined at three concentrations, in accordance with the recommendations of the ICH guidelines [19], by adding known amounts of the reference substance at the beginning of the process.

Ruggedness/Robustness

The ruggedness of the method was determined by changing experimental conditions such as the source of reagents and solvents (different manufacturers), the stationary phase (Shim-pack C₁₈, Phenomenex C₁₈), and mobile phase flow rate (to 0.8 mL min⁻¹).

The analytes, mobile phase, and standard and sample solutions were subjected to long-term (7 days) stability studies. The stability of the solutions was studied by performing the experiment and observing any change in chromatographic pattern compared with freshly prepared solutions.

Specificity

Forced degradation studies were performed to evaluate the specificity of the method. Degraded samples were prepared by treating 1.0 mg mL⁻¹ reference standard solution with acid (0.1 M hydrochloric acid) and base (0.1 M sodium hydroxide) in a oven at 50 °C for 8 h. The solutions were then left to cool at room temperature and neutralized. Oxidative conditions were obtained by mixing the reference standard solution (1.0 mg mL⁻¹) with 3% (v/v) hydrogen peroxide at room temperature for 6 h. After treatment all the samples were diluted to 60 µg mL⁻¹ with mobile phase.

A Philips (Holland) T UV/G30 T8 UV lamp was used as a source of UV radiation; the intensity of the radiation was 1,200 µW cm⁻² and the wavelength was 254 nm. A solution of ceftiofur sodium salt (1 mg mL⁻¹) was exposed to the light continuously for 6 h. The UV lamp was positioned 15 cm from the solution. After exposure, a portion (3.0 mL) of the solution was transferred to a 50-mL volumetric flask

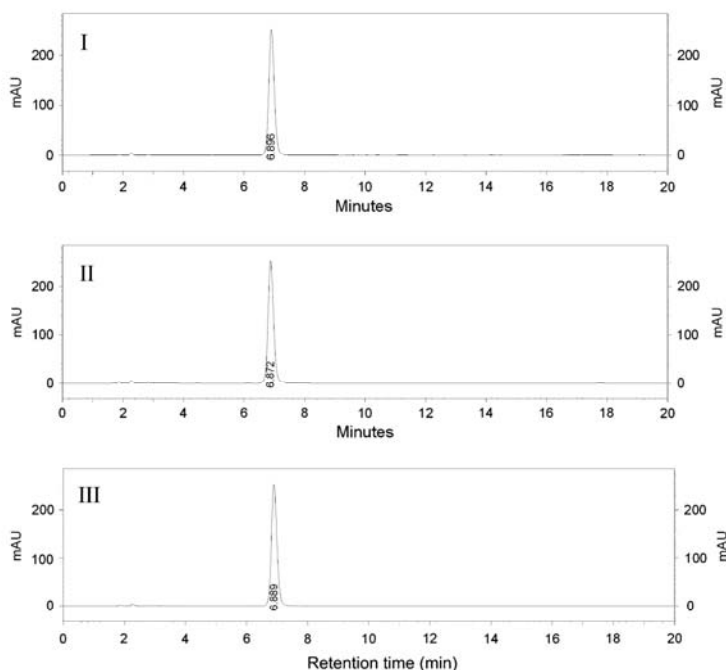


Fig. 2. Chromatograms obtained from 60 µg mL⁻¹ ceftiofur sodium: **I** reference substance, **II** product A, **III** product B. Chromatographic conditions: 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, LiChrospher C₁₈ column with 78:22 (v/v) 0.02 M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid)–acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹; detection wavelength 292 nm

and the solution was diluted to volume with mobile phase, to give a final concentration of 60 µg mL⁻¹.

System Suitability Test

Relative standard deviations of the retention time, tailing factor, number of theoretical plates, peak area, and capacity factor were measured to test system suitability.

Limit of Detection and Quantification

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept from the linear regression lines for three calibration plots, as defined by the ICH [19]. The calibration plots were constructed in the range 20.0–120.0 µg mL⁻¹.

Results and Discussion

Choice of an analytical method depends on factors such as the nature of the drug, the complexity of the sample, and the

intended use. In this study, the chromatographic conditions were affected by the physicochemical properties of ceftiofur sodium, for example solubility, polarity, and UV absorption. The objective of the study was to develop an HPLC assay for analysis of ceftiofur as the drug substance and as the powder for injection. Mobile phase selection was based on peak properties (symmetry, number of theoretical plates, capacity factor), run time, ease of preparation, and cost. This method uses a simple mobile phase, which can be regarded as more useful in routine analysis. Retention time repeatability during the precision studies was found to be excellent for all the solutions. The retention time of ceftiofur sodium 6.8 min, was satisfactory. Ceftiofur gave a sharp and symmetrical peak when chromatographed under the conditions described above (Fig. 2).

Method Validation

Linearity

The calibration plot for ceftiofur was constructed by plotting peak area against

Table 1. Data obtained from analysis of commercial samples by HPLC

| Product | Component | Theoretical amount (mg mL ⁻¹) | Experimental amount (mg mL ⁻¹) ^a | Purity (%) | RSD (%) |
|---------|------------------|---|---|------------|---------|
| A | Ceftiofur sodium | 50 | 49.91 | 99.82 | 0.19 |
| | | 50 | 50.43 | 100.86 | 0.46 |
| | | 50 | 49.69 | 99.39 | 0.50 |
| B | Ceftiofur sodium | 50 | 50.17 | 100.34 | 0.32 |
| | | 50 | 50.43 | 100.86 | 0.06 |
| | | 50 | 50.19 | 100.39 | 0.23 |

^aMean from three determinations**Table 2.** Results from recovery test with ceftiofur product 'A'

| | Amount of standard (µg mL ⁻¹) | | Recovery (%) ^a | RSD (%) |
|----|---|-----------|---------------------------|---------|
| | Added | Recovered | | |
| R1 | 5 | 4.95 | 99.13 | 0.58 |
| R2 | 10 | 9.96 | 99.66 | 1.01 |
| R3 | 15 | 14.93 | 99.56 | 1.13 |

^aMean from three replicate analyses

concentration. It was found to be linear in the range 20.0–120.0 µg mL⁻¹ with a correlation coefficient of 0.9999; a representative linear regression equation was $y = 70978x + 31478$ ($r^2 = 0.9999$).

The RSD of the intercept and slope of the plots were 1.43 and 1.37%, respectively. These data were validated by analysis of variance (ANOVA), which indicated significant linear regression and no significant deviation from linearity ($P < 0.05$).

Precision

The repeatability (intraday precision) of the method was calculated as the RSD of assays of ceftiofur in the same concentration range. The RSD was 0.38% for product A and 0.20% for product B. The experimental results obtained from determination of ceftiofur sodium in samples are listed in Table 1. The average purity (%) for intermediate precision determined by assay of the samples on three different days by three different analysts was 99.11% (RSD = 0.46%) and 99.55% (RSD = 0.19%) for products A and B, respectively.

Accuracy

The accuracy of the LC method was determined by fortifying commercial products A and B with known amounts of ceftiofur reference substance. Mean

Table 3. Results from recovery test with ceftiofur product 'B'

| | Amount of standard (µg mL ⁻¹) | | Recovery (%) ^a | RSD (%) |
|----|---|-----------|---------------------------|---------|
| | Added | Recovered | | |
| R1 | 5 | 4.96 | 99.35 | 1.08 |
| R2 | 10 | 9.84 | 98.40 | 0.90 |
| R3 | 15 | 14.78 | 98.54 | 1.23 |

^aMean from three replicate analyses

recoveries from A and B were 99.45 and 98.76%, respectively, as shown in Tables 2 and 3.

Ruggedness/Robustness

The ruggedness/robustness of the method was studied and it was observed there were no significant changes in chromatographic behavior when the experimental conditions were changed slightly, demonstrating the method is rugged.

When the stability of the solutions was studied the results obtained showed that sample and standard solutions were stable for 7 days when stored at approximately 5 °C under refrigeration.

Specificity

Forced-degradation studies were performed to evaluate the specificity and the amount of ceftiofur sodium recovered in each experiment. The purpose of the specificity test was to determine whether new degradation products were produced during forced degradation of ceftiofur sodium drug substance and whether any degradation products were resolved from the chromatographic peak obtained for ceftiofur sodium (Fig. 3). Degradation of 98.10% was observed when ceftiofur sodium reference substance was heated in an oven at 50 °C for 8 h with 0.1 M sodium hydroxide. The degradation products were observed at retention times

of 1.8 and 2.2 min. Degradation of 5.3% was observed when ceftiofur sodium reference substance was treated with 0.1 M hydrochloric acid for 8 h in an oven at 50 °C. The drug is also degraded by 64.5% in 6 h when treated with 3% hydrogen peroxide at room temperature. The retention times of the degradation products were 1.8, 2.2, 3.0, and 3.8 min. Degradation of 33.8% was observed when ceftiofur sodium reference substance was exposed to UV radiation. The retention times of the degradation products were 2.2, 3.8, 4.5 and 18.1 min. For all four stress conditions tested a degradation product was always detected at 2.25 ± 0.005 min. It is evident the method can separate the peaks of the degradation products from those of ceftiofur sodium. This is one of rare studies in which forced decomposition studies were performed under different conditions and the products were all resolved in a single isocratic run. Peak purity was evaluated by using the diode-array UV detector to reveal the presence of any degradation product coeluting with ceftiofur sodium; there is no coelution if the peak purity is close to 100% (peak purity index 1.00) (Fig. 4). The single point threshold values obtained for ceftiofur sodium from reference substance, after treatment with base and acid, after oxidation, and after exposure to UV radiation at 254 nm were 0.999998, 0.999945, 0.999999, 0.999991, and 0.999998, respectively. Spectra acquired on the upslope, at the apex, and on the downslope indicated that no impurities interfered with the ceftiofur sodium peak.

Classic hydrolysis of the $\Delta 3$ -cephem ring occurs in cephalosporins in aqueous solution, but this is obviously not sufficient to explain all these observations. Our data corroborate the well-known yellowish coloration of cephalosporin during ageing described in the literature [21]. This paper reports competitive photolysis of cefotaxime by at least two processes (one on the $\Delta 3$ -cephem ring and another on the methoxyimino group) leading to intense yellowing of the solution corresponding to destruction of $\Delta 3$ -cephem ring, as was verified by Rabouan-Guyon et al. [22].

System-Suitability Test

The system-suitability test is an important part of an analytical method, and it ascertains the suitability and effectiveness

of the system used. The criteria used for system-suitability tests at each stage of method development will vary with the requirements of the method and its intended application. System-suitability studies were conducted as specified in USP [20]. The characteristics measured were retention time, tailing factor, column efficiency, peak area, and capacity factor. The values obtained are listed in Table 4.

No interference from the sample solvent or from impurities was observed at the detection wavelength.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated to be 0.47 and 1.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Conclusion

This method is sensitive, precise, and accurate, and is suitable for identification and quantification of the ceftiofur sodium as drug substance and in powder for injection. The method uses simple reagents and minimum sample-preparation procedures, encouraging its application in routine analysis. Because results from forced degradation revealed no interference with the ceftiofur sodium peak, the method is both specific and stability-indicating.

Acknowledgements

The authors wish to thank Eurofarma Laboratories Ltda, São Paulo, Brazil, for providing the reference substance. This study was performed with the collaboration of Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS and Universidade Federal de Santa Maria-UFSM.

References

1. Salmon SA, Watts JL, Case CA, Hoffman LJ, Wegener HC, Yancey RJ (1995) *J Clin Microbiol* 33:2435–2444
2. Erskine RJ, Wilson RC, Tyler JW, McClure KA, Nelson RS, Spears HJ (1995) *Am J Vet Res* 56:481–485
3. Stanek C, Kofler J (1998) *Tierarztl Prax. Ausgabe G Grosstiere/Nutztiere* 26:314–317
4. Dalhoff A (1998) *Antibiotics and chemotherapy*. Karger, New York, pp 148
5. Neu HC (1992) *Ann Intern Med* 97:408–419

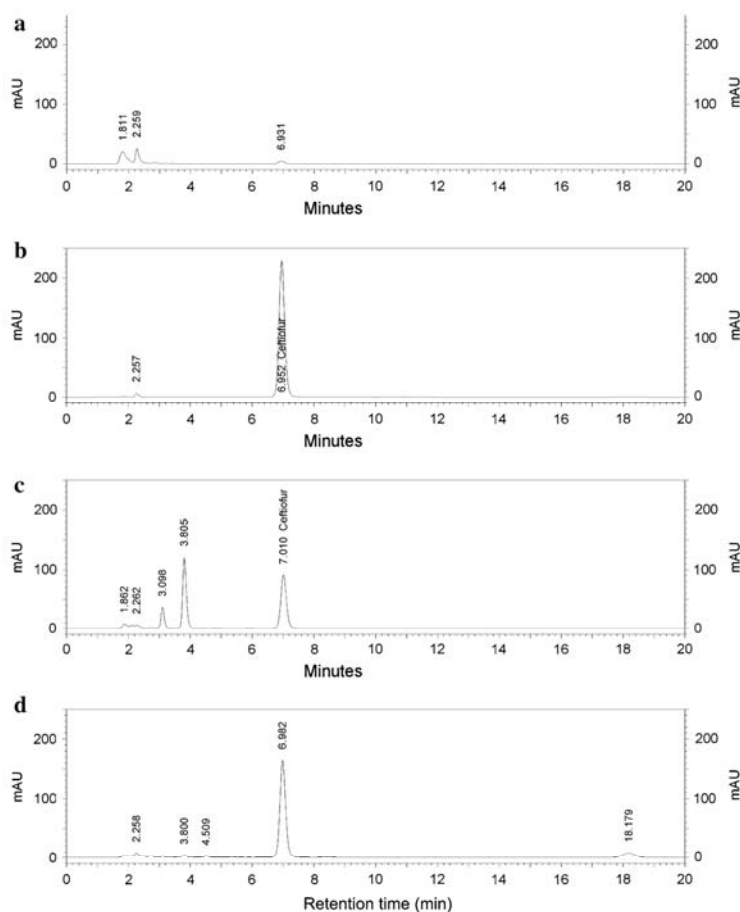


Fig. 3. Chromatograms obtained from 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ceftiofur sodium after forced degradation under different conditions: **a** basic conditions at 50 °C for 8 h, **b** acidic conditions at 50 °C for 8 h, **c** oxidation with 3% hydrogen peroxide for 6 h at room temperature, **d** exposure to UV radiation at 254 nm for 6 h. Chromatographic conditions were described for Fig. 2

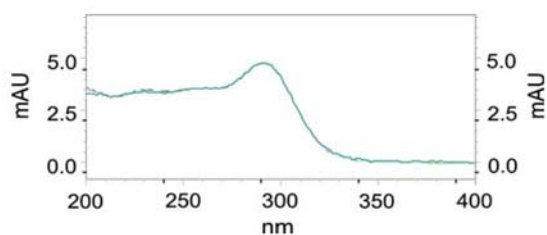


Fig. 4. Overlaid diode-array spectra obtained from ceftiofur reference substance and from the peak obtained after forced degradation under the conditions given in the caption to Fig. 3. Chromatographic conditions were as described for Fig. 2

Table 4. Results from system-suitability study on 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ceftiofur sodium

| | Retention time | Tailing factor | Theoretical plates | Peak area | Capacity factor |
|------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------|-----------------|
| Mean ($n = 6$) | 6.89 | 1.10 | 5167 | 4310945 | 2.4 |
| RSD (%) | 0.06 | 0.15 | 0.04 | 0.31 | 0.08 |

6. Yancey RJ, Kinney ML, Robert BJ, Goodenough KR, Hamel JC, Ford CW (1987) *Am J Vet Res* 48:1050–1053
7. Merck (2001) *The Merck index*, 13th edn. Whitehouse Station, New Jersey, pp 334
8. Tyczkowska KL, Voyksner RD, Straub RF, Anderson KL, Aronson AL (1993) *J Chromatogr* 614:123–134
9. Tyczkowska KL, Voyksner RD, Straub RF, Aronson AL (1994) *J Assoc Off Anal Chem* 77:1122–1131
10. Moats WA, Harik-Kham RJ (1995) *J Assoc Off Anal Chem* 78:49–54
11. Hamlow PJ (1995) *Animal health drug metabolism*, 7926. Upjohn Laboratories
12. Jacobson GA, Martinod S, Cunningham CP (2006) *J Pharm Biomed Anal* 40:1249–1252
13. Straub R, Linder M, Voyksner RD (1994) *Anal Chem* 66:3651–3658
14. Keever J, Voyksner RD, Tyczkowska KL (1998) *J Chromatogr A* 794:57–62
15. Navarre CB, Zhang L, Sunkara G, Duran SH, Kompella UB (1999) *J Vet Pharmacol Ther* 22:13–19
16. Sørensen LK, Snor LK (2000) *J Chromatogr A* 882:145–151
17. Bruno F, Curini R, Di Corcia A, Nazzari M, Samperi R (2001) *J Agric Food Chem* 49:3463–3470
18. Makeswaran S, Patterson I, Points J (2005) *Anal Chim Acta* 529:151–157
19. ICH (1996) *International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals, validation of analytical procedures; methodology, harmonised tripartite guideline*. ICH, Geneva
20. *United States pharmacopeial convention (2005) United States pharmacopeia, 28th edn*. USP, Rockville, pp 2748–2751
21. Lerner DA, Bonnefond G, Fabre H, Mandrou B, Simeon De Bouchberg M (1988) *J Pharm Sci* 77:699–703
22. Rabouan-Guyon SM, Guet AF, Courtois PY, Barthes DMC (1997) *Int J Pharm* 154:185–190

CAPÍTULO 3: Desenvolvimento do ensaio microbiológico para determinação da potência do ceftiofur sódico.

3.1 INTRODUÇÃO

Os ensaios microbiológicos são preconizados em códigos oficiais CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 1998, Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia 1988); Farmacopéia Britânica (B.P., 2005); USP 30 (2007) e Farmacopéia Européia (Eur. Ph., 2005).

O método de difusão em ágar é utilizado para a determinação de potência especialmente de antibióticos e foi preconizado por Heatley quando publicou, em 1944, esse método para estimar a potência da penicilina (HEWITT, 2003).

Estudos *in vitro* têm sido reportados para o ceftiofur indicando que a concentração inibitória mínima (CIM₉₀), para *Escherichia coli* e para *Staphylococcus aureus* foi respectivamente 0,5 µg/ml e 0,13 µg/ml (KLEIN *et al.*, 1985; YANCEY *et al.*, 1988; SALMON *et al.*, 1993; SALMON *et al.*, 1994). NAVARRE e colaboradores (1999) realizaram um ensaio microbiológico para quantificar ceftiofur e seus metabólitos ativos em plasma de gado utilizando como microrganismo *Pasteurella haemolytica*.

A literatura não descreve método microbiológico para avaliar a potência do ceftiofur matéria-prima e na forma farmacêutica, justificando-se assim o desenvolvimento desse método.

PUBLICAÇÃO 2: Development of a microbiological assay to determine the potency of ceftiofur sodium powder.

Publicado no Journal of AOAC International v. 90, N° 6, p.1-6, 2007.

Development of a Microbiological Assay to Determine the Potency of Ceftiofur Sodium Powder

MARINÊS J. E. SOUZA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brazil; Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Farmácia Industrial, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

CLARICE M.B. ROLIM

UFSM, Farmácia Industrial, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil; UFSM, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

JANINE MELO

UFSM, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

PAULO S. SOUZA FILHO

UFSM, Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

ANA M. BERGOLD

UFRGS, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brazil

Ceftiofur sodium is a third-generation broad-spectrum cephalosporin antibiotic, formulated as an intramuscular injection, that is approved for use in pigs, cattle, poultry, and dogs. The present work reports a method to quantify ceftiofur in powder for injection by comparing the cylinder plate assay and the liquid chromatographic (LC) method. The assay is based on the inhibitory effect of ceftiofur upon the strain of *Micrococcus luteus* ATCC 10240 used as the test microorganism. Ceftiofur sodium at concentrations ranging from 2.0 to 8.0 µg/mL can be measured in powder for injection. A prospective validation showed that the method is linear ($r^2 = 0.9998$), with precise relative standard deviation (RSD) of 0.8% for product A (Excenel[®]; Pharmacia and Upjohn Co., Kalamazoo, MI) and of 0.6% for product B (Topcef[®]; Eurofarma Lab. Ltda, São Paulo, Brazil), with intermediate precision; between-day RSD = 1.0 and 1.1%, between-analyst RSD = 0.8 and 0.8% for products A and B, respectively and accurately. The comparison between bioassay and LC by analysis of variance and Student's *t*-test showed no significant difference among methodologies. The results demonstrated the validity of the proposed bioassay that is simple and a useful alternative methodology for analysis of ceftiofur in routine quality control.

The full chemical name of ceftiofur (Figure 1) is (6R-(6 α , 7 β (Z)))-7-(((2-furanylcarbonyl)-thio methyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo (4.2.0) oct-2-ene-2-carboxylic acid) (1). Ceftiofur sodium, a third-generation cephalosporin, is one of the newer antibiotics approved for veterinary use. The formulations include a powder which is reconstituted in sterile water prior to intramuscular injection. Ceftiofur is used to treat respiratory diseases in swine, ruminants, and horses. A major advantage of ceftiofur over other antibiotics is that it is approved for use in lactating dairy cattle, and when administered systemically according to label dose, it does not have a withholding period for milk or meat. These advantages have made ceftiofur a very popular drug among farmers. Ceftiofur exhibits a good activity against a broad range of Gram-negative and -positive bacteria, including many that produce β -lactamases (2, 3).

In the literature, in vitro activity of ceftiofur was compared using ceftriaxone-resistant [producing extended spectrum β -lactamase (ESBL)] and susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (3). Navarre et al. (4) used *Pasteurella haemolytica* as the test organism for their microbiological assay for the quantitative determination of ceftiofur and its microbiological active metabolites in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. Several methods have been reported in the literature for the determination of residues of ceftiofur in bovine milk and serum using high-performance liquid chromatography (LC; 5–11).

Bioassay for other antibiotics such as azithromycin, meropenem (12, 13), and a fluorquinolone, enrofloxacin, used in veterinary practice (14) have been described. Because ceftiofur sodium is very used in antimicrobial therapy, it is important that alternative methods for its determination in pharmaceutical dosage form are developed. Antibiotics can be

Received June 3, 2007. Accepted by JB July 19, 2007.
Corresponding author's e-mail: msouza.ufsm@gmail.com

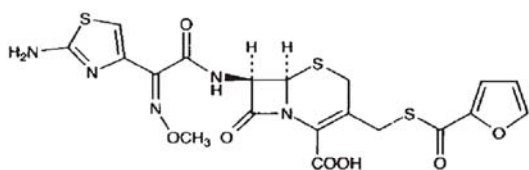


Figure 1. Chemical structure of ceftiofur sodium.

measured by microbiological assay, evaluating their inhibitory effects on the growth of test microorganisms (15). In the meantime, for the quality control of medicines a microbiological assay for the determination of ceftiofur in pharmaceutical formulations has not yet been reported. This assay can reveal subtle changes not demonstrable by chemical methods. Moreover, it allows possible evaluation of the potency of ceftiofur, which is very important for the analysis of antibiotics.

The aim of this study was to develop and validate a microbiological assay by the agar-diffusion cylinder-plate method. The parameters linearity, precision, and accuracy to quantify ceftiofur in injectable formulations are described. The LC method developed and validated in our laboratory (16) was chosen as a comparison.

METHOD

Materials

The ceftiofur reference substance (assigned purity 101.2%) was a generous gift from Eurofarma (São Paulo, Brazil). The purity of the reference substance was evaluated by LC/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), UV, and nuclear magnetic resonance spectra. No impurities were found. Pharmaceuticals products (A and B) containing ceftiofur sodium were obtained commercially and claimed to contain 1 g ceftiofur sodium powder/flask. Distilled sterile water was used to prepare all solutions in all experiments.

Preparation of Reference Substance Solutions

A quantity of ceftiofur reference substance equivalent to 25 mg ceftiofur was accurately weighed and transferred to a 25 mL volumetric flask. Distilled sterile water was added to make up the volume in order to obtain a final concentration of 1000 µg/mL. From this solution, 5.0 mL portions were transferred into a 50 mL volumetric flask and water was added to make up the volume (100 µg/mL). Aliquots of this solution were diluted with water to obtain concentrations of 2.0, 4.0, and 8.0 mg/mL, which were used in the assay.

Preparation of Sample Solutions

Ceftiofur sodium powder (50 mg) was accurately weighed and transferred to a 50 mL volumetric flask. The preparation then followed the same procedure described for the reference substance preparation.

Microorganism and Inoculum Standardization

The cultures of *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (INCQS, National Institute for Quality Control in Health, Rio de Janeiro, Brazil) were cultivated on Grove-Randall's medium 1 (Difco Laboratories, Detroit, MI) and maintained on slants in the refrigerator ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). They were transferred to another Grove-Randall's medium 1 (24 h before assay) which was kept in a incubator at 35°C for 1 day. Diluted culture suspensions of 25% turbidity (transmittance) were obtained at 580 nm, using a suitable spectrophotometer (Bausch & Lomb, Rochester, NY) and 13 mm diameter test tubes as absorption cells against 0.9% sodium chloride as blank. Portions of 1.0 mL of the inoculated 0.9% saline solution were added to 100 mL Grove-Randall's medium 1 at 48°C and used as the inoculation layer.

Cylinder-Plate Assay

The agar was composed of 2 separate layers. The Grove-Randall's medium 2 (20 mL) was poured into a 100×20 mm Petri dish for the base layer. After solidification of this layer, portions of 5 mL of inoculated Grove-Randall's medium 1 were poured to the base layer. Six stainless steel cylinders of uniform size ($8 \times 6 \times 10$ mm) were placed on the surface of the inoculated medium. Three alternated cylinders were filled with 100 µL of the reference solutions and the other 3 cylinders with 100 µL of the sample solutions, in the same concentrations as the reference solutions (2.0, 4.0, and 8.0 µg/mL). Six plates were used for each assay. The bioassay plates were incubated aerobically at 35°C for 18 h. The growth inhibition diameters (mm) were carefully measured

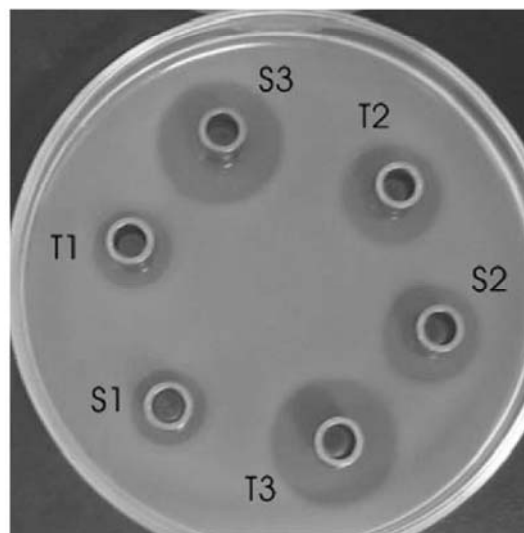


Figure 2. Agar diffusion assay (cylinder-plate method) using a strain of *Micrococcus luteus* ATCC 10240 as the test microorganism, ceftiofur reference substance at concentrations of 2 (S1), 4 (S2), and 8 (S3) µg/mL, and ceftiofur sample at concentrations of 2 (T1), 4 (T2), and 8 (T3) µg/mL.

Table 1. Diameters of growth inhibition zones for ceftiofur standard solutions obtained for standard curve

| Concn, $\mu\text{g/mL}$ | Range of zone size, mm ^a | Mean diameters of growth inhibition zones, ^b mm | RSD, % |
|-------------------------|-------------------------------------|--|--------|
| 2.0 | 13.12–13.54 | 13.37 | 1.0 |
| 4.0 | 17.00–17.34 | 17.08 | 0.6 |
| 8.0 | 20.59–21.20 | 20.78 | 1.3 |

^a Electronic caliper resolution is 0.01 mm.

^b Mean of 9 assays with 6 plates in each.

with an electronic caliper (Starrett[®] Series 797B, resolution 0.01 mm; São Paulo, Brazil).

Calculation of Activity and Method Validation

To calculate the activity of ceftiofur sodium, products A and B, the Hewitt equation was used (17). The assays were statistically calculated by the linear parallel model and by means of regression analysis, and verified using analysis of variance (ANOVA; 15, 17).

The method was validated by determination of the following operational characteristics: linearity, precision, and accuracy (15, 18).

Linearity was determined intra- and interday on 3 different days. The calibration curve was obtained with 3 doses of the reference substance. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least-squares regression method.

The precision of analytical procedure was evaluated through the repeatability (intra-assay) and intermediate

precision (interassay). Method repeatability was studied by assaying samples of ceftiofur sodium for injection at the same concentration, during the same day, and under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was evaluated through the performance of the analysis on 3 days (interday) and by having different analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts).

The accuracy was determined by adding known amounts of ceftiofur sodium reference substance to the samples at the beginning of the process. Amounts of 2 mL ceftiofur sodium stock solution (100 $\mu\text{g/mL}$) were placed in 100 mL volumetric flasks, and 0.8, 2.0, and 3.2 mL amounts of ceftiofur reference solution (100 $\mu\text{g/mL}$) were added, in this order. Water was added to make up the volume in order to obtain final concentrations of 2.8, 4.0, and 5.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Each level was made up in triplicate. The solutions were submitted to the cylinder-plate assay described above. The percentage of reference ceftiofur sodium added was calculated using the equation proposed in the AOAC *Official Methods of Analysis* (19).

Chromatographic Conditions

The LC method was performed on a Shimadzu[®] SCL-10AVP LC system, equipped with a Model LC-10 ADVP pump; an SPD 10AVP, variable-wavelength UV-Vis; an SPD-M-10A VP diode array detector; an SCL-10A system controller; and an SIL-10 A VP autoinjector (Shimadzu, Kyoto, Japan). The detector was set at 292 nm, and peak areas were integrated automatically by computer using a Class VP[®] software program. The method was carried out on a pre-packed Lichrospher[®] C₁₈ (250 \times 4.6 mm id, 5 μm particle size) column from Merck (Darmstadt, Germany). The

Table 2. Results of the determination of ceftiofur in powder for injection (products A and B) by microbiological assay

| Products | Declared amt, mg ^a | Experimental amt, mg | Purity, % ^b | Confidence limits, $P = 0.95$ | RSD, % |
|----------|-------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|--------|
| A | 1000 | 1001.20 | 100.12 | 95.18–105.32 | 0.8 |
| | | 1009.30 | 100.93 | 96.93–105.11 | |
| | | 997.90 | 99.79 | 94.97–104.85 | |
| | | 1016.50 | 101.65 | 98.22–105.21 | |
| | | 997.00 | 99.70 | 97.05–102.43 | |
| | | 1013.40 | 101.34 | 98.09–104.71 | |
| B | 1000 ^a | 1002.60 | 100.26 | 95.50–105.25 | 0.6 |
| | | 1001.50 | 100.15 | 96.82–103.59 | |
| | | 1008.20 | 100.82 | 97.13–104.65 | |
| | | 1007.90 | 100.79 | 97.55–104.14 | |
| | | 1015.40 | 101.54 | 97.44–105.82 | |
| | | 1011.40 | 101.14 | 96.21–106.34 | |

^a Declared amount = 1000 mg powder/flask.

^b Each value is the mean of 6 determinations.

Table 3. Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur (products A and B) by microbiological cylinder-plate assay

| Product | Run | Amt of standard, µg/mL | | Recovery, ^a % | RSD, % |
|---------|-----|------------------------|-----------|--------------------------|--------|
| | | Added | Recovered | | |
| A | R1 | 0.800 | 0.801 | 100.20 | 1.9 |
| | R2 | 2.000 | 2.031 | 101.55 | 1.8 |
| | R3 | 3.2 | 3.284 | 102.63 | 0.6 |
| B | R1 | 0.800 | 0.809 | 101.19 | 0.7 |
| | R2 | 2.000 | 1.996 | 99.82 | 1.6 |
| | R3 | 3.200 | 3.208 | 100.26 | 1.2 |

^a Mean of 3 assays with 6 plates in each, concentration determined.

sensitivity was 1.0 AUFS. The LC system was operated at room temperature (23 ± 1°C). The mobile phase was a mixture of 0.02 M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer, pH 6.0, adjusted by addition of orthophosphoric acid 85% and acetonitrile (78 + 22, v/v). The injection volumes were 20 µL and eluted at a flow rate of 1.0 mL/min (16).

Comparison of the Methods

In order to compare the developed bioassay with that of a second well-characterized procedure, 6 commercial samples of ceftiofur (products A and B) were analyzed using the proposed bioassay and the LC method (16). The data obtained by microbiological assay and LC were statistically comparable by ANOVA and Student's *t*-test.

Results and Discussion

The development and validation of analytical methods for the potency determination has received considerable attention in recent years, mainly from regulatory agencies, because of their importance in pharmaceutical analysis. In this case, a microbiological assay was proposed as a suitable method for the determination of ceftiofur in powder for injection.

The experimental conditions were tested and adjusted to accurately determine the performance of the assay. The strain of *Micrococcus luteus* ATCC 10240 was found to be an appropriate test microorganism because of its sensitivity to ceftiofur and its capacity to form sharply defined inhibition growth zones, allowing measurements with precision.

The potency of an antibiotic may be demonstrated under suitable conditions by comparing the growth inhibition of sensitive microorganisms induced by known concentrations of the antibiotic to be examined and a reference standard (15).

In this experimental work of 3 × 3 (Figure 2) design, 3 dose levels for each standard and sample, were respectively used following the procedures described in the Brazilian (20) and European (21) Pharmacopoeias. The calculation procedures normally assume a direct relationship between the observed zone diameter and the logarithm of the applied dose. The

results of growth inhibition zone diameter of ceftiofur sodium reference substance are shown in Table 1.

The calibration curve for ceftiofur was constructed by plotting zone diameter (mm) versus log of concentrations (µg/mL) and showed good linearity in the 2–8 µg/mL range. The representative linear equation for ceftiofur was

$$y = 9.685x + 11.906 \quad (n = 3, r^2 = 0.9998)$$

where *x* is log dose and *y* is zone diameter. The experimental values obtained for the determination of ceftiofur sodium in samples are presented in Table 2. According to the Brazilian and European Pharmacopoeias, if a parallel-line model is chosen, the 2 log dose-response lines of the preparation to be examined and the reference preparation must be parallel, and they must be linear over the range of doses used in the calculation. These conditions must be verified by validity tests for a given probability, usually *P* = 0.05. The assays were validated by means of the ANOVA, as described in those official codes. There were no deviations from parallelism and linearity with the obtained results (*P* < 0.05).

The precision of the method in terms of repeatability (intra-assay) was evaluated by analyzing, on the same day, 6 samples of ceftiofur powder for injection, products A and B, with the same theoretical concentrations. The ceftiofur activity ranged from 99.70 to 101.65%, with an RSD value of 0.8% for product A, and from 100.15 to 101.54% for product B, with an RSD value of 0.6% (Table 2). The intermediate precision was determined by analyzing the sample on 3 different days (interday), with obtained RSD values of 1.0 and 1.1% (between-analysts), with obtained RSD values of 0.7 and 0.8%, for products A and B, respectively.

The accuracy expresses the agreement between the accepted and the found values (18). The accuracy was evaluated by the recovery of ceftiofur (100 µg/mL) at 3 different levels (70, 100, and 130%) of the middle concentration of the curve (4 µg/mL) using 3 preparations for each level tested 3 times. The mean concentration determined was found to be 101.46 and 100.42% (Table 3) for products A and B, respectively.

Table 4. Assay results of ceftiofur (products A and B) by 2 different methods

| Product | Sample No. | Liquid chromatography, ^a % | Mean, % | RSD, % | Microbiological, ^b % | Mean, % | RSD, % |
|---------|------------|---------------------------------------|---------|--------|---------------------------------|---------|--------|
| A | 1 | 99.82 | 100.41 | 0.6 | 100.12 | 100.58 | 0.8 |
| | 2 | 100.86 | | | 100.93 | | |
| | 3 | 100.22 | | | 99.79 | | |
| | 4 | 101.40 | | | 101.65 | | |
| | 5 | 99.95 | | | 99.70 | | |
| | 6 | 100.22 | | | 101.34 | | |
| B | 1 | 100.93 | 100.61 | 0.2 | 100.26 | 100.81 | 0.6 |
| | 2 | 100.86 | | | 100.15 | | |
| | 3 | 100.59 | | | 100.82 | | |
| | 4 | 100.46 | | | 100.79 | | |
| | 5 | 100.72 | | | 101.54 | | |
| | 6 | 100.12 | | | 101.14 | | |

^a Each value is the mean of 3 injections.

^b Each value is the mean of 6 analyses.

With the purpose of comparing methodologies, the mean data from 6 different samples of products A and B of ceftiofur, obtained by microbiological assay and by LC, were statistically analyzed by ANOVA and Student's *t*-test, which indicated that there is no significant difference between the 2 methods at $P < 0.05$. The RSD of the microbiological method for product A was 0.8%, and for LC, 0.6%; the RSD of the microbiological method for product B was 0.6%, and for LC, 0.2% (Table 4).

The results obtained in this study were very satisfactory, and the performed validation proved that microbiological assay is a good alternative methodology for pharmaceutical analysis of ceftiofur in powder for injection. It is a useful analytical tool as a supplement or substitution for the physicochemical method.

Conclusions

The results obtained in this study show that the proposed microbiological method for the determination of ceftiofur in pharmaceutical dosage forms is accurate and possesses excellent linearity and precision characteristics. There is agreement between the results obtained with microbiological assay and the LC method. The low cost of the bioassay is appropriate when the LC system is not available for the antibiotic potency determination. Moreover, bioassay does not require specialized equipment or toxic solvents. Therefore, the method should be useful for routine analytical and quality control of this drug in the studied formulation.

Acknowledgments

We are grateful to Eurofarma for providing the reference substance. This study was performed with the collaboration of

Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Universidade Federal de Santa Maria.

References

- (1) *The Merck Index* (2001) 13th Ed., Merck and Co., Whitehouse Station, NJ
- (2) Deshpande, L., Pfaller, M.A., & Jones, R.N. (2000) *Int. J. Antimicrob. Agents* **15**, 271–275
- (3) Erskine, R.J., Wilson, R.C., Tyler, J.W., McClure, K.A., Nelson, R.S., & Spears, H.J. (1995) *Am. J. Vet. Res.* **56**, 481–485
- (4) Navarre, C.B., Zhang, L., Sunkara, G., Duran, S.H., & Kompella, U.B. (1999) *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **22**, 13–19
- (5) Tyczkowska, K.L., Voyksner, R.D., Straub, R.F., Anderson, K.L., & Aronson, A.L. (1993) *J. Chromatogr.* **614**, 123–134
- (6) Tyczkowska, K.L., Voyksner, R.D., Straub, R.F., & Aronson, A.L. (1994) *J. AOAC Int.* **77**, 1122–1131
- (7) Moats, W.A., & Harik-Kham, R.J. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 49–54
- (8) Hamlow, P.J. (1995) *Animal Health Drug Metabolism*, 7926, Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI
- (9) Jacobson, G.A., Martinod, S., & Cunningham, C.P. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 1249–1252
- (10) Straub, R., Linder, M., & Voyksner, R.D. (1994) *Anal. Chem.* **66**, 3651–3658
- (11) Keever, J., Voyksner, R.D., & Tyczkowska, K.L. (1998) *J. Chromatogr. A* **794**, 57–62
- (12) Breier, A.R., Garcia, C.V., Oppe, T.P., Steppe, M., & Schapoval, E.E.S. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 957–961
- (13) Mendez, A.S.L., Weisheimer, V., Oppe, T.P., Steppe, M., & Schapoval, E.E.S. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**, 649–653
- (14) Souza, M.J., Bittencourt, C.F., & Souza Filho, P.S. (2004) *Int. J. Pharm.* **271**, 287–291

- (15) The U.S. Pharmacopeia (2006) 29th Ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD
- (16) Souza, M.J., Nogueira, D.R., Silva, L.M., Arend, M.Z., Souza Filho, P.S., & Bergold, A.M. (2007) *Chromatographia* **65**, 401–406
- (17) Hewitt, W. (2003) *Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach*, Interpharm/CRC Press, Boca Raton, FL
- (18) *Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures* (1996) International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland
- (19) *Official Methods of Analysis* (1997) 16th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD
- (20) *Farmacopéia Brasileira* (1988) 4th Ed., Parte I, Atheneu, São Paulo, Brazil
- (21) *European Pharmacopoeia* (2005) 5th Ed., Council of Europe, Strasbourg, France

CAPITULO 4: Desenvolvimento do Método Espectrofotometria na Região do Ultravioleta para a Determinação do Cefotiofur Sódico.

4.1 INTRODUÇÃO

A absorção de luz por uma substância na região do ultravioleta/visível, depende da estrutura eletrônica da molécula. Através da incidência de energia sobre a amostra, obtém-se um espectro que origina um gráfico da absorvância ou transmitância versus comprimento de onda (ou frequência). A intensidade dos picos pode ser alterada dependendo da concentração da substância. Esta análise pode ser utilizada para identificação e doseamento de substâncias.

Em muitas monografias da Farmacopéia Brasileira a espectrofotometria na região do ultravioleta é a técnica de análise quantitativa recomendada. Algumas substâncias são submetidas ao método após simples diluição, enquanto que outras necessitam ser previamente purificadas por cromatografia.

O desenvolvimento de uma técnica simples e rápida para a quantificação do ceftiofur conduziu a validação do método por espectrofotometria na região do ultravioleta para ser utilizado em laboratório de controle de qualidade.

publicação 3: Development of a ultraviolet spectrophotometric method for the determination of ceftiofur sodium powder.

Aceito para publicação no Journal of AOAC International

Development of a Ultraviolet Spectrophotometric Method for the Determination of Ceftiofur Sodium Powder

Marinês. J. e Souza ^{1,2,*}, Natália. A. P. Canedo³, Paulo. S. Souza Filho ⁴, Ana. M. Bergold ¹

¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos, UFSM, Brazil*

³ *Faculdade de Farmácia, UFRGS Porto Alegre, RS, Brazil*

⁴ *Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, UFSM, Brazil.*

Abstract

An ultraviolet (UV) spectrophotometric method was developed for analysis of ceftiofur sodium in drug substance and sterile powder for injection. The method validation yielded good results and included the range, linearity, intra and inter-day precision, accuracy, recovery, specificity, robustness, limit of quantification and limit of detection.

The UV spectrophotometric determinations were performed at 292 nm. Good linearity was obtained between 2.5 and 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A prospective validation showed that the method is linear ($r = 0.9999$), with precise relative standard deviation (R.S.D.) of 0.3% for product "A" and of 0.4% for product "B". The intra – and inter-day precision values were $< 2\%$ for all samples analyzed.

The comparison between ultraviolet spectrophotometric and liquid chromatography (LC) by ANOVA and Student's t - test showed no significant difference among methodologies. Moreover, the accuracy and precision obtained with UV method correlated well with the LC method which implied that UV spectrophotometric can be a cheap, reliable and less time consuming alternative for chromatographic analysis. The results demonstrated the validity of the proposed that

is simple and a useful alternative methodology for the ceftiofur analysis in routine quality control.

Keywords: Cephalosporin; Spectrophotometric; Quality control; Ceftiofur sodium

* Corresponding author: Tel: +55 55 3220-8806; fax: +55 55 3220-4280
E-mail address: msouza.ufsm@gmail.com (M. J. Souza).

Introduction

Chemically ceftiofur (Figure 1) is a (6R-(6 α , 7 β (Z)))-7-(((2-furanylcarbonyl)-thio) methyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo (4.2.0) oct-2-ene-2-carboxylic acid sodium salt (1).

Ceftiofur sodium is a cephalosporin antibiotic with broad-spectrum activity against both Gram-positive and -negative bacteria including β -lactamases-producing bacterial strains. It inhibits bacterial cell wall synthesis in a similar fashion to other cephalosporins. Ceftiofur is used in the treatment of respiratory infections in cattle, dairy cattle, swine, and day-old chickens, and to treat interdigital dermatitis in cattle (2, 3). It also been assessed for treatment of mastitis and other septic conditions in cattle (3). In horses, ceftiofur has been found effective for the treatment and control of respiratory infections caused by *Streptococcus zoöepidemicus* (4). In this animal species, ceftiofur has also been used for the antibacterial treatment of septic arthritis by local intraarticular injection (5).

Several analytical LC methods, with different detection modes, have been published for the determination of residues of ceftiofur in bovine milk and biological fluids using high-performance liquid chromatography (LC) (6-12). In the literature, capillary electrophoresis (CE) for determination of cefoperazone and ceftiofur in

plasma has been described (13). Since ceftiofur sodium is very widely used in the antimicrobial therapy, it is important that alternative methods for its determination in pharmaceutical dosage form are developed.

Previously, we developed an LC method (14) and a microbiological assay (15) for the determination of ceftiofur sodium in drug substance and sterile powder for injection.

The aim of this study was to develop and validate other method to the analysis of ceftiofur in pharmaceutical form, which should represent a sensitive, reproducible and accurate alternative to the LC method. For single component preparations, the simplest assay method involves the direct measurement of the UV absorption at the maximum. The method was validated according to the specifications of the *International Conference on Harmonization (ICH)* (16) and the *United States Pharmacopoeia (USP)* (17).

The LC method developed and validated in our laboratory (14) was chosen as a comparison.

METHOD

Materials

The ceftiofur sodium reference substance (assigned purity 101.2%) was obtained from Orchid Chemicals & Pharmaceuticals Ltd. (Chennai, India). It was tested for purity by controlling its melting point, UV (Shimadzu UV 1601 PC spectrophotometer - Japan) and nuclear magnetic resonance spectra (Bruker AM-500 - Karlsruhe, Germany). No impurities were found. Pharmaceuticals products Excenel[®], Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo – Michigan – U.S.A. (product

“A”) and Topcef[®], Eurofarma Lab. Ltda – Brazil (product “B”) containing ceftiofur sodium were obtained commercially and claimed to contain 1 g of ceftiofur sodium powder/flask. Distilled water was used to prepare all solutions in all experiments.

Apparatus

A Shimadzu UV 1601 PC spectrophotometer (Japan) with quartz cells of 1.0-cm was used to obtain the spectra and the absorbance measurements. The concentration of the solutions was determined at 292 nm, against water as blank.

Preparation of Reference Substance Solutions

A quantity of ceftiofur reference substance equivalent to 25 mg of ceftiofur was accurately weighed and transferred to a 25 mL volumetric flask. Distilled water was added to make up the volume in order to give a final concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. From this solution, 5.0 mL portions were transferred into 50 mL volumetric flask and water was added to make up the volume (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Portions (5.0 mL) of this solution were transferred to 50 mL volumetric flasks and diluted to volume with water, giving a final concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Preparation of Sample Solutions

Ceftiofur sodium powder (50 mg) was accurately weighed and transferred to a 50 mL volumetric flask. After that, the preparation followed the same procedure described for the reference substance preparation.

Method validation

The method were validated by determination of the following operational characteristics: linearity, precision, accuracy, specificity, robustness, limits of detection and quantification.

Linearity

Linearity was evaluated by preparing six standard solutions of ceftiofur in the range 2.5 and 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The linearity of the calibration plot was then determined in intra-day and inter-day experiments on three different days. The results obtained were used to calculate the equation of the line by using linear regression by the least-squares regression methods, and the data were evaluated by analysis of variance (ANOVA).

Precision

The precision of analytical procedure was evaluated by determination of the repeatability of the method by assaying six samples of product A and six samples of product B, at the same concentration, on the same day, under same experimental conditions. Inter-day precision values were obtained by assaying freshly prepared solutions on three different days.

Accuracy

Accuracy was evaluated as percent recovery obtained from analysis of samples spiked with known amounts of ceftiofur reference substance at 3 different levels. Aliquots of 3.0 mL sample solutions containing ceftiofur at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, prepared as described in *Preparation of Sample Solutions* were transferred to three 50 mL volumetric flasks containing, 1.0, 2.0 and 3.0 mL ceftiofur reference solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) respectively. Water was added to make up the volume, resulting in final concentration of 8.0, 10.0 and $12.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, which correspond to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). The solutions were not filtered. Each level was made in triplicate. The percentage recovery of added ceftiofur reference substance was calculated using the equation proposed by AOAC *Official Methods of Analysis* (18).

Specificity

The specificity was determined for the LC method previously described (14). Forced degradation studies were performed to evaluate the specificity. The possible interferences were analyzed by the peak purity, which was calculated using Shimadzu Class-VP software. For the UV Spectrophotometric method degraded samples were prepared by treating 1.0 mg mL^{-1} reference substance solution with acid (0.1 M hydrochloric acid) and base (0.1 M sodium hydroxide) in an oven at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 8h. The solutions were then left to cool at room temperature and neutralized. Oxidative conditions were obtained by mixing the reference substance solution (1.0 mg mL^{-1}) with 3% (v/v) hydrogen peroxide at room temperature for 6 h. After treatment all the samples were diluted to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ with water.

A Philips (Holland) T UV/G30 T8 UV lamp was used as a source of UV radiation; the intensity of the radiation was $1,200 \mu\text{W cm}^{-2}$ and the wavelength was 254 nm. The solutions of ceftiofur sodium salt (1 mg mL^{-1}) were exposed to the light continuously for 6 h. The UV lamp was positioned 15 cm from the solution. After exposure the samples were diluted to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ with water.

Robustness

For the LC method, the robustness was determined by the analysis of the samples under a variety of conditions previously described (14). For the UV method, the robustness was valuated by the variation of wavelength (290 and 294 nm); and another spectrophotometric- quantitation performed in a Spectronic Genysis 2 UV-VIS spectrophotometer with detection at 292 nm, and using 1.0 cm quartz cells.

The ceftiofur reference substance and sample solutions were subjected to long-term (7 days) stability studies. Sample solutions and reference substance of ceftiofur were prepared in triplicate and stored at approximately $5 \text{ }^\circ\text{C}$ and $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (room temperature, dark) for 1, 2, 3 and 7 days. The stability of the solutions was studied by performing the experiment and observing any change in chromatographic pattern compared with freshly prepared solutions.

Limit of Detection and Quantification

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept from the linear regression lines for three calibration plots, as defined by the ICH (16).

Chromatographic Conditions

The liquid chromatography method (LC) was performed on a Shimadzu® SCL-10AVP liquid chromatography system, equipped with a model LC-10 ADVP pump; an SPD 10AVP, variable-wavelength UV-VIS; an SPD-M-10A VP DAD detector; an SCL-10A system controller, and an SIL-10A VP auto injector (Shimadzu, Kyoto, Japan). The detector was set at 292 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Class VP® software program. The method was carried out on a pre-packed Lichrospher® C18 (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) column from Merck (Germany). The sensitivity was 1.0 AUFS. The liquid chromatography system was operated at room temperature (23 °C ± 1 °C). The mobile phase was a mixture of 0.02 M di-sodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH 6.0), adjusted by addition of orthophosphoric acid 85% and acetonitrile (78:22, v/v). The injection volumes were 20 µL and eluted at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ (14).

Comparison of the Methods

In order to compare the developed UV spectrophotometric method with that of a second well-characterized procedure, six commercial samples of ceftiofur (products A and B) were analyzed, using the proposed UV spectrophotometric method and the liquid chromatography method (14). The data obtained by UV spectrophotometric

method and liquid chromatography method were statistically comparable by ANOVA test and Student's *t*-test.

Results and discussion

Investigations in the field of pharmaceutical analysis and the quality control of medicines require analytical procedures/methods with good performance characteristics. However, the validation procedure is a time-consuming, expensive, and labor-intensive process and greatly depends on the purpose of the method, the chosen technique, and the procedure in question (19). According to the *United States Pharmacopoeia* (17) and the *International Conference on Harmonization* (16), the main objective of the validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose. The choice of the method depends on factors such as the nature of the drug, the complexity of the sample, and the intended use of the method.

The validated procedure for the determination of ceftiofur in pharmaceuticals previously described (14). Mobile phase selection was based on peak parameters (symmetry, number of theoretical plates, capacity factor), run time, ease of preparation, and cost. The retention time of ceftiofur (6.8 min) allows a rapid determination of the drug, which is important for routine analysis. The calibration plot of ceftiofur was constructed by plotting peak area against concentration. It was found to be linear in the range 20.0-120.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.9999; a representative linear equation was $y = 70978 x + 31478$. The separation was monitored by UV detection at 292 nm and no interference from the sample solvent or from impurities was observed at the detection wavelength.

The spectrophotometric analyses were developed and validated using distilled water. It is important to point that the UV method using aqueous solvent was performed considering the reduction of financial resource waste. The stability of ceftiofur in aqueous solution was evaluated to verify that any spontaneous degradation occur when the samples were prepared. The proposed UV method allows a rapid and economical quantitation of ceftiofur in powder for injection without any time-consuming sample preparation. Moreover, the spectrophotometric methods involve simple instrumentation compared with other instrumental techniques.

For quality control in drug analyses, the simplest and fastest method is desirable. Spectrophotometric method is still widely used because it is inexpensive and easy to perform.

The design of the analytical methods proposed here was influenced by the chemical and physicochemical behavior of ceftiofur. The spectral investigation of ceftiofur in different solvents were evaluated (Figure 2). This drug is soluble in water, acetonitrile, methanol and ethanol. The UV spectrum of ceftiofur solution ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) prepared in methanol shows absorption maxima at 288 and 205 nm; in mobile phase it shows absorption maxima at 292, 258 and 231 nm. When using base (0.1 M sodium hydroxide), the absorption maxima shifted toward short wavelength (241; 215; 210 and 203 nm) and in 0.1 M hydrochloric acid it was at 290 and 224 nm. Ceftiofur in water shows absorption maxima at 292, 257 and 230 nm (Figure 3). The UV spectra of samples and the ceftiofur reference spectrum show the same maxima (Figure 4).

Method linearity, precision, accuracy and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were evaluated. In the UV procedures, absorbance was linearly correlated with concentration in the range 2.5 and 20.0 $\mu\text{g/mL}$ at 292 nm. Beer's law

is obeyed over this concentration range. The representative linear equation for ceftiofur is $y = 0.0462x + 0.0068$, where x is the concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and y is the UV absorption, with a correlation coefficient of 0.9999 ($n=6$). The linearity data were validated by ANOVA, which demonstrated significant linear regression and no significant deviation from linearity ($P < 0.05$).

The repeatability (intra-day precision) of the method was calculated as the RSD of assays of ceftiofur in the same concentrations range. The ceftiofur ranged from 100.66 to 101.51%, with an R.S.D. value of 0.3% for product A, and from 99.71 to 100.70% for product B, with an R.S.D. value of 0.4% (Table 1). The intermediate precision was determined by analyzing the sample in three different days (inter-day), with obtained R.S.D. values of 0.7 and 0.6% for products A and B, respectively.

The accuracy expresses the agreement between the accepted and the found values (16). The accuracy of the method was determined and the mean recovery was found to be 99.90% (Table 2) for product A and 100.15% (Table 3) for product B; indicating an agreement between the true value and the value found.

With the purpose of comparing methodologies, the mean data from six different samples of products A and B of ceftiofur, obtained by UV spectrophotometric method and by liquid chromatography method, were statistically analyzed by ANOVA test and Student's t -test, which indicated that there is no significant difference between the two methods at $p < 0.05$. The R.S.D. of the UV spectrophotometric method for product A was 0.3%, and for LC, 0.6%; the R.S.D. of the UV spectrophotometric method for product B was 0.4% and for LC, 0.2% (Table 4).

The purpose of the specificity test was to determine whether new degradation products were produced during forced degradation of ceftiofur drug substance and

whether any degradation products were resolved from the chromatographic peak obtained for ceftiofur. Degradation of 98.10% was observed when ceftiofur sodium reference substance was heated in an oven at 50 °C for 8 h with 0.1M sodium hydroxide. The degradation products were observed at retention times of 1.8 and 2.2 min. Degradation of 5.3% was observed when ceftiofur sodium reference substance was treated with 0.1 M hydrochloric acid for 8h in an oven at 50 °C. Very small degradation product peak at around 2.2 min were seen. The drug is also degraded by 64.5% in 6 h when treated with 3% hydrogen peroxide at room temperature. Degradation of 33.8% was observed when ceftiofur reference substance was exposed to UV radiation. Peak purity was evaluated by using the diode-array UV detector to reveal the presence of any degradation product co eluting with ceftiofur; there is no co elution if the peak purity is close to 100% (peak purity index 1.00) (Figure 5). The single point threshold values obtained for ceftiofur sodium from reference substance, after treatment with base and acid , after oxidation, and after exposure to UV radiation at 254 nm were 0.999998, 0.999945, 0.999999, 0.999991 and 0.999998, respectively. Spectra acquired on the upslope, at the apex, and on the down slope indicated that no impurities interfered with the ceftiofur sodium peak.

A comparison of the UV-visible spectrum of ceftiofur freshly reconstituted and after forced degradation under different conditions showed a slight decrease in absorbance at 292 nm. These results were compared with those obtained by LC. The absorbance decrease observed at 292 nm can be linked to the destruction of the cephem ring. On the other hand the amount of photolysis cannot be quantified because the formed photoproducts can have a low UV absorption. The direct effects of irradiation on the antibiotic activity make this photochemical degradation path an important one, but it cannot be separated from degradation by hydrolysis. The

degradation of the lactam ring was confirmed by UV, simultaneously with the decrease of the ceftiofur's peak in LC.

For the UV Spectrophotometric method the drug is also degraded at approximately 5.0% in 8 h when treated with acid (0.1 M hydrochloric acid) in a oven at 50 °C for 8h.

The robustness of the LC method was studied and it was observed there were no significant changes in chromatographic behavior when the experimental conditions were changed slightly, demonstrating the method is robust. The UV method remained unaffected by small changes in wavelength. The last experiment was quantitation by using another spectrophotometer - Spectronic Genysis 2 UV-VIS, demonstrating it was possible to quantify the drug satisfactorily; and this confirmed the robustness of the method.

When the stability of the solutions was studied the results showed that sample and reference substance solutions were stable for 7 days when stored at approximately 5 °C under refrigeration and 24 ± 2 °C in the dark.

LOD/LOQ parameters are not a requirement for drug assay; however it is always useful to demonstrate that the analyses are being conducted in a region which is above the LOQ value. The LOD and LOQ of ceftiofur by the proposed methods were determined using calibration standards. LOD and LOQ were calculated as $3.3 \sigma/S$ and $10 \sigma/S$, respectively, where S is the slope of the calibration curve and σ is the standard deviation of y -intercept of regression equation. For spectrophotometric method, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated to be $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.29 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

That the calculated LOQ value allowed confident determination of the analyte was experimentally assessed by absorbance of samples containing the analyte at its

corresponding LOQ concentration value. Under the conditions, ceftiofur was still accurately determined with satisfactory precision, being 1.2, the R.S.D. value of three successive determinations.

Conclusions

The results obtained in this study show that the proposed UV spectrophotometric method for the determination of ceftiofur in pharmaceutical dosage forms is accurate and possesses excellent linearity and precision characteristics. There is agreement between the results obtained with UV spectrophotometric and the liquid chromatography method.

Therefore, the method should be useful for routine analytical and quality control of this drug in the studied formulation.

Acknowledgements

We are grateful to Eurofarma for providing the reference substance. This study was performed with the collaboration of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

References

- (1) *The Index Merck*, (2001) 13th Ed., Whitehouse Station, New Jersey.
- (2) Deshpande, L., Pfaller, M.A., & Jones, R.N. (2000) *Int. J. Antimicrob. Agents* **15**, 271-275.

- (3) Erskine, R.J., Wilson, R.C., Tyler, J.W., McClure, K.A., Nelson, R.S., & Spears, H.J. (1995) *Am. J. Vet. Res.* **56**, 481-485.
- (4) Guglick, M.A., MacAllister, C.G., Clark, C.R., Pollet, R., Hague, C., & Clark J.M. (1998) *AM. J. Vet. Res.* **59**, 458-463.
- (5) Mills, M.L., Rush, B.R., Jean, G. St., Gaughan, E.M., Mosier, D., Gibson, E., & Freeman, L. (2000) *Vet. Surg.*, **29**, 398-406.
- (6) Tyczkowska, K.L., Voyksner, R.D., Straub, R.F., Anderson, K.L., & Aronson, A.L. (1993) *J.Chromatogr.* **614**, 123-134.
- (7) Tyczkowska, K.L, Voyksner, R.D., Straub, R.F., & Aronson, A.L. (1994) *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **77**, 1122-1131.
- (8) Moats, W.A., & Harik-Kham, R.J. (1995) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **78**, 49-54.
- (21) European Pharmacopoeia (2005) 5th Ed., Council of Europe, Strasbourg.
- (9) Hamlow, P.J. (1995) *Animal Health Drug Metabolism.* 7926, Upjohn Laboratories.
- (10) Jacobson, G.A., Martinod, S., & Cunningham, C.P. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 1249-1252.
- (11) Straub, R., Linder, M., & Voyksner, R.D. (1994) *Anal. Chem.* **66**, 3651-3658.
- (12) Keever, J., Voykner, R.D., & Tyczkowska, K.L. (1998) *J. Chromatogr. A* **794**, 57-62.
- (13) Puig, P., Borrull, F. Callul, M., Benavente, F., Saint-Nebot, V., Barbosa, J.&Agguila, C. (2007) *Anal. Chim. Acta* Mar 28; **587**(2): 208-215.
- (14) Souza, M.J., Nogueira, D.R., Silva, L.M., Arend, M.Z., Souza Filho, P.S., & Bergold, A.M. (2007). *Chromatogr.* **65**, 401-406.
- (15) Souza, M.J., Rolim. C.M.B., Melo, J.; Souza Filho, P.S., & Bergold, A.M. (2007). *J.of AOAC Inter.* **90**,(6), 50-54.
- (16) *Harmonised Tripartity Guideline Validation of Analytical Procedures:* Methodology Commission of the European Communities (1996) ICH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, Geneva.
- (17) *The United States Pharmacopoeia* (2008) 31th Ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- (18) *Official Methods of Analytical Chemists* (1997) 16th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Arlington.
- (19) Grdinié, V., & Vukovic, J.(2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**, 489-512.

Figure 1. Chemical structure of ceftiofur sodium.

Figure 2. UV spectrum of ceftiofur sodium ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$): (I) in methanol, (II) in 0.1 M sodium hydroxide, (III) mobile phase: 78:22(v/v) 0.02 M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid) acetonitrile, (IV) in 0.1 M hydrochloric acid.

Figure 3. UV spectrum of ceftiofur reference substance in water ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figure 4. UV spectrum of ceftiofur (reference substance, products A and B) in distilled water ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figure 5. Chromatograms obtained from $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ceftiofur sodium after forced degradation under different conditions: (A) basic conditions at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 8 h, (B) acidic conditions at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 8 h, (C) oxidation with 3% peroxide for 6 h at room temperature, (D) exposure to UV radiation at 254 nm for 6 h. Chromatographic conditions: 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Lichrospher® C18 column with 78:22 (v/v) 0.02M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid)-acetonitrile as mobile phase at a flow rate: 1.0 mL min^{-1} ; detection wavelength 292 nm.

Table 1 Data obtained from commercial sample analysis by UV spectrophotometric method.

| Product | Component | Theoretical amount (mg mL ⁻¹) | Experimental amount ^a (mg mL ⁻¹) | Purity (%) | Mean (%) | R.S.D. (%) |
|---------|------------------|---|---|------------|----------|------------|
| A | Ceftiofur sodium | 50 | 50.33 | 100.67 | 101.05 | 0.3 |
| | | | 50.65 | 101.30 | | |
| | | | 50.33 | 100.66 | | |
| | | | 50.46 | 100.92 | | |
| | | | 50.75 | 101.51 | | |
| | | | 50.60 | 101.20 | | |
| B | Ceftiofur sodium | 50 | 50.28 | 100.56 | 100.16 | 0.4 |
| | | | 49.91 | 99.82 | | |
| | | | 50.12 | 100.24 | | |
| | | | 50.35 | 100.70 | | |
| | | | 49.96 | 99.92 | | |
| | | | 49.85 | 99.71 | | |

^aMean of three determinations

Table 2 Experimental values obtained in the recovery test for product “A” by UV spectrophotometric method.

| | Amount of standard ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | Recovery ^a (%) | Mean (%) | R.S.D. (%) |
|----|--|-----------|---------------------------|----------|------------|
| | Added | Recovered | | | |
| R1 | 2 | 1.99 | 99.52 | 99.90 | 0.6 |
| R2 | 4 | 3.99 | 99.69 | | |
| R3 | 6 | 6.03 | 100.51 | | |

^aMean of three determinations.

Table 3 Experimental values obtained in the recovery test for ceftiofur product “B” by UV spectrophotometric method.

| | Amount of standard ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | Recovery ^a (%) | Mean (%) | R.S.D. (%) |
|----|--|-----------|---------------------------|----------|------------|
| | Added | Recovered | | | |
| R1 | 2 | 1.98 | 99.32 | 100.15 | 0.3 |
| R2 | 4 | 4.04 | 101.02 | | |
| R3 | 6 | 6.00 | 100.12 | | |

^aMean of three determinations.

Table 4 Analysis of ceftiofur (products “A” and “B”) by two different methods.

| Product | Sample No. | LC ^a (%) | Mean (%) | R.S.D. (%) | UV ^b (%) | Mean (%) | R.S.D (%) |
|---------|------------|---------------------|----------|------------|---------------------|----------|-----------|
| A | 1 | 99.82 | 100.41 | 0.6 | 100.67 | 101.05 | 0.3 |
| | 2 | 100.86 | | | 101.30 | | |
| | 3 | 100.22 | | | 100.66 | | |
| | 4 | 101.40 | | | 100.92 | | |
| | 5 | 99.95 | | | 101.51 | | |
| | 6 | 100.22 | | | 101.20 | | |
| B | 1 | 100.93 | 100.61 | 0.2 | 100.56 | 100.16 | 0.4 |
| | 2 | 100.86 | | | 99.82 | | |
| | 3 | 100.59 | | | 100.24 | | |
| | 4 | 100.46 | | | 100.70 | | |
| | 5 | 100.72 | | | 99.92 | | |
| | 6 | 100.12 | | | 99.71 | | |

^aEach value is the mean of three injections.

^bEach value is the mean of three determinations.

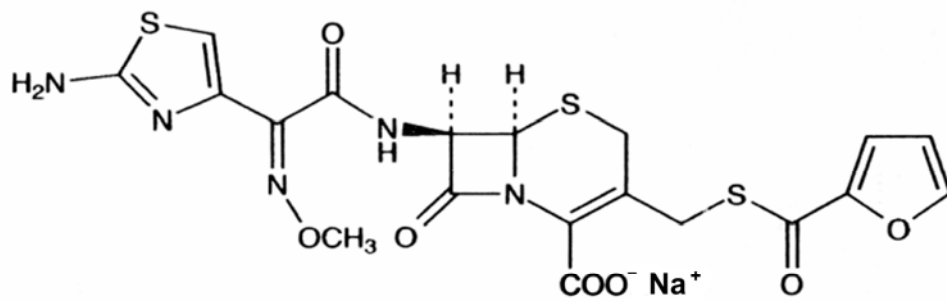


Figure 1 Chemical structure of ceftiofur sodium.

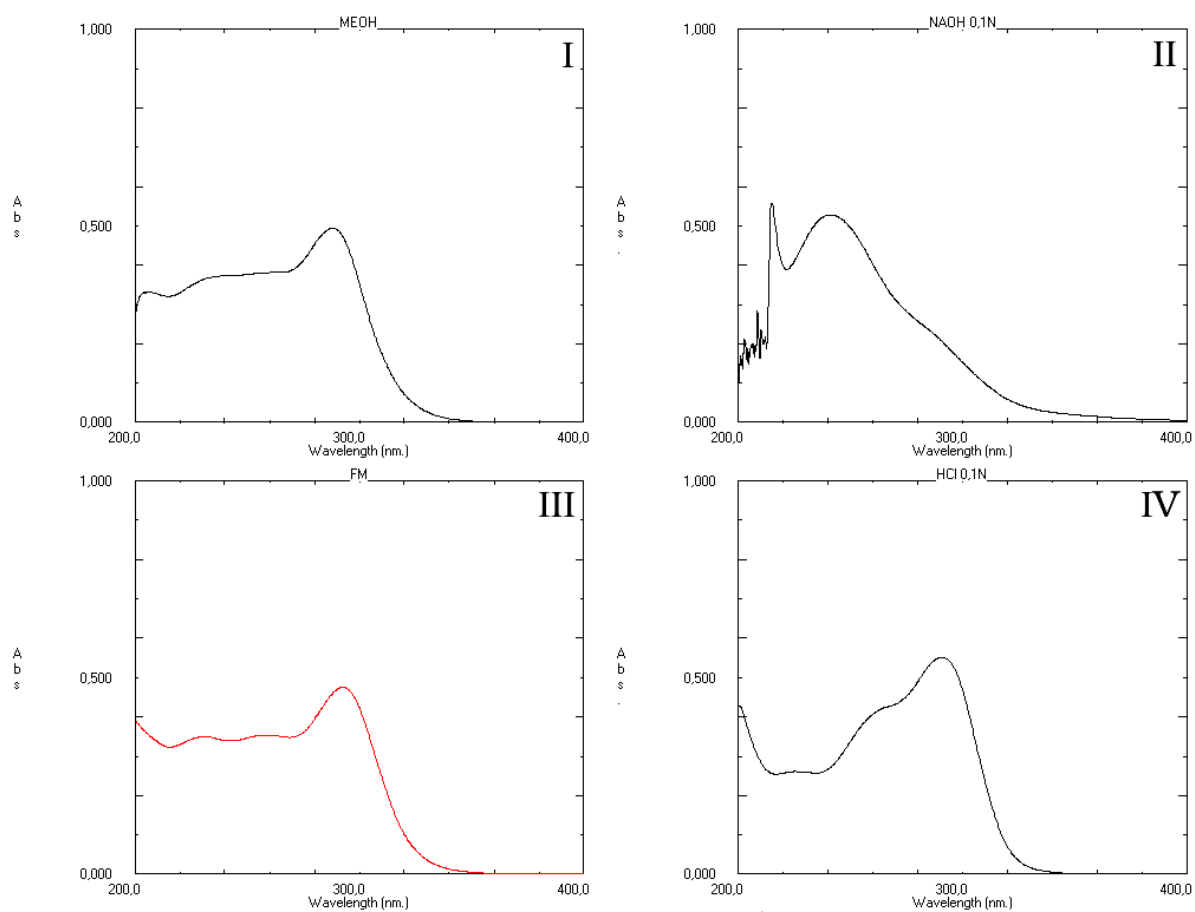


Figure 2 UV spectrum of ceftiofur sodium (10 µg mL⁻¹) : (I) in methanol, (II) in 0.1 M sodium hydroxide, (III) mobile phase: 78:22(v/v) 0.02 M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid) acetonitrile, (IV) in 0.1 M hydrochloric acid.

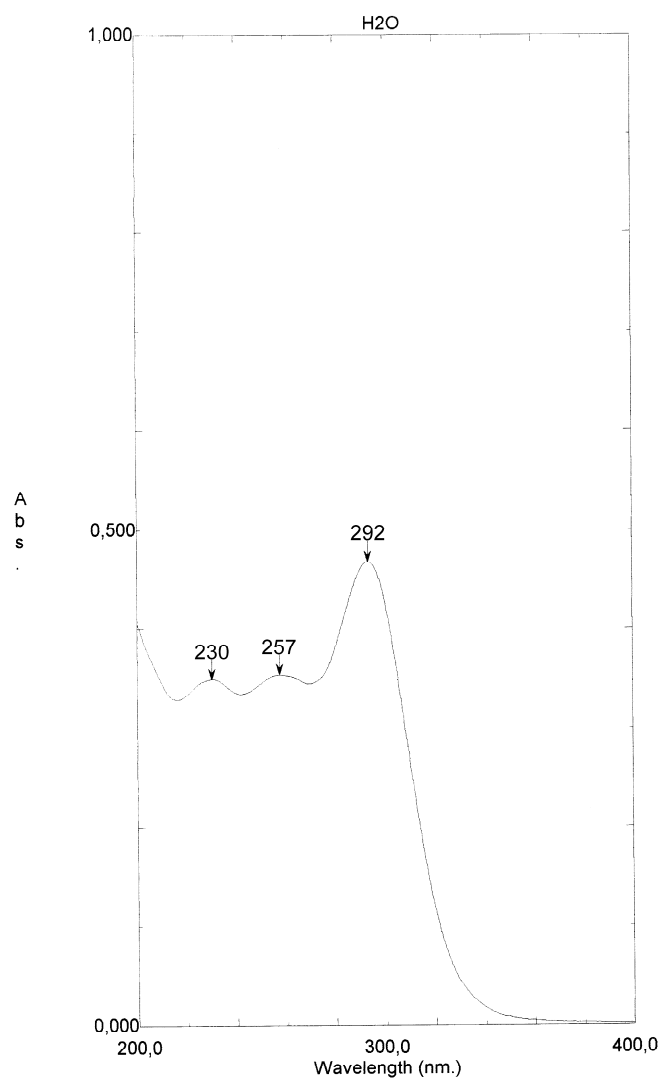


Figure 3 UV spectrum of ceftiofur reference substance in water ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

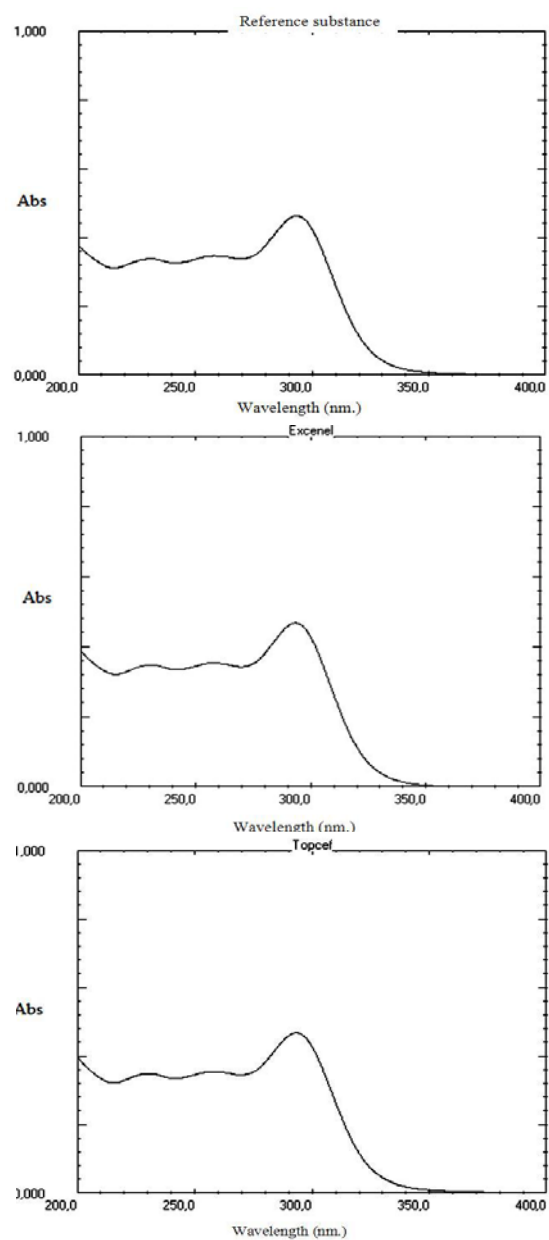


Figure 4 UV spectrum of ceftiofur (reference substance, products A and B) in distilled water ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

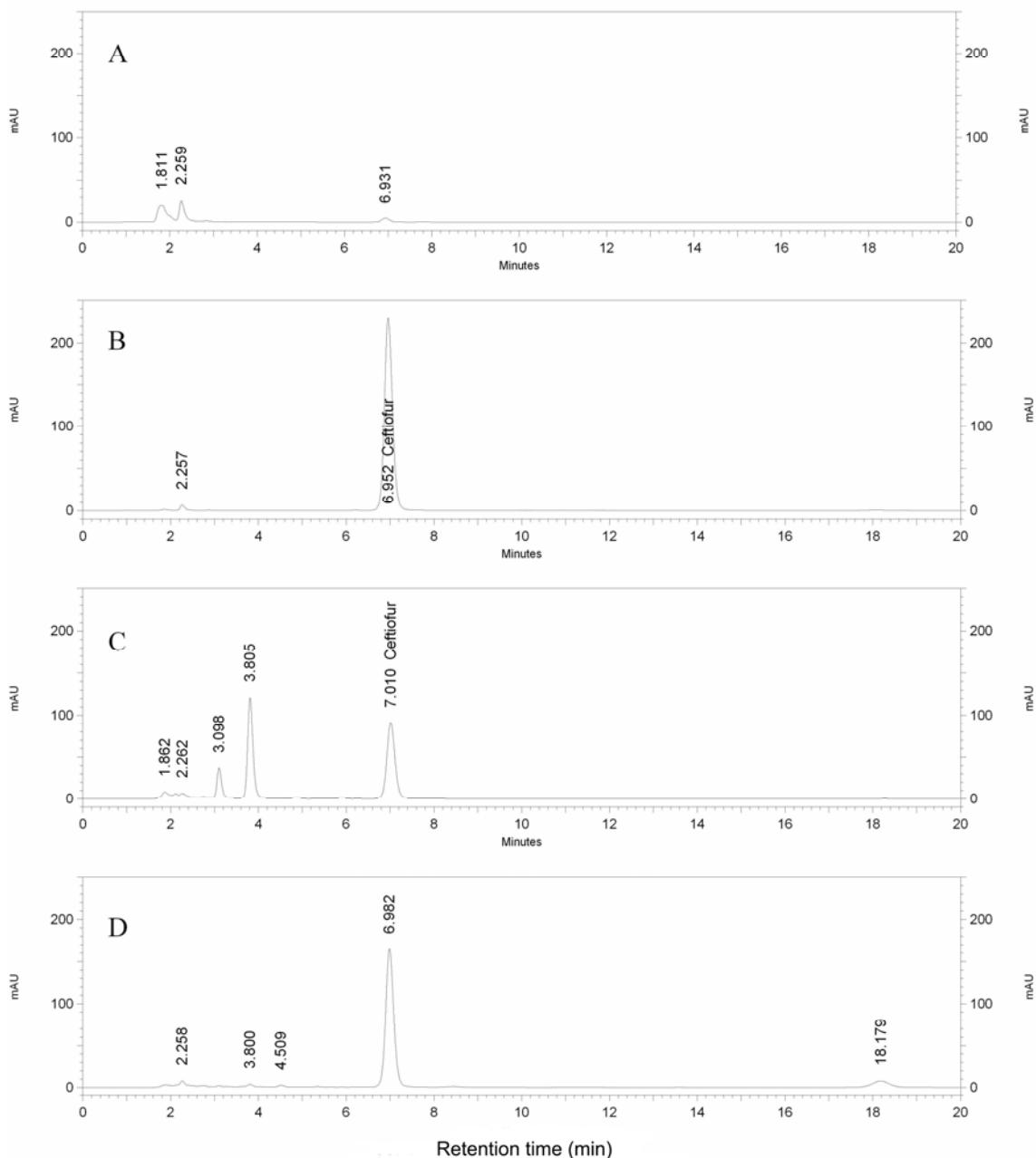


Figure 5 Chromatograms obtained from $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ceftiofur sodium after forced degradation under different conditions: (A) basic conditions at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 8 h, (B) acidic conditions at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 8 h, (C) oxidation with 3% peroxide for 6 h at room temperature, (D) exposure to UV radiation at 254 nm for 6 h. Chromatographic conditions: 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Lichrospher® C18 column with 78:22 (v/v) 0.02M disodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH adjusted to 6.0 with 85% orthophosphoric acid)-acetonitrile as mobile phase at a flow rate: 1.0 mL min^{-1} ; detection wavelength 292 nm.

CAPITULO 5: Avaliação da estabilidade fotoquímica do ceftiofur sódico em solução aquosa.

5.1 INTRODUÇÃO

O objetivo dos estudos de estabilidade é conhecer o período de tempo em que um medicamento mantém suas propriedades terapêuticas, frente a variações climáticas ambientais onde está sendo comercializado. O detentor do registro do medicamento é responsável pela manutenção das características especificadas perante o órgão de vigilância sanitária e perante a sociedade. Caberá a ele indicar em suas embalagens, as condições apropriadas de armazenamento durante o prazo de validade (SANTOS; MORETTO, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução-RE nº 1 de 29 de junho de 2005 (DOU 01/08/05) dispondo de uma Guia para a realização de Estudos de Estabilidade (BRASIL, 2005).

A degradação fotoquímica dos fármacos e de suas formulações tem merecido destaque nos últimos anos, devido ao crescente aumento do número de fármacos fotolábeis reportados. Conseqüentemente, tornou-se um campo de pesquisa importante. Isso pode ser atribuído, em parte à demanda de guias harmonizadas para estudos fotoquímicos da estabilidade dos fármacos, pelos órgãos regulatórios que são responsáveis pelo registro e comercialização do medicamento no mundo (TONNESEN, 2001).

A literatura não descreve estudo da estabilidade fotoquímica do ceftiofur sódico, justificando-se assim o desenvolvimento desse trabalho.

PUBLICAÇÃO 4: Photodegradation kinetics of ceftiofur sodium in aqueous solution determined by lc method.

Para publicação no periódico Chromatographia

Photodegradation Kinetics of Ceftiofur Sodium in Aqueous Solution Determined by LC Method

M. J. e Souza^{1,2,✉}, P. S. Souza Filho³, A. M. Bergold¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

²CTEFAR - Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaaios Farmacêuticos - Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, CEP 97105900, Santa Maria, RS, Brazil; E-mail: msouza@ccs.ufsm.br

³Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, UFSM, CEP 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

Abstract

The stability of the broad-spectrum antibiotic ceftiofur was studied in order to investigate the kinetics of photodegradation of this drug, using a stability-indicating liquid chromatography (LC) method. The degradation was carried out in aqueous solutions, prepared from reference substance and two pharmaceutical products (Excenel[®] and Topcef[®]) containing ceftiofur sodium powder for injection, in quartz cells under UVC (254 nm) and UVA light (352 nm). The kinetics parameters of reaction order and the rate constants of the degradation were determined for both products. The degradation process of ceftiofur sodium in solution can be described by first-order kinetics under the experimental conditions used in this study. The obtained results show that the LC method is satisfactory in the determination of the kinetics of degradation of ceftiofur sodium in the presence of its photolytic degradation products. The present study reveals the photolability of the drug. Thus, appropriate light protection is recommended during the storage and handling.

Keywords: Column liquid chromatography; Photodegradation; Kinetic of degradation; Ceftiofur sodium.

✉ Corresponding author: Tel: +55 55 3220-8806; fax: +55 55 3220-4280
E-mail address: msouza.ufsm@gmail.com (M. J. Souza).

Introduction

Photochemical stability of pharmaceutical substances is a matter of great interest, both for analytical and for practical purposes. Drug light-induced degradation can result in a decreased efficacy and sometimes also involve significant adverse side effects after drug administration [1-3].

Ceftiofur sodium is a third generation broad-spectrum cephalosporin, formulated as an intramuscular injection which is used to treat respiratory diseases in swine, ruminants and horses. Ceftiofur is effective against a wide variety of Gram-positive and Gram-negative microorganisms [4].

Chemically ceftiofur (Fig. 1) is the (6R-(6 α , 7 β (Z)))-7-(((2-furanylcarbonyl)-thio) methyl)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo (4.2.0) oct-2-ene-2-carboxylic acid [5]. This compound is very susceptible to acid, alkaline, and enzyme-catalyzed hydrolysis, producing a number of unstable degradation products. Hydrolysis of ceftiofur is complex; it is readily hydrolyzed to desfuroylceftiofur and is further converted into more complex products [6] such as the dimer of desfuroylceftiofur, corresponding thiolactone and various other forms. The influence of pH and temperature on kinetics of ceftiofur degradation in aqueous solutions have been early described [7].

Preliminary stability investigations realized by our research group revealed that ceftiofur sodium undergo degradation upon exposure to light and its photolability was established by forced degradation tests (stress testing). The International Conference on Harmonization (ICH) guideline presents the standard conditions for photostability studies and requires that stress testing must be carried out to elucidate the inherent stability characteristics of the active substance in a pharmaceutical

preparation. Following the recommendations of this guide, the light testing should be an integral part of stress testing. Besides, a stability-indicating method is necessary to quantify the drug in the presence of its degradation products (DP), and the method should be capable to resolve and detect photolytic degrading products which can appear during the study [8].

Light-stability testing of pharmaceutical formulations should provide information related to the practical use of the product. Photostability testing according to the ICH guideline will give an indication as to whether photochemical degradation of the drug substance or drug product is likely to occur during the shelf-life. The results are used to make labeling decisions. Based on data related to sunlight conditions, it is also possible to make recommendations on how the product should be handled in use.

Moreover, the compound photoreactivity can offer the basis for a selective LC method suitable for a reliable quality control of commercial formulations.

The present work was aimed to investigate the photostability of ceftiofur sodium in solution, under forced exposure to UVC and UVA radiations and determine its photodegradation kinetics. A selective and reliable liquid chromatographic method (LC) was developed and validated according to ICH, for the quantitative evaluation of the drug photodegradation process, in the presence of its photoproducts [9].

Experimental

Samples

The ceftiofur sodium reference substance (assigned purity 101.2%) was obtained from Orchid Chemicals & Pharmaceuticals Ltd. (Chennai, India). It was tested for purity by controlling its melting point, UV (Shimadzu UV 1601 PC spectrophotometer - Japan) and nuclear magnetic resonance spectra (Bruker AM-500 - Karlsruhe, Germany). No impurities were found. Pharmaceutical products Excenel[®], Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo – Michigan – U.S.A. and Topcef[®], Eurofarma Lab. Ltda – Brazil containing ceftiofur sodium were obtained commercially and claimed to contain 1 g of ceftiofur sodium powder/flask.

Reagents and solvents

All used chemicals were of pharmaceutical or special analytical grade. Acetonitrile was HPLC grade (Tedia[®], USA). Analytical reagent grade di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate and orthophosphoric acid were purchased from Merck, Darmstadt, Germany. Water HPLC grade obtained from Milli-Q RO system, was used.

Instrumentation and Analytical Conditions

The developed method was performed with a LC system consisting of a Shimadzu[®] SCL-10AVP system equipped with a Shimadzu model LC-10 ADVP pump, and SPD 10AVP, variable-wavelength UV-VIS and SPD-M-10A VP DAD detector a SCL-10A system controller, and a SIL-10 A VP auto injector, (Shimadzu, Kyoto, Japan). The detector was set at 292 nm and peak areas were integrate automatically by computer using a Class VP[®] software program. The method was carried out on a pre-packed, Lichrospher[®] C₁₈ (250 mm x 4,6 mm i.d. 5 µm particle size) column from Merck (Germany). The mobile phase was a mixture of 0.02M di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate buffer (pH 6.0), adjusted by addition of orthophosphoric acid 85% and acetonitrile (78:22, v/v). The injection volumes were 20 µl and eluted at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The sensitivity was 1.0 AUFS. The HPLC system was operated at room temperature (23 °C ± 1 °C). The mobile phase was filtered through a 0.45 µm membrane filter and degassed with a helium sparge for 15 min. All calculations concerning the quantitative analysis were performed with external standardization by measurement of peak areas.

Photostability studies

Considering the sensibility of ceftiofur sodium to light, demonstrated in preliminary studies, the photostability of the drug was study in this work. Two light sources were tested: an UV fluorescent lamp model (*Light express LE*, 30W), emitting radiation at 254 nm (UVC) and Blacklight blue lamp - Orion (352 nm) 30 W,

130 V (UVA), both fixed to a chamber in a horizontal position. The chamber was internally coated with mirrors, in order to distribute the light uniformly. The effect of the light was studied exposing the aqueous sample solutions in 1 cm quartz cells, in a distance of 8 cm of the lamp each one. The temperature in the chamber was controlled into and was always below 30 °C.

Degradation Study

The photodegradation kinetics of ceftiofur sodium was evaluated in water. Stock solutions (1mg mL^{-1}) were prepared from the reference substance, Excenel[®] and Topcef[®]. The stress degradation study was performed exposing the solutions contained in quartz cells in the chamber. The samples were positioned horizontally, to provide maximum area of exposure to the light source. Considering the UV absorption of ceftiofur, the irradiation was carried out at 254 nm at different time intervals (0, 30.0, 60.0, 90.0 and 120.0 min.); and for UVA (0, 1.0, 3.0, 16.0 and 24.0 h). In order to evaluate the contribution of thermally induced change to the total change, protected samples, wrapped in aluminum foil, were used as dark controls. Three samples were analyzed at each time interval. After the time, the samples were diluted with the mobile phase to give final concentration of $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$. The samples were assayed by HPLC, using standard solutions, prepared in water, which were diluted with mobile phase to the concentration of $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for the quantitation of the drug. All solutions were injected in triplicate.

Kinetics Calculations

The degradation rate kinetics of ceftiofur sodium was determined by plotting concentration of the remaining drug versus time (zero-order process), log of concentration of the drug versus time (first-order process), and reciprocal of concentration of the drug versus time (second-order process). The regression coefficients (r) were obtained, and the best observed fit indicates the reaction order. The kinetics parameters like apparent order degradation rate constant (k), and t_{90} (time where 90% of original concentration of the drug is left) were obtained.

The kinetics model can be represented as:

$$C = C_o - k \cdot t \quad t_{90\%} = 0.1 C_o / k \text{ (zero-order reaction)}$$

$$\ln C = \ln C_o - k \cdot t \therefore C = C_o \cdot e^{-k \cdot t} \quad t_{90\%} = (0.106) / k \text{ (first-order reaction)}$$

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_o} + k \cdot t \therefore C = \frac{C_o}{1 + C_o \cdot k \cdot t} \quad t_{90\%} = 1/9 k C_o \text{ (second-order reaction)}$$

Where C_o is the concentration of the reactants under consideration at time zero. C is the concentration after reaction time t and k is the reaction rate constant.

Results and Discussion

Drug photostability constitutes an important current subject of investigation because the photodegradation process can result in a loss of the potency of the drug and also in adverse effects due to the formation of minor toxic degradation products [10].

Information about the stability of the drug substance is an integral part of the systematic approach on the stability evaluation. Investigation of the influence of light on the stability of drugs has gained more and more importance in recent years. Characterization of the photochemical degradation of drugs using accurate, specific and well-characterized methods is of interest, regarding safety, quality and effectiveness of drug formulation. Light exposure (during production, storage and use) can change the stability of the drug and toxic decomposition products may be formed. Information about photostability of drugs can help to determine the storage conditions in order to achieve high quality of pharmaceutical products [11]. As ceftiofur is a cephalosporin, and these products are very labile, the product was considered photounstable.

The LC method previously developed and validated (9) for the quantitation of ceftiofur sodium in pharmaceutical dosage forms was applied in the determination of the photodegradation kinetics of ceftiofur sodium, and could effectively separate the drug from its degradation products (DP). The chromatographic parameters of resolution, theoretical plates, and asymmetry were evaluated for ceftiofur sodium and for the main observed DP. Through the obtained results, the LC method can be satisfactorily employed as a stability-indicating method.

Stress testing is the first part of the stability evaluation and can help to identify the likely DP, establish the degradation pathways and the intrinsic stability of the molecule and validate the stability indicating power of the analytical procedure used. The purpose of photostability tests is to provide evidence on how the quality of a drug varies with the time under the influence of the light.

This paper presents photostability study of ceftiofur submitted to two different light (UVC and UVA) sources. Ceftiofur was found to be photoreactive when exposed

to UV radiation, consequently adequate light protection should be adopted for its storage and handling. The kinetics of photodegradation of ceftiofur sodium was carried out through the employment of stress conditions. The exposure to light was found to be an important adverse stability factor. The LC method was used for the determination of the drug in the degraded samples. The photodegradation profile of ceftiofur sodium was evaluated at different time intervals. The effect of light on the residual concentration of ceftiofur sodium in degraded samples is shown in Tables 1 and 2. It was observed that around 95% of the parent compound degraded after a 2 h exposure to light UVC and around 75% of the parent compound degraded after a 24 h exposure to light UVA. Typical chromatograms, showing the observed changes during the degradation in UVC and UVA, in comparison to the initial sample, are demonstrated in Figs. 2 and 3, respectively. A yellowish color developed there upon exposure the ceftiofur sodium reconstituted sample at light. Fig. 2 shows the changes observed during degradation of the reconstituted drug in comparison with the initial sample. Four majority degradation product peaks at around 2.6, 3.1, 3.8 and 13.9 min were seen after UVC irradiation at 254 nm.

On exposure of ceftiofur to UVA, two majority degradation product peaks at around 3.9 and 13.6 min appeared, very small degradation product peaks at around 2.6 and 3.1 also were detected. The peaks of the degradation products are demonstrated in Fig. 3. The temperature, which was controlled into the chamber, was always below 30 °C.

The photodegradation kinetics was calculated for SQR, Excenel[®] and Topcef[®], through the fall in the drug concentration with the time. The concentration of remaining ceftiofur sodium was calculated at each time interval for the three replicates, in comparison with the mean concentration of the standard solution of the

drug in each product. The plots of log of concentration of drug remaining versus time obtained in the course of the kinetics studies UVC and UVA are shown in Figs. 4 and 5, respectively.

Through the evaluation of the correlation coefficients, it can be demonstrated that the degradation process of ceftiofur sodium in UVC and UVA light can be described by first-order kinetic under the experimental conditions used in this study. From the slopes of the straight lines it was possible to calculate the first-order degradation rate constant k , and the $t_{90\%}$ for each sample tested (Table 3)

The classic hydrolysis of the $\Delta 3$ -cephem ring occurs in cephalosporins in aqueous solution, but it is obviously not sufficient to explain all these observations. On the other hand, our data corroborate the well-known yellowish coloration of cephalosporin during ageing as described in the literature [12]. Lerner et al. [12] report competitive photolysis of cefotaxime consisting of at least two processes (one on the $\Delta 3$ -cephem ring and the second on the methoxyimino group) which led to an intense yellowing of the solution corresponding to the destruction of $\Delta 3$ -cephem ring, as was verified by Rabouan - Guyon et al. [13] and consequently loss of antimicrobial activity.

Conclusion

The photodegradation kinetics of the antibiotic ceftiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] by UVC and UVA light was determined. The stability-indicating LC method was satisfactorily employed in the quantitation of the drug in the presence of its degradation products. The photodegradation of ceftiofur sodium follow first-order

reaction kinetics. The kinetics parameters of degradation rate constant, and t_{90} were calculated. The results obtained in this study indicate the photosensitivity of ceftiofur sodium SQR and pharmaceuticals products (Excenel[®] and Topcef[®]) in solution exposed to UV light; extensive decomposition was observed. Consequently an appropriate protection is recommended during the storage and handling of this antibiotic after reconstitution.

Acknowledgements

The authors wish to thank Eurofarma Laboratories Ltda, São Paulo, Brazil for providing the reference substance. This study was performed with the collaboration of Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS and Universidade Federal de Santa Maria - UFSM.

References

1. Andrisano V, Gotti R, Leoni A, Cavrini V (1999) J Pharm Biomed Anal 21: 851-857.
2. Albini A, Fasani E, in: Albini A , Fasani E (Eds.), Drugs: Photochemistry and Photostability, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp 1-73.
3. Moore DE, in: Tonnesen (Ed.), Photostability of Drugs and Drugs Formulations, Taylor & Francis, London, 1996 pp 9-38
4. Hornish RE, Kotarski SF, (2002) Curr Top Med Chem 2:717-731.

- 5 The Index Merck, (2001) Merck & CO. INC. Whitehouse Station, NJ USA, 13Th Ed., pp334.
6. Koshy KT, Cazars AR (1997) J Pharm Sci 86 (3) : 389-395.
7. Sunkara G. , Navarre CB, Kompella UB (1999) J Pharm Pharmacol 51: 249-255.
8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals, ICH, (Nov.6.1996) *Validation of Analytical Procedures; Methodology*, Harmonised tripartite Guideline, Geneva, Switzerland
9. Souza MJ, Nogueira DR, Silva LM , Arend MZ., Souza FPS, Bergold AM (2007) Chromatographia 65: 401-406.
10. Tonnensen H.H., in: Tonnensen H.H (Ed.) Photostability of Drugs and Drugs Formulations, Taylor & Francis, London, 1996, pp. 1-7.
11. Kovariková P, Mokry M, Klimes J, (2003) J Pharm Biomed Anal 31: 827-832.
12. Lerner DA, Bonnefond G, Fabre H, Mandrou B, Simeon De Bouchberg M. (1988) J Pharm Sci 77: 699-703.
13. Rabouan-Guyon SM, Guet AF, Courtois PY, Barthes DMC (1997) Intern J Pharm 154:185-190.

Figure 1. The chemical structure of ceftiofur.

Figure 2. Chromatograms of ceftiofur sodium SQR not exposed in the time 0 (I), and exposed (II) to UVC radiation, Excenel[®] (III) and Topcef[®] (IV), exposed to UVC radiation, in aqueous solution after 120 min of irradiation. Chromatographic conditions as described in the text.

Figure 3. Chromatograms of ceftiofur sodium SQR not exposed in the time 0 (I), and exposed (II) to UVA radiation, Excenel[®] (III) and Topcef[®] (IV), exposed to UVA radiation, in aqueous solution after 24 h of irradiation. Chromatographic conditions as described in the text.

Figure 4 First-order plots for the degradation of ceftiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] irradiated with UVC (254 nm).

Figure 5 First-order plots for the degradation of ceftiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] irradiated with UVA.

Table 1. Results of the residual concentration of ceftiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] in aqueous solutions after photodegradation (UVC), using the LC method.

| Sample | Time (min) | Sample concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Measured concentration ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Purity ^a (%) | RSD |
|----------------------|------------|--|---|-------------------------|------|
| SQR | 0 | 60 | 60.00 | 100.00 | 0.18 |
| | 30 | | 28.13 | 46.88 | 0.33 |
| | 60 | | 16.98 | 28.30 | 0.64 |
| | 90 | | 6.98 | 11.64 | 0.45 |
| | 120 | | 2.88 | 4.38 | 0.59 |
| Excenel [®] | 0 | 60 | 60.34 | 100.56 | 0.22 |
| | 30 | | 30.99 | 51.37 | 0.49 |
| | 60 | | 19.79 | 32.80 | 0.71 |
| | 90 | | 8.67 | 14.38 | 0.26 |
| | 120 | | 2.76 | 4.60 | 0.64 |
| Topcef [®] | 0 | 60 | 60.14 | 100.23 | 0.24 |
| | 30 | | 29.21 | 48.58 | 0.47 |
| | 60 | | 18.93 | 31.47 | 0.39 |
| | 90 | | 6.52 | 10.85 | 0.64 |
| | 120 | | 2.94 | 4.89 | 0.44 |

^aMean of three analysis

Table 2 Results of the residual concentration of cefiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] in aqueous solutions after photodegradation (UVA), using the LC method.

| Sample | Time (h) | Sample concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Measured concentration ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Purity ^a (%) | RSD |
|----------------------|----------|--|---|-------------------------|------|
| SQR | 0 | 60 | 60.00 | 100.00 | 0.18 |
| | 1 | | 51.30 | 85.50 | 0.36 |
| | 3 | | 47.52 | 79.20 | 0.42 |
| | 16 | | 43.53 | 72.56 | 0.29 |
| | 24 | | 26.89 | 44.83 | 0.53 |
| Excenel [®] | 0 | 60 | 60.34 | 100.56 | 0.22 |
| | 1 | | 50.88 | 84.80 | 0.47 |
| | 3 | | 47.13 | 78.55 | 0.28 |
| | 16 | | 43.56 | 72.60 | 0.45 |
| | 24 | | 27.44 | 45.74 | 0.31 |
| Topcef [®] | 0 | 60 | 60.14 | 100.23 | 0.24 |
| | 1 | | 51.12 | 85.20 | 0.19 |
| | 3 | | 48.57 | 80.95 | 0.28 |
| | 16 | | 45.70 | 76.18 | 0.52 |
| | 24 | | 29.70 | 42.84 | 0.46 |

^aMean of three analysis

Table 3 Degradation rate constant k and $t_{90\%}$ for ceftiofur SQR, Excenel[®] and Topcef[®] in aqueous solution after photodegradation, determined by LC method.

| Sample | UVA | | UVC | |
|----------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | k (min ⁻¹) | $t_{90\%}$ (min) | k (min ⁻¹) | $t_{90\%}$ (min) |
| SQR | 4.32 | 88.37 | 2.38×10^{-2} | 4.39 |
| Excenel [®] | 4.60 | 83.11 | 2.20×10^{-2} | 4.81 |
| Topcef [®] | 4.20 | 90.76 | 2.33×10^{-2} | 4.55 |

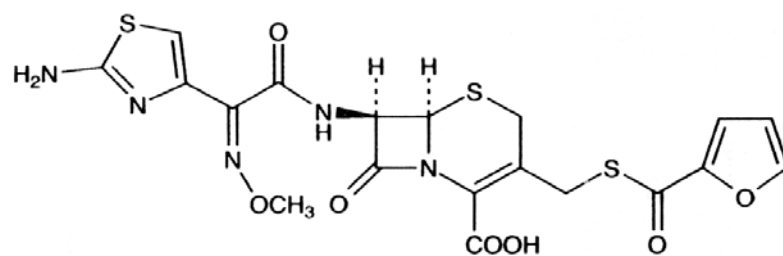


Figure 1 The chemical structure of ceftiofur.

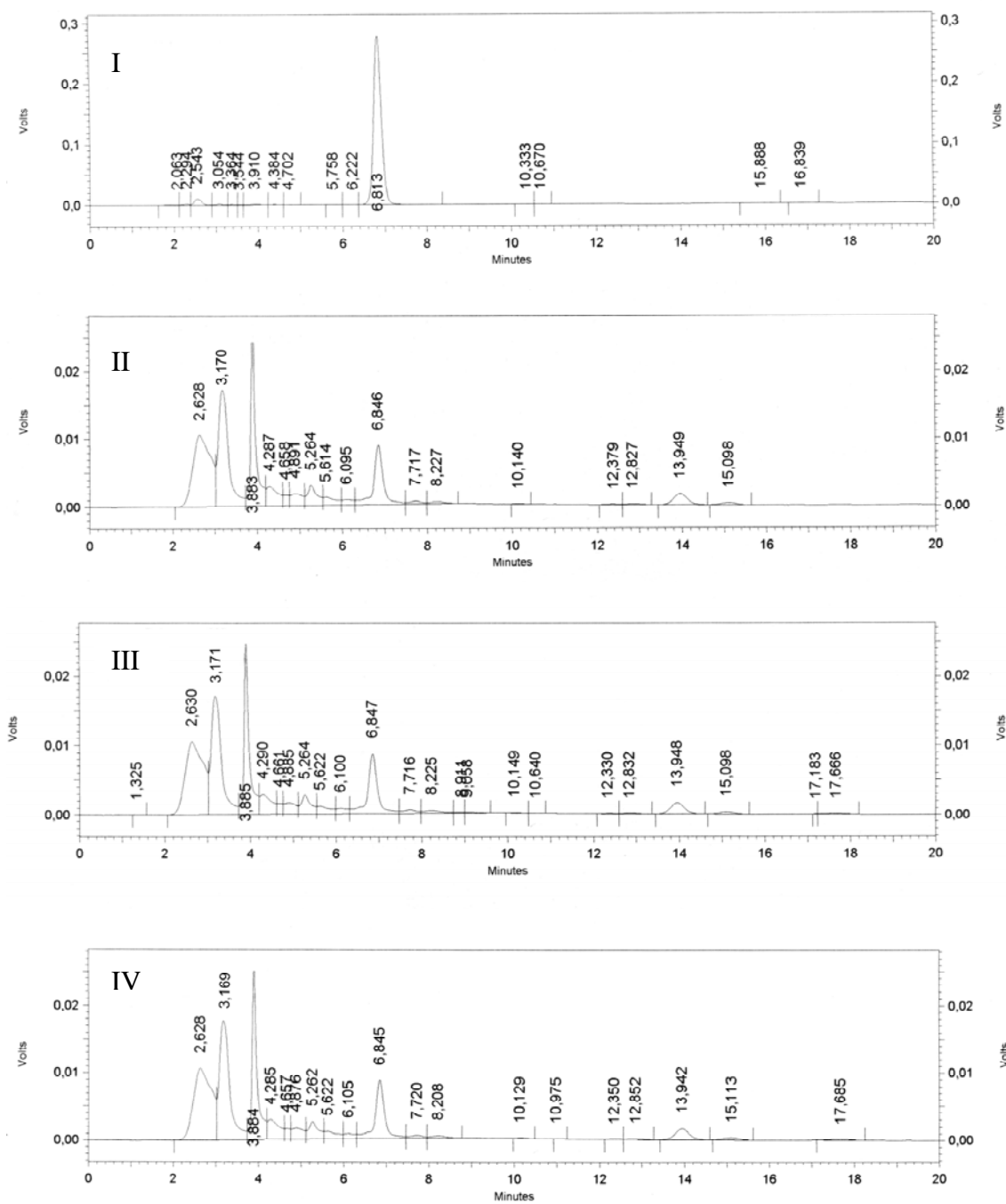


Figure 2 Chromatograms of ceftiofur sodium SQR not exposed in the time 0 (I), and exposed (II) to UVC radiation, Excenel[®] (III) and Topcel[®] (IV), exposed to UVC radiation, in aqueous solution after 120 min of irradiation. Chromatographic conditions as described in the text.

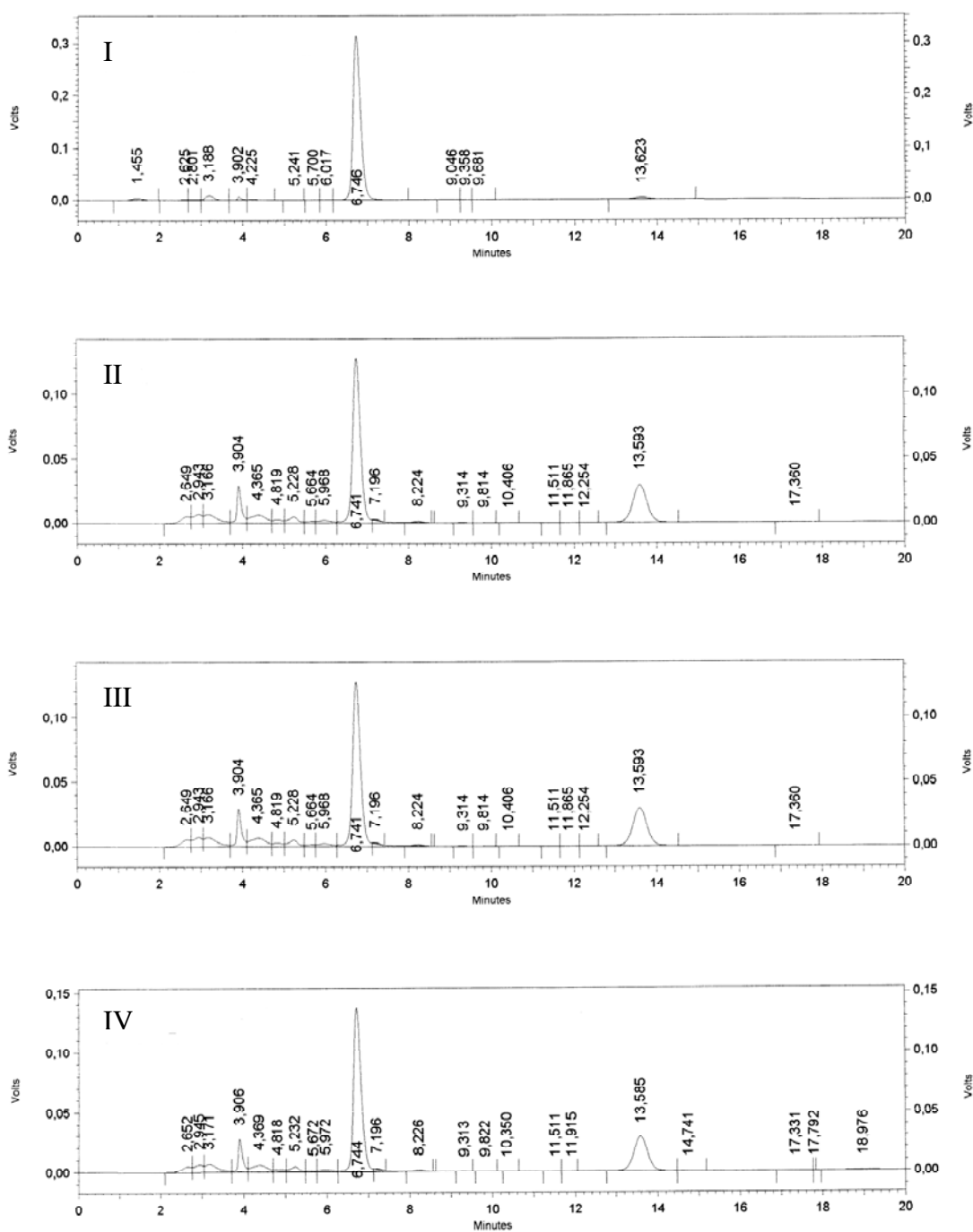


Figure 3 Chromatograms of ceftiofur sodium SQR not exposed in the time 0 (I), and exposed (II) to UVA radiation, Excenel[®] (III) and Topcef[®] (IV), exposed to UVA radiation, in aqueous solution after 24 h of irradiation. Chromatographic conditions as described in the text.

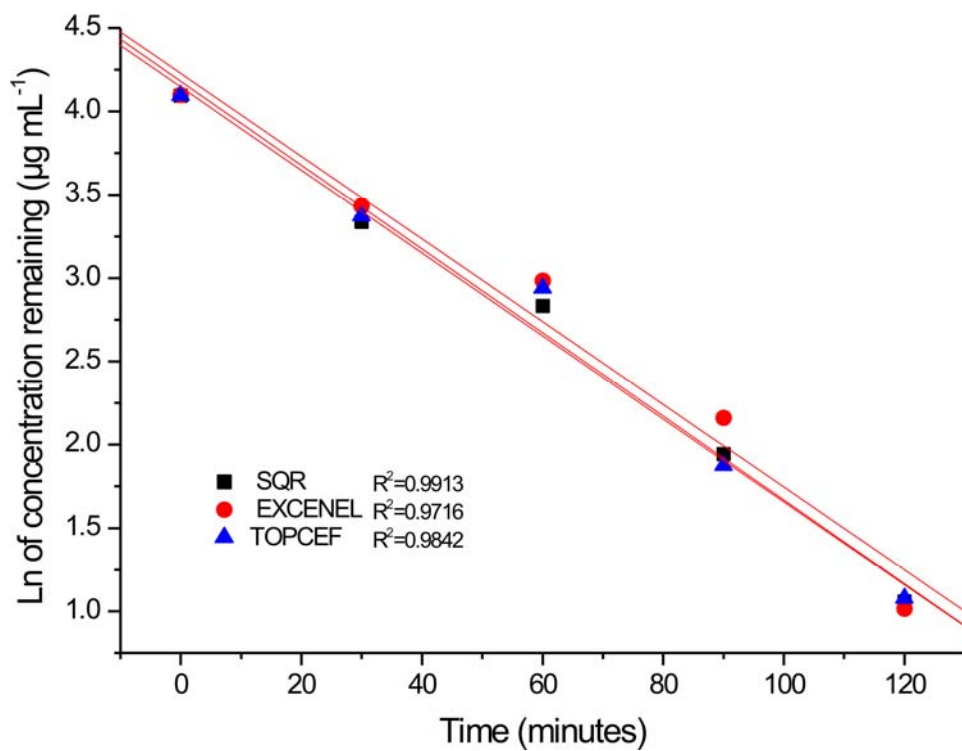


Figure 4 First-order plots for the degradation of ceftiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] irradiated with UVC (254 nm).

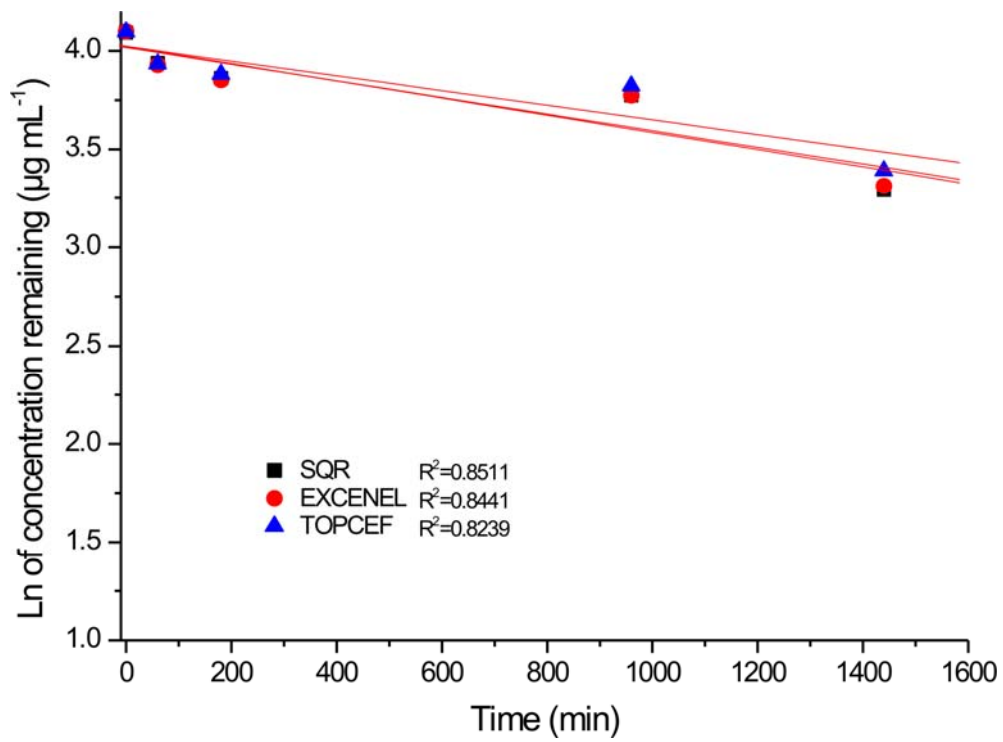


Figure 5 First-order plots for the degradation of ceftiofur sodium SQR, Excenel[®] and Topcef[®] irradiated with UVA.

DISCUSSÃO GERAL

Os avanços na área terapêutica, nas últimas décadas, têm permitido a introdução de novos fármacos e novas formas farmacêuticas com o intuito de satisfazer uma terapêutica mundial. No entanto, verifica-se que muitos destes novos fármacos, tanto para uso humano quanto veterinário, não possuem metodologia descrita em códigos oficiais, limitando, desse modo, a avaliação da qualidade dos mesmos.

O processo de desenvolvimento e validação de um método tem impacto direto na qualidade dos dados analíticos.

O exposto conduziu ao planejamento, desenvolvimento e validação de métodos analíticos usualmente descritos nos códigos oficiais e na literatura relacionada ao controle de qualidade de fármacos e medicamentos, os quais foram desenvolvidos e validados dentro dos parâmetros estabelecidos por órgãos nacionais e internacionais. A simplicidade de execução, o tempo de análise e o custo dos equipamentos necessários ao seu desenvolvimento foram fatores considerados, tendo em vista que se buscaram métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina.

Independente do método analítico escolhido, é de fundamental importância que o mesmo seja validado sob as condições definidas. Assim, para se conseguir alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessária a implantação de um sistema de garantia da qualidade, que incorpore as normas de Boas Práticas de Fabricação e de Laboratório, no qual os estudos de validação constituem parte essencial destas normas.

A análise qualitativa é importante na identificação da substância ativa em matérias-primas e formas farmacêuticas. Os métodos utilizados mostraram-se adequados para a finalidade proposta.

Os métodos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta e CLAE foram desenvolvidos para identificar o fármaco na forma farmacêutica. Os resultados obtidos pelas técnicas utilizadas confirmam a identidade do ceftiofur SQR, bem como na forma farmacêutica injetável dos dois produtos comerciais utilizados no estudo. Dessa maneira, as diferentes técnicas poderão ser utilizadas propiciando alternativas na escolha do método de análise.

Após definida a metodologia a ser utilizada neste estudo para a quantificação do ceftiofur, foram determinadas, por meio de estudos preliminares, as condições adequadas para a execução de cada método.

A espectrofotometria no ultravioleta constitui-se em uma técnica muito utilizada e de simples execução, tanto para a identificação como na quantificação de fármacos. Possui como principais vantagens o baixo custo operacional e a simplicidade. Todavia, em muitos casos pode não apresentar especificidade, o que poderá limitar a sua utilização. A espectrofotometria no UV é um método útil na avaliação em processo, considerando as características descritas.

Atualmente o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em vários laboratórios é considerado indispensável. Conhecer suas limitações, vantagens, componentes e critérios de escolha entre as opções de equipamentos é competência dos profissionais de laboratórios químicos, farmacêuticos e outros. Apresenta capacidade de realizar separações e análises quantitativas de inúmeros componentes presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com exatidão, precisão e sensibilidade.

Mesmo apresentando inúmeras vantagens, a CLAE também possui algumas restrições, como por exemplo o alto custo na aquisição da instrumentação nem sempre compensador para alguns laboratórios devido a um número reduzido de análises a serem realizadas e também da manutenção do equipamento. Todavia, deve-se considerar o desenvolvimento de laboratórios de controle de qualidade, em todo o país, onde este método tornou-se rotineiro. Dessa maneira é válida sua proposição para análises de substâncias antimicrobianas.

Conforme citado na revisão bibliográfica a CLAE tem sido largamente utilizada para determinação de ceftiofur e seus metabólitos em fluídos biológicos, leite e tecidos (HAMLOW, 1995; NAVARRE *et al.*, 1999; BAERE *et al.*, 2004; BAERE *et al.*, 2004; JACOBSON *et al.*, 2006; JACOBSON *et al.*, 2006; PUIG *et al.*, 2007; PUIG *et al.*, 2007). Nesses estudos, foram utilizadas condições cromatográficas complexas para separar o ceftiofur e seu metabólito, empregando tampões com diferentes valores de pH, diferentes concentrações e preparações. Entretanto, para a análise de antibióticos, matéria-prima e especialidade farmacêutica, procedimentos

mais simples e rápidos podem ser utilizados, conforme pode ser inferido por meio de monografias de outras cefalosporinas (USP 30, 2007; F. Bras. IV. 1988; B.Ph., 2005).

As propriedades físico-químicas do ceftiofur tiveram influência na definição dos parâmetros usados na escolha de métodos para a sua análise, tendo sido consideradas sua polaridade, solubilidade e absorção no UV.

Das diferentes fases móveis testadas no presente trabalho, encontrou-se como a mais adequada a mistura de tampão hidrogenofosfato dissódico diidratado (pH previamente ajustado para 6,0 com ácido ortofosfórico 85%) : acetonitrila (78:22, V/V). O tempo de retenção de aproximadamente 6,8 minutos demonstrou ser adequado para o estudo proposto e também para o estudo da estabilidade. Corroborando com a escolha da fase móvel para a determinação quantitativa por CLAE, pode-se verificar que os cromatogramas obtidos com a mesma apresentaram picos sem interferentes, conforme Figuras 2 e 3 do artigo publicado: "Development an Validation of an HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium" (SOUZA *et.al.* 2007a).

A realização do ensaio microbiológico requer um maior tempo de execução e maior experiência por parte do analista. Possui, no entanto, a vantagem que a potência do antibiótico pode ser demonstrada, avaliando dessa forma, a atividade do fármaco. Os resultados do desenvolvimento e a validação do ceftiofur sódico pelo método microbiológico por difusão em ágar foram publicados (SOUZA *et.al.* 2007b).

A validação foi conduzida com base nas guias ICH (2005), USP 30 (2007) e Resolução nº 899 (BRASIL, 2003), as quais contêm os parâmetros principais a serem avaliados durante a validação de um método analítico. Segundo o ICH (2005), os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão são essenciais para garantir o desempenho do método proposto para a quantificação da substância ativa. Os métodos apresentados nesse trabalho foram validados de acordo com esses parâmetros.

A linearidade foi demonstrada em todos os métodos, por meio da construção de curvas-padrão. As curvas foram construídas pelo método dos mínimos quadrados, as quais foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA).

Verificou-se que todas as análises realizadas forneceram regressão linear significativa, não apresentando desvio significativo da linearidade. Todos os métodos apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,999. Esses resultados indicam haver uma relação linear entre as concentrações utilizadas e as respectivas respostas obtidas.

A precisão foi demonstrada por ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados de desvio padrão relativo (DPR), obtidos para os métodos propostos, não excedeu o valor de 2%. Desse modo, pode-se dizer que os mesmos apresentaram elevada precisão sob as condições estabelecidas no estudo.

Outra característica analisada na validação foi a exatidão, a qual foi avaliada através do teste de recuperação. As médias de recuperação para todos os métodos foram próximas de 100%, indicando que os mesmos possuem exatidão adequada.

Na comparação dos métodos validados, CLAE, ensaio microbiológico e espectrofotometria na região do UV, através da análise de variância ANOVA, a avaliação estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os mesmos para um nível de significância de $p < 0,05$, indicando que se equivalem (ANEXO I).

Nos estudos preliminares de estabilidade verificou-se que a luz foi um importante fator de degradação para o ceftiofur. O estudo da cinética de fotodegradação realizado a partir do antibiótico em solução aquosa, por meio da exposição de soluções da SQR e dos produtos Excenel[®] e Topcef[®] à luz UVA e UVC, por diferentes tempos, demonstrou a sensibilidade do fármaco, apresentando degradação significativa nas condições estudadas.

Os resultados demonstraram que o ceftiofur SQR e os produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®] apresentam fotodegradação em solução aquosa em ambas as fontes de luz testadas. No entanto, a exposição à radiação UVA provocou um decréscimo menos acentuado no teor. As soluções apresentaram coloração amarela, a qual aumentou com o tempo de exposição.

A análise dos resultados dos cromatogramas obtidos na estabilidade acelerada do ceftiofur SQR e nos produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®]

demonstrou que ocorre a formação de produtos com semelhantes tempos de retenção após submetidos à luz UVC, para todas as amostras testadas. O produto de degradação majoritário possui tempo de retenção de aproximadamente 3,8 minutos, sendo mais polar que o ceftiofur que possui tempo de retenção de 6,8 minutos.

Os resultados obtidos dos cromatogramas na estabilidade acelerada do ceftiofur SQR e nos produtos comerciais demonstraram que ocorre a formação dos mesmos produtos de fotodegradação frente à luz UVA, para todas as amostras testadas, porém em tempo maior para ocorrer a degradação se comparado à luz UVC. O produto de degradação majoritário possui tempo de retenção de 13,6 minutos, sendo menos polar que o ceftiofur.

O método por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido e validado para a quantificação do ceftiofur mostrou ser adequado para o estudo da fotoestabilidade.

A velocidade de degradação e o tempo de vida útil do ceftiofur sódico SQR e dos produtos comerciais Excenel[®] e Topcef[®] em solução aquosa (60 µg/ml) na luz UVC e na luz UVA estão descritos na Tabela 3 do Capítulo 5 no artigo “Photodegradation kinetics of Ceftriaxone Sodium in Aqueous Solution Determined by LC Method”.

Com base nos gráficos obtidos foi possível atribuir à reação de fotodegradação do ceftiofur em solução, cinética de degradação de primeira ordem de reação para a exposição à luz UVA e UVC. Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k) e o tempo de vida útil ($t_{90\%}$) foram calculadas com base nas equações matemáticas preconizadas para a reação de primeira ordem.

CONCLUSÕES

- ✓ Os métodos qualitativos desenvolvidos (CLAE, CCD e espectrofotometria no UV), mostraram-se adequados para a identificação do ceftiofur na forma farmacêutica;
- ✓ A determinação de ceftiofur por espectrofotometria na região do ultravioleta a 292 nm, utilizando água como solvente, demonstrou ser linear, precisa e exata;
- ✓ A cromatografia líquida de alta eficiência, demonstrou ser exata, precisa, específica, linear e robusta, sendo adequada para a quantificação do ceftiofur e para ser empregada em estudos de estabilidade;
- ✓ O ensaio microbiológico – método de difusão em ágar, cilindros em placa, utilizando como microrganismo *Micrococcus luteus* ATCC 10240, apresentou linearidade, precisão e exatidão para a determinação quantitativa do ceftiofur nas amostras comerciais Excenel[®] e Topcef[®].
- ✓ A análise estatística dos métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico indicou que não há evidências de diferença significativa entre os teores médios encontrados pelos três métodos;
- ✓ Observou-se que o ceftiofur degrada rapidamente em meio alcalino e meio oxidante, temperatura e luz UVA e UVC;
- ✓ O método por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido para a quantificação do ceftiofur mostrou ser adequado para os produtos de fotodegradação, permitindo separação dos mesmos com adequada resolução. A partir dos cromatogramas, foi possível observar os produtos de degradação majoritários para as amostras submetidas à luz UVA e UVC.
- ✓ Os resultados obtidos na avaliação da cinética de estabilidade fotoquímica indicam tratar-se de uma reação de primeira ordem para as amostras submetidas à luz UVA e UVC.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; ANGEN, O. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 143-146, 2004.

ASBEL, L. E.; LEVISON, M. E. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 14, p. 435-447, 2000.

BAERE, De. S.; PILLE, F.; CROUBELS, L.; BACKER, De. P. High-performance liquid chromatographic-UV detection analysis of ceftiofur and its metabolite desfuroylceftiofur in horse plasma and synovial fluid after regional intravenous perfusion and systemic intravenous of ceftiofur sodium. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, p. 75-84, 2004.

BANTING, A.; MIGNOT, A.; LEFEBYRE, M. A. MILLERIOUX, L. STEFFAN, J.; GILBERTSON, T. J. **The Upjohn Company**; TR 788-9760-88-018, "Plasma Profile and Pharmacokinetic Parameters in Calves After Single (IV and IM) and Multiple Dose Administration (IM) of Ceftiofur Sodium, 1989.

BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**. São Paulo, v.2, p. 175-177, 2002.

BECONI-BARKER, M. G.; ROOF, R. D.; MILLERIOUX, L.; KAUSCHE, F. M.; VIDMAR, T. J.; SMITH, E. B.; CALLAHAN, J. K.; HUBBARD, V. L.; SMITH, G. A.; GILBERTSON, T. J. Determination of ceftiofur and its desfuroylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatographic. **Journal of Chromatography B**, v. 673, p. 231-244, 1995.

BELLIDO, F.; PECHERE, J. C.; HANCOCK, R. E. W. Reevaluation of the factors involved in the efficacy of new beta-lactams against *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 35, p. 73-8, 1991.

BERTHE, J. **Centre Des Recherches Clin-Midy**. Code Nomenclature: T0010-00, Direction Des Recherches Sanofi, Montpellier, France: Etude de la Toxicité Aigue de CM31916 (Etude Preliminaire), 1982.

BO, G. Giuseppe Brotzu and discovery of cephalosporins. **Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 6 (suppl 3), p. 6-8, 2000.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE nº 899 de 20 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União** 02.06.2003.

_____ Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União** 01.08.2005.

BRISSE, S.; DUIJKEREN, E. van. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 307-312, 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA, Her Majesty's Stationary Office, London, 2005.

BRUNO, F.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERRI, R.; Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 3463- 3470, 2001.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS: Food and Drug Administration. Washington: office of the **Federal Register**. Title 21, parts 300 to 499, 1998.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS: Food and Drug Administration. Washington: office of the **Federal Register**. Title 21, v. 6, parts 500 to 599, 1999.

CHANG, C.; YEH, T.; CHOU, C.; CHANG, Y.; CHIANG, T. Antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v. 84, p. 169-177, 2002.

CRAIGMILL, A., WETZLICH, S., BULGIN, M., LANE, M. Farmacokineits of ceftiofur sodium in sheep. **Acta Veterinary Scand.** V.87, p. 120-122, 1991.

DALHOFF, A. Antibiotics and Chemotherapy, Ed. Karger, New York, pp 148, 1998.

DESHPANDE, L.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. *In vitro* activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum beta lactamase producing strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 15, p. 271-275, 2000.

DIXON, B. A.; ISSVORAN, G. S. The activity of ceftiofur sodium for *Aeromonas spp.* Isolated from ornamental fish. **Journal Wildlife Disease**, v. 28, p. 453-6, 1992.

DUIJKEREN, Van. E.; KLINGEREN Van. A. S. J. P. A. M. *In vitro* susceptibility to antimicrobial drugs of 62 Salmonella strains isolated from horses in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 19-26, 1995.

DUMONCEAUX, G.; ISAZA, R.; KOCH, D. E.; HUNTER, R. P. Pharmacokinetics and i.m. bioavailability of ceftiofur in Asian elephants (*Elephas maximus*). **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutical**, v. 28 , p. 441-446, 2005.

DUNN, M. J.; HAHN, D. A. Aqueous high-performance size-exclusion chromatographic assay for high-molecular-weight impurities in ceftiofur sodium. **Journal of Chromatography**, v. 595, p. 185-192, 1992.

Eur. Ph. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4 ed. Strasbourg: Ed. Council of Europe, 2005.

ERSKINE, R.J.; WILSON, R. C.; TYLER, J. W.; McCLURE, K. A.; NELSON, R. S.; SPEARS, H. J.. Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental *Escherichia coli* - induced mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 481-485, 1995.

FABRE, H.; HUSSAM EDDINE, N.; BERGE, G. Degradation kinetics in aqueous solution of cefotaxime sodium, a third-generation cephalosporin. . **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 611-618, 1984.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo, Atheneu, Parte I, 1988.

FDA Animal drugs, feed, and related products: ceftiofur sterile powder. **Federal Register**, v. 53, p. 5365 – 5370, 1988.

FDA. Food and Drug Administration. Implantation or injectable dosage form: new animal health drugs not subject to certification: ceftiofur sterile powder. **Federal Register**, v. 56, p. 12119, 1991.

_____. Implantation or injectable dosage form new animal drugs. **Federal Register** .Title 21, v. 6. Part 522, p. 215-216, 1999.

FUBARA, J. O.; NOTARI, R. E. Influence of pH, temperature and buffers on cefepime degradation kinetics and stability predictions in aqueous solutions. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 87, p. 1572-1576, 1998.

GILMAN, A.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, F. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9th ed. 1996, 1436 p. p. 802-811:Quimioterapia das Doenças Microbianas.

GOUDAH, A. Pharmacokinetics of ceftiofur after single intravenous and intramuscular administration in camels (*Camelus dromedarius*). **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutical**, v. 30, p. 371-374, 2007.

GREENHILL, J. V.; McLELLAND, M. A. Photodecomposition of drugs. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 51-121, 1990.

HALSTEAD, S. L.; WALKER, R. D.; BAKER, J. C.; HOLLAND, R. E.; STEIN, G. E.; HAUPTMAN, J. G. Pharmacokinetic evaluation of ceftiofur in serum, tissue chamber fluid and bronchial secretions from healthy beef-breeds calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 269-274, 1992.

HAMLOW, P. J. HPLC analysis for the determination of ceftiofur residues in bovine and swine plasma, sop 7926/289/09. a. **Animal Health Drug Metabolism**, 7926, Upjohn Laboratories, 22 february, 1995.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical Analysis**, A Rational Approach, Interpharm/CRC, New York, p. 244, 2003.

HORNISH, R. E.; KOTARSKI, S. F. Cephalosporins in veterinary medicine ceftiofur use in food animals. **Curr Top Med Chem**. v. 2, p. 1558-64, 2002.

ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, 2005.

_____. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Stability Testing of New Drug Substances and Products- Q1A(R2)* 2003.

JACOBSON, G. A.; MARTINOD, S.; CUNNINGHAM, C. P. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 1249-1252, 2006.

JELINSKA, A.; DOBROWOLSKI, L.; OSZCZAPOWICZ, I. The influence of pH, temperature and buffers on the degradation kinetics of cefetame pivoxil hydrochloride in aqueous solutions. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1273-1277, sep, 2004.

JONES, R. N. β -lactamase production by enteric bacilli. In: Moellering, R. C., editor. Therapeutic Decision-Making: Treatment with β -lactamase Inhibitor Combinations. Montreal: **PharmaLibri**, p. 45-54, 1999.

KEEVER, J.; VOYKSNER, R. D.; TYCZKOWSKA, K. L. Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 794, p. 57-62, 1998.

KLEIN, L. K.; YANCEY, R. J. GOODENOUGH, K. R.; KINNEY, M. L.; ROBERTS, B. J. **The Upjohn Company**: TR 705-7922-85-003. *In vitro* and *In Vivo* Evaluation of the Monobactam Antibiotics, U70, 887B AND U71, 689B, Compared to Aztreonam and Ceftiofur Against Bacterial Pathogens of Veterinary Importance, 1985.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Edição 2005/2006. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LACHMAN, L.; DE LUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LERNER, D. A.; BONNEFOND, G.; FABRE, H.; MANDROU, B.; *et al.* Photodegradation paths of cefotaxime. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 699-703, 1988.

MAKESWARAN, S.; PATTERSON, I.; POINTS, J. An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 151-157, 2005.

MARSHALL, L. E.; BLAIR, J. E. The cephalosporins. **Mayo Clin. Proc.**, v. 74, p. 187-195, 1999.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25; p. 831-856, 1999.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

MOATS, W. A.; HARIK-KHAM, R. J. "Liquid chromatographic determination of β -lactam antibiotics in milk: A multiresidue approach" **Journal Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 78, p. 49-54, 1995.

MORSCH, L. M. **Cloridrato de cefetamete pivoxila: validação de metodologia de análise e estudo da estabilidade.** 2002. 183f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

NAVARRE, C. B. ZHANG, L.; SUNKARA, G.; DURAN, S. H.; KOMPELLA, U. B. Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. **Journal Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 22 , n.1, p.13-9. 1999.

NEU, H. C. Relation of structural properties of beta lactam antibiotics to antibacterial activity. **Am. J. Med.**, v. 79 (Suppl 2A), p. 2-13, 1985.

NEU, H. C. Beta-lactam antibiotics structural relationships affecting *in vitro* activity and pharmacological properties. **Rev. Infectious Diseases.**, v. 8 (Suppl 3) S 237-59, 1986.

NEU, H. C. Third generation cephalosporins: safety profiles after 10 years of clinical use. **Journal Clinical Pharmacology**, v. 30, p. 396-403, 1990.

NIKAIDO, H.; LIU, W.; ROSENBERG, E. Outer membrane permeability and beta-lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v. 28, p. 669-76, 1991.

NORBY, S. R. Side effects of cephalosporins. **Drugs**, v. 34 (Suppl. 2), p. 105-120, 1987.

NUDELMAN, N. E. E. **Estabilidad de Medicamentos.** Buenos Aires, ed. Atheneu, 1975. 187p.

OWENS, W. E.; XIANG, Z. Y.; RAY C. H.; NICKERSON, S. C. Determination of milk and mammary tissue concentrations of Ceftiofur after intramammary and intramuscular therapy. **Journal Dairy Science.** , v. 73, p. 3449-3456, 1990.

PEREIRA, O. A. **Substâncias Farmacêuticas Comerciais.** Rio de Janeiro, ABIQUIF 2ª ed., p. 504, 2002.

PFIZER Saúde Animal. **Catálogo de Produtos** Laboratórios Pfizer Ltda, p. 270, 2003

POST, K.W.; SONGER, J. G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. **Anaerobe**, v. 10, p. 47-50, 2004.

PRICE, K. E., MCGREGOR, D. N. Basic design of beta-lactam antibiotics cephalosporins. **Scand. Journal Infectious Diseases.**, Suppl 42, p. 50-63, 1994.

PUIG, P.; TEMPELS, F. W.; BORRULL, F.; CALLULL, M.; AGUILAR, C.; SOMSEN, G. W.; de JONG, G. J. On – line coupling of solid-phase extraction and capillary electrophoresis for the determination of cefoperazone and ceftiofur in plasma. **Journal Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v.2, p. 365-370 2007.

RABOUAN-GUYON, S. M.; GUET, A.F. COURTOIS, P. Y.; BARTHES, D.M.C. Stability study of cefepime in different infusion solutions. **International Journal of Pharmaceutics** v. 154, p. 185-190. 1997.

SADER, H. Será o fim da era dos antibióticos? **Revista Ser Médico**, ed. 21, out. 2002.

SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J.; CASE, C. A., Minimum Inhibitory Concentrations for Ceftiofur and Desfuroylceftiofur with Isolates of Veterinary Importance. **The Upjohn Company**: TR 705-7923-93-007, 1993.

SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; CASE, C. A; YANCEY, R. J. Minimum Inhibitory concentrations for ceftiofur and comparator antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark.. **The Upjohn Company**: TR N° 705-7923-94-020, 1994.

SALMON, S. A.; WATTS, J. L.; CASE, C. A.; HOFFMAN, L. J.; WEGENER, H. C.; YANCEY, R. J. Jr. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2435-44, 1995.

SANDERS, C. C.; SANDERS W. E. Jr. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. v. 15, p. 824-839, p. 1992.

SANTOS,N. Jr.; MORETTO, L. D. **Estabilidade de Fármacos e Medicamentos**, v.6, São Paulo, Febrapharma, 2005, p.69.

SIWEK, J.; ZAJAC, M. Kinetics of hydrolysis of ceftazidime in aqueous solutions. **Acta Pol. Pharm.** v. 52, p. 21-30, 1995.

SHRYOCK, T. R.; WHITE, D. W.; WERNER, C. S. Antimicrobial Susceptibility of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 305-309, 1998.

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

SOUZA, M. J.; NOGUEIRA, D. R.; SILVA, L. M.; AREND, M. Z.; SOUZA FILHO, P.S.; BERGOLD, A. M. Development and Validation of na HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium. **Chromatographia** v.65, p.401-406, 2007a.

SOUZA, M. J.; ROLIM, C. M. B.; MELO, J.; SOUZA FILHO, P. S., BERGOLD, A. M. Development of a microbiological assay to determine the potency of the antibiotic ceftiofur sodium powder. 2007. **The Journal of AOAC International**, v. 90, p.1-6, 2007b.

STANEK, C.; KOFLER, J. Use of sodium ceftiofur in the combined therapy of complicated septic diseases in cattle Tierärztliche Praxis. **Ausgabe G. Grosstiere Nutztiere**, v. 26, p. 314-7, 1998.

STEAD, S.L.; ASHWIN, H.; RICHMOND, S.F.; SHARMAN, M.; LANGEVELD, P.C.; BARENDSE, J.P.; STARK, J.; KEELY, B.J. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest[®] SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p 3-11, 2008.

STRAUB, R.; LINDER, M.; VOYKSNER, R. D. Determination of β -Lactam Residues in Milk Using Perfusive-Particle Liquid Chromatography Combined With Ultrasonic Nebulization Electrospray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 3651-3658, 1994.

SUNKARA, G.; NAVARRE, C. B.; KOMPELLA, U. B. Influence of pH and Temperature on kinetics of ceftiofur degradation in aqueous solutions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.249-255, 1999.

THE INDEX MERCK, Merck, Thirteenth edition, Rahway, 2001.

TONESSEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

TYCZKOWSKA, K. L.; VOYKSNER, R. D.; Straub, R. F.; ANDERSON, K. L.; ARONSON, A. L. Determination of Ceftiofur And Its Metabolite Desfuroylceftiofur In Bovine Serum and Milk By Ion-Paired Liquid Chromatography . **Journal of Chromatographic**, v. 614, p. 123-134, 1993.

TYCZKOWSKA, K. L.; VOYKSNER, R. D.; Straub, R. F.; ANDERSON, K. L.; ARONSON, A. L. Simultaneous multiresidue analysis of β -lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection and confirmation by electrospray mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. v.77, p. 11200-1131, 1994.

UNB. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Celular. Brasília 2007. Disponível em:
<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html#mecanismos>
Acesso em: 24 nov. 2007.

USP, 30. **The United States Pharmacopeia** Rockville, MD20852, United States Pharmacopeial Convention Inc., 2007.

VILANOVA, B.; MUNOZ, F.; DONOSO, J.; FRAU, J.; *et al.* Alkaline hydrolysis of cefotaxime. A HPLC and ¹H NMR Study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 322-327, 1994.

WANG, D.; NOTARI, R.E. Cefuroxime hydrolysis and stability predictions in aqueous solution, **Journal Pharmaceutical Science**, v. 83, p. 577-81, 1994.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**, Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 382p.

WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Jr.; SALMON, S. A.; CASE, C. A. A 4 – year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory diseases in North America. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, p. 725- 31, 1994.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, v. 279, p. 996-997, 1998.

YANCEY, R. J.; KINNEY, M. L.; ROBERT, B. J.; GOODENOUGH, K. R.; HAMEL, J. C.; FORD, C. W. Ceftiofur sodium, a broad spectrum cephalosporins: evaluation *in vitro* and *in vivo* in mice. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 1050-1053, 1987.

YANCEY, R. J. ROBERTS, B. J.; FOLZ, S. D. **The Upjohn Company**: TR 705-7923-91-020. *In vitro* Activity of Ceftiofur Sodium (U-64, 279E) for Urinary and Respiratory Tract Pathogens of Companion Animals, 1988.

YEIN, F. S.; ZAYA, M. J.; ARNOLD, T. S.; HOFFMAN, G. A.; ROOF, R. D.; DAME, K. J.; COX, T., D.; REEVES, D. R.; FLOOK, T. F. **The Upjohn Company**: TR 796-9760-89-002. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of ¹⁴C-Ceftiofur (U-64, 279E) Sodium in the Swine, 1990.

ZAJAC, M.; MUSIAL, W.; PAWLOWISKI, T. Stability of cefotaxime sodium in solid state. **Pharmazie**, v. 55, p. 917-918, 2000.

ZHOU, M.; NOTARI, R. E. Influence of pH, temperature and buffers on the kinetics of ceftazidime degradation in aqueous solutions. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 534-8, 1995.

ZURENKO, G. E.; YAGI, B. H. **The Upjohn Company**: TR 7254-090-098. The *In vitro* Activity of Ceftiofur Sodium (U-64279E) and Desfuroylceftiofur (U-75104) Against Human Bacterial Clinical Isolates, 1990.

Tabela I. Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas para as curvas padrão de ceftiofur, por CLAE.

| Fontes de variação | GL | Soma de Quadrados | Variância | F calculado | F tabelado |
|-----------------------|----|--------------------------|--------------------------|-------------|------------|
| Tratamentos | 5 | $1,05806 \times 10^{14}$ | $2,11661 \times 10^{13}$ | 3889,51* | 3,1 |
| Regressão | 1 | $1,05795 \times 10^{14}$ | $1,05795 \times 10^{14}$ | 19445,63* | 4,75 |
| Desvio da Linearidade | 4 | $1,04805 \times 10^{10}$ | $2,6201 \times 10^9$ | 0,48 | 3,26 |
| Dentro (resíduo) | 12 | $6,52870 \times 10^{10}$ | $5,44058 \times 10^9$ | | |
| Total | 17 | $1,05871 \times 10^{14}$ | | | |

*significativo para $P < 0,05$

Tabela II Análise estatística (ANOVA) das absorvâncias determinadas para obtenção da curva padrão do ceftiofur por espectrofotometria no UV.

| Fontes de variação | GL | Soma de Quadrados | Variância | F calculado | F tabelado |
|-----------------------|----|-------------------|-----------|-------------|------------|
| Tratamentos | 5 | 1,3585 | 0,27170 | 63514,71 | 3,48 |
| Regressão | 1 | 1,3561 | 0,35612 | 317014,98 | 4,96 |
| Desvio da Linearidade | 4 | 0,0024 | 0,00060 | 1,39 | 3,71 |
| Dentro (resíduo) | 12 | 0,0001 | 0,00000 | | |
| Total | 17 | 1,3586 | | | |

*significativo para $P < 0,05$

Tabela III. Análise de variância dos dados experimentais do ensaio microbiológico do ceftiofur, pelo método de difusão em ágar - cilindros em placas.

| Fontes de variação | GL | Soma de Quadrados | Variância | F calculado | F tabelado |
|-----------------------|----|-------------------|-----------|-------------|------------|
| Preparação | 1 | 0,016 | 0,016 | 0,20 | 4,24 |
| Regressão | 1 | 318 | 318 | 3923,54* | 7,77 |
| Desvio de Paralelismo | 1 | 0,137 | 0,137 | 1,68 | 4,24 |
| Desvio de Linearidade | 1 | 0,175 | 0,087 | 1,08 | 3,38 |
| Entre doses | 5 | 318,391 | 63,678 | 785,52* | 2,60 |
| Entre placas | 5 | 0,403 | 0,081 | 0,99 | 2,60 |
| Dentro (erro) | 25 | 2,027 | 0,081 | - | 2,06 |
| Total | 35 | 320,8 | - | - | - |

*significativo para $P < 0,05$

Tabela IV. Resultados experimentais obtidos para o doseamento de ceftiofur, pelos métodos avaliados.

| Produto | Amostra N° | CLAE ^a (%) | Média (%) | R.S.D (%) | Microb ^b (%) | Média (%) | R.S.D (%) | UV ^c (%) | Média (%) | R.S.D (%) |
|---------|------------|-----------------------|-----------|-----------|-------------------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|-----------|
| A | 1 | 99,82 | 100,4 | 0,6 | 100,12 | 100,58 | 0,8 | 100,67 | 101,0 | 0,3 |
| | 2 | 100,86 | 1 | | 100,93 | | | 101,30 | 5 | |
| | 3 | 100,22 | | | 99,79 | | | 100,66 | | |
| | 4 | 101,40 | | | 101,65 | | | 100,92 | | |
| | 5 | 99,95 | | | 99,70 | | | 101,51 | | |
| | 6 | 100,22 | | | 101,34 | | | 101,20 | | |
| B | 1 | 100,93 | 100,6 | 0,2 | 100,26 | 100,81 | 0,6 | 100,56 | 100,1 | 0,4 |
| | 2 | 100,86 | 1 | | 100,15 | | | 99,82 | 6 | |
| | 3 | 100,59 | | | 100,82 | | | 100,24 | | |
| | 4 | 100,46 | | | 100,79 | | | 100,70 | | |
| | 5 | 100,72 | | | 101,54 | | | 99,92 | | |
| | 6 | 100,12 | | | 101,14 | | | 99,71 | | |

^a Cada valor é média de 3 injeções.

^b Cada valor é média de 6 determinações.

^c Cada valor é média de 3 determinações.

Tabela V. Análise de variância dos resultados experimentais do doseamento do ceftiofur (Excenel[®]), pelos métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar, cilindros em placa.

| Fonte de variação | GL | Soma de quadrados | Quadrado médio | F calculado | F crítico* |
|-------------------|----|-------------------|----------------|-------------|------------|
| Entre grupos | 2 | 1,274478 | 0,637239 | 1,625914 | 3,68232 |
| Dentro dos grupos | 15 | 5,8789 | 0,391927 | | |
| Total | 17 | 7,153378 | | | |

*significativo para $p < 0,05$.

Tabela VI. Análise de variância dos resultados experimentais do doseamento do ceftiofur (Topcef[®]), pelos métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar, cilindros em placa.

| Fonte de variação | GL | Soma de quadrados | Quadrado médio | Fcalculado | Fcrítico* |
|-------------------|----|-------------------|----------------|------------|-----------|
| Entre grupos | 2 | 1,2531 | 0,62655 | 3,546844 | 3,68232 |
| Dentro dos grupos | 15 | 2,64975 | 0,17665 | | |
| Total | 17 | 3,90285 | | | |

*significativo para $p < 0,05$.

ANEXO 2: Pareceres da banca examinadora

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: "Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo da estabilidade"

Doutoranda: MARINÊS JOST E SOUZA

PARECER

Após analisar a tese "Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo da estabilidade" observa-se tratar-se de desenvolvimento de tema importante para o controle de qualidade de cefalosporina de terceira geração: ceftiofur. O trabalho está bem estruturado e escrito e a metodologia empregada é adequada e atual. A execução da pesquisa oportunizou a elaboração de quatro trabalhos científicos: dois publicados, um aceito e um submetido, todos em periódicos de bom impacto, aportando subsídios importantes ao controle de qualidade de fármacos e medicamentos estudados. Considera-se o trabalho aprovado, recomendando-se a concessão do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas a Marinês Jost e Souza.

Elfrides Eva Scherman Schapoval

Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Porto Alegre, 7 de outubro 2008.

Formação 28 JAN 2005

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: "Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo da estabilidade"

Doutoranda: MARINÊS JOST E SOUZA

P A R E C E R

Trata-se de trabalho de tese estruturado na forma de encarte de artigos publicados ou submetidos à publicação, que abrangem o desenvolvimento e validação de métodos analíticos por CLAE, espectrofotometria no UV e microbiológicos. A metodologia está bem descrita e é consistente com os objetivos propostos, que, por sua vez, são claros e bem delimitados. De modo geral. A Relevância do Tema e a Discussão estão alicerçados sobre uma revisão bibliográfica atual e são pertinentes ao tema. Da avaliação geral, pode-se concluir que a tese apresentada reúne méritos científicos e acadêmicos suficientes, pelo que sou pela aprovação dessa na forma apresentada e, conseqüentemente, de parecer favorável à concessão do título de doutor


Prof. Dr. George González Ortega
Porto Alegre, 13 de outubro de 2008.

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

Nível: Doutorado


Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS.

Título: Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo da estabilidade.

Doutoranda: MARINÊS JOST E SOUZA

P A R E C E R

A tese descreve os resultados detalhados de um trabalho que aborda diferentes aspectos do controle da qualidade do ceftiofur sódico, um antibiótico da classe das cefalosporinas. O trabalho apresenta mérito científico, representado pelo desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação qualitativa e quantitativa de um fármaco não descrito nos compêndios oficiais. Descreve, além dos métodos de análise qualitativa e quantitativa, o estudo da estabilidade fotoquímica do ceftiofur sódico. Os objetivos propostos foram plenamente alcançados e foram respaldados por metodologia adequada. Os resultados foram explorados com coerência e encontram-se, em sua maioria, disponíveis para consulta em periódicos científicos de nível internacional. A literatura utilizada no desenvolvimento da metodologia é pertinente e atual. Em seu conjunto, o trabalho aporta conhecimento novo e cientificamente adequado para uma tese de doutorado. Baseado no exposto, sou de parecer favorável à sua aprovação e à concessão do Grau Acadêmico de Doutor à Marinês Jost e Souza.


Prof. Dr. Margareth Linde Athayde
Porto Alegre, 7 de outubro de 2008.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS

Título: "Desenvolvimento de metodologia para análise de cefotiofur sódico e estudo da estabilidade"

Doutoranda: MARINÊS JOST E SOUZA

PARECER

A presente tese trata-se de trabalho científico de mérito, bem delineado e escrito. Aborda tema atual e relevante no âmbito das Ciências Farmacêuticas. Traz importante contribuição ao controle de qualidade do cefotiofur, aliado a métodos analíticos atuais e bem conduzidos. Os objetivos definidos foram atingidos, sendo que os resultados possibilitaram a publicação de artigos científicos em periódicos de impacto. Face ao exposto, sou de parecer favorável à aprovação da tese e concessão do grau de doutora em Ciências Farmacêuticas a Marinês Jost e Souza.

Adams

Profa. Dr. Andrea Inês Horn Adams
Porto Alegre, 07 de outubro de 2008.

Nome: Marinês Jost e Souza

Data de nascimento: 14/03/1962

Graduação:

Farmácia (1982-1985): Universidade Federal de Santa Maria

Farmácia Bioquímica Tecnologia de Alimentos (

Farmácia Industrial (1996-1998): Universidade Federal de Santa Maria

Pós-Graduação:

Nível: Mestrado (março 1999 à janeiro 2001)

Dissertação: Enrofloxacino: Desenvolvimento de Metodologia de Análise e Estudo da Estabilidade

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

Nível: Doutorado (2005-2008)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Atuação Profissional:

ANVISA-ESPECIALISTA EM REGULAÇÃO E VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Gerência Geral de Inspeção de Insumos, Medicamentos e Produtos. GGIMP/GIMEP.

13/03/2007 até data atual.

UFSM-FARMACÊUTICA DO DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA INDUSTRIAL –

Participação em atividades voltadas à pesquisa e controle de qualidade de medicamentos e insumos farmacêuticos. Analista da área de controle microbiológico do Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos (CTEFAR), integrante dos laboratórios REBLAS. 1987 até 13/03/2007.

Lista de Publicações:

SOUZA, M.J.; Canedo, N.A.P.; Souza Filho, P. S., Bergold, A. M. Development of a Ultraviolet Spectrophotometric Method for the Determination of Ceftiofur Sodium Powder. Aceito para publicação no periódico The Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2008.

SOUZA, M. J.; Nogueira, D. R.; Silva, L. M.; Arend, M. Z.; Souza Filho, P.S.; Bergold, A. M. Development and Validation of na HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium, v.65, p.401- 406, 2007a.

SOUZA, M. J.; Rolim, C. M. B.; Melo, J.; Souza Filho, P. S., Bergold, A. M. Development of a microbiological assay to determine the potency of the antibiotic ceftiofur sodium powder. 2007. The Journal of AOAC INTERNATIONAL, v. 90, Nº 6, p.1-6, 2007b.

SOUZA, M. J.; Bittencourt, C. F.; Souza Filho, P. S. Microbiological Assay for Enrofloxacin injection. International Journal of Pharmaceutics, Holanda, v. 271, p. 287-291, 2004.

SOUZA, M. J.; Bittencourt, C. F.; Morsch, L. M. LC Determination of Enrofloxacin. Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, USA, v. 28, n. 6, p. 1195-1199, 2002.

SOUZA, M. J.; Bittencourt, C. F.; Fontoura, A. I.Determinação Microbiológica de Enrofloxacino na Forma Farmacêutica Pó para Injetável. Revista de Farmácia e Química, São Paulo SP, v. 32, n. 2, p. 28-28, 1999.

MORSCH, L. M.; Souza, M. J.; Bittencourt, C. F.; Milano, J. LC method for the analysis of cefetamet pivoxil hydrochloride in drug substance and powder for oral suspension. Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, USA, v. 30, n. 3, p. 643-649, 2002.

SCHMIDT, C. A; Souza, M. J.; Kulmann, R. R.; Nogueira, D. R.; Zimmermann, E. S.; Silva, L. M.; Schmidt, C. A. Development and in-house validation of a microbiological assay for determination of cefepime in injectable preparations. The Journal of AOAC INTERNATIONAL, v.89, Issue 5, p. 1367 – 1372, 2006.

MELO J., Hurtado, F. K., Prado, A. W., Souza, M. J., Rolim, C. M. B. Validation of HPLC and UV Spectrophotometric Methods for the Determination of Bezafibrate in Pharmaceutical Formulations. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.31, p. 269–280, 2008.