

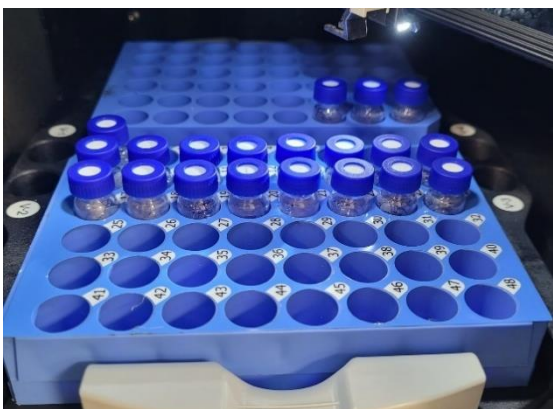


**TECNOLOGIA  
BARREIRO**

ESCOLA SUPERIOR  
POLITÉCNICO SETÚBAL

DANIELA MIRANDA  
SILVA MARQUÊS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
ANALÍTICO PARA DETEÇÃO DE 8  
CEFALOSPORINAS**



Relatório de Estágio do Mestrado em  
Engenharia Biológica e Química

**ORIENTADORA**

Professora Doutora Ana Cláudia Cavaco de  
Sousa Coelho

**SUPERVISORA**

Mestre Anabela Simões Supico Santos Silva

Dezembro de 2025

DANIELA MIRANDA  
SILVA MARQUÊS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
ANALÍTICO PARA DETEÇÃO DE 8  
CEFALOSPORINAS**

**JÚRI**

*Presidente:* Professora Doutora Maria de Lurdes de Figueiredo Gameiro, ESTBarreiro/IPS

*Orientadora:* Professora Doutora Ana Cláudia Cavaco de Sousa Coelho, ESTBarreiro/IPS

*Vogal:* Professora Doutora Ana Gabriela Gonçalves Neves Gomes, ESTBarreiro/IPS

À minha avó



## AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha avó, que já não pôde presenciar a sua conclusão, mas cuja força, orgulho e amor sempre me guiaram. Foi ela quem mais desejou que eu terminasse o meu “cursinho”, acreditando profundamente que este caminho me daria independência e segurança. Este marco é, em grande parte, fruto do que me ensinou e do que sempre representou para mim.

Agradeço a todos os colaboradores da Hikma, que me acolheram com uma generosidade que jamais esquecerei. À minha supervisora, Eng.<sup>a</sup> Anabela Supico, expresseo a minha sincera gratidão pelo cuidado, orientação e disponibilidade demonstrados desde o primeiro dia. À equipa de Controlo de Qualidade da Hikma II — Carlita, Jojo, Pereira, Cláudia, Baby, Inês e Martinha — agradeço por me acompanharem de perto, pelo apoio constante e pela forma tão humana com que me ajudaram a ultrapassar cada desafio.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Gameiro, manifesto o meu profundo reconhecimento pela atenção e empenho em estabelecer o contacto com a empresa e por viabilizar este estágio. À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Coelho, agradeço por me ter acolhido como sua orientanda, pela sua preocupação genuína, orientação atenta e disponibilidade incansável. E extendo este agradecimento a todos os professores da ESTBarreiro, cujos ensinamentos, dedicação e exigência foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos, o meu muito obrigada pela paciência, palavras certas nos momentos difíceis e por estarem sempre presentes ao longo desta caminhada. Ao meu namorado, agradeço por tornar este percurso imensamente mais leve, por cada gesto de apoio e por caminhar ao meu lado com tanta compreensão e carinho.

À minha família, agradeço de coração por acreditarem em mim, e por me acompanharem e apoiarem de forma tão incondicional. Cada conquista minha é também vossa.

Por fim, a todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para este trabalho e não foram mencionados individualmente, deixo o meu mais sincero obrigada.



## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para detetar oito cefalosporinas produzidas na unidade Hikma II — Cefuroxime, Ceftriaxone, Ceftizoxime, Cefoxitin, Cefotaxime, Cefazolin, Cefepime e Ceftazidime — no contexto das atividades de *containment* do Controlo de Qualidade.

O método anteriormente utilizado por HPLC não permitia a deteção de Cefepime e Ceftazidime, o que justificou a necessidade de implementação de um procedimento que que incluísse todos os compostos monitorizados na instalação.

Assim, avaliou-se a transferência do método usado em HPLC para UPLC, procurando melhorar o tempo de análise e a capacidade de deteção.

A etapa de desenvolvimento incluiu o estudo de várias colunas cromatográficas, composições de fase móvel e condições operatórias, com o objetivo de alcançar separação completa das oito cefalosporinas, resolução mínima de 1 e relação sinal-ruído acima de 10.

Após testes comparativos, verificou-se que a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (1,7 µm, 2,1×50 mm), associada à fase móvel composta por tampão fosfato de pH 4,0, metanol e acetonitrilo na proporção 88:5:7, apresentou o desempenho mais adequado, permitindo a eluição clara dos compostos e tempos de corrida compatíveis com a rotina laboratorial.

Foram também comparadas diferentes zaragatoas utilizadas no processo de amostragem ao que os ensaios evidenciaram que a zaragatoa Texwipe TX761K apresentava o comportamento mais adequado à fase móvel e às condições instrumentais estudadas, sendo por isso selecionada para os ensaios subsequentes.

Definidas as condições operatórias, procedeu-se à validação do método segundo as diretrizes ICH Q2 e o procedimento interno da Hikma Farmacêutica Portugal. Os parâmetros avaliados foram: adequabilidade do sistema, precisão, linearidade, limites de deteção e quantificação, exatidão em *swab challenge* e *surface test*, gama, estabilidade das soluções e especificidade perante placebo e amostras sujeitas a degradação térmica e luminosa.

Os resultados mostraram que o método cumpre os requisitos estabelecidos para cada um dos parâmetros, cumprindo assim com o objetivo.

**Palavras-Chave:** cefalosporinas, *containment*, HPLC, UPLC, validação.



## ABSTRACT

The present work aimed to develop and validate an analytical method to detect eight cephalosporins produced at the Hikma II facility – Cefuroxime, Ceftriaxone, Ceftizoxime, Cefoxitin, Cefotaxime, Cefazolin, Cefepime and Ceftazidime – within the scope of containment activities carried out in the Quality Control laboratory. The method previously used by HPLC did not allow the detection of Cefepime and Ceftazidime, which justified the need to implement a procedure capable of including all compounds monitored at the facility. Therefore, the transfer of the existing HPLC method to UPLC was evaluated, with the aim of improving analysis time and detection capability.

The development stage included the assessment of various chromatographic columns, mobile phase compositions and operational conditions, with the objective of achieving complete separation of the eight cephalosporins, a minimum resolution of 1, and a signal-to-noise ratio above 10. Comparative testing showed that the ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 column (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 $\times$ 50 mm), combined with a mobile phase consisting of phosphate buffer at pH 4,0, methanol and acetonitrile in a ratio of 88:5:7, provided the most suitable performance, allowing clear elution of the compounds and run times compatible with routine laboratory operation.

Different swabs used in the sampling process were also compared. The results showed that the Texwipe TX761K swab revealed the most appropriate behavior under the selected mobile phase and instrumental conditions and was therefore chosen for subsequent testing.

Once the operational conditions were established, validation of the method was carried out in accordance with ICH Q2 guidelines and the internal procedure of Hikma Pharmaceutica Portugal. The parameters assessed included system suitability, precision, linearity, limits of detection and quantification, accuracy in swab challenge and surface test, range, solution stability and specificity against placebo and samples subjected to thermal and photolytic degradation. The results evidenced that the method meets the established requirements for each parameter, thus fulfilling its intended purpose.

**Keywords:** cephalosporins, containment, HPLC, UPLC, validation.



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enquadramento do Estágio .....	1
1.1.1. Caracterização da Instituição de Acolhimento .....	1
1.1.2. Hikma II .....	2
1.1.3. Controlo de Qualidade .....	3
1.1.4. <i>Containment</i> .....	3
1.1.5. Objetivos do Estágio .....	6
1.1.6. Cronograma de Atividades .....	7
1.2. Fundamentação Teórica .....	7
1.2.1. Cefalosporinas .....	7
1.2.2. Métodos Analíticos .....	9
1.2.3. Cromatografia .....	9
1.2.4. Cromatografia Líquida (LC).....	10
1.2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) .....	10
1.2.6. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) .....	11
1.2.7. Variáveis Críticas .....	13
1.2.8. Cromatograma .....	15
1.2.9. Validação de Métodos Analíticos .....	18
2. METODOLOGIA .....	23
2.1. Materiais.....	23
2.1.1. Substâncias de Referência (Cefalosporinas) .....	23
2.1.2. Reagentes .....	23
2.1.3. Equipamentos .....	23
2.1.4. Materiais para Amostragem .....	24
2.1.5. Colunas Cromatográficas.....	24
2.2. Desenvolvimento do Método .....	24
2.2.1. Preparação da Fase Móvel .....	26
2.2.2. Preparação de Solução Padrão 5 ppm, 0,02 ppm e Soluções Individuais... ..	28
2.2.3. Amostragem.....	29

---

2.3. Procedimento Analítico de Validação do Método .....	29
2.3.1. Método de Amostragem .....	29
2.3.2. Reagentes .....	29
2.3.3. Preparação da Fase Móvel .....	30
2.3.4. Solvente.....	30
2.3.5. Preparação de Soluções Padrão .....	30
2.3.6. Preparação de Soluções Padrão sem Ceftriaxone: .....	30
2.3.7. Preparação de Soluções Padrão De Ceftriaxone: .....	30
2.3.8. Preparação de Amostra .....	31
2.3.9. Condições cromatográficas.....	31
2.3.10. Requisitos de adequação do sistema.....	31
2.3.11. Cálculos .....	31
2.3.12. Precisão.....	32
2.3.13. Linearidade .....	32
2.3.14. Limite de Quantificação (LOQ).....	33
2.3.15. Limite de Detecção (LOD) .....	33
2.3.16. Exatidão – <i>Swab Challenge</i> .....	33
2.3.17. Exatidão – <i>Surface Test</i> .....	34
2.3.18. Gama.....	35
2.3.19. Estabilidade das Soluções .....	35
2.3.20. Especificidade – Análise Placebo, Decomposição Térmica e Degradação por Exposição à Luz .....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
3.1. Desenvolvimento do Método .....	37
3.1.1. Método A.....	37
3.1.2. Método B .....	38
3.1.3. Método C .....	50
3.1.4. Método D .....	50
3.1.5. Método E .....	51
3.1.6. Método F.....	53
3.1.7. Amostragem.....	57
3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC .....	58
3.2.1. Precisão do Sistema .....	58
3.2.2. Linearidade .....	59
3.2.3. Limite de Quantificação (LOQ).....	60
3.2.4. Limite de Detecção (LOD) .....	61
3.2.5. Exatidão – <i>Swab Challenge</i> .....	62

3.2.6. Exatidão – <i>Surface Test</i> .....	66
3.2.7. Gama .....	68
3.2.8. Estabilidade das Soluções .....	69
3.2.9. Especificidade – Análise Placebo, Decomposição Térmica e Degradação por Exposição à Luz .....	70
3.2.10. Desvios .....	70
4. CONCLUSÃO .....	73
5. BIBLIOGRAFIA .....	75
ANEXOS .....	83
Anexo 1 - Atividade e Resistência das Diferentes Gerações de Cefalosporinas .....	84
Anexo 2 - Cefalosporinas Produzidas na Hikma 2 e suas Características .....	85
Anexo 3 – Diferenças entre os Processos de LC, HPLC e UPLC .....	87
Anexo 4 – Estrutura Química de Modificações de Sílica para Fase Estacionária de Cromatografia de Fase Reversa .....	88
Anexo 5 – Atributos de Desempenho Necessários para a Validação de Métodos das Diferentes Categorias .....	89
Anexo 6 – Preparações e Condições Cromatográficas do Método para HPLC, na Hikma Sintra, que Deteta as 8 Cefalosporinas Produzidas no Local .....	90
Anexo 7 – Segurança dos Reagentes Utilizados para Preparação da Fase Móvel, Solução Stock e Padrões .....	91
Anexo 8 – Proporções 85:10:5, 87:8:5, 88:7:5, 87:7:6, 89:7:4, 89:6:5, 86:8:6, 86:9:5, 84:10:6, 85:9:6, 87,5:7,5:5, 83:10:7, 87:7,5:5,5 Utilizando a Coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm) .....	98
Anexo 9 – Reports dos Espetros (200-400 nm), das Soluções STD 5ppm de Cada Cefalosporina, com Comprimento de Onda, cuja Absorção é Máxima, Representado .....	103
Anexo 10 – Proporções 90:6:4, 89:6:5, 86:6:8, 85:6:9, 87:6:7, 88:5:7, 90:3:7, 91:2:7 e 93:0:7 Utilizando a Coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm) .....	111
Anexo 11 – Linearidade: Resultados Obtidos .....	114
Anexo 12 – Linearidade: Análise de Regressão Linear da Concentração vs Área Média do Pico de Cada Cefalosporina .....	120
Anexo 13 – Especificidade: Cromatogramas de Solvente Referentes às Diferentes Amostras Injetadas (Padrão, <i>Swab Challenge</i> , PVC e INOX), Decomposição Térmica e Degradação por Exposição à Luz .....	123



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Layout</i> da planta da Hikma Portugal [4].	2
Figura 2 - Cefalosporinas produzidas pela Hikma Sintra (figura elaborada pela autora).	2
Figura 3 - Pirâmide de classificação de <i>containment</i> , que compara o limite de exposição ocupacional (OEL), a banda de exposição ocupacional (OEB), a exposição diária permitida (PDE) e a exposição diária aceitável (ADE) [10].	4
Figura 4 - Cronograma de estágio.	7
Figura 5 - Estrutura química da cefalosporina C (à esquerda) e matéria-prima (à direita) obtida através de um processo de hidrólise enzimática seletiva para a semissíntese dos antibióticos beta-lactâmicos [18].	7
Figura 6 - Estrutura básica da penicilina (à esquerda) e das cefalosporinas (à direita), com anel beta-lactâmico indicado a vermelho e cadeias laterais representadas por R1 e R2 [21, 22].	8
Figura 7 - Sistema HPLC Alliance [32].	10
Figura 8 - Ilustração da retenção de dois componentes (A e B) na coluna (à esquerda) e correspondente cromatograma (à direita), em que B tem uma maior afinidade com a fase estacionária que A [33].	11
Figura 9 - Waters Acquity UPLC H Class [37].	11
Figura 10 - Variação dos parâmetros da equação Van Deemter [38].	12
Figura 11 - Gráfico de Van Deemter: O efeito do tamanho das partículas (em $\mu\text{m}$ ) na altura da placa (H). Um tamanho de partícula mais pequeno proporciona eficiências de pico globais mais elevadas e uma vasta gama de fluxos [36].	12
Figura 12 - Poder de separação mecânica para enchimento de 5 $\mu\text{m}$ e 1,7 $\mu\text{m}$ , e igual comprimento de coluna [45].	14
Figura 13 - Poder de separação mecânica para colunas com 50 mm e 100 mm de comprimento, com mesmo tamanho de partícula [45].	14
Figura 14 - Separação cromatográfica de duas substâncias [49].	15
Figura 15 - Cromatograma da solução de referência (à esquerda) e do branco (à direita) com variáveis H e h representadas [52].	16
Figura 16 - Diagrama que apresenta pico cromatográfico assimétrico e cálculo do fator de assimetria ( <i>tailing factor</i> ) [49]. À direita encontram-se ainda diagramas de dois picos, um com <i>fronting</i> e outro com <i>tailing</i> [53].	17
Figura 17 – Material para filtração a vácuo da fase móvel (imagem da esquerda) e respetiva montagem (imagem da direita).	26
Figura 18 – Curva da pressão no UPLC.	37
Figura 19 - Falha do instrumento UPLC devido a pressão acima do limite máximo. ...	37
Figura 20 – Cromatograma STD 5ppm (preto) vs solvente (vermelho), com condições cromatográficas iniciais do método em desenvolvimento.	38
Figura 21 - Cromatograma STD 0,02ppm, com deteção a 240 nm e Sampling Rate 20 pontos/seg.	39
Figura 22 – Cromatograma STD 0,02ppm (azul) vs solvente (preto), com deteção a 240 nm e Sampling Rate 5 pontos/seg.	39
Figura 23 – Cromatograma STD 0,02ppm (azul) vs solvente (preto), com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu\text{m}$ (2,1 $\times$ 50mm),	39

Figura 24 - Cromatogramas dos vários solventes: água desmineralizada (a preto), WFI (a azul escuro), fase móvel (a azul claro) e Solvente do Anexo 6 (a verde claro), sobrepostos.....	40
Figura 25 - Comparação dos cromatogramas de injeções STD 0,02ppm com fase móvel inicial (a azul) e fase móvel com 850 mL de tampão fosfato, 100 mL de metanol e 50 mL de acetonitrilo (85:10:5) (a preto).....	41
Figura 26 – Cromatograma STD 0,02ppm (azul) vs solvente (preto) com fase móvel 85,5:10:4,5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo). ....	41
Figura 27 - Cromatograma STD 5ppm, com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo). ....	42
Figura 28 – Cromatograma solvente (verde) vs. STD 5ppm (azul) vs. STD 0,02ppm (preto), com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo). ....	42
Figura 29 - Cromatogramas STD 5ppm individuais.....	43
Figura 30 - Cromatogramas da última injeção de STD 5ppm (a azul), STD 0,02ppm (a verde) e F.M como solvente (a preto).....	43
Figura 31 - Cromatograma de STD 5ppm de Ceftriaxone Na (a verde) analisado 2 dias após ser preparado vs. STD 5ppm de Ceftriaxone Na (a preto) preparado e injetado no próprio dia vs. solvente (a azul). ....	44
Figura 32 - Cromatograma STD 5ppm de Ceftriaxone feito com água desmineralizada como solvente (preto) e STD 5ppm de Ceftriaxone feito com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) como solvente (presente também na Figura 30). ....	44
Figura 33 - Cromatograma STD 5ppm utilizando as colunas ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm) e Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	45
Figura 34 - Cromatogramas STD 5ppm com coluna a 32°C, 30°C e 35°C, respetivamente. ....	45
Figura 35 - Cromatogramas STD 5ppm com fluxo de 0,3 mL/min, 0,25 mL/min e 0,35 mL/min, respetivamente.....	46
Figura 36 - Cromatograma da solução STD 5ppm com a fase móvel 85,5:9,5:5 com pH 3,4, 3,6 e 3,8, respetivamente.....	46
Figura 37 - Cromatograma STD 5 ppm utilizando a Fase móvel 85,5:9,5:5 com pH 3,2. ....	47
Figura 38 - Cromatograma STD 5ppm com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm) antiga e outra coluna nova, aberta no próprio dia. ....	47
Figura 39 - Cromatograma STD 5ppm com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm) aberta no próprio dia e fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) preparada de fresco. ....	48
Figura 40 - Cromatograma STD 5ppm (a preto) e STD 0,02ppm (a azul) com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0. ....	48
Figura 41 - Cromatograma STD 0,02ppm com fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) de pH 3,0, com integração.....	49
Figura 42 – Cromatogramas das soluções STD 5ppm individuais sobrepostos, com fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0. ....	49
Figura 43 - Cromatograma STD 0,02ppm utilizando fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0. ....	49
Figura 44 - Cromatogramas sobrepostos do solvente (a preto), STD 5ppm (a azul) e STD 0,02ppm (a verde), utilizando a fase móvel 86:9:5 (tampão fitalato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0. ....	50
Figura 45 – Cromatogramas STD 5ppm e STD 0,02ppm (a vermelho), com fase móvel 86:9:5 (tampão citrato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0. ....	51

Figura 46 - Cromatograma 5ppm com fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato com quantidade ajustada:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.....	51
Figura 47 - Cromatograma STD 5ppm com fase móvel com pH ajustado de 3,0 para 5,0. ....	52
Figura 48 - Cromatograma soluções STD 5ppm individuais, com fase móvel com pH ajustado para 4,0 e desígnio dos picos por ordem de eluição, à direita. ....	52
Figura 49 - Cromatograma STD 0,02ppm com fase móvel com pH ajustado para 4,0. ....	52
Figura 50 - Gradiente utilizado: proporção 87:8:5 até aos 2,1 min, 86:8:6 até aos 9 min e 87:8:5 até aos 10 min (tempo final de injeção), com uma curva de 6. ....	53
Figura 51 - Cromatograma 5ppm utilizando gradiente: 87:8:5 até aos 2,1 min, 86:8:6 até aos 9 min e 87:8:5 até aos 10 min (tempo final de injeção), e curva de 6. ....	53
Figura 52 - Cromatograma 5ppm com fase móvel 87:7,5:5,5 (de tampão fosfato a pH 4,0:metanol:acetonitrilo) (à esquerda) vs 5ppm com proporção 87:7,5:5,5 de tampão fosfato 4,0, metanol e acetonitrilo, em diferentes canais (à direita). ....	54
Figura 53 - Cromatogramas 5ppm com fase móvel 87:7,5:5,5 de pH 3,8 (à esquerda) e 3,6 (à direita). ....	54
Figura 54 - Cromatograma STD 5ppm com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm) e fase móvel 88:6:6 (tampão fosfato pH 4,0:metanol:acetonitrilo) (à esquerda) vs coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm), com mesmo STD e fase móvel (à direita). ....	55
Figura 55 - Gráfico que ilustra a variação do tempo de retenção das cefalosporinas utilizando fases móveis de diferente composição, na coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm).....	56
Figura 56 - Cromatograma STD 5ppm com fase móvel de proporção 88:5:7 utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm), com integração. ....	57
Figura 57 - Cromatograma STD 0,02ppm com fase móvel de proporção 88:5:7 utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm), com integração. ..	57
Figura 58 - Cromatogramas zaragatoa Cultiplast: solvente (a vermelho) e STD 0,02ppm (a preto).....	57
Figura 59 - Cromatogramas zaragatoa Texwipe STD 0,02ppm, com integração.....	58
Figura 60 - Cromatogramas Solução Padrão 5ppm Linearidade, Nível 100% Exatidão ( <i>Swab Challenge</i> ), Solução Padrão 5 ppm Exatidão ( <i>Surface Test</i> ) e Solução Padrão 5ppm Exatidão ( <i>Surface Test</i> ) com a coluna invertida. ....	71
Figura 61 – Injeção de Solução Padrão 5 ppm utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm), antes desta perder eficiência.....	71
Figura 62 - Injeção de Solução Padrão 5 ppm utilizando uma coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm) sem utilização prévia, aberta no dia. ....	71
Figura 63 – Atividade e resistência das diferentes gerações de Cefalosporinas [16, 58]. ....	84
Figura 64 - Estrutura química de algumas fases estacionárias, de modificações de sílica, para cromatografia de fase reversa [42].....	88
Figura 65 - Cromatograma 5ppm com proporção 85:10:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	98
Figura 66 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:8:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	98
Figura 67 - Cromatograma 5ppm com proporção 88:7:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	98
Figura 68 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:7:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	99
Figura 69 - Cromatograma 5ppm com proporção 89:7:4 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	99

Figura 70 - Cromatograma 5ppm com proporção 89:6:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	99
Figura 71 - Cromatograma 5ppm com proporção 86:8:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	100
Figura 72 - Cromatograma 5ppm com proporção 86:9:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	100
Figura 73 - Cromatograma 5ppm com proporção 84:10:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	100
Figura 74 - Cromatograma 5ppm com proporção 85:9:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	101
Figura 75 - Cromatograma 5ppm com proporção 87,5:7,5:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	101
Figura 76 - Cromatograma 5ppm com proporção 83:10:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	101
Figura 77 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:7,5:5,5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm). ....	102
Figura 78 - Espetro STD 5ppm Ceftrizoxime. ....	103
Figura 79 - Espetro STD 5ppm Cefotaxime. ....	104
Figura 80 - Espetro STD 5ppm Cefuroxime. ....	105
Figura 81 - Espetro STD 5ppm Cefazolin. ....	106
Figura 82 - Espetro STD 5ppm Cefoxitin. ....	107
Figura 83 - Espetro STD 5ppm Ceftriaxone. ....	108
Figura 84 - Espetro STD 5ppm Cefepime. ....	109
Figura 85 - Espetro STD 5ppm Ceftazidime. ....	110
Figura 86 - Cromatograma 5ppm com proporção 90:6:4 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm), ....	111
Figura 87 - Cromatograma 5ppm com proporção 89:6:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	111
Figura 88 - Cromatograma 5ppm com proporção 86:6:8 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	111
Figura 89 - Cromatograma 5ppm com proporção 85:6:9 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	112
Figura 90 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:6:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	112
Figura 91 - Cromatograma 5ppm com proporção 88:5:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	112
Figura 92 - Cromatograma 5ppm com proporção 90:3:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	112
Figura 93 - Cromatograma 5ppm com proporção 91:2:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). ....	113

---

Figura 94 - Cromatograma 5ppm com proporção 93:0:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm). .....	113
Figura 95 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefepime.	120
Figura 96 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Ceftazidime. .....	120
Figura 97 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Ceftizoxime. .....	120
Figura 98 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Ceftriaxone. .....	121
Figura 99 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefotaxime. .....	121
Figura 100 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefuroxime. .....	121
Figura 101 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefazolin. .....	121
Figura 102 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefoxitin. .....	122
Figura 103 - Cromatograma integrado do solvente injetado diretamente. ....	123
Figura 104 - Cromatograma integrado do solvente utilizado no <i>Swab challenge</i> . ....	123
Figura 105 - Cromatograma integrado do solvente amostrado em placa de PVC. ....	123
Figura 106 – Cromatograma integrado do solvente amostrado em placa de INOX. ...	124
Figura 107 - Cromatograma Integrado da Decomposição Térmica do Nível de Linearidade 100%, em INOX. ....	124
Figura 108 – Cromatograma Integrado da Degradação por Exposição à Luz do Nível de Linearidade 100%, em INOX. ....	124



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos A-F de acordo com o tampão utilizado, proporções de tampão:orgânico e pH's da fase móvel/tampão testados. ....	25
Tabela 2 - Colunas e condições de temperatura e fluxo utilizadas nos métodos A-F. ....	26
Tabela 3 – Preparação de Tampão Ftalato, de acordo com a USP [57]. ....	27
Tabela 4 - Preparação de Tampão Citrato, de acordo com a USP [57]. ....	27
Tabela 5 - Níveis de linearidade e seu modo de preparação. ....	33
Tabela 6 - Preparação das Amostras para Recuperação. ....	35
Tabela 7 – Condições cromatográficas iniciais do método em desenvolvimento. ....	37
Tabela 8 - Condições cromatográficas finais do método desenvolvido. ....	58
Tabela 9 - Área dos picos de 6 injeções consecutivas de STD 5ppm para avaliação da precisão do sistema. ....	59
Tabela 10 – Valores de %RSD para os níveis de linearidade 150%, 120%, 100%, 50%, 10%, 1,2% e 0,3%. ....	59
Tabela 11 – Tabela com coeficiente de correlação, declive e intercept. ....	60
Tabela 12 - Limite de Quantificação para Ceftriaxone. ....	60
Tabela 13 - Limite de Quantificação para Cefepime, Ceftazidime, Ceftizoxime, Cefotaxime, Cefuroxime, Cefazolin e Cefoxitin. ....	61
Tabela 14 - Limite de Detecção para Ceftriaxone. ....	61
Tabela 15 - Limite de Detecção para Cefepime, Ceftazidime, Ceftizoxime, Cefotaxime, Cefuroxime, Cefazolin e Cefoxitin. ....	62
Tabela 16 - Exatidão – <i>Swab Challenge</i> , Níveis de Linearidade 150%, 100% 1,2% e 0,3%. ....	63
Tabela 17 - Exatidão – <i>Swab Challenge</i> , Nível de Linearidade 100%. ....	64
Tabela 18 - Exatidão – <i>Swab Challenge</i> , Nível LOQ 1,2%. ....	64
Tabela 19 - Exatidão – <i>Swab Challenge</i> , Nível LOQ 0,3%. ....	65
Tabela 20 - Exatidão – <i>Surface Test</i> , Nível de Linearidade 150%. ....	66
Tabela 21 - Exatidão – <i>Surface Test</i> , Nível de Linearidade 100%. ....	67
Tabela 22 - Exatidão – <i>Surface Test</i> , Nível LOQ 1,2%. ....	67
Tabela 23 - Exatidão – <i>Surface Test</i> , Nível LOQ 0,3%. ....	68
Tabela 24 – Estabilidade: %Recuperação das Amostras em INOX e Solução Padrão 5 ppm, em relação ao ensaio inicial. ....	69
Tabela 25 - Tempos de retenção dos picos desconhecidos obtidos dos testes de especificidade. ....	70
Tabela 26 - Cefalosporinas produzidas na Hikma 2 e suas características [59]. ....	85
Tabela 27 - LC vs. HPLC vs. UPLC [68]. ....	87
Tabela 28 - Atributos de desempenho necessários para a validação de métodos das diferentes categorias (tabela adaptada dos SOPs da empresa). ....	89
Tabela 29 – Preparações e condições cromatográficas de HPLC. ....	90
Tabela 30 - Nível de linearidade 150%. ....	114
Tabela 31 - Nível de linearidade 120%. ....	115
Tabela 32 - Nível de linearidade 100%. ....	116
Tabela 33 - Nível de linearidade 50%. ....	117
Tabela 34 - Nível de linearidade 10%. ....	118
Tabela 35 - Nível de linearidade 1,2%. ....	118
Tabela 36 - Nível de linearidade 0,3%. ....	119



**SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

7-ACA	Ácido 7-Aminocefalosporânico
A	Área ou Termo da Difusão Turbulenta na equação de Van Deemter
ADE	<i>Acceptable Daily Exposure</i> , Exposição Diária Aceitável
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> , Princípio Ativo
AU	Unidades de Absorvância
B	Termo da Difusão Longitudinal na equação de Van Deemter
BEH	<i>Bridged Ethylene Hybrid</i> , Partículas híbridas de pontes de etileno
BP	<i>British Pharmacopoeia</i> , Farmacopeia Britânica
C Van Deemter	Termo da Resistência à Transferência de Massa na equação de Van Deemter
CDS cromatográficos	<i>Chromatography Data System</i> , Sistema de Gestão de Dados Cromatográficos
CoA	<i>Certificate of Analysis</i> , Certificado de Análise
Da	Unidade de Massa Atômica, Dalton
DEL	<i>Design Exposure Limit</i> , Limite de exposição do projeto
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agência Europeia de Medicamentos
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> , Farmacopeia Europeia
EU	<i>European Union</i> , União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
f	Largura da Parte Frontal do Pico
FD	Fator de Diluição
FDA medicamentos dos EUA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA
F.M	Fase Móvel
GC	<i>Gas Chromatography</i> , Cromatografia Gasosa
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i> , Boas Práticas de Fabrico
h	Altura
h/2	Meia Altura
HEPA Partículas	<i>High Efficiency Particle Arrestance</i> , Alta Eficiência na Retenção de Partículas
HETP	Altura Equivalente ao Prato Teórico

HPG	Gradiente de Alta Pressão
HPLC de Alta Eficiência	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HVAC	<i>Heating, Ventilation and Air Conditioning</i> , Aquecimento, Ventilação e Ar Condicionado
I&D	Investigação e Desenvolvimento
ICH Harmonização	<i>International Council for Harmonisation</i> , Conselho Internacional de Harmonização
ID	Diâmetro Interno
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K <sub>2</sub>	Fator de Capacidade
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LPG	Gradiente de Baixa Pressão
MENA	<i>Middle East and North Africa</i> , Médio Oriente e Norte de África
N	Normalidade (concentração, equivalente a mol/L)
NOAEL Observáveis	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> , Nível sem Efeitos Adversos Observáveis
NLT	<i>Not Less Than</i> , Não Inferior a
NMT	<i>Not More Than</i> , Não Superior a
NP	<i>Normal Phase</i> , Fase Normal
OEB	<i>Occupational Exposure Bands</i> , Banda de Exposição Ocupacional
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBPs	<i>Penicillin-Binding Proteins</i> , Proteínas de Ligação à Penicilina
PDE	Permitted Daily Exposure, Exposição Diária Permitida
PEEK	Poli (Éter-Éter-Cetona)
ppb	Medida de Concentração, Partes por Bilhão
ppm	Medida de Concentração, Partes por Milhão
psi	<i>Pound per Square Inch</i> , Unidade de Pressão
QA	<i>Quality Assurance</i> , Garantia de Qualidade
QC	<i>Quality Control</i> , Controlo de Qualidade
R	Resolução; Fator de Correlação
RRT	Tempo de Retenção Relativo
RP	<i>Reverse Phase</i> , Fase Reversa
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> , Desvio Padrão Relativo

RT	Tempo de Retenção
S. A	Sociedade Anônima
SD	<i>Standard Deviation</i> , Desvio Padrão
SM	<i>Sample Manager</i> , Gerenciador de Amostras
S/N	<i>Signal-to-Noise Ratio</i> , Razão Sinal-Ruído
SOAS cas	<i>Stability of Analytical Solutions</i> , Estabilidade das Soluções Analíticas
SOPs Normalizados	<i>Standard Operating Procedures</i> , Procedimentos Operacionais
SST	<i>System Suitability Testing</i> , Teste de Adequação do Sistema
STD	<i>Standard</i> , Padrão
T	Fator de Simetria
t	Tempo de Retenção
t <sub>1</sub>	Tempo de Retenção da Substância 1
t <sub>2</sub>	Tempo de Retenção da Substância 2
t <sub>a</sub>	Tempo de Retenção do Solvente
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> , Cromatografia de Camada Fina
t <sub>M</sub>	Tempo Morto, Vazio
t <sub>R</sub>	Tempo de Retenção
UPLC de Ultra Eficiência	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> , Farmacopeia dos Estados Unidos
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
v	Velocidade Linear
V	Volume
v/v	Porcentagem em volume
W	Largura da Base do Pico
W <sub>0,05</sub>	Largura do Pico a 5% da Altura
W <sub>1</sub>	Largura do Pico da Substância 1
W <sub>2</sub>	Largura do Pico da Substância 2
WFI	<i>Water For Injection</i> , Água para Injetáveis
Wh/2	Largura a Meia Altura
X	Média das Áreas das Injeções

**Símbolos Gregos**

$\lambda$	Comprimento de Onda, Lamda
-----------	----------------------------

### Fórmulas Químicas

$C_6H_5$	Fenil
$C_6H_8O_7$	Ácido Cítrico
$C_8$	Octyl (8-Carbon)
$C_8H_5KO_4$	<i>Potassium Biphthalate</i> , Ftalato de potássio
$C_{18}$	Octadecyl (18-Carbon)
$CH_3CN$	Acetonitrilo
$CH_3OH$	Metanol
$H_3PO_4$	Ácido Fosfórico
HCl	Ácido Clorídrico
$KH_2PO_4$	Dihidrogenofosfato de Potássio
Na	Sódio
$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	Citrato de sódio

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ENQUADRAMENTO DO ESTÁGIO

O presente Relatório de Estágio foi elaborado no âmbito da Unidade Curricular Projeto/Estágio/Dissertação do Mestrado em Engenharia Biológica e Química, do Instituto Politécnico de Setúbal – Escola Superior de Tecnologia do Barreiro. Este trabalho resulta do estágio realizado na empresa Hikma Farmacêutica, S.A., em Sintra, na Unidade de Qualidade da Hikma II, entre 24 de fevereiro de 2025 e 14 de julho de 2025, sob a supervisão da Eng.<sup>a</sup> Anabela Supico e a orientação da Prof.<sup>a</sup> Doutora Cláudia Coelho.

### 1.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE ACOLHIMENTO

A Hikma Farmacêutica é uma empresa multinacional que desenvolve, fabrica e comercializa uma vasta gama de medicamentos dentro das classes de genéricos injetáveis e orais, genéricos de marca e produtos especializados [1, 2]. A sua missão é facultar medicamentos de alta qualidade, a quem deles necessita, não fosse o seu lema “*Better Health. Within Reach. Every Day.*” [1].

A Hikma foi fundada na Jordânia, em 1978, por Samih Darwazah, e estabeleceu-se em Portugal em 1990, escolhendo Sintra para instalar a sua fábrica especializada no fabrico de injetáveis [1].

A nível global, a Hikma emprega em torno de 9500 colaboradores (mais de 952 em Sintra), possui 29 unidades de produção, 13 fábricas inspecionadas pela FDA (*Food and Drug Administration*, autoridade reguladora dos Estados Unidos), 12 fábricas inspecionadas pela EMA (*European Medicines Agency*, Agência Europeia de Medicamentos), conta ainda com 9 centros de I&D (Investigação e Desenvolvimento) e produz mais de 800 produtos de alta qualidade, dos quais mais de 160 são produzidos em Sintra [1, 2].

Em Portugal, as instalações da Hikma estão divididas em 4 edifícios, todos eles localizados na Terrugem, Sintra, e cada um dedicado a áreas específicas: um para líquidos e liofilizados (Hikma I), um para cefalosporinas (Hikma II), o armazém central (Hikma III) e outro edifício destinado à área da oncologia (Hikma IV), conforme ilustrado na Figura 1 [3, 4]. A empresa encontra-se atualmente em expansão, prevendo a construção de mais 3 edifícios, até ao final de 2025 [4].

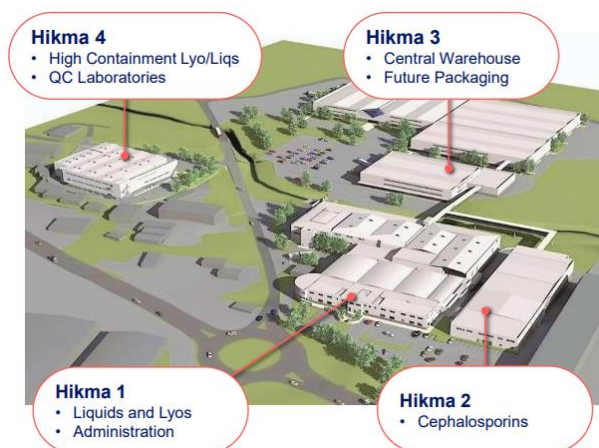


Figura 1 - Layout da planta da Hikma Portugal [4].

A unidade de Sintra é reconhecida como uma das mais avançadas tecnologicamente do grupo Hikma e desempenha um papel estratégico para que a empresa se mantenha entre os três principais fabricantes de genéricos injetáveis nos Estados Unidos, sendo responsável por cerca de 45% das vendas globais de injetáveis da Hikma [4, 5].

Aproximadamente 95% da produção da empresa é destinada à exportação, tendo como principais mercados os EUA (Estados Unidos da América), a região MENA (*Middle East and North Africa*, Médio Oriente e Norte de África) e a UE (União Europeia) [4, 5].

#### 1.1.2. HIKMA II

A Fábrica Hikma II está organizada em três departamentos principais:

- **Departamento de Cefalosporinas**, que inclui as Linhas de Produção, de Embalagem, Garantia de Qualidade e Armazém;
- **Controlo de Qualidade**, que inclui laboratórios de Cromatografia (HPLC), Microbiologia, Química e Novos Projetos;
- **Departamento de Manutenção**, que inclui a oficina e as infraestruturas da fábrica.

Nesta unidade são produzidas, de momento, 8 cefalosporinas, esquematizadas na Figura 2.

<b>1ª GERAÇÃO</b>	<b>3ª GERAÇÃO</b>
Cefazolin sodium	Cefotaxime sodium Ceftizoxime sodium
<b>2ª GERAÇÃO</b>	Ceftazidime pentahydrate Ceftriaxone sodium
Cefoxitin sodium Cefuroxime sodium	<b>4ª GERAÇÃO</b> Cefepime Hydrochloride

Figura 2 - Cefalosporinas produzidas pela Hikma Sintra (figura elaborada pela autora).

Pelo facto de a indústria farmacêutica utilizar o inglês como língua padrão em toda a documentação técnica, incluindo procedimentos operacionais, registos de qualidade, certificados de análise e fichas de segurança, bem como a nomenclatura oficial dos princípios ativos, excipientes e reagentes ser definida em inglês pelas principais farmacopeias internacionais, usadas como referência neste trabalho, optou-se por manter os nomes das cefalosporinas em inglês.

### 1.1.3. CONTROLO DE QUALIDADE

O departamento de Controlo de Qualidade da Hikma garante, através de procedimentos sistemáticos de análise e verificação, que as suas matérias-primas, materiais de embalagem, produtos intermédios, produtos acabados e amostras de estabilidade cumprem rigorosamente as normas de segurança, eficácia e conformidade regulamentar. Estas verificações garantem o cumprimento das farmacopeias oficiais, tais como a Europeia (EP), a Britânica (BP) e a dos Estados Unidos (USP), bem como o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico (GMP), estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

As GMP constituem um sistema de normas e procedimentos, que assegura a produção consistente de medicamentos e o controlo rigoroso da qualidade, garantindo que os produtos são adequados ao seu uso [6]. Abrangem todas as etapas do fabrico, desde a receção das matérias-primas, passando pela limpeza e testagem das linhas de produção, pelo enchimento dos frascos, pelos testes laboratoriais de qualidade, até à expedição do produto final [6].

Estas práticas exigem que todos os processos sejam definidos, validados, revistos e documentados, garantindo que a produção decorre em condições controladas, com pessoal, instalações e materiais compatíveis com a natureza dos produtos, assegurando a integridade e segurança do medicamento [6, 7]. As diretrizes da OMS devem ser adaptadas e validadas de acordo com as necessidades de cada empresa e produto, permitindo harmonizar a atuação das agências reguladoras e garantir a uniformidade e qualidade dos medicamentos a nível internacional [6, 7].

Na Hikma, cada procedimento é formalizado em SOPs (Standard Operating Procedures ou Procedimentos Operacionais Normalizados), que fornecem instruções detalhadas e asseguram a execução das atividades de forma padronizada, rastreável e segura [6, 7]. Os colaboradores são formados e certificados, e todos os resultados, documentos e registos são armazenados e controlados, garantindo a integridade dos dados e a disponibilidade de informação [6, 7].

O sistema GMP da Hikma inclui ainda auditorias internas e externas, autoinspeções, avaliações de fornecedores e controlo das infraestruturas, equipamentos e propriedade intelectual, seguindo as recomendações da OMS para assegurar o cumprimento das normas e promover a melhoria contínua do sistema de qualidade [6, 7].

### 1.1.4. CONTAINMENT

Na indústria farmacêutica o termo *containment* refere-se ao conjunto de medidas físicas, técnicas e organizacionais destinadas a prevenir a libertação de substâncias farmacologicamente ativas, tóxicas ou alergénicas para o ambiente de trabalho, outras áreas de fabrico ou para o meio ambiente. Os principais objetivos são a proteção dos operadores

contra a exposição ocupacional, a prevenção da contaminação cruzada entre produtos e a minimização do impacto ambiental decorrente do fabrico de substâncias potencialmente perigosas [8, 9].

A definição do nível de *containment* necessário para cada substância assenta numa análise combinada de parâmetros toxicológicos e de risco operacional [10]. Inicialmente, estabelece-se o NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), correspondente à dose mais elevada testada na qual não se observa nenhum efeito «crítico» [11]. Este permite calcular a PDE ou ADE (*Permitted Daily Exposure* ou *Acceptable Daily Exposure*) [10]. A determinação da PDE baseia-se na fórmula recomendada pelas orientações ICH/EMA, em que o NOAEL é ajustado para uma massa corporal padrão (normalmente 50 kg) e dividido por uma série de fatores de incerteza que refletem variabilidade entre espécies (F1), variabilidade humana (F2), duração do estudo (F3), severidade do efeito tóxico (F4) e limitações da base de dados (F5) [11]. A expressão geral é:

$$PDE = \frac{NOAEL \times Weight\ Adjustment}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \quad (1)$$

O valor resultante exprime a exposição diária considerada segura para um indivíduo e constitui a base para a definição do OEL (*Occupational Exposure Limit*) [10]. Estes limites sustentam a classificação das substâncias em OEBs (*Occupational Exposure Bands*), que agrupam os compostos em faixas de exposição de acordo com a sua toxicidade e risco potencial para os trabalhadores [10].

A pirâmide ilustrada na Figura 3 sintetiza esta classificação, distribuindo as substâncias por bandas crescentes de risco, desde OEB 1 (baixo perigo, OEL na gama dos milhares de  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) até OEB 6 (extremamente perigosas, com OEL  $< 0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) [10].

Quanto mais elevada a banda OEB, mais exigentes são as medidas de *containment* requeridas [10].



Figura 3 - Pirâmide de classificação de *containment*, que compara o limite de exposição ocupacional (OEL), a banda de exposição ocupacional (OEB), a exposição diária permitida (PDE) e a exposição diária aceitável (ADE) [10].

A manutenção do desempenho destas barreiras requer a definição de um DEL (*Design Exposure Limit*), geralmente inferior ao OEL normalizado [10]. Este valor funciona como

referência operacional para assegurar que o sistema permanece dentro dos limites de desempenho previstos ao longo do ciclo de vida da instalação [10].

Só após a determinação da banda OEB e do nível de *containment* apropriado é que se considera o contexto específico de cada classe de substâncias [10].

No caso particular dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como as cefalosporinas, o nível de contenção exigido situa-se tipicamente nos patamares superiores da pirâmide, visto estes antibióticos, amplamente utilizados no tratamento de infeções bacterianas, serem compostos sensibilizantes que apresentam potencial alergénico significativo, podendo desencadear reações de hipersensibilidade como erupções cutâneas e crises asmáticas, até reações mais graves e potencialmente fatais, como anafilaxia, mesmo em concentrações residuais [12]. Para além do impacto direto na saúde ocupacional, a manipulação inadequada destas substâncias em ambientes industriais pode contribuir ainda para a disseminação de resistência antimicrobiana [13].

O sistema de contenção farmacêutica estrutura-se em três níveis complementares: contenção primária, secundária e terciária.

A contenção primária tem por finalidade impedir a libertação do princípio ativo no ponto de origem e proteger diretamente o operador. Para tal, empregam-se sistemas fechados de manipulação de pós, isoladores, cabines de fluxo laminar invertido e equipamentos com barreiras físicas integradas [14]. Para  $\beta$ -lactâmicos, recomenda-se ainda a utilização de linhas de produção dedicadas, de forma a minimizar o risco de contaminação cruzada residual [8].

A contenção secundária assegura a proteção do ambiente produtivo e de outras áreas adjacentes. As principais estratégias incluem a separação física das instalações, a implementação de sistemas HVAC (Heating, Ventilation and Air Conditioning - Aquecimento, Ventilação e Ar Condicionado) independentes, a manutenção de pressões negativas diferenciais e o uso de filtração HEPA (High Efficiency Particle Arrestance - Retenção de Partículas de Alta Eficiência) dupla nos fluxos de extração e insuflação de ar [6]. Estas barreiras são reforçadas por zonas de transição controladas, com troca obrigatória de vestuário e limitação de acesso apenas a pessoal [6].

A contenção terciária corresponde às medidas de proteção ambiental e gestão de resíduos. Envolve o tratamento de ar de exaustão contaminado, a recolha e neutralização de efluentes líquidos e sólidos, e a validação rigorosa e periódica de processos de limpeza [12, 13].

Estas medidas encontram-se alinhadas com orientações internacionais, nomeadamente o ICH Q7, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*, que estabelece as Boas Práticas de Fabrico (GMP) para Ingredientes Farmacêuticos Ativos (APIs). Este guia recomenda, especificamente, o uso de instalações dedicadas, incluindo sistemas de ventilação e equipamentos independentes, na produção de substâncias altamente sensibilizantes, como penicilinas e cefalosporinas [12].

Ainda que as contenções mencionadas sejam aplicadas na Hikma II, não existe a segregação física total entre os edifícios I e II, bem como o acesso ao edifício IV não é restrito. Assim, para garantir que a limpeza das instalações, dos equipamentos e a higiene do pessoal (na Hikma II) está a ser efetuada corretamente, bem como se não existe qualquer presença de cefalosporinas nas instalações e pessoal não dedicados a

cefalosporinas, é efetuada uma análise, pelo departamento de Controlo de Qualidade da Hikma II, uma vez por mês, denominada *containment*.

O procedimento desta análise, detalhado num SOP da empresa, descreve os passos a seguir para detetar a presença/ausência de cefalosporinas nas superfícies dos departamentos não dedicados a cefalosporinas e nas mãos dos trabalhadores da área de produção e do departamento de Controlo de Qualidade de Cefalosporinas, aquando da sua saída das instalações.

De acordo com o documento, deve ser efetuada uma amostragem por zaragatoa (swab) numa área de 100 cm<sup>2</sup> em cada local de análise, e a amostragem das mãos deve abranger toda a superfície das mãos, ou tanto quanto possível.

Após a recolha de todas as amostras, estas devem ser preparadas numa solução para utilização em equipamento de HPLC (High Pressure Liquid Chromatography - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), fora das instalações da Hikma II, para evitar contaminações. O analista apenas volta às instalações da Hikma II quando as amostras preparadas se encontram nos frascos (*vials*) utilizados na análise por HPLC, não expondo novamente o conteúdo a analisar ao ar.

Estas amostras são analisadas por meio de um método analítico de HPLC, que utiliza uma solução padrão preparada previamente, com todas as cefalosporinas produzidas na Hikma II, como meio de comparação, para identificar se estas se encontram presentes nas amostras das zaragatoas preparadas. Tal é conseguido pois o resultado obtido da análise por HPLC desta solução é um cromatograma, no qual são apresentados picos distintos, correspondentes a cada uma das cefalosporinas. Tendo este cromatograma como referência, é possível comparar os resultados das amostras e verificar se existe algum pico na mesma posição dos picos apresentados na análise da solução padrão.

Caso os resultados não mostrem qualquer evidência da presença de cefalosporinas, significa que todos os sistemas de contenção e procedimentos implementados para prevenir a contaminação cruzada estão a ser corretamente executados.

#### 1.1.5. OBJETIVOS DO ESTÁGIO

O método atual de deteção de cefalosporinas em superfícies e no pessoal apenas permite identificar seis das oito cefalosporinas produzidas na fábrica: Cefazolin, Cefuroxime, Ceftriaxone, Ceftizoxime, Cefoxitin e Cefotaxime, sendo que Cefepime e Ceftazidime não podem ser detetadas utilizando o método atualmente em vigor. Foi criado recentemente um método capaz de detetar as oito cefalosporinas produzidas na Hikma II, incluindo a Cefepime e a Ceftazidime, no entanto, este não foi validado.

Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo a avaliação da possibilidade de transferência do método de deteção de 8 cefalosporinas realizado por HPLC, para a técnica UPLC, e posterior validação do método analítico mais apropriado, consoante os resultados obtidos, para implementação na análise de *containment* da empresa Hikma.

### 1.1.6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Os trabalhos foram realizados de acordo com o cronograma da Figura 4.

Tarefas	Meses				
	1	2	3	4	5
T1. Visita às instalações, integração na equipa e treino nos procedimentos da empresa (SOPs) necessários para a execução do trabalho.	X				
T2. Formação na calibração/verificação e uso dos equipamentos necessários ao desenvolvimento do método (balanças analíticas, potenciômetro, UPLC).	X	X			
T3. Pesquisa bibliográfica.	X	X	X		
T4. Desenvolvimento e transferência do método existente de HPLC para UPLC.		X	X		
T5. Desempenho de outras atividades na empresa (Identificação de matérias-primas por IV, análise de material de embalagem)		X	X	X	
T6. Validação do método analítico com discussão de ajustes para cumprimento dos requisitos de validação.				X	X
T7. Análise de resultados e escrita do relatório.	X	X	X	X	X

Figura 4 - Cronograma de estágio.

## 1.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.2.1. CEFALOSPORINAS

As cefalosporinas são antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos derivados do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), por sua vez obtido inicialmente da cefalosporina C, um antibiótico natural isolado em 1945, de uma estirpe do fungo *Cephalosporium acremonium*, por um processo de hidrólise enzimática seletiva, ilustrado na Figura 5 [15, 16, 17, 18]. Estes antibióticos possuem um anel  $\beta$ -lactâmico, uma estrutura química de quatro átomos altamente reativa que é essencial para a sua ação, ao inibir as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular das bactérias, provocando a sua morte. A estrutura do anel é também alvo das  $\beta$ -lactamases, enzimas que algumas bactérias produzem para degradar o antibiótico, pelo que as cefalosporinas semi-sintéticas são quimicamente modificadas para aumentar a sua estabilidade e eficácia terapêutica [15, 16, 17, 18, 19].

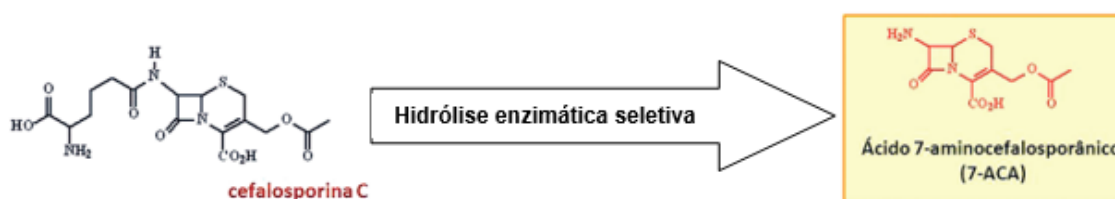


Figura 5 - Estrutura química da cefalosporina C (à esquerda) e matéria-prima (à direita) obtida através de um processo de hidrólise enzimática seletiva para a semissíntese dos antibióticos beta-lactâmicos [18].

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem uma importante classe terapêutica, reconhecida pela sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e pela baixa toxicidade para os pacientes humanos. Esta segurança resulta do seu mecanismo de ação específico, que interfere na síntese da parede celular bacteriana, uma estrutura essencial reforçada pela ligação cruzada de unidades de peptidoglicano, mediada pelas proteínas de ligação à penicilina (PBP) [16]. Os anéis  $\beta$ -lactâmicos destes antibióticos ligam-se às PBP, inibindo a sua atividade de *cross-linking* do peptidoglicano, o que incapacita a bactéria de formar a parede celular, levando à lise e morte celular [16, 20]. Este modo de ação explica também a baixa toxicidade para o ser humano, cujas células eucarióticas não possuem parede celular [19].

Apesar de todos os antibióticos na família terem um anel  $\beta$ -lactâmico, a sua estrutura química não é igual, contendo anéis adjacentes diferentes e podendo conter também diferentes tipos de cadeias laterais, que diferenciam as características do antibiótico, espectros de ação e resistência às  $\beta$ -lactamases (enzimas produzidas por algumas bactérias, que quebram o anel  $\beta$ -lactâmico, inibindo a eficácia do medicamento) [19, 21]. A estas cadeias laterais parecem estar ainda associadas diversas reações de hipersensibilidade [21].

No caso das cefalosporinas, o anel adjacente é um anel dihidrotiazina e, à semelhança das penicilinas, possuem locais onde podem ser adicionados diversos radicais (R1 e R2), que permitem modificar propriedades da molécula base, de forma a tentar melhorar a sua estrutura básica, representada na Figura 6 [19]. Os substituintes na posição 7 do anel  $\beta$ -lactâmico estão relacionados à alteração da atividade antibacteriana destes compostos, enquanto substituições na posição 3 do anel dihidrotiazina estão associadas a alterações no metabolismo e nas propriedades farmacocinéticas do fármaco [22]. As cefalosporinas são compostos polares solúveis em água [23].

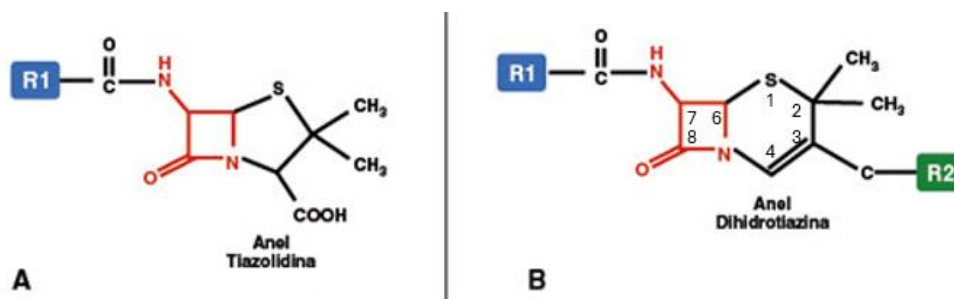


Figura 6 - Estrutura básica da penicilina (à esquerda) e das cefalosporinas (à direita), com anel beta-lactâmico indicado a vermelho e cadeias laterais representadas por R1 e R2 [21, 22].

Designa-se por espetro de ação a gama de microrganismos sensíveis a um determinado antibiótico. Este espetro pode ser estreito, quando o fármaco é eficaz contra um número reduzido de bactérias, ou amplo, quando abrange tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.

As cefalosporinas, devido ao seu amplo espetro de ação, são antibióticos bactericidas amplamente utilizados no tratamento de diversas infeções bacterianas [19]. No entanto, o seu uso intensivo tem contribuído para o surgimento e disseminação de estirpes bacterianas resistentes, o que tem motivado esforços contínuos na investigação e no desenvolvimento de novas moléculas [19].

Com o objetivo de melhor caracterizar a sua evolução, as cefalosporinas foram organizadas em gerações, atualmente cinco, refletindo alterações no espectro de ação e na resistência às beta-lactamases [19].

As cefalosporinas de primeira geração apresentam maior eficácia contra bactérias Gram-positivas [19, 22]. A partir das gerações subsequentes, observa-se um aumento progressivo da atividade contra bactérias Gram-negativas, bem como uma maior resistência à inativação por beta-lactamases [19, 22].

No [Anexo 1](#) encontram-se exemplos de cefalosporinas de cada geração, bem como o seu nível de atividade contra bactérias Gram +, Gram - e nível de resistência à enzima beta-lactamase.

No [Anexo 2](#) encontram-se ilustradas as estruturas químicas das cefalosporinas produzidas na Hikma, bem com a sua aparência, fórmula molecular, massa molecular, solubilidade e pKa.

### 1.2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

Na indústria farmacêutica, a quantificação rigorosa das cefalosporinas é essencial em várias etapas do desenvolvimento, fabrico e controlo de qualidade de medicamentos. Durante a fase de formulação, é necessário garantir que a substância ativa está presente na dose correta para assegurar a eficácia terapêutica e a segurança do fármaco [24]. No controlo de qualidade, a quantificação permite verificar a conformidade com as especificações farmacopeicas e assegurar a estabilidade do produto ao longo do tempo [24]. Além disso, durante os estudos de validação e bioequivalência, a monitorização precisa da concentração plasmática das cefalosporinas é fundamental para determinar parâmetros farmacocinéticos, como a taxa de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco pelo organismo [24]. Também no âmbito regulatório, a quantificação é um requisito obrigatório para o registo de medicamentos, garantindo a consistência entre lotes e a ausência de impurezas ou produtos de degradação em níveis inaceitáveis [24]. Assim, a escolha de métodos analíticos adequados é crucial para garantir a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos à base de cefalosporinas.

### 1.2.3. CROMATOGRAFIA

Um dos métodos analíticos mais conhecidos e utilizados para a determinação quantitativa e qualitativa dos componentes químicos presentes em misturas é a cromatografia, que pode ser gasosa (GC), se a fase móvel é um gás, líquida (LC), se a fase móvel é um líquido, ou em superfície plana (TLC), na qual uma fase móvel líquida ascende por capilaridade numa placa plana [25, 26, 27].

Destes, a cromatografia líquida (LC) é a técnica mais utilizada em análises quantitativas e qualitativas de compostos farmacêuticos, pois permite separar compostos não voláteis, polares ou termossensíveis, ao contrário da cromatografia gasosa (GC), adequada para analitos voláteis e estáveis ao calor, e da cromatografia em superfície plana (TLC), que é simples e rápida, mas limitada em precisão e quantificação [27].

#### 1.2.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC)

O princípio da LC baseia-se na separação dos componentes de uma mistura pela interação diferencial entre as moléculas da amostra e as fases móvel e estacionária, sendo a fase móvel responsável pelo transporte dos analitos através da coluna cromatográfica [27].

As separações por LC podem ser classificadas de acordo com o tipo de interações que o analito estabelece com a fase estacionária e da polaridade da fase móvel e estacionária [27, 28].

Quanto ao tipo de interações, as separações podem ser realizadas tendo em conta a polaridade dos compostos químicos (cromatografia de adsorção ou de partição), o tamanho molecular (cromatografia de exclusão molecular/permeação em gel), a carga elétrica (cromatografia de permuta iónica), ou interações específicas reversíveis (cromatografia de afinidade) ou diferenciais (cromatografia quiral) [28, 29].

Quanto à polaridade, esta pode ser de fase normal (fase estacionária polar e fase móvel apolar), na qual o analito menos polar é eluído primeiro, por possuir menor afinidade com a fase estacionária, ou de fase reversa (fase estacionária apolar e fase móvel aquosa moderadamente polar), na qual o analito menos polar é eluído por último [28, 29].

Evoluindo tecnologicamente ao longo das últimas décadas, a LC deu origem à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e, mais recentemente, à Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), que representam atualmente técnicas de referência na indústria farmacêutica. Estas metodologias possuem o mesmo princípio da Cromatografia Líquida, mas destacam-se pela alta sensibilidade, seletividade, precisão e rapidez, sendo fundamentais no controlo de qualidade, nos estudos de estabilidade e na validação de medicamentos na indústria farmacêutica.

No [Anexo 3](#) encontram-se resumidas as maiores diferenças entre os processos de separação por cromatografia líquida convencional (LC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).

#### 1.2.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Uma das técnicas mais utilizadas para a análise/detecção de cefalosporinas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [30]. Esta é uma forma avançada de cromatografia líquida que utiliza altas pressões para a separação de misturas complexas de moléculas, a fim de quantificar os componentes de uma amostra [26, 31].

O modo de funcionamento do HPLC (Figura 7) passa pela injeção de uma amostra, que é arrastada por uma fase móvel (eluyente), com auxílio de uma bomba, para uma coluna cromatográfica (onde se encontra a fase estacionária), na qual ocorre a separação dos componentes presentes na mistura [25, 32].



Figura 7 - Sistema HPLC Alliance [32].

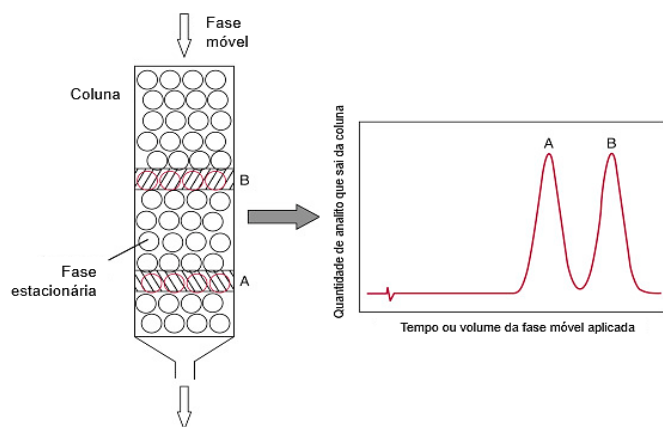


Figura 8 - Ilustração da retenção de dois componentes (A e B) na coluna (à esquerda) e correspondente cromatograma (à direita), em que B tem uma maior afinidade com a fase estacionária que A [33].

Esta separação, chamada de eluição, dá-se devido à diferente afinidade que diferentes analitos têm com a fase móvel/estacionária, já que analitos com maior afinidade para com a fase estacionária têm tendência a ficar retidos na coluna por um maior período, e assim acabarem por ser eluídos mais lentamente que analitos com maior afinidade com a fase móvel (Figura 8) [25, 33].

De forma a detetar os sinais à medida que os compostos se separam, é usado um detetor, que regista os tempos de retenção das moléculas, enquanto converte esses sinais recebidos em dados analíticos, desenhando um cromatograma observável num computador com um software próprio para o efeito [25, 29].

De forma a detetar os sinais à medida que os compostos se separam, é usado um detetor, que regista os tempos de retenção

#### 1.2.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC)

Ainda que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) se tenha consolidado como a técnica de referência em análises quantitativas e qualitativas de fármacos, sendo amplamente empregue em controle de qualidade, a evolução tecnológica dos sistemas cromatográficos tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas ainda mais eficientes, capazes de oferecer melhor desempenho analítico em menor tempo.

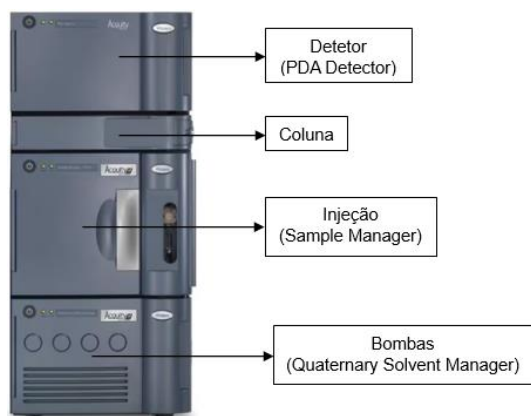


Figura 9 - Waters Acquity UPLC H Class [37].

Nesse contexto, a empresa Waters, em 2004, desenvolveu e patenteou a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) (Figura 9), uma evolução da HPLC que se caracteriza pelo uso de colunas com partículas de diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$  e pela operação sob pressões substancialmente superiores (acima de 15000 psi) [34, 35, 36, 37].

O princípio por detrás desta evolução é a equação de Van Deemter, que descreve a relação entre a eficiência de uma coluna, expressa pela altura equivalente a um prato teórico (HETP ou H), e a velocidade linear do fluxo da fase móvel ( $v$ ) [35]. A equação é geralmente escrita como:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \times v \quad (2)$$

Onde os termos A, B e C representam diferentes fontes de dispersão dos picos [38]. O termo A, termo da difusão turbulenta, conhecido como efeito de múltiplos caminhos, corresponde às diferenças nos caminhos percorridos pelas moléculas através da coluna devido à estrutura granular da fase estacionária [38]. O termo B, ou difusão longitudinal, descreve a difusão das moléculas ao longo da coluna, que tende a alargar os picos, sobretudo a baixas velocidades da fase móvel [38]. O termo C, relacionado com a transferência de massa, reflete a resistência ao equilíbrio entre fase móvel e fase estacionária, tornando-se mais significativo a velocidades elevadas, quando as moléculas têm menos tempo para interagir com a fase estacionária [38].

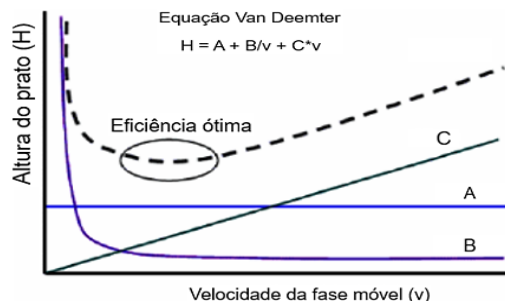


Figura 10 - Variação dos parâmetros da equação Van Deemter [38].

A equação de Van Deemter mostra assim que existe uma velocidade ótima (ilustrada na Figura 10) da fase móvel, que minimiza a HETP (H) e maximiza a eficiência da separação, sendo que velocidades muito baixas ou muito altas aumentam a dispersão devido aos efeitos de B e C, enquanto o termo A contribui de forma constante para a largura dos picos [35].

Na Figura 11 é possível observar ainda o efeito do tamanho das partículas no HETP e na velocidade linear, mostrando que partículas de menor diâmetro superam o alargamento da banda em comparação com partículas maiores, e são menos afetadas por um fluxo de coluna mais elevado [36].

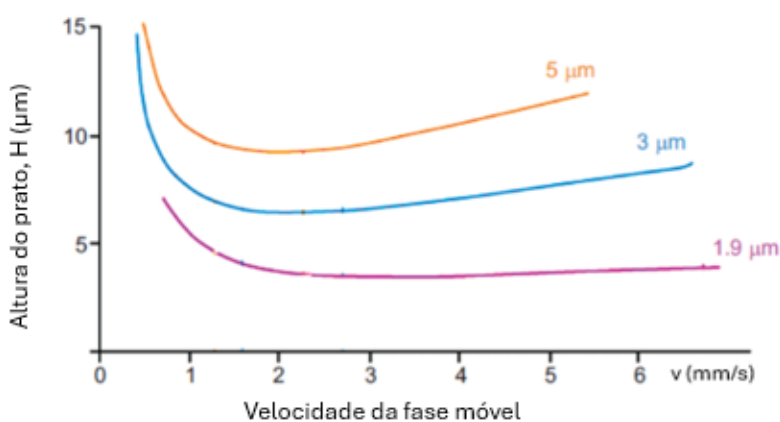


Figura 11 - Gráfico de Van Deemter: O efeito do tamanho das partículas (em  $\mu\text{m}$ ) na altura da placa (H). Um tamanho de partícula mais pequeno proporciona eficiências de pico globais mais elevadas e uma vasta gama de fluxos [36].

Assim, a redução do tamanho das partículas da coluna permite reduzir o comprimento da mesma (pois a resistência ao fluxo é maior, aumentando a pressão e, portanto, também a velocidade) bem como aumentar o fluxo, o que torna a separação mais rápida, sem perda de resolução e com um menor gasto de solvente [36].

O UPLC possui alta resolução, maior rapidez, maior seletividade e sensibilidade e menor gasto de solvente que HPLC [38]. No entanto, produz maiores contrapressões, o que reduz a vida útil das colunas [38]. Para além disso, por ser um equipamento mais avançado e que funciona a elevadíssimas pressões, é mais caro, e necessita de verificações e substituições de peças mais frequentemente [38].

Ainda assim, as vantagens inerentes à UPLC em relação à HPLC podem atenuar as suas desvantagens ao longo do tempo, tornando o UPLC uma opção rentável, pelo que motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que essa técnica

apresenta potencial para otimizar o desempenho analítico e contribuir para a implementação de procedimentos mais sensíveis, rápidos e sustentáveis, em consonância com as atuais demandas do setor farmacêutico [38, 39].

#### 1.2.7. VARIÁVEIS CRÍTICAS

O controle rigoroso das variáveis críticas num método de análise, nomeadamente: a composição da fase móvel, a fase estacionária, o fluxo, a pressão e a temperatura, é fundamental para assegurar separações eficientes, reprodutíveis e com elevada resolução entre os analitos.

##### **Fase móvel**

A fase móvel desempenha um papel determinante na seletividade e no tempo de retenção dos analitos. Esta deve ser composta por solventes de elevada pureza e compatíveis tanto com a fase estacionária como com o detetor, evitando interferências ou ruído de base [40, 41]. Normalmente, utiliza-se uma combinação de um solvente aquoso (água ou tampão) e um solvente orgânico (metanol ou acetonitrilo), podendo incluir modificadores de pH para ajustar a ionização dos analitos e garantir estabilidade química [40, 25].

O controle do pH é especialmente importante, uma vez que pequenas variações podem alterar a forma iónica das substâncias, modificando as interações com a fase estacionária e, conseqüentemente, o perfil cromatográfico [28]. A escolha entre eluição isocrática (composição fixa da fase móvel) e em gradiente (composição variável) depende da complexidade da amostra, uma vez que gradientes são preferíveis quando há grande diferença de polaridade entre os compostos, pois melhoram a resolução e reduzem o tempo total de análise [28].

##### **Fase estacionária**

A fase estacionária é o material que se encontra no interior da coluna, que define as interações químicas responsáveis pela separação dos compostos da amostra, com base nas interações entre os analitos e a superfície do material de suporte, pelo que a escolha da coluna certa faz toda a diferença no resultado da análise [42].

Atualmente, a técnica de separação mais utilizada na indústria farmacêutica é a cromatografia de fase reversa (RP) [42, 43]. As amostras adequadas a esta técnica possuem uma alta solubilidade em água/solventes orgânicos polares, e a fase estacionária pode conter uma variedade de suportes quimicamente modificados com grupos hidrofóbicos, como é o caso das vulgarmente chamadas colunas C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>, classificadas consoante o número de hidrocarbonetos adicionados à estrutura base de sílica [42, 43]. No [Anexo 4](#) encontram-se representadas estruturas químicas de algumas fases estacionárias.

Parâmetros físicos da coluna, como tamanho das partículas (Figura 12), comprimento (Figura 13) e diâmetro interno (colunas de diâmetro  $\leq 2,1$  mm oferecem maior sensibilidade e menor consumo de solvente, já colunas de diâmetro  $\geq 4,6$  mm, suportam caudais mais elevados), influenciam diretamente o desempenho cromatográfico [44].

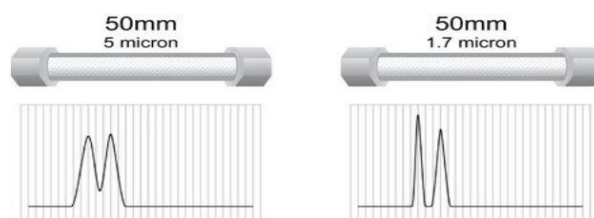


Figura 12 - Poder de separação mecânica para enchimento de 5  $\mu\text{m}$  e 1,7  $\mu\text{m}$ , e igual comprimento de coluna [45].

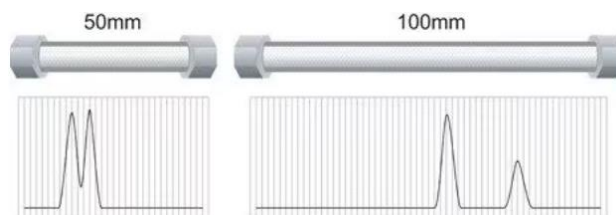


Figura 13 - Poder de separação mecânica para colunas com 50 mm e 100 mm de comprimento, com mesmo tamanho de partícula [45].

## Fluxo

O fluxo da fase móvel é igualmente crítico, pois afeta a eficiência, o tempo de retenção e a resolução. Fluxos mais elevados reduzem o tempo de análise, mas podem comprometer a separação e aumentar a contrapressão do sistema [46]. Já fluxos mais baixos melhoram a eficiência de separação, à custa de um maior tempo de corrida [46]. Assim, o fluxo ideal é aquele que maximiza a resolução sem ultrapassar os limites de pressão suportados pela coluna e pela bomba [46].

## Pressão

A pressão é diretamente proporcional ao tamanho das partículas, ao comprimento da coluna e ao fluxo da fase móvel. Deve manter-se estável durante toda a análise, uma vez que flutuações podem indicar problemas como a presença de bolhas, obstruções ou fugas no sistema. A manutenção de uma pressão constante é essencial para assegurar a reprodutibilidade dos resultados e preservar a integridade do sistema cromatográfico [47]. Pressões excessivamente elevadas podem causar desgaste prematuro do equipamento e danos às colunas, enquanto pressões demasiado baixas podem refletir vazamentos, falhas na bomba ou perda de eficiência na separação cromatográfica.

## Temperatura

A temperatura desempenha um papel central na cromatografia, influenciando a cinética de eluição, a difusão dos solutos e parâmetros cromatográficos como tempo de retenção, seletividade, eficiência e reprodutibilidade [48].

O aumento da temperatura reduz a viscosidade da fase móvel, melhorando a difusão dos analitos e diminuindo a pressão do sistema, o que permite trabalhar com caudais mais elevados [48].

A temperatura afeta igualmente o equilíbrio termodinâmico entre o analito e a fase estacionária [48]. Em termos gerais, temperaturas mais elevadas diminuem os tempos de retenção devido ao enfraquecimento das forças intermoleculares responsáveis pela adsorção, pelo que uma mudança na temperatura pode permitir uma separação entre solutos, que não seria obtida empregando-se a temperatura originalmente utilizada [48]. Esta dependência da retenção em relação à temperatura pode ser descrita pela equação de Van't Hoff (Equação 3) que mostra que, para a maioria dos analitos, temperaturas mais altas aumentam a taxa de dessorção e eluição:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (3)$$

Onde  $k$  é o fator de retenção,  $\Delta H^\circ$  representa a entalpia do sistema,  $\Delta S^\circ$  corresponde à entropia do sistema,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  a temperatura absoluta em Kelvin e  $\phi$  é a razão do volume entre a fase estacionária e a fase móvel [48].

Também o fator de retenção para solutos com maior  $\Delta H$  é mais afetado do que para solutos com menor valor de  $\Delta H$ , fornecendo diferentes seletividades em diferentes temperaturas [48].

Variações de temperatura podem assim comprometer a repetibilidade e a robustez do método, e analitos termossensíveis podem degradar-se a temperaturas mais elevadas, originando produtos secundários que interferem na quantificação [48]. Por isso, é fundamental o controlo rigoroso da temperatura da coluna através de sistemas termostatisados, bem como a definição prévia de um intervalo térmico seguro de operação [48].

### 1.2.8. CROMATOGRAMA

Com os sinais enviados pelo detetor, um computador gera um gráfico denominado de cromatograma, onde é possível analisar o resultado da análise cromatográfica.

Na Figura 14 está representado o cromatograma de uma separação típica de duas substâncias, 1 e 2, onde:  $t_1$  e  $t_2$  são os tempos de retenção respetivos;  $h$ ,  $h/2$  e  $W_{h/2}$  são a altura, meia altura e a largura a meia altura, respetivamente, para o pico 1;  $W_1$  e  $W_2$  são as larguras dos picos 1 e 2, respetivamente, na base de referência; e  $t_M$  o chamado “tempo morto/vazio”, que corresponde ao tempo total que qualquer componente passa na fase móvel [49].

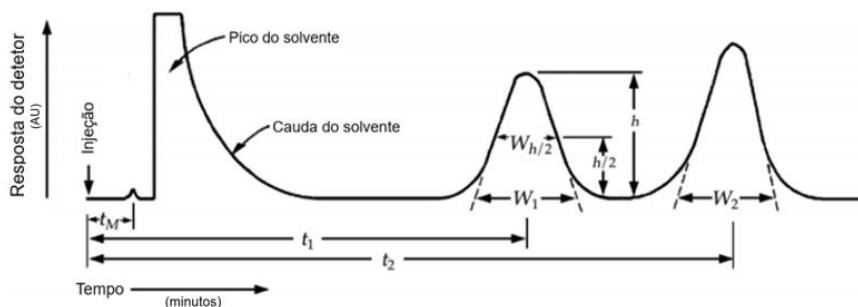


Figura 14 - Separação cromatográfica de duas substâncias [49].

Uma determinada substância, utilizando-se as mesmas condições, possui sensivelmente o mesmo tempo de retenção ( $t_R$ ), dado pela diferença entre o momento em que o pico máximo elui e o momento da injeção (tempo zero), em minutos [49, 50]. Assim, soluções padrão são injetadas no mesmo sistema cromatográfico, utilizando a mesma fase móvel e estacionária, para construir a curva de calibração. Esta curva permite correlacionar o tempo de retenção das amostras testadas com os compostos presentes, possibilitando a sua identificação [50].

A partir do cromatograma, é possível realizar a análise quantitativa da amostra, determinando a concentração de cada composto presente com base na área ou altura dos picos e na curva de calibração previamente construída [50].

No caso da substância 1, da Figura 13, a sua área (A) poderia ser calculada com a Equação 4 [51].

$$A = \frac{1}{2} h \times W_1 \quad (4)$$

Uma vez registrado o cromatograma, devem ser executados os requisitos especificados no método.

#### 1.2.8.1. Relação sinal-ruído (S/N)

O ruído a curto prazo influencia a precisão e a exatidão da quantificação. A relação sinal-ruído é calculada utilizando a Equação 5:

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (5)$$

Onde H é a altura do pico correspondente ao componente em causa, no cromatograma obtido com a solução de referência, medida entre o máximo do pico e a linha de base extrapolada do sinal, observada a uma distância de, pelo menos, 5 vezes a largura a meia altura, e h representa a amplitude do ruído num cromatograma obtido após a injeção de um branco, observada a uma distância de, pelo menos, 5 vezes a largura a meia altura do pico no cromatograma obtido com a solução de referência e, se possível, situada igualmente em torno do local onde se encontraria esse pico (representado na Figura 15) [52].

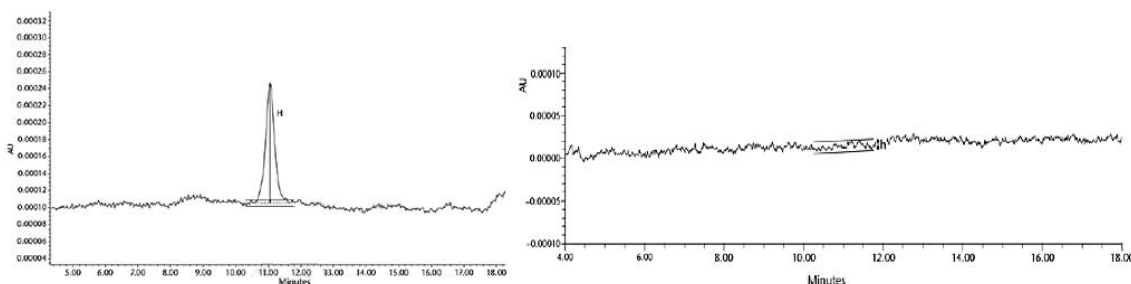


Figura 15 - Cromatograma da solução de referência (à esquerda) e do branco (à direita) com variáveis H e h representadas [52].

#### 1.2.8.2. Precisão

A precisão é feita com pelo menos cinco injeções da solução padrão quando o desvio padrão relativo da área das injeções for menor ou igual a 2%. Para desvios padrão relativos superiores a 2%, devem ser realizadas seis injeções.

### 1.2.8.3. Pratos Teóricos (N)

O número de pratos teóricos é um parâmetro que avalia a eficiência da coluna cromatográfica. Cada prato teórico corresponde a uma zona hipotética em que o soluto atinge o equilíbrio completo entre a fase móvel e a fase estacionária. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior a eficiência da coluna na separação dos compostos. Este é calculado da seguinte forma:

$$N = 16 \left( \frac{t}{W} \right)^2 \quad (6)$$

Onde  $t$  é o tempo de retenção da substância desde a injeção até ao máximo do pico, e  $W$  a largura da base do pico, obtida por extrapolação dos segmentos retos de cada lado do pico até à linha de base.

### 1.2.8.4. Fator de Simetria (T)

Em cromatografia líquida, a forma ideal dos picos corresponde a uma distribuição Gaussiana, caracterizada por simetria perfeita [53]. Contudo, em condições analíticas reais, observa-se frequentemente assimetria do pico, evidenciada sob a forma de *fronting* ou *tailing* [53].

A avaliação quantitativa desta assimetria é habitualmente efetuada através do *tailing factor* (T), conforme definido pela *United States Pharmacopeia* (USP) e ilustrado na Figura 16, o qual é determinado a partir do quociente entre a largura do pico medida a 5% da sua altura ( $W_{0,05}$ ) e o dobro da largura da parte frontal do pico, medida a 5% de altura ( $f$ ) [53].

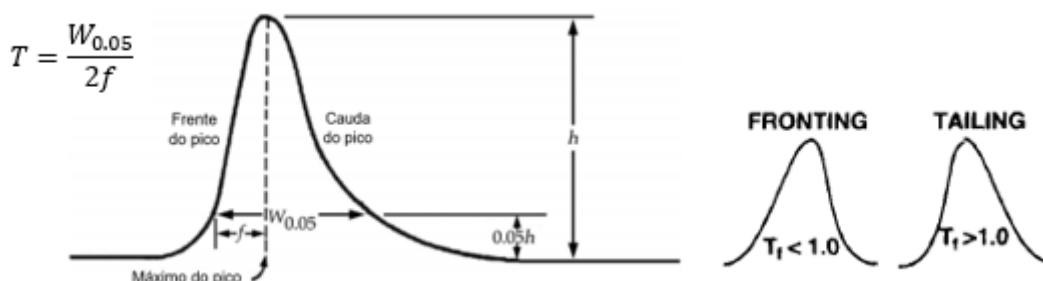


Figura 16 - Diagrama que apresenta pico cromatográfico assimétrico e cálculo do fator de assimetria (*tailing factor*) [49]. À direita encontram-se ainda diagramas de dois picos, um com *fronting* e outro com *tailing* [53].

Valores de T compreendidos entre 0,9 e 1,4 são considerados aceitáveis, sendo 1,0 indicativo de um pico simétrico [53].

O *tailing* é geralmente causado por fenómenos de adsorção ou por outras interações fortes entre o analito e a fase estacionária, enquanto o *fronting* pode resultar de sobrecarga da coluna, de reações químicas ou de processos de isomerização ocorridos durante o processo cromatográfico [53].

#### 1.2.8.4. Resolução (R)

Avalia o grau de separação de dois picos. É utilizada para estabelecer a eficiência do sistema para separar os picos dos vários componentes. O cálculo da resolução é efetuado com base na Equação 7.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1} \quad (7)$$

Onde  $t_2$ ,  $t_1$  correspondem aos tempos de retenção de dois componentes, desde o tempo de injeção até ao tempo de eluição correspondente ao máximo pico e  $W_2$ ,  $W_1$  à largura das bases dos picos correspondentes.

#### 1.2.9. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Entende-se por validação o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, que as características de desempenho do procedimento cumprem os requisitos para as aplicações analíticas pretendidas.

A validação pode ser de diversos tipos: validação de processos, validação de métodos analíticos, validação de limpeza ou validação de sistemas computadorizados [54].

De acordo com a norma ICH Q2 (R1), a validação de métodos analíticos pode ser definida como: “Estabelecer uma prova documentada que proporcione um elevado grau de garantia de que um processo específico produzirá consistentemente um resultado pretendido de acordo com as especificações e características de qualidade previamente definidas”, isto é, que um procedimento analítico é adequado para a utilização planeada [54]. O procedimento analítico refere-se à forma de efetuar a análise, descrevendo em pormenor os passos necessários para efetuar cada teste analítico, incluindo a preparação da amostra, do padrão de referência e dos reagentes, utilização do aparelho, geração da curva de calibração, utilização das fórmulas para os cálculos, entre outros [55].

A validação de métodos é necessária quando um novo método é desenvolvido e quando os métodos estabelecidos são utilizados em diferentes laboratórios e por diferentes analistas [54].

Os ensaios de validação de procedimentos analíticos variam consoante a natureza de cada procedimento a validar, que se pode dividir em 4 categorias:

Categoria I - Métodos analíticos para a quantificação dos principais componentes de substâncias medicamentosas ou dos princípios ativos (incluindo os conservantes) nos produtos farmacêuticos: Procedimentos de ensaio (*Assay*);

Categoria II - Métodos analíticos para a determinação das impurezas (compostos relacionados, compostos de degradação, solventes residuais e metais pesados presentes em substâncias medicamentosas a granel, matérias-primas e produtos acabados) presentes nas substâncias medicamentosas ou nos compostos de degradação dos produtos farmacêuticos acabados;

Categoria III - Métodos analíticos para a determinação das características de desempenho (por exemplo, dissolução, libertação do fármaco): Procedimentos de dissolução;

Categoria IV - Testes de identificação.

No [Anexo 5](#) encontra-se uma tabela com os parâmetros analíticos para validação de métodos dos procedimentos que se encaixam nas diferentes categorias supramencionadas.

Para o método desenvolvido ao longo do presente relatório, os parâmetros avaliados serão a adequabilidade do sistema (SST), precisão, linearidade, range, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade e especificidade.

### **Adequabilidade do sistema (*System Suitability Test, SST*)**

A adequabilidade do sistema é o critério estabelecido para garantir que a validade do procedimento analítico seja mantida sempre que utilizado. É avaliada por um conjunto de testes realizados antes e durante a análise cromatográfica para confirmar que o sistema analítico está a funcionar corretamente e é adequado ao método que se pretende aplicar.

Os critérios de adequação do sistema devem ser cumpridos para que os resultados gerados sejam aceites.

A adequação do sistema inclui também o tempo de estabilização necessário, quaisquer precauções antes de colocar o sistema em funcionamento e o número de injeções de configuração do sistema necessárias para garantir que o sistema está pronto para a análise.

### **Precisão**

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a amostras múltiplas de uma amostra homogénea, e é expressa normalmente através do desvio padrão relativo (RSD) de várias repetições.

Esta pode ser uma medida do grau de reprodutibilidade - que se refere à utilização do procedimento analítico em diferentes laboratórios (ex.: estudo colaborativo) - ou de repetibilidade - que se refere à utilização do procedimento analítico num laboratório durante um curto período, utilizando o mesmo analista e o mesmo equipamento - do método analítico em condições normais de funcionamento.

A precisão é classificada em três categorias:

- **Precisão do sistema** – Verifica a eficácia do sistema operativo como um sistema único; avalia se o equipamento está a funcionar de forma estável e consistente, por injeções consecutivas da mesma solução padrão e cálculo do desvio padrão relativo da área dos picos ou do desvio padrão;
- **Precisão do método** - utilizada para determinar a repetibilidade do método analítico (mesmo operador e condições idênticas) através da avaliação de um número de amostras contendo quantidades conhecidas de analito;
- **Precisão intermediária (*ruggedness*)** - reflete a robustez do método quando sujeito a pequenas variações nas condições experimentais, isto é, avalia se o método continua a fornecer resultados fiáveis e consistentes mesmo quando há mudança de operador e pequenas mudanças nas condições experimentais.

## **Linearidade**

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de obter resultados de ensaio que são diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração da substância a analisar nas amostras dentro de uma determinada gama.

Deve ser estabelecida inicialmente por exame visual de uma representação gráfica dos sinais em função da concentração do analito no teor. Se parecer existir uma relação linear, os resultados do teste devem ser estabelecidos por métodos estatísticos adequados (ex.: através do cálculo de uma linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados).

É normalmente expresso em termos de variância em torno do declive da reta de regressão calculada de acordo com uma relação matemática estabelecida a partir de resultados de ensaios obtidos pela análise de amostras com concentrações variáveis de analito. O fator de correlação (R) avalia o grau de linearidade entre os pontos experimentais [56].

## **Gama**

A gama de um método analítico é o intervalo entre os níveis superior e inferior (inclusive) da substância a analisar, no qual se considera que o método é exato, preciso e linear.

## **Exatidão**

A exatidão de um método analítico pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor real/convencional, e deve ser estabelecida em toda a gama especificada do procedimento analítico [54]. É frequentemente expressa como uma percentagem de recuperação, através do ensaio de quantidades adicionadas conhecidas de analito.

A exatidão pode ser obtida de várias formas, incluindo a avaliação da recuperação da substância a analisar (percentagem de recuperação) ao longo do intervalo do ensaio, ou a avaliação da linearidade da relação entre as concentrações estimadas e reais.

## **Limite de deteção (*Limit Of Detection*, LOD)**

O limite de deteção é a concentração mais baixa, de uma substância a analisar numa amostra, que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, nas condições experimentais indicadas. Este é expresso como a concentração da substância a analisar.

## **Limite de quantificação (*Limit Of Quantification*, LOQ)**

O limite de quantificação é um parâmetro de quantificação ou ensaio para baixos níveis de compostos em matrizes de amostras, tais como impurezas em substâncias a granel e formas de dosagem acabadas. É a concentração mais baixa, de uma substância a analisar numa amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis

nas condições experimentais indicadas. O limite de quantificação, tal como o limite de detecção, é expresso como a concentração da substância a analisar.

### **Estabilidade das soluções (*Stability of Analytical Solutions, SOAS*)**

Neste contexto a estabilidade refere-se à capacidade de uma solução padrão ou de amostra de manter as suas propriedades químicas e físicas inalteradas durante um determinado período e sob condições específicas de armazenamento.

A estabilidade do padrão é analisada durante um período específico, em comparação com a mesma solução recém-preparada para comparação.

A estabilidade da amostra pode ser determinada por análise durante um período especificado em relação à recuperação da solução original da amostra, em comparação com uma solução de amostra recém-preparada e/ou uma solução padrão recém-preparada.

A percentagem de recuperação entre as soluções recentemente preparadas e a da solução originalmente preparada fornece os dados de estabilidade, que só são relevantes para as condições de armazenamento estabelecidas (armazenadas à temperatura ambiente, em condições de refrigeração, em bancada, dentro do amostrador automático, no armário de armazenamento escuro, em balão volumétrico de plástico/vidro, etc).

### **Especificidade/Seletividade**

A especificidade é a capacidade de avaliar inequivocamente a substância a analisar na presença de componentes que se pode esperar que estejam presentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A falta de especificidade de um procedimento analítico individual pode ser compensada por outros procedimentos analíticos de apoio.

Autoridades internacionais de renome, como a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), têm preferido o termo “seletividade”, reservando “especificidade” para os procedimentos que são completamente seletivos.

Testes de identificação: assegurar a identidade da substância a analisar;

Testes de pureza: assegurar que todos os procedimentos analíticos realizados permitem uma declaração exata do teor de impurezas de uma substância a analisar (por exemplo, ensaio de substâncias relacionadas, limite de metais pesados ou impurezas orgânicas voláteis);

Assay: fornecer um resultado exato que permita uma declaração precisa sobre o teor ou a potência da substância a analisar numa amostra.



## 2. METODOLOGIA

O desenvolvimento do método analítico por UPLC, destinado a ser utilizado nos testes de rotina para detectar a ausência de cefalosporinas nas áreas comuns do departamento de líquidos e liofilizados e na monitorização do pessoal, iniciou-se tendo como base um método analítico por HPLC ([Anexo 6](#)).

### 2.1. MATERIAIS

As medidas de segurança relativas às substâncias de referência e reagentes encontram-se apresentadas no [Anexo 7](#).

#### 2.1.1. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA (CEFALOSPORINAS)

- Ceftizoxime Sodium;
- Cefotaxime Sodium;
- Cefuroxime Sodium;
- Cefazolin Sodium;
- Cefoxitin Sodium;
- Ceftriaxone Sodium;
- Cefepime for Injection;
- Ceftazidime Pentahydrate.

#### 2.1.2. REAGENTES

- Di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );
- Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ );
- Citrato de Sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );
- Ftalato de potássio monobásico ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ );
- Ácido Clorídrico (HCl);
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), grau HPLC;
- Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), grau HPLC;
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ );
- Hidróxido de Sódio (NaOH).

#### 2.1.3. EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica;
- Placa de aquecimento com agitação magnética;
- Potenciômetro;
- Banho de ultrassons;
- Bomba de vácuo;
- Espectrofotômetro UV-Vis;
- UPLC Waters Acquity H Class.

#### 2.1.4. MATERIAIS PARA AMOSTRAGEM

- Xtra PTFE – 45/25, Chromafil®
- Zaragatoas TX 761K, Texwipe®
- Zaragatoas Cultiplast®

#### 2.1.5. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

- CORTECS UPLC C18+ 1,6 µm 2,1×100mm;
- ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm);
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm);
- Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1,7 µm (2,1×50 mm).

### 2.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Além de detetar todas as oito cefalosporinas, eram objetivos deste desenvolvimento de método: alcançar a separação satisfatória entre o pico de injeção e a primeira cefalosporina que elui, bem como entre os picos correspondentes às oito cefalosporinas, com resolução acima de 1 e razão s/n acima de 10; diminuir o tempo de corrida; diminuir o LOD.

Para tal, durante a fase inicial de desenvolvimento, foi necessário preparar diferentes soluções:

- Oito soluções individuais, uma para cada cefalosporina, para identificar os picos, a uma concentração de 5 ppm;
- Mistura contendo todas as oito cefalosporinas, a uma concentração de 5 ppm, para avaliar a separação (solução padrão ou STD 5ppm);
- Mistura contendo todas as oito cefalosporinas a uma concentração de 0,02 ppm, de forma a observar o desempenho do método no limite de deteção do método atual.

Como o UPLC em questão não era utilizado há muito tempo, inicialmente lavou-se bem o sistema e purgou-se todos os canais com o solvente.

Ao se montar cada coluna, purgou-se os canais utilizados e lavou-se a mesma com um fluxo de 0,3 mL/min, primeiramente com uma proporção água desmineralizada: acetoneitrilo de 90:10, durante 30 minutos, e, em seguida, numa proporção 50:50, por mais 30 minutos - procedimento padrão, não havendo indicação em contrário do fornecedor - inspecionando inicialmente a coluna para garantir não haver fugas, e controlando a pressão pelo software.

O Software utilizado para comandar todas as operações descritas foi o Software Waters Empower 3 (CDS).

Foram avaliados diversos parâmetros de modo a estudar as melhores condições de separação entre os picos cromatográficos.

No total foram feitos seis tampões distintos para preparação de fase móvel, conforme mostrado na Tabela 1. De modo a facilitar a organização, as diferentes preparações serão designadas por Método A, B, C, D, E e F.

Tabela 1 - Métodos A-F de acordo com o tampão utilizado, proporções de tampão:orgânico e pH's da fase móvel/tampão testados.

Método	Tampão utilizado	Proporção			pH
		Tampão	Metanol	Acetonitrilo	
A	Di-Hidrogenofosfato de Potássio	82	13	5	3,2
B	Di-Hidrogenofosfato de Potássio (fase móvel filtrada)	82	13	5	3,2
		85	10	5	3,2
		85,5	10	4,5	3,2
		85,5	9,5	5	3,2
		86	9	5	3,0
C	Ftalato	86	9	5	3,0 (tampão)
D	Citrato	86	9	5	3,0 (tampão)
E	Di-Hidrogenofosfato de Potássio (quantidade ajustada)	86	9	5	3,0
					5,0
					4,0
F	Fosfato pH 4,0 (quantidade ajustada)	Canais separados*			4,0
		Método em gradiente (87:8:5 e 86:8:6)			4,0
		87	7,5	5,5	4,0
					3,8
					3,6
		88	6	6	4,0
		90	6	4	
		89	6	5	
		86	6	8	
		85	6	9	
		87	6	7	
		88	5	7	
		90	3	7	
		91	2	7	
93	0	7			

\* De forma a simplificar o processo e evitar a necessidade de preparar uma nova fase móvel para cada ensaio, utilizaram-se canais separados no equipamento de UPLC para o tampão:metanol:acetonitrilo, de forma semelhante a um fluxo em gradiente, mas mantendo a percentagem de cada canal ao longo de toda a corrida. Os resultados encontram-se mencionados em [3.1.5. Método E](#) e [Anexo 8](#). As diferentes percentagens testadas foram: 85:10:5, 87:8:5, 88:7:5, 87:7:6, 89:7:4, 89:6:5, 86:8:6, 86:9:5, 84:10:6, 85:9:6, 87,5:7,5:5, 83:10:7, 87:7,5:5,5.

Os métodos acima descritos foram aplicados em diferentes colunas, nas quais foram testadas diversas temperaturas e fluxos, descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Colunas e condições de temperatura e fluxo utilizadas nos métodos A-F.

Método	Coluna	Temperatura da coluna	Fluxo
A, B	CORTECS UPLC C18+ 1,6 µm (2,1×100mm)	32°C	0,3 mL/min
B	ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm)	32°C	0,3 mL/min
			0,25 mL/min
			0,35 mL/min
		30°C	0,3 mL/min
35°C	0,3 mL/min		
C, D, E, F	ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm)	32°C	0,3 mL/min
B, E, F	ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm)	32°C	0,3 mL/min
B	Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1,7 µm (2,1×50 mm)	32°C	0,3 mL/min

Em [3.1.2. Método B](#) encontram-se também mencionados os diferentes comprimentos de onda e solventes experimentados.

## 2.2.1 PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL

### 2.2.1.1 Método A

**Tampão:** Dissolver 5,45 g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio em 820 mL de água desmineralizada.

**Fase móvel:** Adicionar aos 820 mL de tampão, 130 mL de metanol e 50 mL de acetoni-trilo (82:13:5). Misturar bem. Ajustar o pH a 3,2, com ácido fosfórico.

### 2.2.1.2 Método B

Mesma preparação que [Método A](#), com a diferença de se filtrar a vácuo as fases móveis no final. O material utilizado e montagem encontram-se ilustrados na Figura 17.

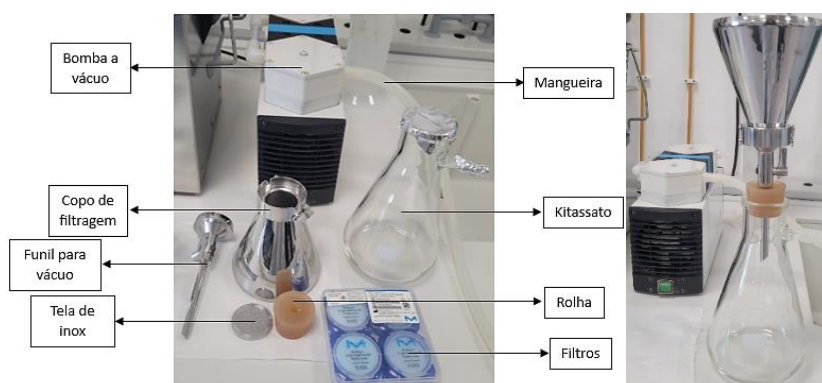


Figura 17 – Material para filtração a vácuo da fase móvel (imagem da esquerda) e respetiva montagem (imagem da direita).

As fases móveis nos métodos conseguintes continuaram a ser filtradas da mesma forma.

### 2.2.1.3 Método C

Preparou-se o Tampão Ftalato (*Acid Phthalate Buffer*) de acordo com a USP “*Buffer Solutions*”, cujo procedimento se encontra na Tabela 3 [57].

Tabela 3 – Preparação de Tampão Ftalato, de acordo com a USP [57].

Solução de ftalato de potássio 0,2 M: 40,85 g/L de ftalato de potássio em água.	
<b>Tampão Ftalato</b>	
Coloque 50 mL da solução de ftalato de potássio num balão volumétrico de 200 mL, adicione o volume especificado da solução de ácido clorídrico (HCL) e, em seguida, adicione água até atingir o volume desejado.	
<b>pH</b>	3,0
<b>0,2M HCl (mL)</b>	22,3

Para preparar 1L de fase móvel, prepararam-se as seguintes soluções.

#### Solução de Ftalato de Potássio

Pesar aproximadamente 10,2125 g de  $C_8H_5KO_4$  (*Potassium Biphthalate*, Ftalato de potássio), e dissolver para balão de 250 mL, com água desmineralizada. Misturar bem.

#### Solução 0,2M HCl

Pipetar 17mL de HCl (ácido clorídrico) e diluir para balão de 1000 mL, com água desmineralizada. Misturar bem.

#### Tampão Ftalato pH 3,0

Juntar os 250 mL de solução de ftalato de potássio e 111,5 mL de solução 0,2M HCl num balão volumétrico de 1L, perfazendo o restante volume com água desmineralizada. Misturar bem e ler o seu pH.

#### Preparação da fase móvel 86:9:5 com tampão ftalato

Juntar 860 mL de tampão ftalato, 90 mL de metanol e 50 mL de acetonitrilo. Misturar bem e filtrar a vácuo.

### 2.2.1.4. Método D

Preparou-se o Tampão Citrato (*Citrate Buffer*) de acordo com a USP “*Buffer Solutions*”, cujo procedimento se encontra na Tabela 4 [57].

Tabela 4 - Preparação de Tampão Citrato, de acordo com a USP [57].

Solução de Ácido Cítrico, 0,1 M: 21,01 g/L de ácido cítrico em água.	
Solução de Citrato de Sódio, 0,1 M: 29,41 g/L de citrato de sódio em água.	
<b>Tampão Citrato</b>	
Misture ácido cítrico 0,1 M com citrato de sódio 0,1 M nas proporções indicadas abaixo.	
<b>pH</b>	3,0
<b>0,1M Ácido Cítrico (mL)</b>	82,0
<b>0,1M Citrato de Sódio (mL)</b>	18,0

Para preparar 1L de fase móvel, prepararam-se as seguintes soluções.

#### **Solução 0,1M Ácido Cítrico**

Pesar aproximadamente 17,2282 g de  $C_6H_8O_7$  (ácido cítrico) e dissolver em 820 mL de água desmineralizada. Misturar bem.

#### **Solução 0,1M Citrato de Sódio**

Pesar aproximadamente 5,2938 g de  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  (citrato de sódio) e dissolver em 180 mL de água desmineralizada. Misturar bem.

#### **Tampão Citrato pH 3,0**

Juntar os 180 mL de solução 0,1M Citrato de Sódio aos 820 mL de solução 0,1M Ácido Cítrico. Misturar bem e ler o seu pH.

#### **Preparação da fase móvel 86:9:5 com tampão citrato**

Juntar 860 mL de Tampão Citrato, 90 mL de metanol e 50 mL de acetonitrilo. Misturar bem e filtrar a vácuo.

#### *2.2.1.5. Método E*

Inicialmente, 5,45 g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio ( $KH_2PO_4$ ) eram diluídos em 820 mL de água, por isso, calculou-se que seria necessário pesar aproximadamente 5,72 g para 860 mL de água, para que o tampão tivesse a mesma diluição inicial.

Ao tampão adicionou-se, de seguida, 90 mL de metanol e 50 mL de acetonitrilo, tal como em [Método A](#).

Para aumentar o pH das fases móveis utilizou-se hidróxido de sódio, ao passo que, para diminuir, se continuou a utilizar ácido fosfórico.

#### *2.2.1.6. Método F*

Para a preparação de 1000 mL de tampão, pesou-se 5,71 g de reagente Di-Hidrogenofosfato de Potássio e completou-se o volume com água desmineralizada. Ajustou-se o pH da solução tampão, em vez do pH da fase móvel final como havia sido feito nos métodos anteriores.

A restante preparação das fases móveis foi levada efetuada como descrito anteriormente, verificando o pH da solução tampão e de seguida, misturar na preparação.

#### **2.2.2 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO 5 PPM, 0,02 PPM E SOLUÇÕES INDIVIDUAIS**

Solvente: Água desmineralizada.

Solução Stock: Pesar com exatidão o equivalente a 20 mg de cada cefalosporina: Cef-tizoxime Na, Cefotaxime Na, Cefuroxime Na, Cefazolin Na, Cefoxitin Na, Ceftriaxone Na, Cefepime e Ceftazidime, para um balão volumétrico de 100 mL, perfazendo com solvente.

Solução Padrão 5 ppm: Diluir 5 mL da Solução Stock para um balão volumétrico de 250 mL, com solvente.

Solução Padrão 0,02 ppm: Diluir 1 mL de Solução Padrão 5 ppm para balão de 25 mL, perfazendo com solvente. De seguida, pipetar 1 mL para balão de 10 mL e completar com solvente.

Soluções Individuais: Igual à preparação da Solução Stock e Solução Padrão 5 ppm, porém, para cada cefalosporina individualmente.

### 2.2.3 AMOSTRAGEM

Transferir 10 mL de Solução Padrão 0,02 ppm e 10 mL de solvente (água desmineralizada) para 2 tubos, respetivamente. Mergulhar uma zaragatoa Cultiplast, em cada um. Repetir para a marca Texwipe.

Levar as 4 zaragatoas ao banho de ultrassons por 5 minutos.

Passados os 5 minutos, agitar bem o conteúdo de cada uma das zaragatoas e, utilizando uma seringa de 5 mL e um filtro PTFE 45/25 (para cada uma), filtrar o conteúdo para 4 vials, respetivamente.

Reservar os tubos no frigorífico, sem que as zaragatoas fiquem em contacto com o volume remanescente, de modo a minimizar a degradação, por um máximo de 7 dias.

## 2.3. PROCEDIMENTO ANALÍTICO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O seguinte procedimento analítico de validação foi concebido para validar o método de análise por UPLC para monitorização do *containment* de cefalosporinas, em amostras de superfície. A validação deve ser conduzida de acordo com as diretrizes ICH (ICH Q2) e com o procedimento interno da Hikma Farmacêutica Portugal (SOP), relativo à validação de métodos analíticos.

### 2.3.1. MÉTODO DE AMOSTRAGEM

Área de esfregaço: 100 cm<sup>2</sup>

Solvente para esfregaço: Água desmineralizada

Número e tipo de zaragatoa:

Número do produto Texwipe: TX761K

Número e tipo de filtro:

CHROMAFIL Xtra disposable filter PTFE-45/25, Macherey-Nagel

Tamanho do poro: 0,45 µm

N.º CAT: 9.049 060

### 2.3.2. REAGENTES

Metanol (grau HPLC);

Acetonitrilo (grau HPLC);

Di-Hidrogenofosfato de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>);

Água desmineralizada.

### 2.3.3. PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL

Preparação do tampão fosfato: Dissolver 5,71 g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para balão de 1000 mL, com água desmineralizada. Ajustar o pH a 4,0, com ácido fosfórico.

Preparação da fase móvel: Misturar tampão fosfato, metanol e acetonitrilo numa proporção 88:5:7.

### 2.3.4. SOLVENTE

Água desmineralizada

### 2.3.5. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO

**Solução Stock:** Pesar com exatidão o equivalente a 20 mg de cada uma das seguintes substâncias: Ceftrizoxime Na, Cefotaxime Na, Cefuroxime Na, Cefazolin Na, Cefoxitin Na, Ceftriaxone Na, Cefepime for injection (38,5 mg) e Ceftazidime para um balão volumétrico de 100 ml. Dissolver com solvente.

**Solução Padrão 5 ppm:** Diluir 5,0 mL desta solução para balão de 200 mL, com solvente.

**Solução Padrão 0,02 ppm:** Diluir 1 mL do padrão 5 ppm para balão de 25 mL, prefazer com solvente, e diluir 1 mL para balão de 10 mL, prefazendo no final com solvente.

### 2.3.6. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO SEM CEFTRIAZONE:

**Solução Stock sem Ceftriaxone:** Pesar com exatidão o equivalente a 20 mg de cada uma das seguintes substâncias: Ceftrizoxime Na, Cefotaxime Na, Cefuroxime Na, Cefazolin Na, Cefoxitin Na, Cefepime for injection (38,5 mg) e Ceftazidime para um balão volumétrico de 100 ml. Dissolver com solvente.

**Solução Padrão sem Ceftriaxone 5 ppm:** Diluir 5,0 mL desta solução para balão de 200 mL, com solvente.

**Solução Padrão sem Ceftriaxone 0,015 ppm:** Diluir 1 mL da Solução Stock sem Ceftriaxone para balão de 200 mL, com solvente. Desta, diluir 3 mL para balão de 200 mL, com solvente.

**Solução Padrão sem Ceftriaxone 0,005 ppm:** Diluir 5 mL da solução padrão sem Ceftriaxone para 100 mL, com solvente. Desta, diluir 2 mL para balão de 100 mL, com solvente.

### 2.3.7. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO DE CEFTRIAZONE:

**Solução Stock de Ceftriaxone:** Pesar com exatidão 20 mg de Ceftriaxone Na para um balão volumétrico de 100 ml. Dissolver com solvente.

**Solução Padrão de Ceftriaxone 0,06 ppm:** Diluir 3 mL da Solução Stock de Ceftriaxone para balão de 200 mL, com solvente. Desta, diluir 2 mL para balão de 100 mL, com solvente.

**Solução Padrão de Ceftriaxone 0,015 ppm:** Diluir 1 mL da Solução Stock de Ceftriaxone para balão de 200 mL, com solvente. Desta, diluir 3 mL para balão de 200 mL, com solvente.

### 2.3.8. PREPARAÇÃO DE AMOSTRA

Adicionar exatamente 10 ml de água desionizada a cada amostra de esfregaço em análise. Agitar a amostra durante dez segundos (à mão), levar ao banho de ultrassons durante mais dez segundos e filtrar através de um filtro de 0,45 µm.

### 2.3.9. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Injetar 5 µL de cada solução de solvente, padrão e amostra nas seguintes condições cromatográficas:

Coluna: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm)

Caudal: 0,3 mL/ min.

Comprimento de onda: 240 nm

Temperatura do forno da coluna: 32°C.

Temperatura do arrefecedor de amostras: 8 °C.

Tempo de execução: 5 minutos.

### 2.3.10. REQUISITOS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA

A %RSD da área do pico de cada cefalosporina em seis injeções repetidas da solução padrão deve ser NMT 10,0% e a resolução entre cefalosporinas consecutivas deve ser de NLT 1.

### 2.3.11. CÁLCULOS

#### 2.3.11.1. Quantificação de cefalosporinas em amostras de esfregaço

$$\mu\text{g}/100\text{cm}^2 = \frac{\text{Área Cefalosporina}_{\text{amostra}}}{\text{Área Cefalosporina}_{\text{padrão 5ppm}}} \times \text{Concentração Cefalosporina}_{\text{padrão 5ppm}} (\text{ppm}) \times \text{Diluição (10ml)} \quad (8)$$

#### 2.3.11.2. Percentagem de recuperação

$$\% \text{Recuperação} = \left[ \frac{\left( \frac{\text{Área do pico da cefalosporina na amostra de recuperação}}{\text{Área do pico da cefalosporina no padrão}} \right) \times \text{Concentração da cefalosporina no padrão}}{\text{Concentração da cefalosporina na amostra de recuperação}} \right] \times 100 \quad (9)$$

**2.3.11.3. Desvio Padrão Relativo (%RSD)**

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (10)$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (11)$$

**2.3.11.4. Percentagem de Recuperação – Amostras de Estabilidade em Relação ao Ensaio Inicial**

$$\% \text{ Recuperação} = \left( \frac{\text{Área da solução envelhecida de padrão ou amostra}}{\text{Área da solução inicial de padrão ou amostra}} \right) \times 100 \quad (12)$$

**2.3.11.5. Percentagem de Degradação**

$$\% \text{ Degradação} = \left( \frac{\text{Área da solução degradada de padrão ou amostra}}{\text{Área da solução inicial de padrão ou amostra}} \right) \times 100 \quad (13)$$

**2.3.11.6. Tempo de Retenção Relativo (RRT)**

$$RRT = \frac{RT \text{ pico desconhecido}}{RT \text{ pico conhecido (API)}} \quad (14)$$

**2.3.12. PRECISÃO****Critério de aceitação**

Para que o método seja considerado preciso, a %RSD da área do pico de cada cefalosporina deve ser NMT 10,0%.

**Procedimento**

Preparar Solução Padrão 5 ppm, de acordo com a secção [2.3.5.](#) do procedimento analítico de validação do método, e efetuar 6 injeções múltiplas no sistema UPLC.

**2.3.13. LINEARIDADE****Critério de aceitação**

A %RSD entre três réplicas para o mesmo nível de concentração deve ser inferior ou igual a 10,0% e o coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,98.

**Procedimento**

Preparar os níveis de linearidade efetuando as diluições necessárias conforme ilustrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Níveis de linearidade e seu modo de preparação.

Nível (%)	Diluição	Concentração (µg/ mL)
150	Transferir 15,0 mL de Solução-mãe padrão para um balão volumétrico de 200 mL. Completar o volume com solvente e misturar bem. Diluir 5,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL, com solvente e misturar bem.	7,5
120	Transferir 4,0 mL de nível 150% para um balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com solvente e misturar bem.	6
100	Transferir 5,0 mL de Solução-mãe padrão para um balão volumétrico de 200 mL. Completar o volume com solvente e misturar bem.	5
50	Transferir 5,0 mL de nível 100% para um balão volumétrico de 10 mL. Completar o volume com solvente e misturar bem.	2,5
10	Transferir 2,0 mL de nível 100% para um balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com solvente e misturar bem.	0,5
1,2	Transferir 3,0 mL de Solução-mãe padrão para um balão volumétrico de 200 mL e completar com solvente. Diluir 2,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL, completar com solvente e misturar bem.	0,06
0,3	Transferir 1,0 mL de Solução-mãe padrão para um balão volumétrico de 200 mL e completar com solvente. Diluir 3,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 200 mL, completar com solvente e misturar bem.	0,015

Efetuar três injeções de cada nível de linearidade, e calcular a %RSD em cada nível.

#### 2.3.14. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

##### **Critério de aceitação**

O Nível LOQ deve ser linear, exato e preciso (%RSD para três leituras replicadas deve ser NMT 10,0). A razão *Signal to Noise* (S/N) para o LOQ deve ser NLT 10.

##### **Procedimento**

Preparar os níveis 1,2% e 0,3% de linearidade. Injetar 3 vezes cada um dos níveis.

#### 2.3.15. LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

##### **Critério de aceitação**

A razão *Signal to Noise* (S/N) para o LOD deve ser cerca de 3.

##### **Procedimento**

O nível do limite de detecção é determinado através da realização de diluições adicionais, até se atingir uma razão S/N de cerca de 3.

#### 2.3.16. EXATIDÃO – SWAB CHALLENGE

##### **Critério de aceitação**

A %RSD entre as três injeções para o mesmo nível de concentração deve ser inferior a 10.

A exatidão percentual deve estar compreendida entre  $100,0 \pm 15,0$  da quantidade real (85,0% - 115,0%).

## Procedimento

Mergulhar uma zaragatoa num tubo e adicionar 5,0 mL de cada nível de linearidade (150%, 100% e LOQ%), individualmente. Efetuar 3 destas preparações para cada nível. Levar a banho de ultrassons por cerca de 5 minutos. Injetar uma vez cada preparação.

### 2.3.17. EXATIDÃO – SURFACE TEST

#### Critério de aceitação

A %RSD para a %Recuperação entre as três preparações em cada nível de recuperação deve ser inferior a 15,0.

A exatidão deve ser superior a 50 % da quantidade real para cada preparação individual.

#### Procedimento

Este tem como objetivo validar o processo de esfregaço, determinando-se o fator de extração do esfregaço relevante (apenas para PVC), o que dará uma avaliação da eficiência do esfregaço numa área de 100cm<sup>2</sup>, utilizando as zaragatoas.

Para tal, preparar Solução Padrão 5 ppm, de acordo com a secção [2.3.5](#) do procedimento analítico de validação do método, bem como amostras para o ensaio de superfície do PVC (três níveis) da seguinte forma:

- Branco

Distribuir 0,1 mL de solvente secção [2.3.4](#) numa área de 100 cm<sup>2</sup> da placa de PVC, e deixar à temperatura ambiente até que toda a quantidade distribuída esteja completamente seca.

- Procedimento de amostragem:

- A. Humedecer a zaragatoa necessária com água desmineralizada;
- B. Esfregar a área de 100 cm<sup>2</sup> da placa de PVC com a zaragatoa húmida;
- C. Efetuar a preparação da amostra com este esfregaço:

- Amostras para Recuperação

Distribuir 0,1 mL de cada Nível da Tabela 6 numa área de 100 cm<sup>2</sup> da placa de PVC e deixar à temperatura ambiente até que toda a quantidade distribuída esteja completamente seca. Repetir o procedimento de amostragem acima descrito.

As preparações da Tabela 6 têm em conta que apenas 0,1 ml da solução é aplicada na placa de PVC e que a zaragatoa será diluída para 10 ml.

Tabela 6 - Preparação das Amostras para Recuperação.

Nível (%)	Diluição*	Concentração (µg/ mL)
150	Pesar com exatidão o equivalente a 75 mg de cada cefalosporina, exceto Cefepime for injection, da qual deve se retirado aproximadamente 144,4 mg, para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolver e diluir com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a>	7,5
100	Pesar com exatidão o equivalente a 50 mg de cada cefalosporina, exceto Cefepime for injection, da qual deve se retirado aproximadamente 96,3 mg, para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolver e diluir com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a>	5
100 (Ceftriaxone)	Pesar com exatidão 50 mg de Ceftriaxone para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolver e diluir com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a>	5
100 (sem Ceftriaxone)	Pesar com exatidão o equivalente a 50 mg de cada cefalosporina, exceto Cefepime for injection, da qual deve se retirado aproximadamente 96,3 mg, para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolver e diluir com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a>	5
1,2	Diluir 3,0 mL do nível 100% (Ceftriaxone) para um balão volumétrico de 250 mL, com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a> e misturar bem.	0,06
0,3	Diluir 1,0 mL do nível 100% (sem Ceftriaxone) para um balão volumétrico de 10 mL, com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a> e misturar bem. Diluir 3,0 mL da solução preparada para 100,0 ml com solvente secção <a href="#">2.3.4.</a> e misturar.	0,015

## 2.3.18. GAMA

**Critério de aceitação**

A gama deve ser linear, exata e precisa.

## 2.3.19. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES

**Critério de aceitação**

A %Recuperação em relação aos resultados “frescos” deve ser de 90 -110% ±10%.

**Procedimento**

Preparar Solução Padrão 5 ppm, de acordo com a secção [2.3.5.](#) do procedimento analítico de validação do método.

Preparar amostra ao nível de 100% da concentração-alvo, para ensaio na superfície de aço inoxidável, conforme especificado na Tabela 6.

Distribuir alíquotas da Solução Padrão e Amostra para dois *vials* cada, e manter um deles no amostrador automático, e um à temperatura ambiente.

Analisar as soluções acima referidas estabelecendo um valor de tempo zero para cada uma delas.

## 2.3.20. ESPECIFICIDADE – ANÁLISE PLACEBO, DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA E DEGRADAÇÃO POR EXPOSIÇÃO À LUZ

**Critério de aceitação**

Confirmar que não se verificam interferências de quaisquer ingredientes inativos ou degradantes com picos de cefalosporinas.

### **Procedimento – Análise Placebo**

Injetar solução de esfregaço de branco uma vez no sistema, de forma a avaliar se ocorre alguma interferência de quaisquer picos de ingredientes inativos com picos de cefalosporinas.

A injeção de um esfregaço em branco fornecerá uma visão geral do tempo de eluição dos picos do ingrediente inativo que podem ser observados na concentração de trabalho.

### **Procedimento – Decomposição Térmica**

Preparar amostra ao nível de 100% da concentração-alvo, para ensaio na superfície de aço inoxidável (INOX), conforme especificado na Tabela 6 e injetar no sistema.

Retirar alíquota da solução preparada e expô-la na estufa, a 40 °C, durante 2 dias. Após o tempo especificado, injetar a amostra tratada.

### **Procedimento – Degradação por Exposição à Luz**

Preparar amostra ao nível de 100% da concentração-alvo, para ensaio na superfície de aço inoxidável (INOX), conforme especificado na Tabela 6 e injetar no sistema.

Retirar uma porção da solução preparada, e colocá-la à luz ambiente durante uma semana. Após o tempo especificado, injetar a amostra tratada.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

#### 3.1.1. MÉTODO A

Preparou-se a Fase Móvel com tampão fosfato, metanol e acetonitrilo na proporção 82:13:5, respetivamente, como descrito em [2.2.1.1.](#) e, em seguida, a Solução Stock e os STD 5ppm e 0,02ppm, utilizando como solvente água desmineralizada.

Depois de preparado o cromatógrafo, criou-se o método de instrumentos (TestPro-SNT17970) com as condições cromatográficas da Tabela 7, e iniciou-se a análise.

Tabela 7 – Condições cromatográficas iniciais do método em desenvolvimento.

<b>Coluna</b>	CORTECS UPLC C18+ 1,6 $\mu$ m (2,1 $\times$ 100 mm)
<b>Fluxo</b>	0,3 mL/ min
<b>Detetor UV-Vis</b>	260 nm
<b>Temperatura da coluna</b>	32°C
<b>Temperatura das amostras</b>	8 °C
<b>Tempo de corrida</b>	20 min
<b>Volume de injeção</b>	5 $\mu$ L
<b>Eluição</b>	Isocrática

No final, observou-se que o cromatógrafo tinha desenhado o cromatograma do solvente sem quaisquer problemas. No entanto, quando chegou à injeção do padrão 5ppm, a pressão atingiu valores superiores a 17000 psi, levando à falha do instrumento (como se pode observar pelas Figuras 18 e 19).

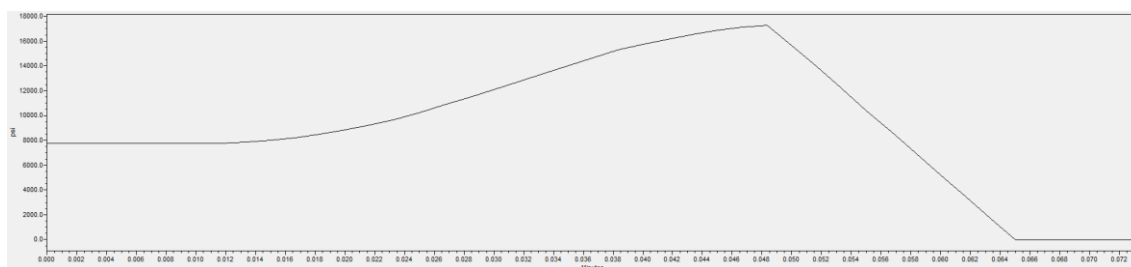


Figura 18 – Curva da pressão no UPLC.

49	STD 5ppm	1:A,2	1	Unknown	12/Mar/25 20:13:26 WET	PDA Ch1 260nm@4.8nm	PDA Ch1 260nm@4.8nm	Instrument Failure	Acquisition Finished
50	STD 5ppm	1:A,2	1	Unknown	12/Mar/25 20:13:26 WET	System Pressure	System Pressure	Instrument Failure	Acquisition Finished
51	Solvent	1:A,1	1	Unknown	12/Mar/25 19:52:44 WET	PDA Ch1 260nm@4.8nm	PDA Ch1 260nm@4.8nm	Complete	Acquisition Finished

Figura 19 - Falha do instrumento UPLC devido a pressão acima do limite máximo.

Esta subida de pressão pode estar relacionada com uma grande variedade de fatores, visto que o UPLC ser um equipamento extremamente sensível.

### 3.1.2. MÉTODO B

De modo a tentar perceber o que tinha causado a subida de pressão no Método A, começou-se por filtrar a vácuo a fase móvel 82:13:5, pois partículas presentes nesta poderiam ter causado entupimento no sistema, o que aumentaria a pressão.

Depois de filtrada a fase móvel, e colocado o respetivo canal no frasco, lavou-se e purgou-se novamente o sistema.

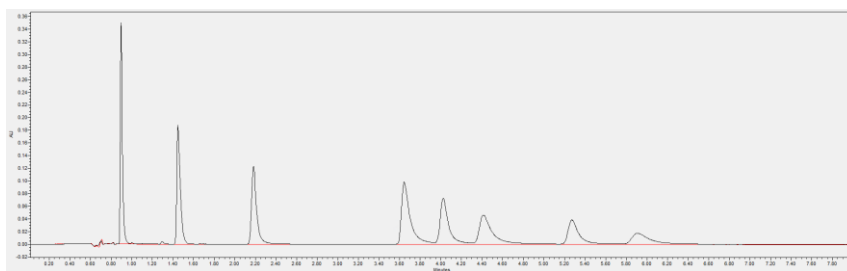


Figura 20 – Cromatograma STD 5ppm (preto) vs solvente (vermelho), com condições cromatográficas iniciais do método em desenvolvimento.

Obteve-se, desta vez, com sucesso o cromatograma STD 5ppm, representado na Figura 20, concluindo que a filtragem da fase móvel resolveu o problema de *overpressure* anterior, pelo que se começou a filtrar as fases móveis preparadas a partir deste momento.

Visto que os picos se encontram separados e que se obteve os 8 picos (correspondentes às 8 cefalosporinas da amostra), foi-se avaliar também o cromatograma da solução padrão 0,02ppm.

Mas antes, preparou-se padrões individuais para se fazer um varrimento de comprimentos de onda, de forma a avaliar qual o melhor comprimento de onda para deteção das cefalosporinas.

Utilizou-se o equipamento UV-Vis Spectrophotometer Evolution 300 de forma a observar a absorção de cada cefalosporina. Leu-se então 3 vezes o branco (água desmineralizada) e começou-se a leitura das soluções STD 5ppm preparadas, de cada cefalosporina, num intervalo de comprimento de onda de 200-400 nm, obtendo-se os espetros do [Anexo 9](#).

Concluiu-se que todas as cefalosporinas têm o pico de absorção por volta dos 240 nm, comparativamente aos 260 nm até então utilizados, alterando-se então o comprimento de onda de 260 nm para 240 nm.

Na quarta injeção de STD 5ppm houve novamente falha do instrumento, mas desta vez por necessitar calibração e de troca da agulha de injeção.

Utilizando a nova condição cromatográfica (deteção a 240 nm), e com a manutenção do equipamento anteriormente mencionada, iniciou-se uma nova análise.

O cromatograma de STD 0,02ppm obtido encontra-se representado na Figura 21.

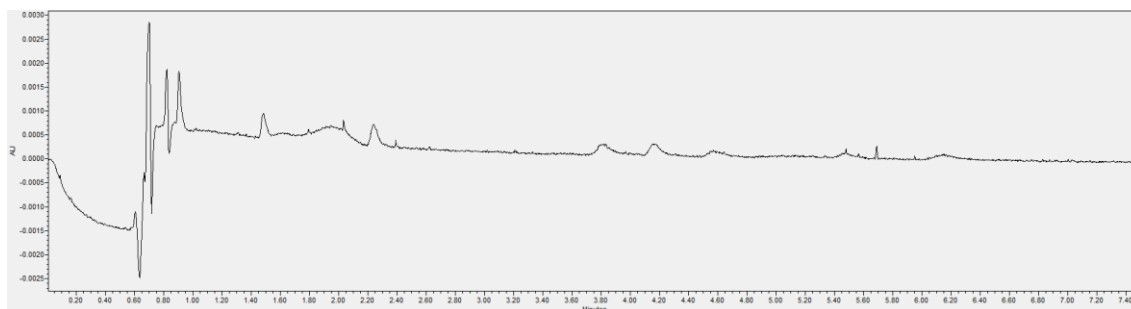


Figura 21 - Cromatograma STD 0,02ppm, com detecção a 240 nm e Sampling Rate 20 pontos/seg.

Como se pode observar pela Figura 21, o cromatograma possuía muito ruído, pelo que se baixou o *Sampling Rate* de 20 pontos/seg para 5 pontos/seg, de modo a diminuir um pouco a sensibilidade do equipamento, e voltou-se a injetar o solvente e soluções.

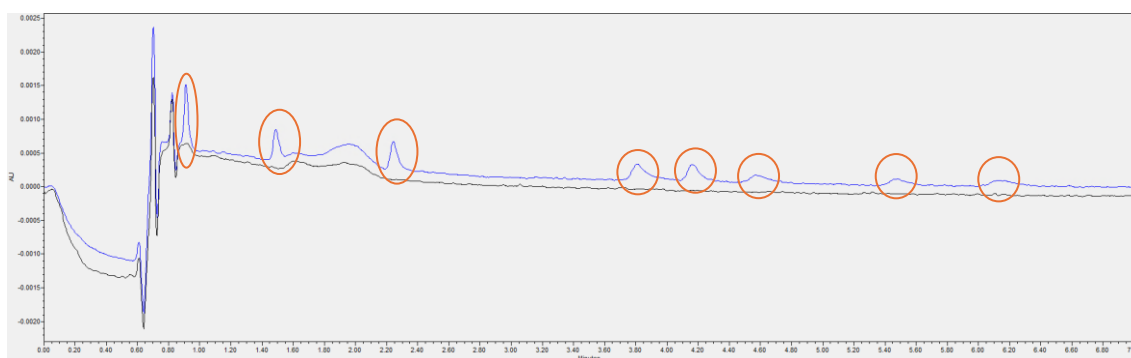


Figura 22 – Cromatograma STD 0,02ppm (azul) vs solvente (preto), com detecção a 240 nm e Sampling Rate 5 pontos/seg.

É observável, pela Figura 22, que baixar o *Sampling Rate* diminuiu o ruído. É nos ainda possível, com a injeção do STD 0,02ppm, identificar os 8 picos (rodeados a laranja) correspondentes às 8 cefalosporinas, que aparecem com uma boa separação entre eles. No entanto, não só o primeiro pico elui muito em cima do pico de injeção, como a partir do 4º pico, inclusive, ocorre um alargamento gradual dos picos, perdendo-se eficiência e diminuindo o s/n.

Deste modo, para averiguar se os resultados seriam mais satisfatórios, trocou-se a coluna para a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

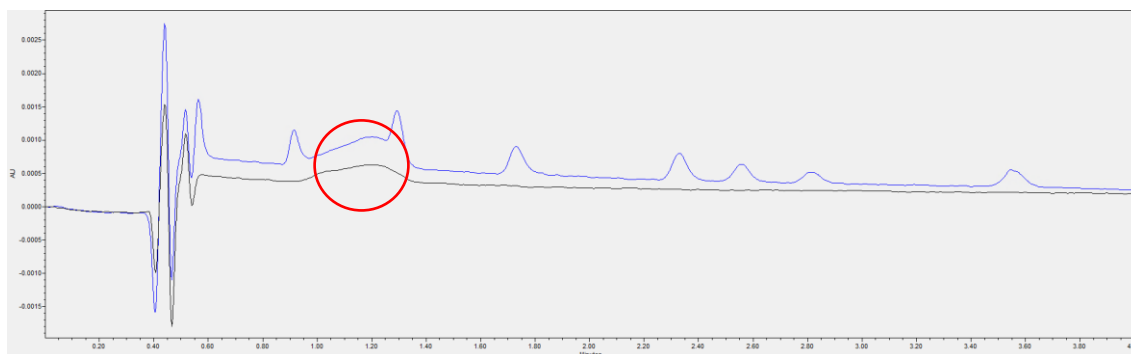


Figura 23 – Cromatograma STD 0,02ppm (azul) vs solvente (preto), com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm),

Como se pode ver pela Figura 23, o cromatograma apresenta uma interferência na linha de base (rodeada a vermelho) que aparece também no solvente, e que interfere com o 3º pico correspondente à cefalosporina que elui aproximadamente aos 1,30 minutos, nas condições utilizadas, interferência esta que aparecia também na coluna anterior na mesma zona do cromatograma.

Fizeram-se injeções de vários solventes, no caso: da fase móvel utilizada, do solvente do Anexo 6 e de water for injection (WFI), para averiguar se a interferência era devida a alguma interação entre a água e a fase estacionária da coluna.

Porém, todos os cromatogramas continham a mesma interferência, como se pode observar na Figura 24 (rodeada a vermelho).

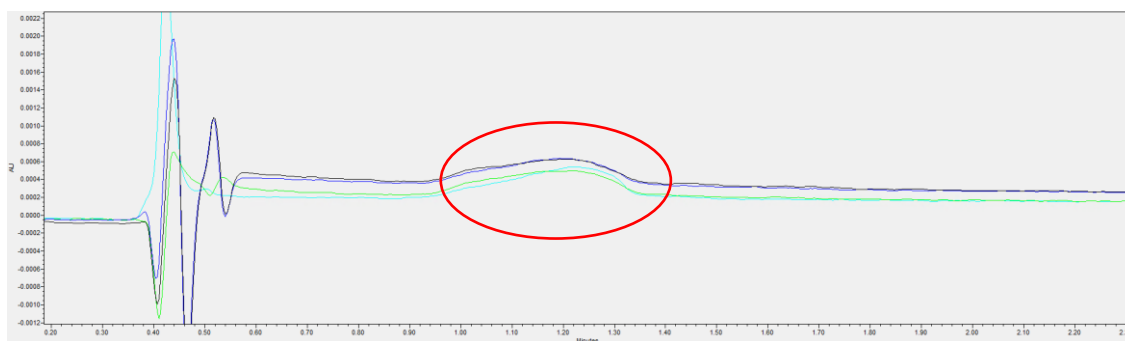


Figura 24 - Cromatogramas dos vários solventes: água desmineralizada (a preto), WFI (a azul escuro), fase móvel (a azul claro) e Solvente do Anexo 6 (a verde claro), sobrepostos.

Concluindo assim que mudar o solvente não resolveria o problema, pelo que se manteve a utilização de água desmineralizada.

Visto a coluna proporcionar uma separação razoável entre os picos, estudou-se o efeito que mudar a proporção de água e solventes orgânicos na fase móvel teria na eluição dos compostos.

### Fase móvel 85:10:5

A primeira variação na fase móvel que se fez foi diminuir a quantidade de metanol de 130 mL para 100 mL, compensando com mais 30 mL de água desmineralizada, isto porque reduzir o teor de composto orgânico na fase móvel aumenta a sua polaridade, o que pode levar a maior tempo de retenção dos analitos, especialmente os mais hidrofóbicos, ao que tal poderia eventualmente separar a interferência do pico.

A comparação das injeções STD 0,02ppm com as 2 fases moveis diferentes encontra-se na Figura 25.

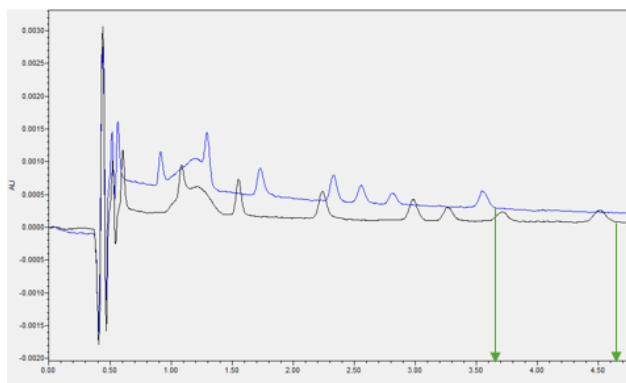


Figura 25 - Comparação dos cromatogramas de injeções STD 0,02ppm com fase móvel inicial (a azul) e fase móvel com 850 mL de tampão fosfato, 100 mL de metanol e 50 mL de acetonitrilo (85:10:5) (a preto).

Como se observa na figura acima, e como previsto, houve um aumento do tempo de retenção de todos os picos, aumentando o tempo de retenção final em aproximadamente 1 min (como se pode ver pelas setas verdes na Figura 25), mas também melhorando a separação entre os picos. A interferência passou de se encontrar no início do terceiro pico, para se encontrar no final do segundo.

#### Fase móvel 85,5:10:4,5

Preparou-se outra fase móvel com 100 mL de metanol, mas desta vez com 45 mL de acetonitrilo, em vez de 50 mL.



Figura 26 – Cromatograma STD 0,02ppm (azul) vs solvente (preto) com fase móvel 85,5:10:4,5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo).

Através da Figura 26, é possível observar uma melhor separação (rodeada a azul-claro) entre o pico de injeção e o primeiro pico de cefalosporina, ao se utilizar esta fase móvel, o que é um ponto positivo, porém, os picos de duas das cefalosporinas (rodeadas a castanho) juntaram, em comparação com os cromatogramas anteriores.

É ainda observável que 5 minutos de eluição é um tempo curto para esta fase móvel, já que não é visível no cromatograma a eluição completa do último pico.

Quanto à interferência na linha de base, esta continua presente.

### Fase móvel 85,5:9,5:5

Diminuiu-se ainda mais a quantidade de metanol, para 95 mL, e utilizou-se 50 mL de acetonitrilo (à semelhança da fase móvel inicial).

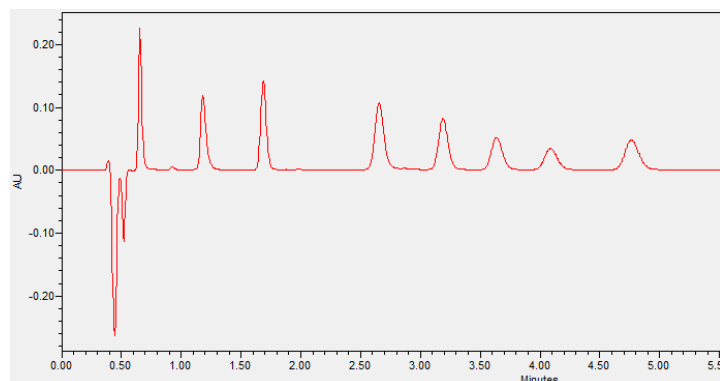


Figura 27 - Cromatograma STD 5ppm, com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo).

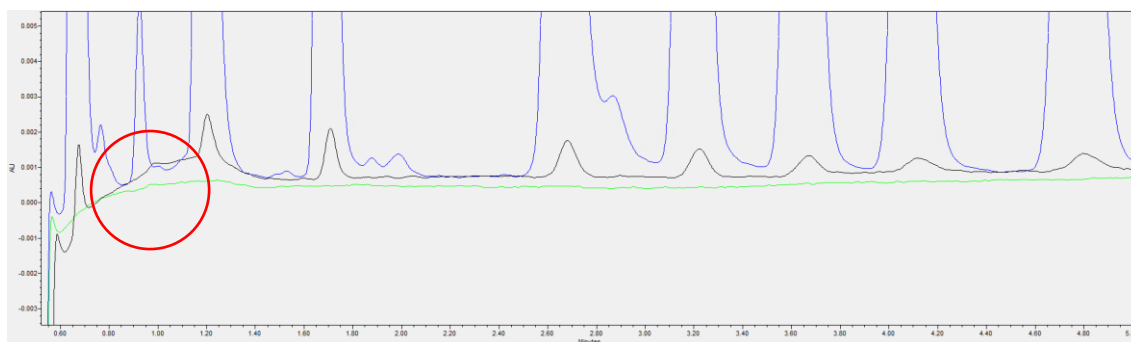


Figura 28 – Cromatograma solvente (verde) vs. STD 5ppm (azul) vs. STD 0,02ppm (preto), com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo).

Pela Figura 27 é possível observar que, com esta fase móvel, continuou a haver a satisfatória separação do pico correspondente à primeira cefalosporina que elui e do pico de injeção, bem como uma melhor separação dos picos em comparação com as fases móveis anteriores. Também o tempo de eluição diminuiu um pouco, no entanto, a interferência que se faz notar no solvente (rodeada na Figura 28 a vermelho) interfere a linha de base, e conseqüentemente o perfil dos picos.

Notou-se, pela Figura 24, que o pico de injeção da fase móvel (a azul-claro, na figura mencionada) era menor. Deste modo, mudou-se o solvente de água para a fase móvel de proporção 85,5:9,5:5.

Prepararam-se padrões individuais para saber o tempo de retenção correspondente a cada cefalosporina, bem como as soluções padrão 5ppm e 0,02ppm, utilizando como solvente a fase móvel supramencionada.

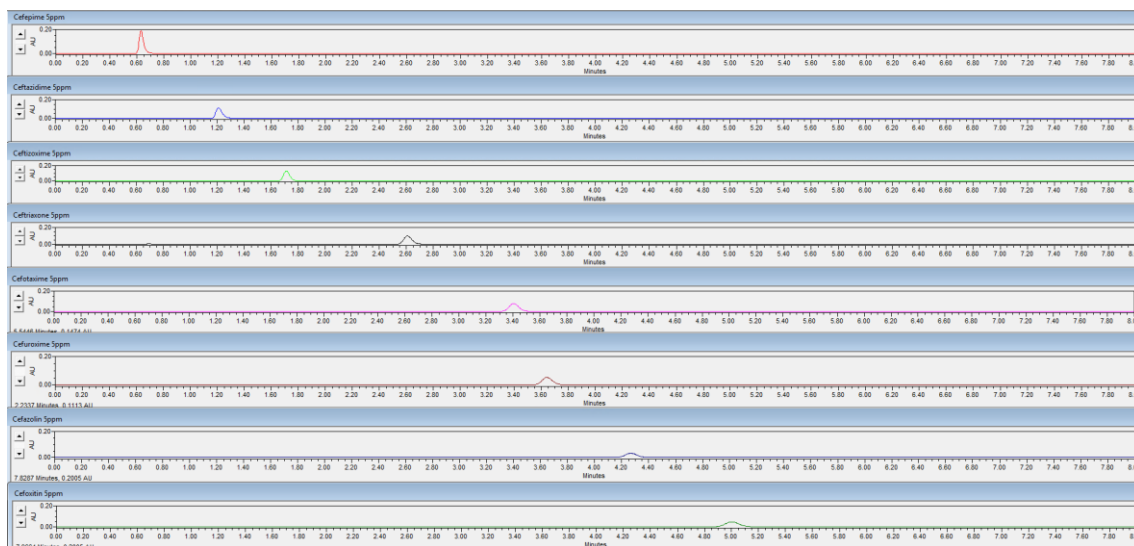


Figura 29 - Cromatogramas STD 5ppm individuais.

Como se pode observar pela Figura 29, a ordem de eluição (do menor para o maior tempo de retenção) das cefalosporinas detetadas, nas condições cromatográficas utilizadas, é: Cefepime, Cefotaxime, Cefuroxime, Ceftriaxone, Cefotaxime, Cefuroxime, Cefazolin e, por fim, Cefoxitin.

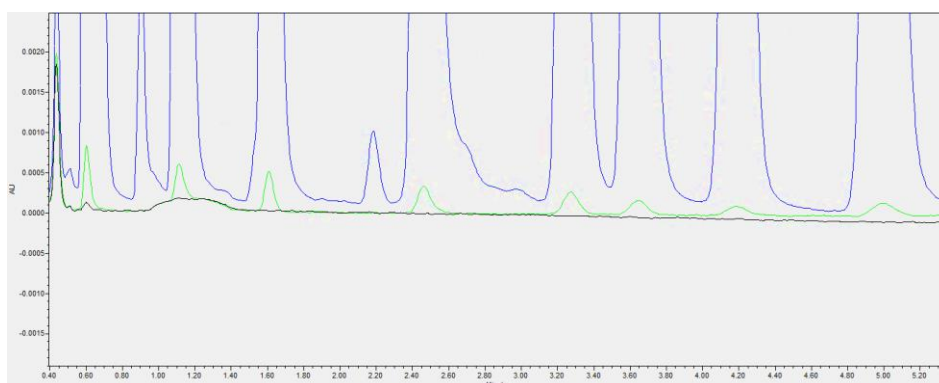


Figura 30 - Cromatogramas da última injeção de STD 5ppm (a azul), STD 0,02ppm (a verde) e F.M como solvente (a preto).

Ainda que melhorando a linha de base (Figura 30), verificou-se que a degradação da Ceftriaxone nesta solução era imediata, e que, mesmo mantida no frio, ao segundo dia era bastante acentuada (como se pode observar na Figura 31), ao passo que, utilizando água desmineralizada como solvente, não ocorria degradação da mesma (Figura 32).

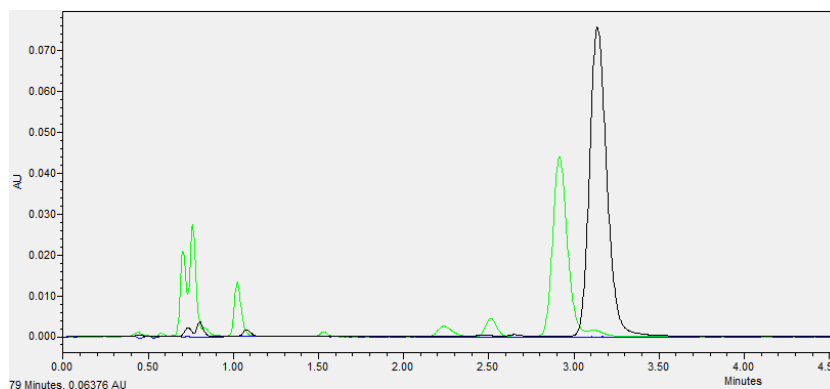


Figura 31 - Cromatograma de STD 5ppm de Ceftriaxone Na (a verde) analisado 2 dias após ser preparado vs. STD 5ppm de Ceftriaxone Na (a preto) preparado e injetado no próprio dia vs. solvente (a azul).

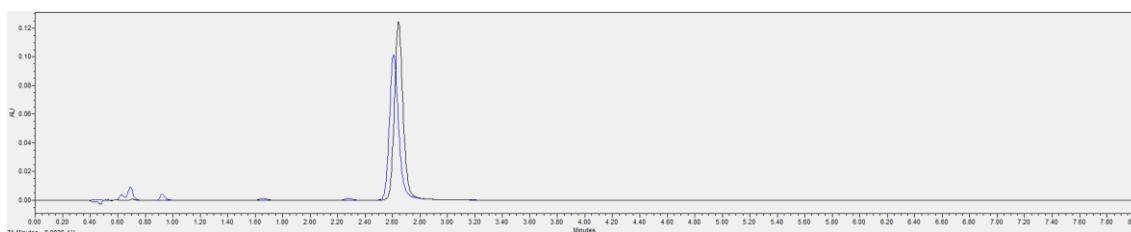


Figura 32 - Cromatograma STD 5ppm de Ceftriaxone feito com água desmineralizada como solvente (preto) e STD 5ppm de Ceftriaxone feito com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) como solvente (presente também na Figura 30).

Também a utilização de água desmineralizada como solvente facilita a própria análise do *containment*, visto esta análise ser feita num ambiente que deve ser livre de cefalosporinas, logo, a fase móvel utilizada como solvente teria de ser feita também nesse ambiente, de forma a assegurar que não se encontrava contaminada por cefalosporinas e alteraria o resultado, o que dificultaria o processo.

Testaram-se novas colunas: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu\text{m}$  (2,1 $\times$ 50 mm) e Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1,7  $\mu\text{m}$  (2,1 $\times$ 50 mm) (Figura 33), de forma a avaliar a eficácia da separação. Fez-se a lavagem e condicionou-se bem cada uma delas, como anteriormente, porém não foram obtidos melhores resultados, já que a primeira piorava a resolução dos picos e a segunda não retia as cefalosporinas, eluindo, portanto, todas as cefalosporinas no início da corrida.

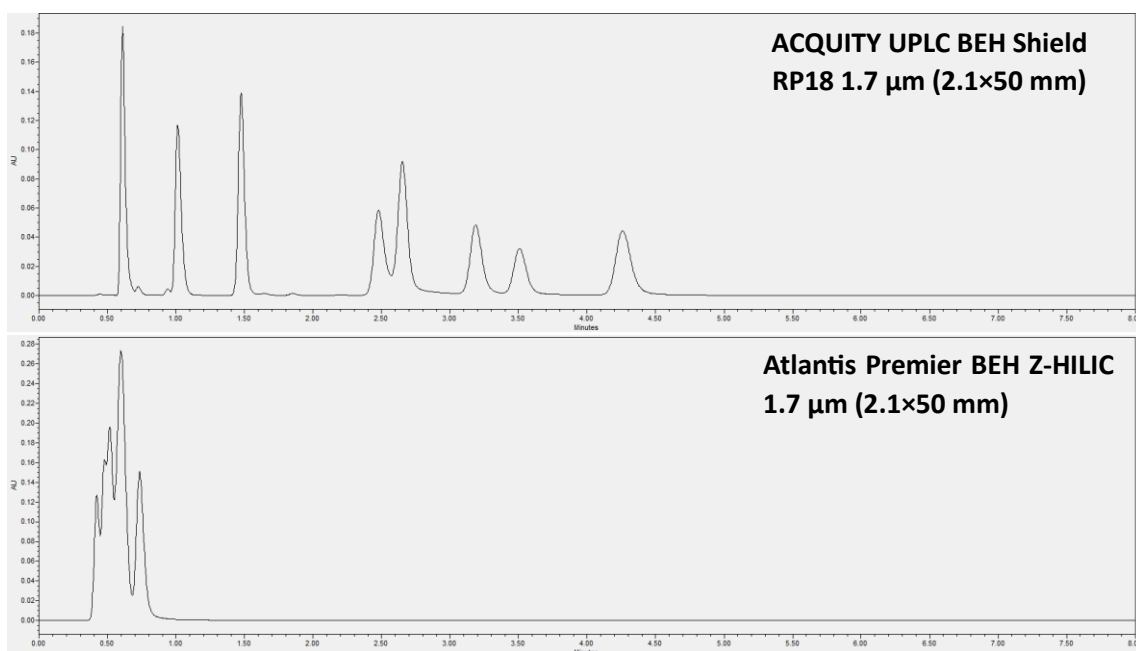


Figura 33 - Cromatograma STD 5ppm utilizando as colunas ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 μm (2,1×50 mm) e Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1,7 μm (2,1×50 mm).

Utilizou-se uma nova coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7μm (2,1 × 50mm), e estudou-se qual o impacto que a mudança de temperatura da coluna teria na separação, utilizando para tal as temperaturas: 32 °C (condição inicial), 30 °C e 35 °C (Figura 34).

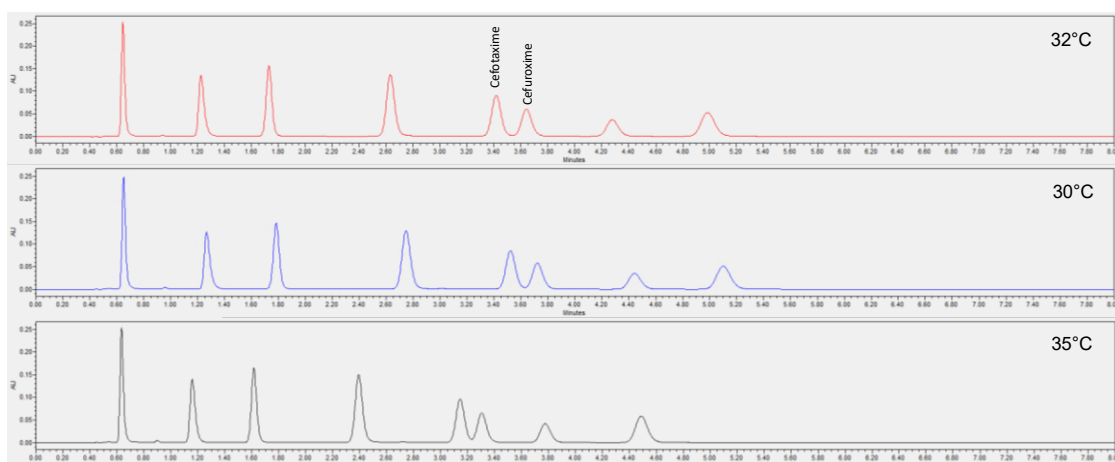


Figura 34 - Cromatogramas STD 5ppm com coluna a 32°C, 30°C e 35°C, respetivamente.

Concluiu-se que o aumento da temperatura diminui o tempo de retenção dos compostos, enquanto a diminuição da mesma o aumenta. Notou-se ainda uma ligeira melhoria na separação entre os picos de Cefotaxime e Cefuroxime a 32 °C.

Avaliou-se também o impacto que a mudança de fluxo teria na separação, utilizando para tal os fluxos: 0,3 mL/min (condição inicial), 0,25 mL/min e 0,35 mL/min (Figura 35).

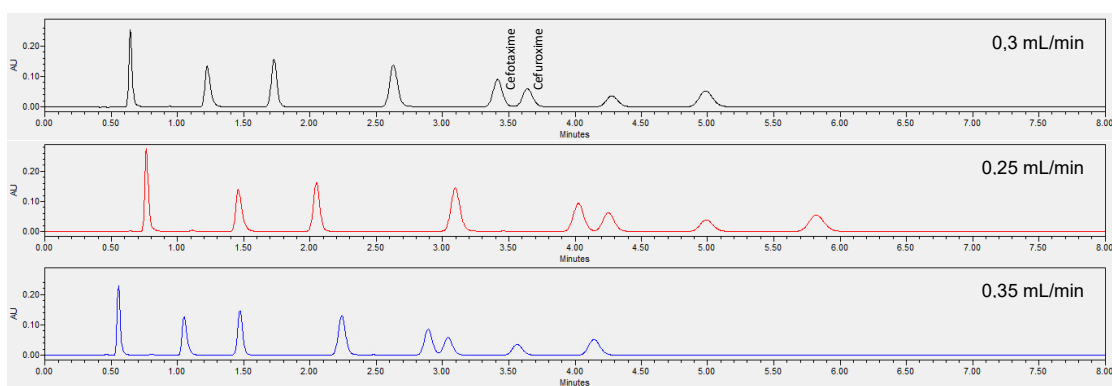


Figura 35 - Cromatogramas STD 5ppm com fluxo de 0,3 mL/min, 0,25 mL/min e 0,35 mL/min, respetivamente.

Concluiu-se que, à semelhança da temperatura da coluna, o aumento do fluxo diminui o tempo de retenção dos compostos, ao passo que a diminuição do mesmo o aumenta. Notou-se ainda uma ligeira melhoria na separação entre os picos de Cefotaxime e Cefuroxime com o fluxo 0,3 mL/min.

Testou-se deste modo ajustar o pH da fase móvel para: 3,4, 3,6 e 3,8, continuando com as condições de fluxo e temperatura iniciais do método (0,3 mL/min e 32 °C).

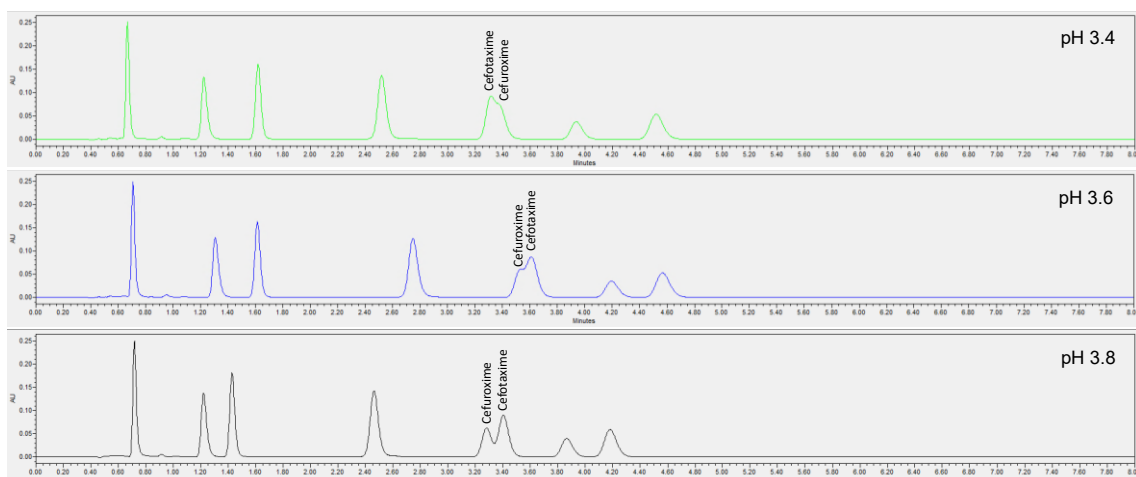


Figura 36 - Cromatograma da solução STD 5ppm com a fase móvel 85,5:9,5:5 com pH 3,4, 3,6 e 3,8, respetivamente.

Os cromatogramas da Figura 36 mostram que, a pH 3,4 e 3,6, os picos de Cefotaxime e Cefuroxime possuem interações semelhantes com a fase estacionária, daí aparecerem sobrepostos.

A pH 3,8 houve uma ligeira melhoria na separação entre Cefuroxime e Cefotaxime, mas ainda com uma resolução abaixo do pretendido.

Voltou-se então a utilizar a fase móvel 85,5:9,5:5 com pH 3,2 (Figura 37).

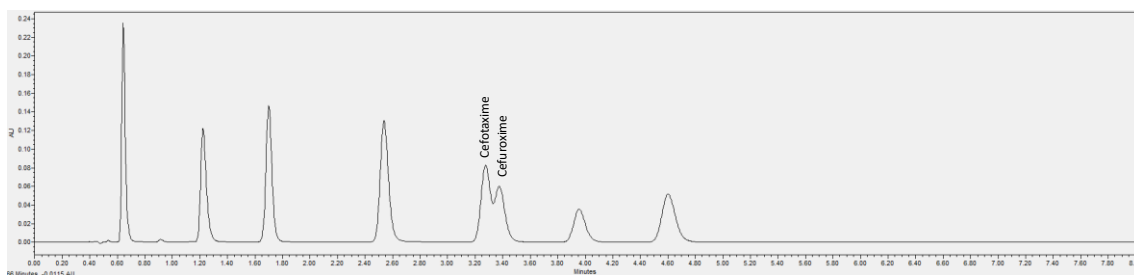


Figura 37 - Cromatograma STD 5 ppm utilizando a Fase móvel 85,5:9,5:5 com pH 3,2.

No entanto, não foi obtida a mesma separação observada anteriormente, mesmo sob as mesmas condições, quando se utilizou uma coluna mais antiga (Figura 27) ou utilizando a mesma coluna inicialmente (Figura 34, a 32 °C, e Figura 35, a 0,3 mL/min).

Diante estes resultados, injetou-se as amostras na coluna mais antiga e numa nova coluna, aberta no dia, ambas do tipo ACQUITY UPLC BEH C18 1,7  $\mu$ m (2,1  $\times$  50 mm). Ambas foram lavadas conforme o procedimento descrito anteriormente e devidamente equilibradas com a fase móvel antes do uso.

Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 38.

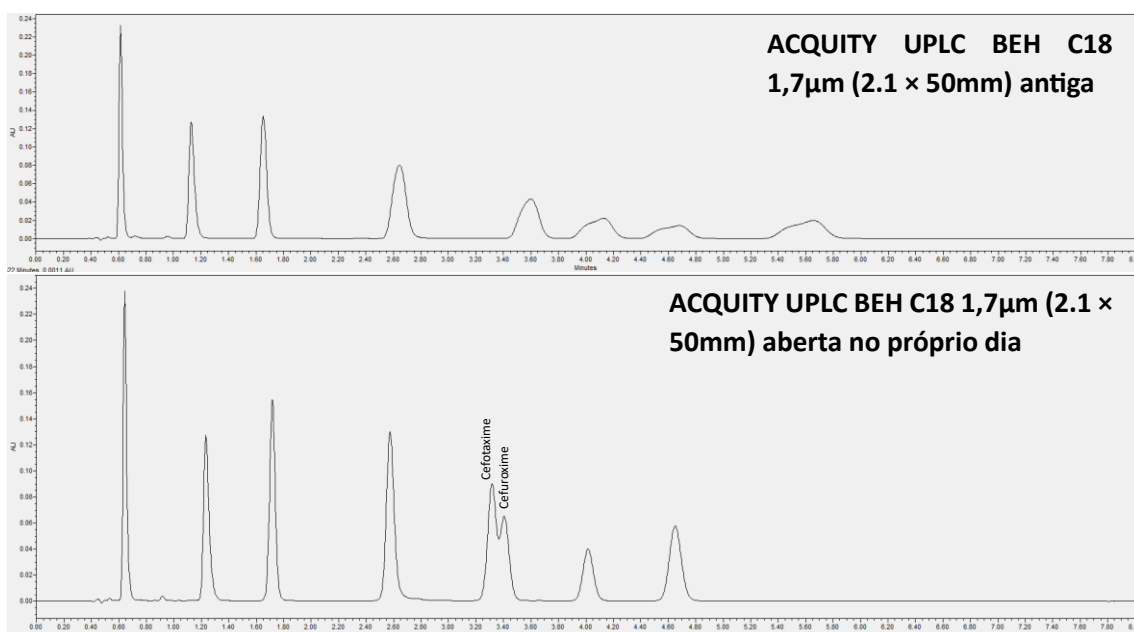


Figura 38 - Cromatograma STD 5ppm com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm) antiga e outra coluna nova, aberta no próprio dia.

Observa-se uma separação satisfatória com a coluna antiga, havendo apenas um achatamento dos picos, possivelmente em decorrência do uso prolongado da mesma. Por outro lado, ao utilizar a coluna nova, os picos correspondentes à Cefotaxime e à Cefuroxime apresentam um perfil semelhante ao observado na Figura 37.

Injetou-se as mesmas amostras com uma fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) feita de fresco, na coluna aberta no próprio dia, visto a fase móvel utilizada estar quase no final de validade (quase 1 mês depois da sua preparação), para

averiguar se a fase móvel utilizada teria sofrido alguma contaminação ou perda de propriedades. Obteve-se o cromatograma da Figura 39.

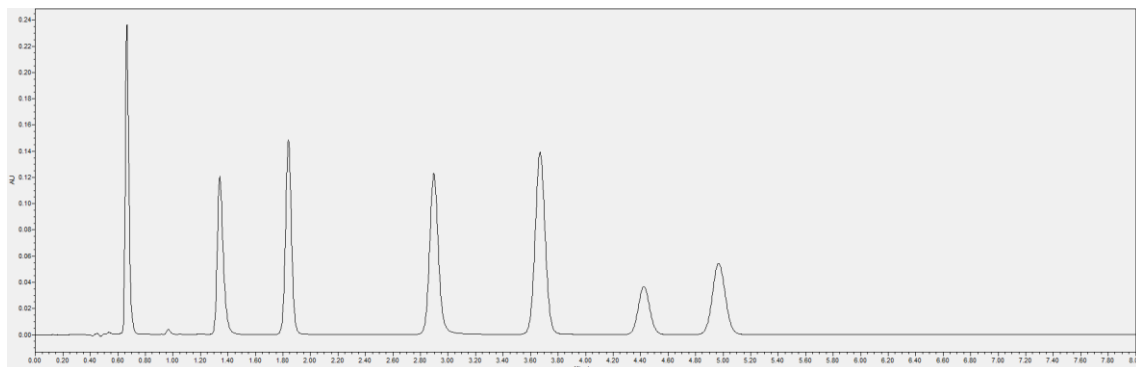


Figura 39 - Cromatograma STD 5ppm com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1 x 50mm) aberta no próprio dia e fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) preparada de fresco.

Neste, observa-se a sobreposição completa dos picos de Cefotaxime e Cefuroxime, demonstrando que o problema advinha da fase móvel.

Visto não se terem experimentado valores de pH abaixo de 3,2, experimentou-se diminuir o pH da fase móvel para 3,0, obtendo os cromatogramas da Figura 40.

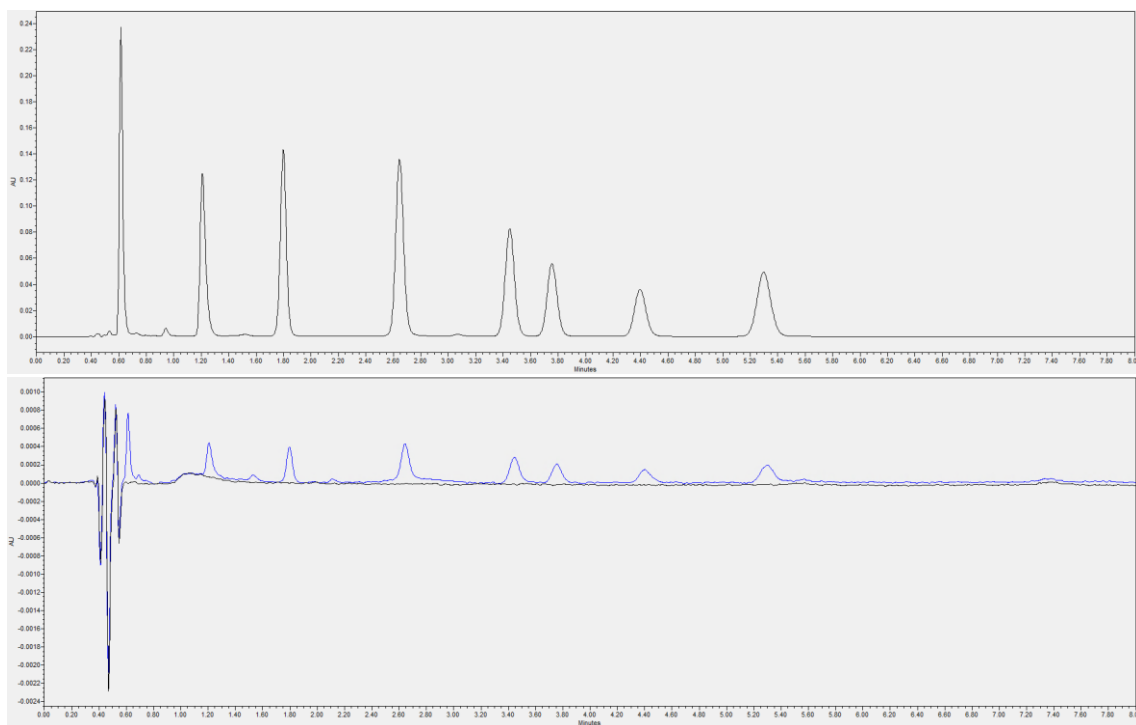


Figura 40 - Cromatograma STD 5ppm (a preto) e STD 0,02ppm (a azul) com fase móvel 85,5:9,5:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.

Onde é por fim visível a separação satisfatória dos 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> picos. Porém, com a alteração do pH, o pico da primeira cefalosporina juntou novamente ao pico de injeção.

### Fase móvel 86:9:5

Preparou-se então outra fase móvel, com menor quantidade de metanol (90 mL), compensando com água desmineralizada, numa tentativa de separar novamente o primeiro pico do pico de injeção, sem juntar os 5º e 6º picos.

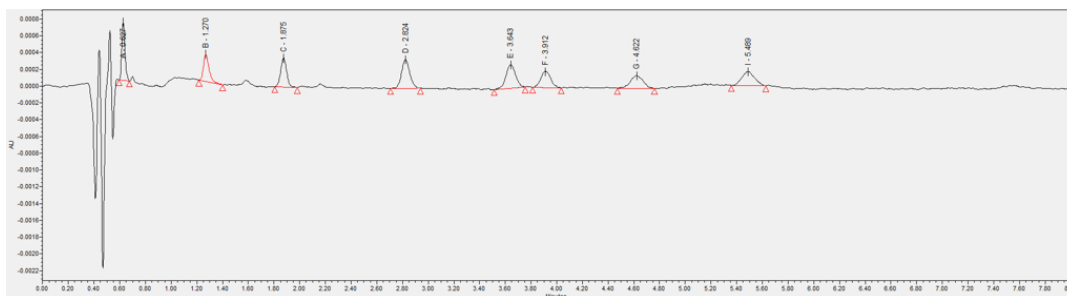


Figura 41 - Cromatograma STD 0,02ppm com fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) de pH 3,0, com integração.

Como se pode observar no cromatograma da Figura 41, conseguiu-se uma separação ligeira, mas suficiente, entre o primeiro pico e o pico de injeção.

No dia seguinte, prepararam-se padrões individuais das cefalosporinas, de modo a conferir se a ordem de eluição se mantinha, tal como novo padrão.

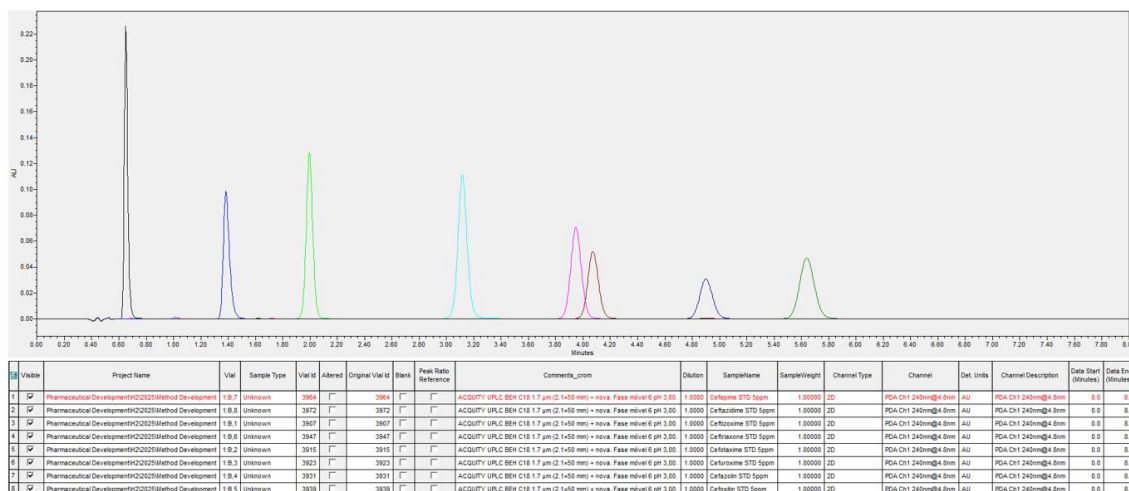


Figura 42 – Cromatogramas das soluções STD 5ppm individuais sobrepostos, com fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.

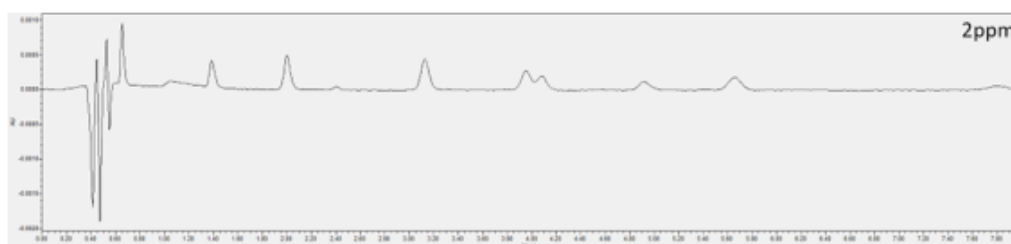


Figura 43 - Cromatograma STD 0,02ppm utilizando fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.

Pela Figura 42, consegue-se observar que a ordem de eluição das cefalosporinas se manteve. No entanto, novamente, é evidente a instabilidade da solução, pois, como observado na Figura 43, uma fase móvel que anteriormente separava os picos (Figura 41), no dia seguinte juntou-os.

Pensa-se que esta instabilidade pode dever-se ao tampão utilizado (Di-Hidrogenofosfato de Potássio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), já que, de acordo com a USP "*Buffer Solutions*", o fosfato é indicado para uma gama de pH entre 5,8 e 8,0, e, portanto, não se encontra em equilíbrio a um pH abaixo ou acima dessa gama [57].

### 3.1.3. MÉTODO C

Preparou-se fase móvel com tampão ftalato em substituição do tampão fosfato, de proporção 86:9:5 (tampão ftalato:metanol:acetonitrilo).

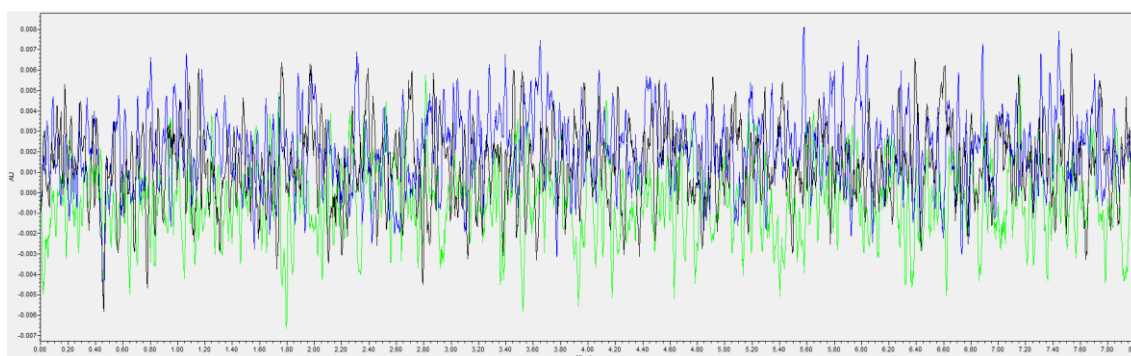


Figura 44 - Cromatogramas sobrepostos do solvente (a preto), STD 5ppm (a azul) e STD 0,02ppm (a verde), utilizando a fase móvel 86:9:5 (tampão ftalato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.

No entanto, e como é observável pela Figura 44, o tampão ftalato não é compatível com o método, visto o cromatograma obtido apresentar múltiplos picos sobrepostos e numerosos sinais de interferência.

### 3.1.4. MÉTODO D

Tentou-se também a preparação de fase móvel 86:9:5 com tampão citrato (tampão citrato:metanol:acetonitrilo), obtendo os cromatogramas da Figura 45.

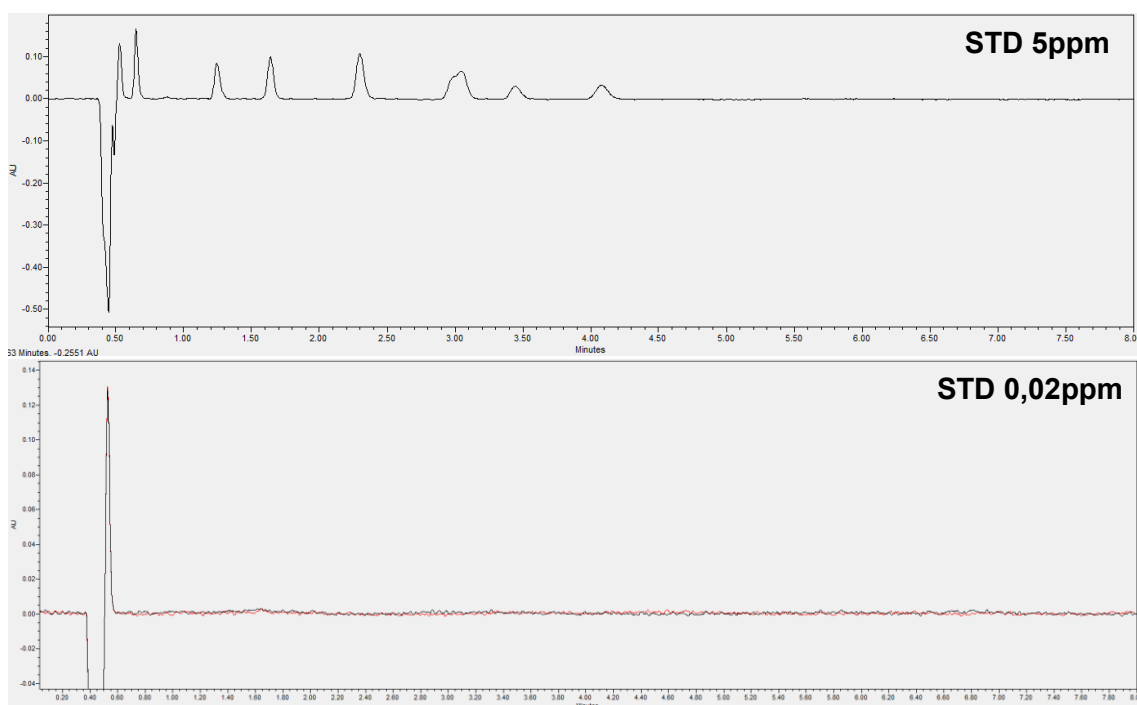


Figura 45 – Cromatogramas STD 5ppm e STD 0,02ppm (a vermelho), com fase móvel 86:9:5 (tampão citrato:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.

Utilizando tampão citrato, foi possível obter o cromatograma correspondente à solução padrão 5ppm e os 8 picos, ainda que o primeiro pico elua muito juntamente ao pico de injeção e o 5º e 6º picos apareçam quase sobrepostos. No entanto, com o padrão STD 0,02 ppm já não foi possível a deteção das cefalosporinas.

### 3.1.5. MÉTODO E

Assim sendo, continuou-se com a utilização do tampão fosfato, mas ajustou-se a sua quantidade à quantidade de água utilizada na fase móvel, pois a diluição excessiva do tampão poderia ter levado à sua ineficácia.

Preparou-se a fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato com quantidade ajustada:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0 e, depois de se lavar bem a coluna e reequilibrar, obteve-se o cromatograma da Figura 46.

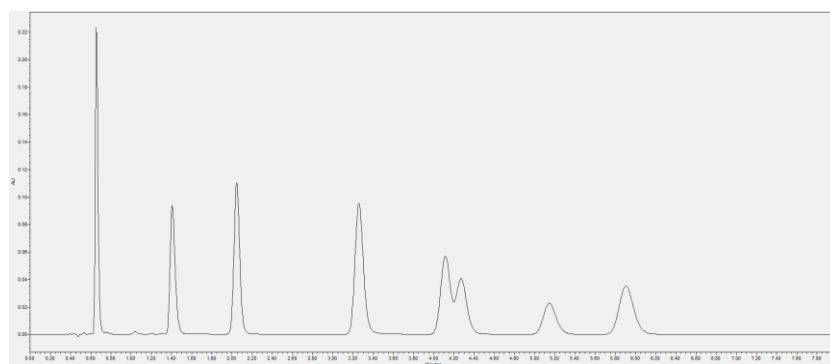


Figura 46 - Cromatograma 5ppm com fase móvel 86:9:5 (tampão fosfato com quantidade ajustada:metanol:acetonitrilo) com pH 3,0.

Que, novamente, não produziu uma separação satisfatória entre o 5º e 6º picos, e possui um perfil semelhante ao do cromatograma anteriormente obtido sem a quantidade de tampão fosfato ajustada, da Figura 43.

Decidiu-se então aumentar o pH da fase móvel para 5,0, já que o tampão utilizado é mais estável em valores de pH nessa gama (5-6).

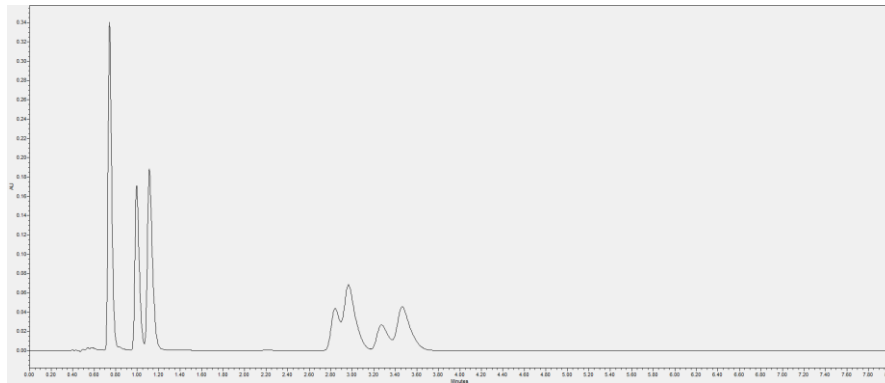


Figura 47 - Cromatograma STD 5ppm com fase móvel com pH ajustado de 3,0 para 5,0.

Mas, como se pode observar pela Figura 47, não se obtiveram bons resultados com o pH de 5,0, visto terem aparecido apenas 7 picos, e os que eluíram terem saído muito perto uns dos outros.

Como ainda não se tinha tentado um pH de 4,0, ajustou-se a mesma fase móvel para esse mesmo pH e injetaram-se novamente os padrões individuais das cefalosporinas, para perceber onde se encontrariam os picos. Injetou-se também a solução padrão 0,02 ppm.

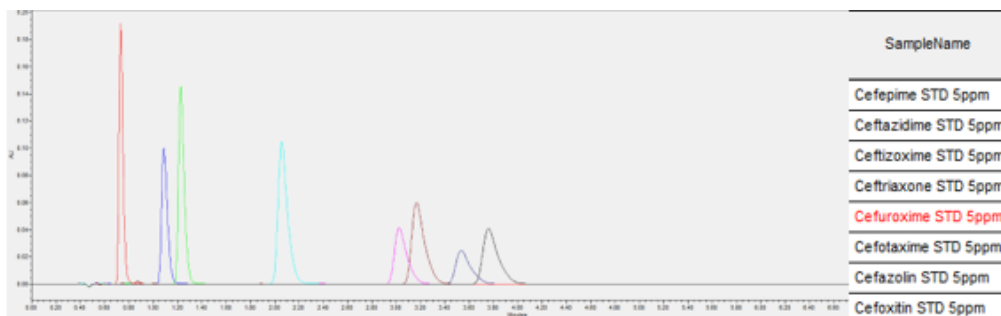


Figura 48 - Cromatograma soluções STD 5ppm individuais, com fase móvel com pH ajustado para 4,0 e designio dos picos por ordem de eluição, à direita.

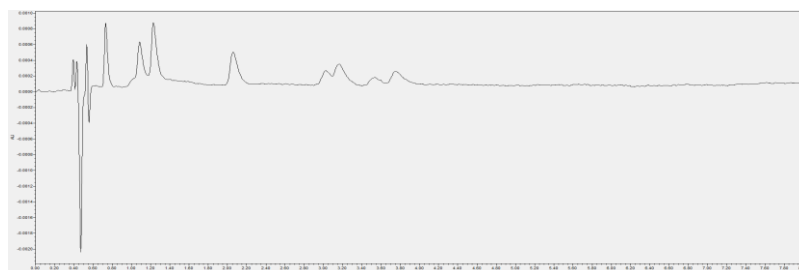


Figura 49 - Cromatograma STD 0,02ppm com fase móvel com pH ajustado para 4,0.

Como se pode ver pela Figura 48, com pH 4,0 já aparecem os picos correspondentes às 8 cefalosporinas, porém, ainda se encontram demasiado juntos uns aos outros. Para além disso, a Cefuroxime elui primeiro que a Cefotaxime, ao passo que quando é injetado o padrão com a fase móvel de pH 3,0, a Cefotaxime elui primeiro.

Ainda assim, a este pH, a separação entre o pico de injeção e o primeiro pico é bastante boa (como se pode observar na Figura 49).

### 3.1.6. MÉTODO F

De modo a economizar tempo e recursos, colocou-se tampão fosfato com pH 4,0, metanol e acetonitrilo em canais separados no UPLC (canal A, B e C, respetivamente).

Os cromatogramas correspondentes às diferentes proporções encontram-se no [Anexo 8](#).

Visto não se ter chegado a um cromatograma com uma separação desejável, criou-se um método em gradiente com duas proporções distintas que separavam bem as 4 cefalosporinas que eluem primeiro (87:8:5) bem como as 4 cefalosporinas que eluem mais adiante (86:8:6), como ilustrado na seguinte Figura.

Gradient:							
	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.300	87.0	8.0	5.0	0.0	Initial
2	2.10	0.300	86.0	8.0	6.0	0.0	6
3	9.00	0.300	87.0	8.0	5.0	0.0	6

Figura 50 - Gradiente utilizado: proporção 87:8:5 até aos 2,1 min, 86:8:6 até aos 9 min e 87:8:5 até aos 10 min (tempo final de injeção), com uma curva de 6.

Porém, devido ao curtíssimo tempo de corrida, a coluna não teve tempo de reequilibrar com a segunda fase móvel antes que eluíssem os últimos 4 picos, pelo que se obteve uma separação ineficaz dos mesmos, como é visível na Figura 51.

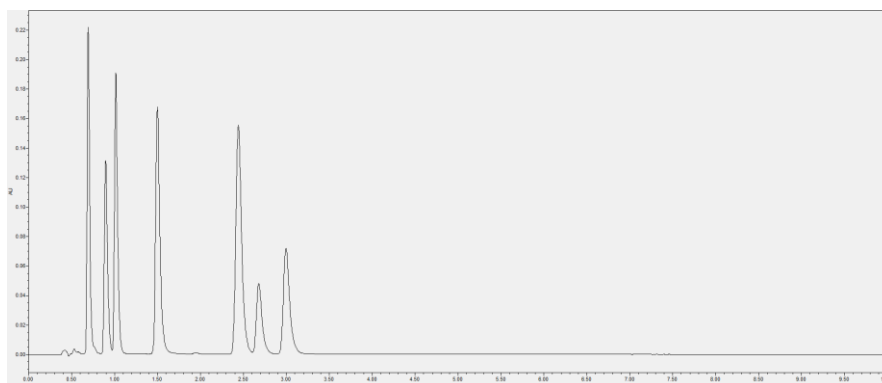


Figura 51 - Cromatograma 5ppm utilizando gradiente: 87:8:5 até aos 2,1 min, 86:8:6 até aos 9 min e 87:8:5 até aos 10 min (tempo final de injeção), e curva de 6.

### Fase móvel 87:7,5:5,5

Como se utilizaram os componentes da fase móvel em canais separados, preparou-se desta vez fase móvel utilizando a proporção 87:7,5:5,5 que, com tampão a pH 4,0, tinha sido a mais bem-sucedida em separar todas as cefalosporinas. Distribuiu-se ainda a fase móvel para 3 frascos Schott e ajustou-se o pH para 4,0, 3,8 e 3,6.

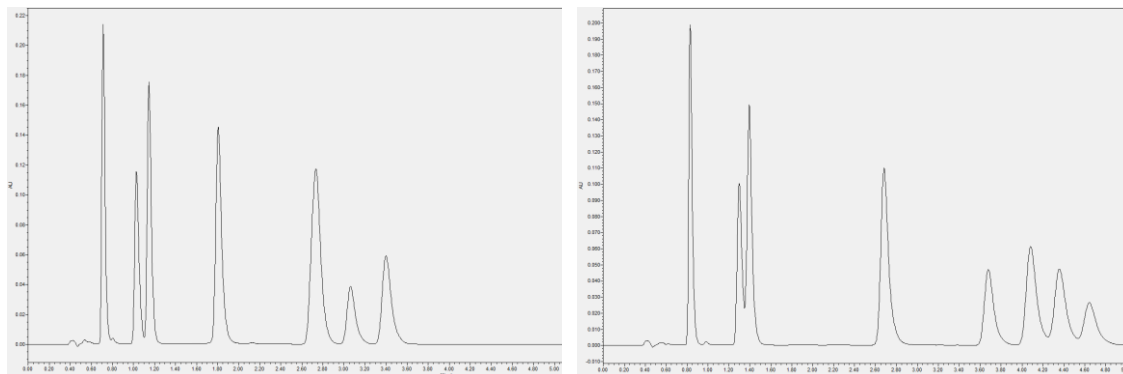


Figura 52 - Cromatograma 5ppm com fase móvel 87:7,5:5,5 (de tampão fosfato a pH 4,0:metanol:acetonitrilo) (à esquerda) vs 5ppm com proporção 87:7,5:5,5 de tampão fosfato 4,0, metanol e acetonitrilo, em diferentes canais (à direita).

Comparando os cromatogramas apresentados na Figura 52, verifica-se uma diferença na resolução entre os picos, atribuída ao modo de preparação da fase móvel. A utilização de um único canal assegura uma mistura homogênea dos componentes, enquanto a utilização de canais distintos pode originar uma mistura menos eficiente, sobretudo no caso de solventes orgânicos, podendo até mesmo criar microgradientes. Neste estudo, constatou-se que a proporção testada, quando colocada em canais separados, permitiu a resolução entre o 5º e o 6º picos, ao passo que, quando colocada a mistura num único canal, conduziu à sua co-eluição.

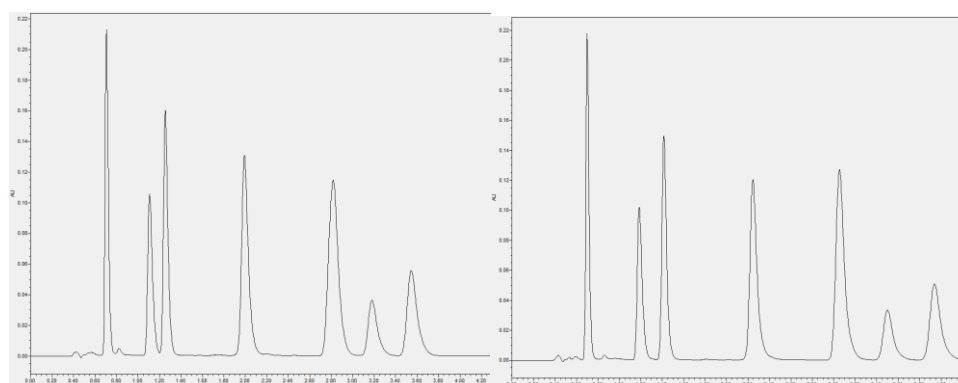


Figura 53 - Cromatogramas 5ppm com fase móvel 87:7,5:5,5 de pH 3,8 (à esquerda) e 3,6 (à direita).

Também a diminuição do pH da mistura para 3,8 e 3,6 não resolveu a co-eluição dos picos (como é visível na Figura 53), ainda que tenha aumentado a resolução entre os picos já existentes.

### Fase móvel 88:6:6

Visto nenhuma das proporções ter sido eficaz a separar os picos e não se poder diminuir mais o pH da fase móvel, já que esta se demonstrou instável a menores pH's, experimentou-se uma última fase móvel de proporção 88:6:6 (tampão fosfato pH 4,0:metanol:acetonitrilo) na coluna atual [ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm)], e essa mesma fase móvel numa coluna diferente, anteriormente testada [ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1 $\times$ 50 mm)].

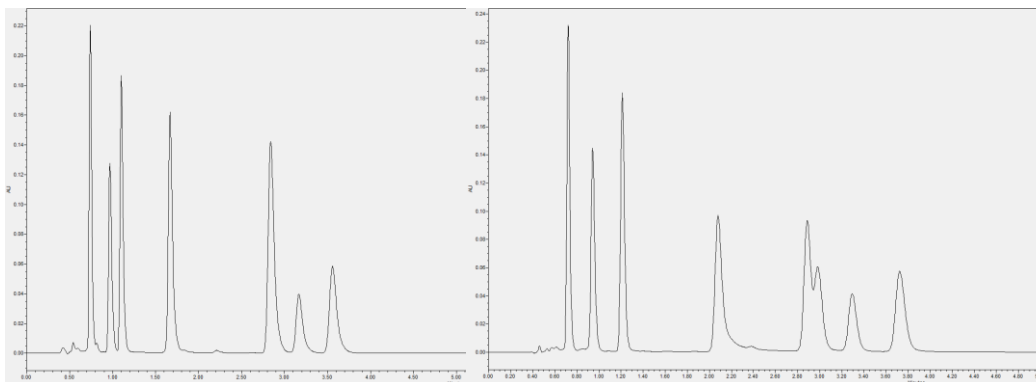


Figura 54 - Cromatograma STD 5ppm com coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm) e fase móvel 88:6:6 (tampão fosfato pH 4,0:metanol:acetonitrilo) (à esquerda) vs coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1 $\times$ 50 mm), com mesmo STD e fase móvel (à direita).

Novamente, na coluna que estava a ser utilizada, a fase móvel não proporcionou a separação dos picos (como é visível na Figura 54, à esquerda). Já na coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1 $\times$ 50 mm) (Figura 54, à direita) é possível ver uma ligeira separação entre os mesmos.

Continuou-se então com a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1 $\times$ 50 mm), onde se fez passar fases móveis com diversas proporções, de modo a estudar qual delas produzia a melhor resolução entre os picos.

Experimentou-se, portanto, as proporções de tampão fosfato pH 4,0:metanol:acetonitrilo: 90:6:4, 89:6:5, 86:6:8, 85:6:9, 87:6:7, 88:5:7, 90:3:7, 91:2:7 e 93:0:7. Os cromatogramas obtidos encontram-se no [Anexo 10](#), e os seus resultados encontram-se sintetizados na Figura 55.

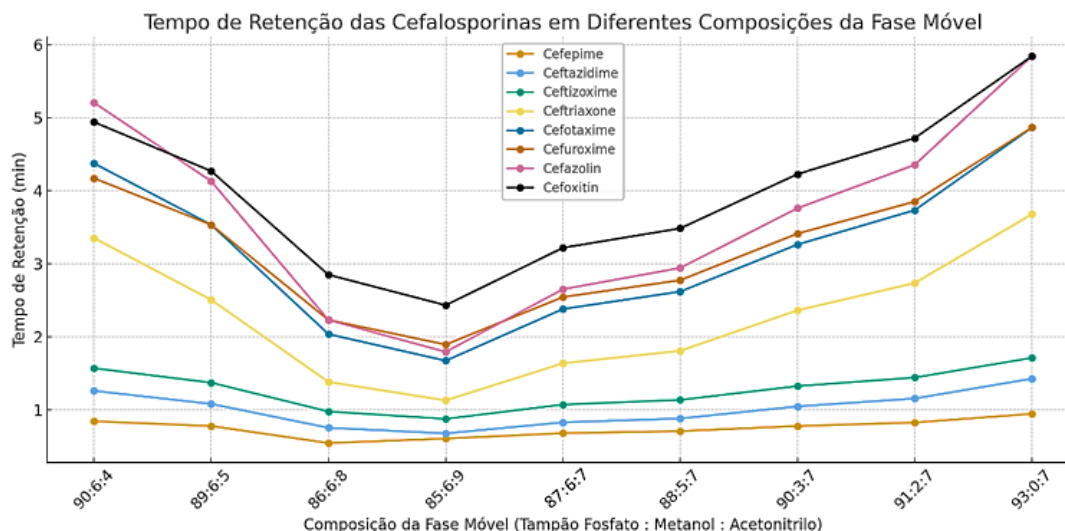


Figura 55 - Gráfico que ilustra a variação do tempo de retenção das cefalosporinas utilizando fases móveis de diferente composição, na coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1x50 mm).

Ao analisar os resultados obtidos, resumidos na Figura 55, é possível auferir que, quando a fase móvel contém maior proporção de tampão fosfato e menor fração de solventes orgânicos, o tempo de retenção das cefalosporinas aumenta para todos os compostos. Em contrapartida, o aumento da proporção de acetonitrilo, ou metanol, reduz o tempo de retenção, acelerando a eluição.

Entre os solventes orgânicos, o aumento de metanol provoca redução consistente do tempo de retenção, devido ao incremento da força eluente. Já o aumento de acetonitrilo apresenta um efeito mais complexo: em composições com teor moderado, acelera a eluição, mas em proporções mais elevadas pode aumentar novamente o tempo de retenção, provavelmente em função de alterações no equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico e na interação com a fase estacionária.

O ajuste do teor de metanol mostrou-se mais eficaz para controlar e encurtar o tempo de retenção, enquanto o acetonitrilo apresentou papel secundário, mas relevante para otimizar a resolução e evitar co-eluição.

A intensidade da variação depende ainda das características químicas de cada cefalosporina. As cefalosporinas mais polares, como Cefepime e Ceftazidime, apresentam tempos de retenção geralmente inferiores a 1,5 minutos, enquanto compostos menos polares, como Cefazolin e Cefoxitin, alcançam valores superiores, chegando a mais de 5 minutos na condição 93:0:7.

Na prática, tempos de retenção mais longos podem favorecer a separação, mas prolongam a duração da análise. Além disso, em determinadas composições, ainda que com tempos mais longos de retenção, observa-se sobreposição de picos, indicando co-eluição e comprometendo a resolução cromatográfica.

Assim, pelos resultados, a composição de tampão fosfato pH 4,0:metanol:acetonitrilo 88:5:7 é a que oferece o melhor equilíbrio entre resolução e tempo total de corrida.

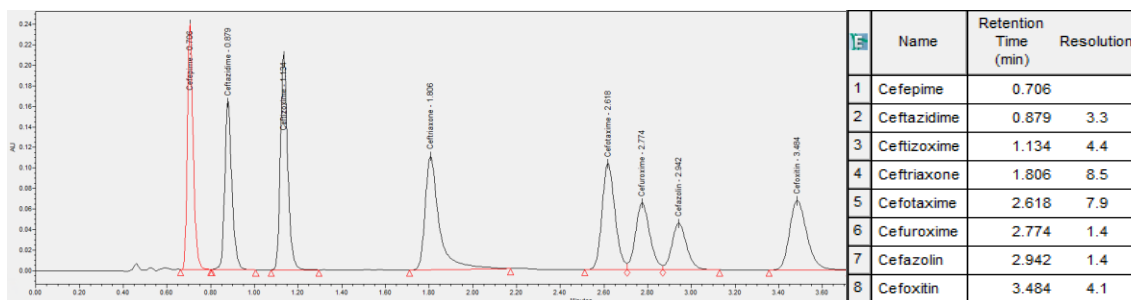


Figura 56 - Cromatograma STD 5ppm com fase móvel de proporção 88:5:7 utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1x50 mm), com integração.

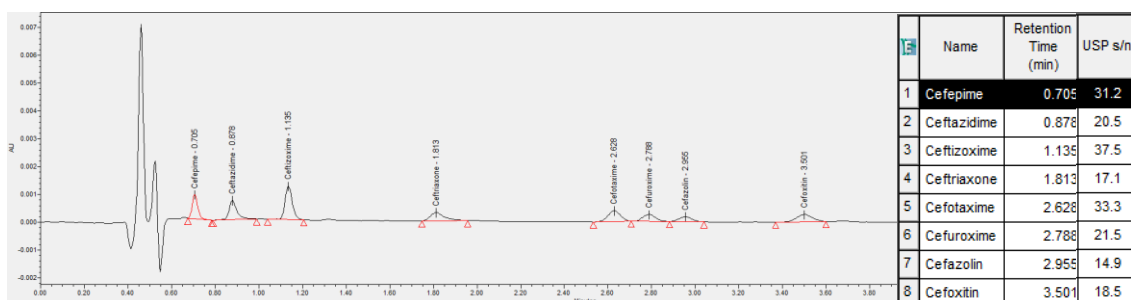


Figura 57 - Cromatograma STD 0,02ppm com fase móvel de proporção 88:5:7 utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1x50 mm), com integração.

E, fazendo a integração dos cromatogramas obtidos na Figura 56 e 57, confirma-se que a mesma satisfaz todos os requisitos de: separação satisfatória entre o primeiro pico e o pico de injeção, resolução acima de 1 e s/n acima de 10.

### 3.1.7. AMOSTRAGEM

Escolhida a fase móvel e coluna, testou-se entre zaragatoas da marca Cultiplast e da marca Texwipe, TX761K, qual seria a melhor para efetuar a recuperação.

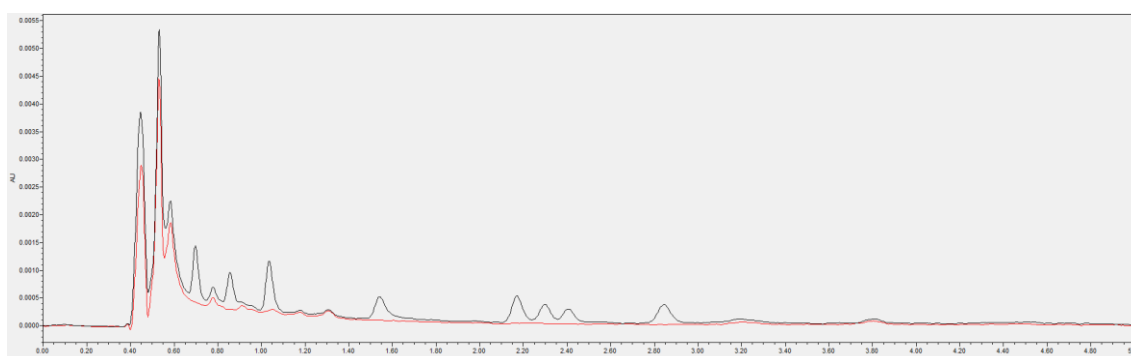


Figura 58 - Cromatogramas zaragatoa Cultiplast: solvente (a vermelho) e STD 0,02ppm (a preto).

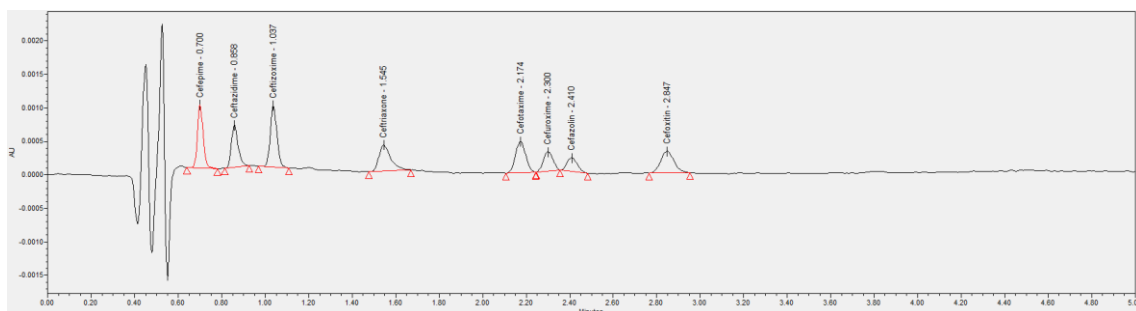


Figura 59 - Cromatogramas zaragatoa Texwipe STD 0,02ppm, com integração.

Os resultados obtidos (Figuras 58 e 59) evidenciaram que a zaragatoa Texwipe era a mais apropriada para se utilizar na amostragem, devido à sua linha de base com menos interferências.

### 3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC

Depois de encontradas as condições finais, prosseguiu-se com a validação do método, utilizando as condições cromatográficas descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições cromatográficas finais do método desenvolvido.

<b>Coluna</b>	ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7µm (2,1 × 50 mm)
<b>Fluxo</b>	0,3 mL/ min
<b>Detetor UV-Vis</b>	240 nm
<b>Temperatura da coluna</b>	32°C
<b>Temperatura das amostras</b>	8 °C
<b>Tempo de corrida</b>	5 min
<b>Volume de injeção</b>	5 µL
<b>Eluição</b>	Isocrática

#### 3.2.1. PRECISÃO DO SISTEMA

Os resultados obtidos, cálculo da média e %RSD da área obtida encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Área dos picos de 6 injeções consecutivas de STD 5ppm para avaliação da precisão do sistema.

Injeção #	Área do pico ( $\mu\text{V}/\text{sec}$ )							
	Cefepime for injection	Ceftazidime	Ceftizoxime sodium	Ceftriaxone sodium	Cefotaxime sodium	Cefuroxime sodium	Cefazolin sodium	Cefoxitin sodium
1	440717	362444	472874	444759	437786	304865	221192	382416
2	440105	362352	472958	450457	438022	301947	220170	380735
3	439721	362199	473262	453808	439167	304052	220405	382318
4	440040	362425	472867	453357	438603	303808	220228	382054
5	440617	362516	472951	453123	437712	305295	220984	381870
6	439794	362402	472793	453494	437491	305114	220871	381559
Desvio padrão	415,453	107,782	164,146	3518,932	634,373	1243,050	429,477	617,357
Média	440166	362390	472951	451500	438130	304180	220642	381825
%RSD	0,09	0,03	0,04	0,78	0,14	0,41	0,20	0,16

Visto a %RSD das áreas dos picos correspondentes a cada cefalosporina serem abaixo de 10,0% ( $\%RSD \leq 0,78$ ), o método demonstrou-se preciso.

### 3.2.2. LINEARIDADE

Os resultados obtidos encontram-se no [Anexo 11](#). Os valores de %RSD para todos os níveis estão sintetizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de %RSD para os níveis de linearidade 150%, 120%, 100%, 50%, 10%, 1,2% e 0,3%.

Cefalosporina	%RSD						
	Nível 150%	Nível 120%	Nível 100%	Nível 50%	Nível 10%	Nível 1,2%	Nível 0,3%
Cefepime for injection	0,03	0,11	0,17	0,17	0,11	-	1,50
Ceftazidime	0,03	0,11	0,17	0,18	0,46	-	1,11
Ceftizoxime sodium	0,04	0,12	0,17	0,15	0,52	-	1,03
Ceftriaxone sodium	0,85	0,15	3,68	0,51	0,79	2,80	-
Cefotaxime sodium	0,06	0,09	1,43	0,28	0,17	-	5,87
Cefuroxime sodium	0,16	0,32	1,93	0,47	0,12	-	1,78
Cefazolin sodium	0,07	0,11	4,04	0,13	0,79	-	6,04
Cefoxitin sodium	0,06	0,17	1,63	0,23	0,25	-	1,92

Para nenhum dos níveis de linearidade, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, foi superior a 6,04%, como se pode observar na Tabela 10, cumprindo o critério de aceitação ( $\%RSD \leq 10,0\%$ ).

Efetuuou-se ainda a análise de regressão linear da Concentração vs Área média do pico e resumiu-se os dados para cada cefalosporina na Tabela 17.

Tabela 11 – Tabela com coeficiente de correlação, declive e intercept.

	<b>Coeficiente de Correlação</b>	<b>Declive</b>	<b>Intercept</b>
<b>Cefepime</b>	<b>0,99995</b>	87116,55548	980,21816
<b>Ceftazidime</b>	<b>0,99998</b>	72123,66560	502,05582
<b>Ceftizoxime</b>	<b>0,99999</b>	94109,99299	480,75012
<b>Ceftriaxone</b>	<b>0,99906</b>	97418,97559	-3113,96339
<b>Cefotaxime</b>	<b>0,99986</b>	87528,30900	1488,57214
<b>Cefuroxime</b>	<b>0,99987</b>	60820,93880	1061,69473
<b>Cefazolin</b>	<b>0,99943</b>	44431,90000	1331,11100
<b>Cefoxitin</b>	<b>0,99989</b>	76606,81000	678,53830

Para além da %RSD  $\leq$  10,0%, o coeficiente de correlação demonstrou-se superior a 0,98 para todas as cefalosporinas, pelo que o método é linear, como ilustram as Figuras do [Anexo 12](#).

### 3.2.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Os dados obtidos foram resumidos nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Limite de Quantificação para Ceftriaxone.

<b>Limite de Quantificação</b>						
<b>Cefalosporina</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Injeção #</b>	<b>Área do pico (mAU*min)</b>	<b>Média</b>	<b>%RSD</b>	<b>S/N</b>
<b>Ceftriaxone injection</b>	0,06	<b>1</b>	4089	4192	<b>4,15</b>	<b>15</b>
		<b>2</b>	4095			<b>15</b>
		<b>3</b>	4393			<b>16</b>

Para a concentração 0,06 µg/mL (Nível 1,2%) de Ceftriaxone sodium, o método demonstrou ser preciso e linear. Para além disso, esta possui uma razão S/N  $\geq$  15, cumprindo também o critério correspondente ao S/N (S/N NLT 10), sendo, portanto, o LOQ para esta cefalosporina.

Tabela 13 - Limite de Quantificação para Cefepime, Ceftazidime, Ceftizoxime, Cefotaxime, Cefuroxime, Cefazolin e Cefoxitin.

Limite de Quantificação						
Cefalosporina	Concentração (µg/mL)	Injeção #	Área do pico (mAU*min)	Média	%RSD	S/N
Cefepime for injection	0,015	1	1358	1312	3,67	24
		2	1262			25
		3	1317			26
Cefazidime		1	1055	1068	1,03	14
		2	1073			14
		3	1075			14
Ceftizoxime sodium		1	1492	1500	1,51	20
		2	1526			20
		3	1483			21
Cefotaxime sodium		1	1398	1373	1,94	26
		2	1375			26
		3	1345			26
Cefuroxime sodium	1	964	949	5,64	16	
	2	890			15	
	3	994			16	
Cefazolin sodium	1	712	700	8,22	10	
	2	637			10	
	3	750			10	
Cefoxitin sodium	1	1067	1100	2,96	16	
	2	1100			16	
	3	1132			16	

Para a concentração 0,015 µg/mL (Nível 0,3%) o método demonstrou ser preciso e linear para as restantes cefalosporinas. Para além disso, a razão S/N  $\geq 10$ , cumprindo também o critério correspondente ao S/N (S/N NLT 10), sendo, portanto, o LOQ para todas as cefalosporinas produzidas na fábrica, à exceção de Ceftriaxone sodium.

#### 3.2.4. LIMITE DE DETEÇÃO (LOD)

Os resultados correspondentes aos LOD encontram-se expressos na tabelas seguintes.

Tabela 14 - Limite de Detecção para Ceftriaxone.

Cefalosporina	Concentração (µg/mL)	Injeção #	S/N
Ceftriaxone sodium	0,015	1	4
		2	5
		3	4

A concentração 0,015 µg/mL de Ceftriaxone sodium possui uma razão S/N  $\geq 4$ , cumprindo o critério correspondente ao S/N (S/N cerca de 3), sendo, portanto, o LOD para esta cefalosporina.

Tabela 15 - Limite de Detecção para Cefepime, Ceftazidime, Ceftizoxime, Cefotaxime, Cefuroxime, Cefazolin e Cefoxitin.

Cefalosporina	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Injeção #	S/N
Cefepime for injection	0,005	1	8
		2	8
		3	8
Cefazidime		1	4
		2	4
		3	4
Ceftizoxime sodium		1	7
		2	7
		3	7
Cefotaxime sodium		1	6
		2	6
		3	7
Cefuroxime sodium	1	5	
	2	4	
	3	4	
Cefazolin sodium	1	4	
	2	4	
	3	4	
Cefoxitin sodium	1	4	
	2	5	
	3	5	

Já para as restantes cefalosporinas, a concentração 0,005  $\mu\text{g/mL}$  possui também uma razão S/N  $\geq 4$ , cumprindo o critério correspondente ao S/N (S/N cerca de 3), sendo, portanto, o LOD para as mesmas.

### 3.2.5. EXATIDÃO – SWAB CHALLENGE

Calculou-se a percentagem recuperada para cada nível de recuperação individual e a %RSD para cada nível. Os resultados encontram-se resumidos nas Tabelas 16-19.

Tabela 16 - Exatidão – *Swab Challenge*, Níveis de Linearidade 150%, 100%, 1,2% e 0,3%.

Nível %	Cefalosporina	Concentração (µg/100cm <sup>2</sup> )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
150	Cefepime for injection	7,607	1	99,4	99,7	0,47
		7,669	2	100,3		
		7,607	3	99,4		
	Ceftazidime	7,696	1	97,0	97,2	0,47
		7,759	2	97,8		
		7,696	3	97,0		
	Ceftizoxime sodium	7,804	1	100,4	100,7	0,43
		7,862	2	101,2		
		7,804	3	100,4		
	Ceftriaxone sodium	8,019	1	104,4	104,4	0,32
		8,044	2	104,8		
		7,992	3	104,1		
	Cefotaxime sodium	7,480	1	97,5	98,2	0,75
		7,530	2	99,0		
		7,480	3	98,3		
	Cefuroxime sodium	7,325	1	96,3	96,0	0,48
		7,382	2	96,2		
		7,325	3	95,4		
	Cefazolin sodium	7,113	1	92,4	92,6	0,35
		7,159	2	93,0		
		7,113	3	92,4		
	Cefoxitin sodium	7,790	1	101,4	100,7	0,69
		7,831	2	100,6		
		7,790	3	100,0		

Para o Nível 150% de concentração, a %RSD entre as três injeções, para cada cefalosporina, não foi superior a 0,75%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 10%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão percentual), esta está compreendida entre 92,4% e 104,8% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (85,0%-115,0%).

Tabela 17 - Exatidão – Swab Challenge, Nível de Linearidade 100%.

Nível %	Cefalosporina	Concentração (µg/100cm <sup>2</sup> )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
100	Cefepime for injection	5,116	1	100,3	100,2	0,26
		5,119	2	100,4		
		5,094	3	99,9		
	Ceftazidime	5,178	1	97,9	97,6	0,30
		5,175	2	97,8		
		5,149	3	97,3		
	Ceftizoxime sodium	5,254	1	101,4	101,3	0,30
		5,255	2	101,4		
		5,228	3	100,9		
	Ceftriaxone sodium	5,127	1	100,2	100,6	0,48
		5,177	2	101,1		
		5,146	3	100,5		
	Cefotaxime sodium	5,023	1	99,0	99,1	0,08
		5,029	2	99,1		
		5,022	3	99,0		
	Cefuroxime sodium	4,924	1	96,2	95,8	0,59
		4,914	2	96,0		
		4,870	3	95,2		
	Cefazolin sodium	4,773	1	93,0	92,9	0,26
		4,779	2	93,1		
		4,754	3	92,6		
	Cefoxitin sodium	5,212	1	100,4	100,4	0,27
		5,228	2	100,7		
		5,200	3	100,2		

Para o Nível 100% de concentração, a %RSD entre as três injeções, para cada cefalosporina, não foi superior a 0,59%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 10%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão percentual), esta está compreendida entre 92,6% e 101,4% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (85,0%-115,0%).

Tabela 18 - Exatidão – Swab Challenge, Nível LOQ 1,2%.

Nível LOQ %	Cefalosporina	Concentração (µg/100cm <sup>2</sup> )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
1,2	Ceftriaxone sodium	0,056	1	89,9	88,5	1,45
		0,055	2	88,0		
		0,054	3	87,5		

Para o Nível 1,2% de concentração, a %RSD entre as três injeções de Ceftriaxone sodium foi 1,45%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 10%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão percentual), esta está compreendida entre 87,5% e 89,9% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (85,0%-115,0%).

Tabela 19 - Exatidão – Swab Challenge, Nível LOQ 0,3%.

Nível LOQ %	Cefalosporina	Concentração (µg/100cm <sup>2</sup> )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
0,3	Cefepime for injection	0,015	1	95,4	94,1	2,61
		0,014	2	91,3		
		0,015	3	95,8		
	Ceftazidime	0,015	1	94,8	102,5	6,54
		0,017	2	106,4		
		0,017	3	106,5		
	Ceftizoxime sodium	0,016	1	99,3	100,3	0,82
		0,016	2	100,8		
		0,016	3	100,6		
	Cefotaxime sodium	0,015	1	95,6	95,5	2,98
		0,014	2	92,5		
		0,015	3	98,2		
	Cefuroxime sodium	0,014	1	93,9	105,0	9,38
		0,017	2	108,6		
		0,017	3	112,7		
	Cefazolin sodium	0,013	1	85,2	94,7	8,74
		0,016	2	99,3		
		0,016	3	99,7		
	Cefoxitin sodium	0,014	1	88,2	95,6	8,60
		0,016	2	104,4		
		0,015	3	94,2		

Por fim, para o Nível 0,3% de concentração, a %RSD entre as três injeções, para cada cefalosporina, não foi superior a 9,38%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 10%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão percentual), esta está compreendida entre 85,2% e 112,7% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (85,0%-115,0%).

## 3.2.6. EXATIDÃO – SURFACE TEST

Calculou-se a %Recuperação para cada amostra individual, bem como a sua média, e a %RSD entre as três amostras, encontrando-se apresentados os resultados obtidos nas tabelas abaixo.

Tabela 20 - Exatidão – Surface Test, Nível de Linearidade 150%.

Superfície PVC						
Nível de Recuperação	Cefalosporina	Concentração ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ )	Preparação #	% Recuperação	Média	% RSD
150	Cefepime for injection	0,055	1	73	74	1,90
		0,056	2	74		
		0,057	3	76		
	Ceftazidime	0,056	1	74	76	1,78
		0,057	2	76		
		0,058	3	77		
	Ceftizoxime sodium	0,058	1	75	76	1,59
		0,059	2	76		
		0,060	3	77		
	Ceftriaxone sodium	0,060	1	75	77	1,79
		0,061	2	77		
		0,062	3	78		
	Cefotaxime sodium	0,055	1	73	74	1,59
		0,056	2	74		
		0,057	3	76		
	Cefuroxime sodium	0,053	1	74	72	1,95
		0,054	2	71		
		0,055	3	72		
	Cefazolin sodium	0,051	1	64	67	4,00
		0,052	2	68		
		0,053	3	69		
	Cefoxitin sodium	0,057	1	78	77	1,25
		0,058	2	76		
		0,059	3	78		

Para o Nível 150% de concentração, a %RSD entre as três injeções, para cada cefalosporina, não foi superior a 4,00%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 15%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão), esta está compreendida entre 64% e 78% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (>50%).

Tabela 21 - Exatidão – *Surface Test*, Nível de Linearidade 100%.

Nível %	Cefalosporina	Concentração (µg/100cm <sup>2</sup> )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
100	Cefepime for injection	0,036	1	71	70	2,08
		0,035	2	69		
		0,034	3	69		
	Ceftazidime	0,037	1	74	72	2,29
		0,036	2	71		
		0,036	3	71		
	Ceftizoxime sodium	0,038	1	74	71	2,54
		0,036	2	70		
		0,036	3	70		
	Ceftriaxone sodium	0,038	1	71	69	2,20
		0,036	2	68		
		0,036	3	68		
	Cefotaxime sodium	0,036	1	72	70	2,41
		0,035	2	69		
		0,035	3	69		
	Cefuroxime sodium	0,035	1	72	70	2,62
		0,034	2	69		
		0,033	3	69		
	Cefazolin sodium	0,034	1	64	63	2,40
		0,033	2	62		
		0,033	3	62		
Cefoxitin sodium	0,038	1	78	76	2,45	
	0,036	2	75			
	0,036	3	75			

Para o Nível 100% de concentração, a %RSD entre as três injeções, para cada cefalosporina, não foi superior a 2,62%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 15%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão), esta está compreendida entre 62% e 78% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (>50%).

Tabela 22 - Exatidão – *Surface Test*, Nível LOQ 1,2%.

Nível LOQ %	Cefalosporina	Concentração (µg/100cm <sup>2</sup> )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
1,2	Ceftriaxone sodium	0,00035	1	54	57	5,25
		0,00037	2	58		
		0,00039	3	60		

Para o Nível 1,2% de concentração, a %RSD entre as três injeções de Ceftriaxone sodium foi superior a 5,25%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 15%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão), esta está compreendida entre 54% e 60% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (>50%).

Tabela 23 - Exatidão – *Surface Test*, Nível LOQ 0,3%.

Nível LOQ %	Cefalosporina	Concentração ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ )	Preparação #	% Recuperação	Média	%RSD
0,3	Cefepime for injection	0,00011	1	74	66	12,80
		0,00010	2	65		
		0,00009	3	58		
	Ceftazidime	0,00011	1	69	60	12,81
		0,00009	2	57		
		0,00008	3	54		
	Ceftizoxime sodium	0,00012	1	76	73	7,45
		0,00012	2	77		
		0,00010	3	67		
	Cefotaxime sodium	0,00011	1	72	69	5,84
		0,00010	2	64		
		0,00011	3	70		
	Cefuroxime sodium	0,00013	1	82	84	4,52
		0,00014	2	88		
		0,00013	3	82		
	Cefazolin sodium	0,00011	1	72	72	5,67
		0,00010	2	67		
		0,00012	3	75		
	Cefoxitin sodium	0,00012	1	78	69	14,72
		0,00011	2	71		
		0,00009	3	58		

Para o Nível 0,3% de concentração, a %RSD entre as três injeções, para cada cefalosporina, não foi superior a 14,72%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD < 15%). Quanto à %Recuperação (ou exatidão), esta está compreendida entre 54% e 88% para as preparações efetuadas, cumprindo também o critério de aceitação (>50%).

Concluiu-se assim que o método é exato, visto cumprir com os critérios de aceitação de ambos os testes de exatidão (*Swab Challenge* e *Surface Test*).

### 3.2.7. GAMA

Utilizando os dados obtidos nas experiências de precisão, exatidão e de linearidade, chegou-se a uma gama de 7,5 ppm a 0,06 ppm (Nível 150% a Nível 1,2%) para Ceftriaxone sodium, e 7,5 ppm a 0,015 ppm (Nível 150% a Nível 0,3%) para as restantes cefalosporinas quantificadas.

## 3.2.8. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES

Calculou-se a %Recuperação da Amostra e Solução Padrão em relação ao ensaio inicial. Os dados foram resumidos na Tabela 30.

Tabela 24 – Estabilidade: %Recuperação das Amostras em INOX e Solução Padrão 5 ppm, em relação ao ensaio inicial.

Estabilidade de soluções analíticas										
Amostra	Condição	Tempo	% Recuperação vs novos resultados							
			Cefepime for injection	Ceftazidime	Ceftizoxime sodium	Ceftriaxone sodium	Cefotaxime sodium	Cefuroxime sodium	Cefazolin sodium	Cefoxitin sodium
Padrão	Temperatura ambiente	24h (1 dia)	99	102	99	94	96	96	99	95
		72h (3 dias)	95	105	94	92	88	88	98	86
		120h (5 dias)	89	108	93	94	80	78	99	79
		144h (6 dias)	86	108	91	92	77	75	97	75
		192h (8 dias)	72	82	80	77	64	61	83	61
	Autosampler	24h (1 dia)	100	100	99	100	99	100	99	99
		72h (3 dias)	100	100	99	100	98	100	99	99
		120h (5 dias)	100	100	99	97	98	96	101	97
		144h (6 dias)	99	99	98	96	98	97	99	97
		192h (8 dias)	87	86	87	80	87	86	87	85
Zaragatoa amostra INOX	Temperatura ambiente	48h (2 dias)	111	115	112	103	105	103	111	103
		96h (4 dias)	105	117	106	106	95	92	112	93
		120h (5 dias)	102	119	105	104	93	88	110	89
		168h (7 dias)	87	92	92	86	77	72	96	73
	Autosampler	48h (2 dias)	87	87	88	85	86	87	86	86
		96h (4 dias)	86	86	86	86	86	83	88	85
		120h (5 dias)	86	86	86	81	86	83	87	85
		168h (7 dias)	76	74	77	74	76	75	77	75

Os resultados mostram que, de modo geral, a refrigeração (autosampler) prolonga a estabilidade das soluções, relativamente à temperatura ambiente.

Visto não se ter estudado a estabilidade em dias consecutivos, considerou-se o pior caso.

Cefepime mantém estabilidade até 6 dias à temperatura ambiente e por mais de 8 dias no autosampler, reduzindo para 5 dias em INOX.

Ceftazidime e Cefazolin são os compostos mais estáveis, permanecendo dentro dos critérios ao longo de todo o período estudado (8 dias) na solução padrão, e até 5 dias em INOX.

Ceftizoxime apresenta estabilidade até 8 dias à temperatura ambiente e ao longo de todo o período estudado (8 dias) no autosampler, enquanto em INOX se mantém estável apenas até 5 dias no autosampler.

Ceftriaxone apresenta estabilidade até 6 dias à temperatura ambiente e um máximo de 8 dias no autosampler, enquanto que em INOX, à temperatura ambiente, apresenta

estabilidade durante todo o período estudado (7 dias), mas no autosampler é estável durante 5 dias.

Cefotaxime, Cefuroxime e Cefoxitin mostram comportamento semelhante, com estabilidade limitada a 3 dias na solução padrão à temperatura ambiente (5 dias, no máximo, para Cefotaxime), e durante todo o período estudado no autosampler (8 dias), reduzindo-se para cerca de 5 dias, em INOX.

Assim, a solução padrão composta por todas as cefalosporinas apresenta uma estabilidade máxima de 8 dias no autosampler e de 3 dias à temperatura ambiente, enquanto as soluções em INOX se mantêm estáveis durante 5 dias, independentemente da condição de armazenamento.

### 3.2.9. ESPECIFICIDADE – ANÁLISE PLACEBO, DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA E DEGRADAÇÃO POR EXPOSIÇÃO À LUZ

Os cromatogramas de solvente das diferentes amostras (padrão, *Swab Challenge*, PVC e INOX) apresentam todos o mesmo perfil, com registos equivalentes, o que indica que todos os materiais testados são compatíveis com o método cromatográfico, não apresentando interferências significativas nem picos adicionais que comprometam a identificação e quantificação das cefalosporinas.

Quanto aos testes de decomposição térmica e degradação por exposição à luz, observaram-se três picos desconhecidos em cada. Estes picos, referentes a degradações dos API's da mistura (8 cefalosporinas), continham os tempos de retenção apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Tempos de retenção dos picos desconhecidos obtidos dos testes de especificidade.

Decomposição Térmica (40°C, 2 dias)		Degradação por Exposição à Luz (7 dias)	
Denominação	RT	Denominação	RT
Unk-1	0,652 min	Unk-1	0,801 min
Unk-2	0,965 min	Unk-2	1,181 min
Unk-3	2,157 min	Unk-3	2,623 min

Visto a solução degradada ser uma mistura de API's, não é possível aferir a que composto ativo cada uma das degradações pertence e, portanto, calcular o RRT (relative retention time, tempo de retenção relativo), como proposto pelo procedimento de validação.

Os cromatogramas das análises placebo, térmica e por exposição à luz encontram-se no [Anexo 13](#).

### 3.2.10. DESVIOS

Ao se iniciar os estudos da Exatidão – *Swab Challenge*, começou a ocorrer a junção de picos de cefalosporinas, como é observável nos cromatogramas da Figura 64.

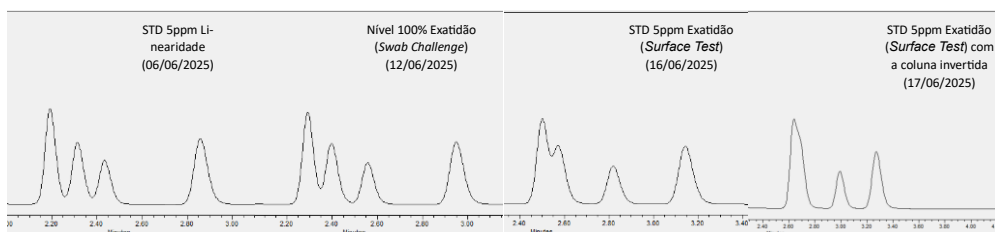


Figura 60 - Cromatogramas Solução Padrão 5ppm Linearidade, Nível 100% Exatidão (*Swab Challenge*), Solução Padrão 5 ppm Exatidão (*Surface Test*) e Solução Padrão 5ppm Exatidão (*Surface Test*) com a coluna invertida.

Esta ocorrência pode dever-se à perda de eficiência da coluna, pelo que se montou uma coluna nova, da mesma marca e modelo, e repetiu-se os testes a partir da Exatidão – *Swab Challenge*.

No entanto, ao se montar uma nova coluna, a área do pico de Ceftriaxone diminuiu, e, consequentemente o seu S/N também, como se pode visualizar nas Figuras 61 e 62.

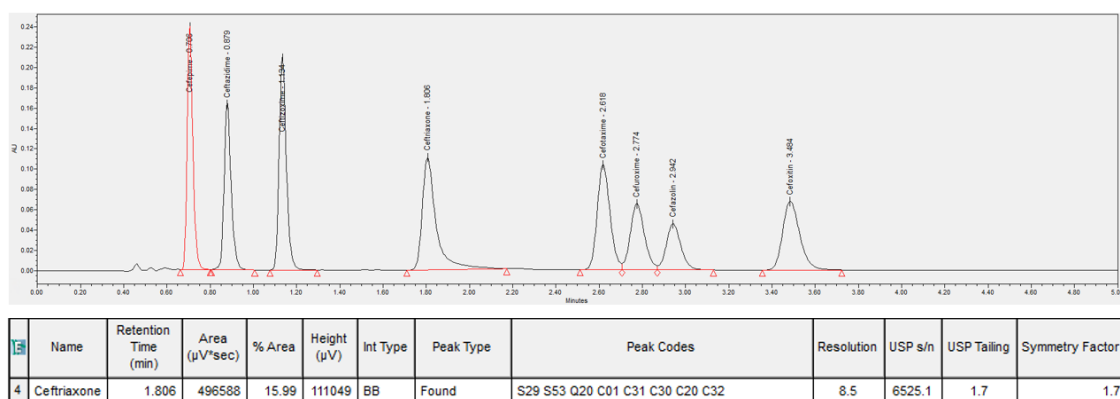


Figura 61 – Injeção de Solução Padrão 5 ppm utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 μm (2,1x50 mm), antes desta perder eficiência.

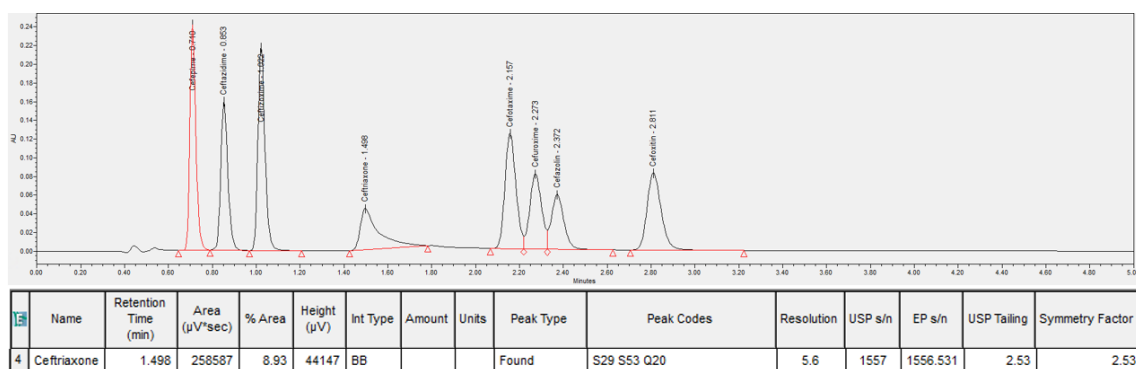


Figura 62 - Injeção de Solução Padrão 5 ppm utilizando uma coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 μm (2,1x50 mm) sem utilização prévia, aberta no dia.

Esta diminuição de área do pico pode dever-se ao facto da coluna nova ainda não estar completamente condicionada pois, com o uso, a fase estacionária atinge o equilíbrio

com a fase móvel e a amostra, resultando num aumento gradual da área do pico, até estabilização.

Outra possível causa poderá ser a adsorção de Ceftriaxone pela coluna quando esta se encontra ainda nova, devido à presença de locais ativos na fase estacionária ainda não saturados. Essa adsorção pode reduzir a quantidade de analito eluída, originando uma diminuição da área do pico, a qual tende a aumentar e estabilizar com o uso contínuo da coluna.

Tal, levou à alteração dos limites de quantificação/deteção até então estabelecidos. Por isso, os resultados dos limites de deteção/quantificação apresentados são para o pior caso, isto é, quando uma nova coluna, do mesmo modelo e marca, é aberta e utilizada no início da sua vida útil.

## 4. CONCLUSÃO

O método anteriormente utilizado em HPLC revelou-se insuficiente para a detecção de Cefepime e Ceftazidime, o que exigiu a sua substituição por uma abordagem que permitisse a inclusão das oito cefalosporinas produzidas na unidade Hikma II. Esta limitação inicial constituiu um desafio que exigiu não apenas uma adaptação técnica, mas também uma reflexão crítica sobre as condições analíticas e os requisitos operacionais do Controlo de Qualidade.

Concluiu-se que a transferência para UPLC permitiria otimizar o tempo de análise e melhorar os níveis de detecção necessários para as atividades de *containment* do Controlo de Qualidade, pelo que o método foi desenvolvido utilizando esta abordagem. No desenvolvimento do método, estudaram-se detalhadamente as condições cromatográficas, identificando-se que a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, em combinação com a fase móvel composta por tampão fosfato pH 4,0, metanol e acetonitrilo na proporção 88:5:7, assegurava a separação completa dos oito compostos, com resolução mínima de 1 e relação sinal-ruído superior a 10. Este processo de otimização incluiu ensaios comparativos de zaragatoas, tendo a Texwipe TX761K sido selecionada por apresentar menor interferência e maior compatibilidade com o sistema analítico.

A validação do método foi realizada em conformidade com as diretrizes ICH Q2 e o procedimento interno da Hikma, permitindo avaliar de forma sistemática todos os parâmetros críticos para a utilização do método em contexto operacional. Durante este processo, confirmou-se o cumprimento dos requisitos de adequabilidade do sistema, assegurando que o equipamento e as condições cromatográficas eram consistentes e reprodutíveis.

Foram avaliados parâmetros fundamentais, incluindo precisão, linearidade da resposta analítica, limites de detecção e quantificação, exatidão, gama, estabilidade das soluções analíticas e especificidade face a placebo e amostras degradadas. Cada um destes parâmetros atingiu os critérios previamente estabelecidos, evidenciando que o método apresenta confiabilidade, robustez e capacidade de discriminação entre os analitos e potenciais interferentes.

O cumprimento destes critérios demonstra que o método desenvolvido não só atende às necessidades operacionais do Controlo de Qualidade, como também está alinhado com as boas práticas de desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Assim, conclui-se que o trabalho realizado permitiu estabelecer um método UPLC validado, robusto e adequado para a análise das oito cefalosporinas, garantindo resultados precisos e reprodutíveis, mesmo perante variações normais de rotina laboratorial.

Para além dos resultados técnicos obtidos, este trabalho constituiu uma experiência de aprendizagem prática muito enriquecedora. As várias situações inesperadas que surgiram ao longo do desenvolvimento e validação do método exigiram análise crítica, adaptação de procedimentos e tomada de decisões fundamentadas, permitindo consolidar

competências essenciais em cromatografia e na resolução de problemas em contexto laboratorial.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] AIECP. *Hikma*. <https://www.portugalglobal.pt/pt/investimento/porque-portugal/casos-de-sucesso/hikma/>. [Acedido a 23 fevereiro 2025].
- [2] Hikma. *Who we are*. <https://www.hikma.com/who-we-are/>. [Acedido a 26 fevereiro 2025].
- [3] Hikma. *Hikma - Portugal*. <https://www.hikma.com/pt-pt/visao/>. [Acedido a 23 fevereiro 2025].
- [4] Featherstone, G. (2022). *Hikma injectables. Portugal site visit*. <https://www.hikma.com/media/q4xideom/injectable-portugal-site-visit-presentation.pdf>. [Acedido a 26 fevereiro 2025].
- [5] Fernandes, F. (2024). *Hikma Portugal, a exportadora de medicamentos*. <https://www.jornaldenegocios.pt/negocios-iniciativas/premios-exportacao---internacionalizacao/detalhe/20241111-0838-hikma-portugal-a-exportadora-de-medicamentos>. [Acedido a 23 fevereiro 2025].
- [6] World Health Organization. (2014). *WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main Principles, Annex 2*. <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/TRS986annex2.pdf>. [Acedido a 20 outubro 2025].
- [7] Patel, K., Chotai, N. (2011). *Documentation and Records: Harmonized GMP Requirements*. *Journal of young pharmacists*, vol. 3, no. 2, pp. 138–150. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.80303>. [Acedido a 20 outubro 2025].
- [8] European Commission. (2022). *Annex 3 – Manufacture of  $\beta$ -Lactam Antibiotics, Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products*, vol. 4, pp. 1-88. [https://health.ec.europa.eu/document/download/ad33d9dd-03f0-4bef-af53-21308ce2187d\\_en?filename=2017\\_11\\_22\\_guidelines\\_gmp\\_for\\_atmps.pdf](https://health.ec.europa.eu/document/download/ad33d9dd-03f0-4bef-af53-21308ce2187d_en?filename=2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf).
- [9] World Health Organization (WHO). (2021). *WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main Principles*. <https://learning.quamed.org/helpdesk/articles/annex-2-who-good-manufacturing-practices-for-pharmaceutical-products-main-principles/>. [Acedido a 20 outubro 2025].
- [10] Denk, R. (2017). *Understanding Containment*. <https://www.pharmtech.com/view/understanding-containment>. [Acedido a 14 novembro 2025].

- [11] European Medicines Agency. (2015). *Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-setting-health-based-exposure-limits-use-risk-identification-manufacture-different-medicinal-products-shared-facilities\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-setting-health-based-exposure-limits-use-risk-identification-manufacture-different-medicinal-products-shared-facilities_en.pdf). [Acedido a 3 dezembro 2025].
- [12] FDA. (2013). *Non-Penicillin Beta-Lactam Drugs: A CGMP Framework for Preventing Cross-Contamination*. Guidance for Industry, pp. 1-10. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Non-Penicillin-Beta-Lactam-Drugs--A-CGMP-Framework-for-Preventing-Cross-Contamination.pdf>.
- [13] Ullah, M., Rana, M. (2025). *Cephalosporin Containment Management Strategies from Drug Manufacturing to Control Antibiotic Resistance in South Asia*. Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste, vol. 29, no. 1, pp. 1-10. doi:10.1061/JHTRBP.HZENG-1330.
- [14] International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE). (2018). *Good Practice Guide: Containment*. <https://pt.scribd.com/document/815537155/ISPE-Good-Practice-Guide-Containment-for-Potent-Compounds-VinaGMP>. [Acedido a 20 outubro 2025].
- [15] Werth, B. (2024). Cefalosporinas. <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-medicamentos-antibacterianos/cefalosporinas>. [Acedido a 27 fevereiro 2025].
- [16] Bui, T. et al. (2024). Cephalosporins. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>. [Acedido a 27 fevereiro 2025].
- [17] Alcaide, B. et al. (2008). Cephalosporins. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*, vol. 2, pp. 111-171. <https://doi.org/10.1016/B978-008044992-0.00202-9>.
- [18] Farinha, S. et al. (2018). *Perfis de sensibilização às cefalosporinas na prática clínica*. Rev Port Imunoalergologia, vol. 26, no. 4, pp. 263-271.
- [19] Azevedo, S. (2014). *Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos*. [https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG\\_21378.pdf](https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG_21378.pdf). [Acedido a 28 fevereiro 2025].
- [20] Livermore, D. (1987). *Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics*. Drugs, vol. 34, no. 2, pp. 64-88.
- [21] Menezes, U. et al. (2021). *Reatividade cruzada entre betalactâmicos: uma abordagem prática*. Arquivos de Asmas Alergia e Imunologia, vol. 5, no. 4.
- [22] Pedroso, T. (2013). *Análise químico-farmacêutica de cefazolina sódica em pó liofilizado para solução injetável*, <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/56eb373b-cb8b-4b72-8776-cf4d687e9640/content>. [Acedido a 3 março 2025].
- [23] Guerra, A. (2020). *Farmacocinética, farmacodinâmica e monitorização sérica de  $\beta$ -lactâmicos*.

- [https://repositorio.ulisboa.pt/bitstream/10451/52214/1/MICF\\_Ana\\_Catarina\\_Guerra.pdf](https://repositorio.ulisboa.pt/bitstream/10451/52214/1/MICF_Ana_Catarina_Guerra.pdf). [Acedido a 6 março 2025].
- [24] Pimenta, A. (2003). *Controlo de formulações farmacêuticas baseado em sistemas de exatidão aferida*. [https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/10494/5/5909\\_TD\\_01\\_P.pdf](https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/10494/5/5909_TD_01_P.pdf). [Acedido a 22 outubro 2025].
- [25] Rodrigues, R. (2022). *Desenvolvimento de um método analítico para IPC (in process control) por HPLC*. <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/83440>. [Acedido a 6 março 2025].
- [26] Cheriyaedath, S. (2023). *Liquid Chromatography versus Gas Chromatography*. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Liquid-Chromatography-versus-Gas-Chromatography.aspx>. [Acedido a 6 março 2025].
- [27] Reina, C. (2015). *A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico*. [https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/88774/1/M\\_Corina%20Reina.pdf](https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/88774/1/M_Corina%20Reina.pdf). [Acedido a 22 outubro 2025].
- [28] Skoog, D *et al.* (2013). *High-Performance Liquid Chromatography*. Fundamentals of Analytical Chemistry 9th ed, pp. 921-943.
- [29] Malviya, R. *et al.* (2010). *High performance liquid chromatography: A short review*. Journal of Global Pharma Technology, vol. 2, no. 5, pp. 22-26.
- [30] Chernomorova, M. *et al.* (2023). *Analytical Determination of Cephalosporin Antibiotics Using Coordination Polymer Based on Cobalt Terephthalate as a Sorbent*. Polymers (Basel), vol. 15, no. 3, p. 548. doi: 10.3390/polym15030548.
- [31] Siddiqui, M. *et al.* (2017). *Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review*. Arabian Journal of Chemistry, vol. 10, no. 1, pp. S1409-S1421. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>.
- [32] Waters Corporation. *Sistema HPLC Alliance. O padrão ouro em análise HPLC. Waters*. <https://www.waters.com/nextgen/br/pt/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-hplc-system.html>. [Acedido a 5 março 2025].
- [33] Hage, D. (2018). *Chromatography*. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry, pp. 1-32.
- [34] Chen, S., Kord, A. (2013). *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Applications*. Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Applications, New Jersey, John Wiley & Sons, pp. 1-30.
- [35] Chawla, G., Ranjan, C. (2016). *Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography*. Open Chemistry Journal, vol. 3, no. 1, pp. 1-16.

- [36] Singh, S. *et al.* (2016). *Ultra Performance Liquid Chromatography: High Throughput Analysis over High Performance Liquid Chromatography*. International Journal of Engineering and Allied Sciences (IJEAS), vol. 2, no. 1, pp. 19-25.
- [37] Waters Corporation. *ACQUITY UPLC H-Class PLUS System*. [https://www.waters.com/nextgen/en/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-uplc-h-class-plus-system.html?srsId=AfmBOooqpiSyPoQz0qjRSZaepW3-NUqvqPPVdlSrBV7TDFr3\\_U1\\_3pM](https://www.waters.com/nextgen/en/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-uplc-h-class-plus-system.html?srsId=AfmBOooqpiSyPoQz0qjRSZaepW3-NUqvqPPVdlSrBV7TDFr3_U1_3pM). [Acedido a 3 março 2025].
- [38] Basharat, R. *et al.* (2021). *A Mini-review on Ultra Performance Liquid Chromatography*. Oriental Journal Of Chemistry, vol. 37, pp. 847-857. doi: 10.13005/ojc/370411.
- [39] GMP Insiders Expert Team, (2024). *HPLC vs UPLC: Understanding the Key Differences*. <https://gmpinsiders.com/hplc-vs-uplc/#:~:text=The%20main%20disadvantages%20of%20UPLC,handling%20and%20preparation%20of%20samples>. [Acedido a 17 março 2025].
- [40] Waters Corporation. *Técnicas alternativas de desenvolvimento de métodos*. <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/preparative-liquid-chromatography-primer/alternative-method-development-techniques.html?srsId=AfmBOorXpxuhO4qtU1PDGXILu4HTgshRJ14uw7Kq02v7IndjLIGgXcD7>. [Acedido a 7 março 2025].
- [41] Santos, V. (2000). *Sumário*. <https://exodocientifica.com.br/repositorio/Ebook%20-%20Solventes%20HPLC.pdf>. [Acedido a 7 março 2025].
- [42] Shimadzu Scientific. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Basics*. <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-basics/index.html>. [Acedido a 10 março 2025].
- [43] European Pharmacopoeia. (2008). *Liquid chromatography*. European Pharmacopoeia, pp. 46-47.
- [44] Hawach Scientific. (2024). *How Do I Choose a Column Size in HPLC - Hawach*. <https://www.hawachhplccolumn.com/news/how-do-i-choose-a-column-size-in-hplc/>. [Acedido a 10 março 2025].
- [45] Waters Corporation. *Hardware das colunas de HPLC*. <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/hplc-column-hardware.html?srsId=AfmBOooz7DcV5XZlrRepG8zLaLi2iAG3uOja5VtOtYQtE4QRhNWHn1AS>. [Acedido a 7 março 2025].
- [46] UHPLCs. *Um guia completo para fase móvel e fase estacionária em HPLC*. <https://uhplcs.com/pt/um-guia-completo-para-fase-m%C3%B3vel-e-fase-estacion%C3%A1ria-em-hplc/>. [Acedido a 28 outubro 2025].

- [47] Costa, D. (2021). *9 Cuidados a ter na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. <https://blog.maldral.pt/9-cuidados-a-ter-na-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-hplc>. [Acedido a 14 março 2025].
- [48] Lancas, F. (2012). *Efeitos de Temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*, Scientia Chromatographica, vol. 4, no. 1, pp. 13-19.
- [49] European Pharmacopoeia. (2008). *Chromatographic separation techniques*. pp. 72-77. <http://www.uspbpep.com/ep60/2.2.46.%20chromatographic%20separation%20techniques%2020246e.pdf>.
- [50] Waters Corporation. *Identificação e quantificação de compostos utilizando HPLC*. <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/identifying-and-quantitating-compounds.html?srsId=AfmBOoo6vgIIRMxJSi8TSfM4kE6qjUBj6tz-jYXfQYBLF3rSpCXRI20X>. [Acedido a 11 março 2025].
- [51] Luiz, A. *et al.* (2018). *Análise Quantitativa por Cromatografia*. Revista Chemkeys. doi: 10.20396/chemkeys.v0i10.9602.
- [52] USP. (2024). *Mass Spectrometry*. [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.masontechnology.ie%2Fwp-content%2Fuploads%2F2023%2F09%2FAdditional-Session-1-USP.pdf&psig=AOvVaw1QsBN\\_pi2zGEAxjoKNFSHY&ust=1746088974874000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBMQjhxqFwoTCLjR2ryu\\_4](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.masontechnology.ie%2Fwp-content%2Fuploads%2F2023%2F09%2FAdditional-Session-1-USP.pdf&psig=AOvVaw1QsBN_pi2zGEAxjoKNFSHY&ust=1746088974874000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBMQjhxqFwoTCLjR2ryu_4). [Acedido a 30 abril 2025].
- [53] Ahuja, S., Dong, M, (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, 1st ed., vol. 6. [http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/91179/1/HANDBOOK%20OF%20PHARMACEUTICAL%20ANALYSIS%20BY%20HPLC-Satinder%20Ahuja\\_Michael%20W%20Dong-Elsevier%20Inc-2005-6.pdf](http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/91179/1/HANDBOOK%20OF%20PHARMACEUTICAL%20ANALYSIS%20BY%20HPLC-Satinder%20Ahuja_Michael%20W%20Dong-Elsevier%20Inc-2005-6.pdf). [Acedido a 5 novembro 2025].
- [54] Chavan, S., Desai, D. (2022). *Analytical method validation: A brief review*. World Journal of Advanced Research and Reviews, vol. 16, no. 2, pp. 389-402.
- [55] ICH. (2005). *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/media/152208/download>. [Acedido a 12 março 2025].
- [56] Porto, H. (2014). *HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência analítica*. [https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/28121/1/TeseMestrado\\_HelenaPorto.pdf](https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/28121/1/TeseMestrado_HelenaPorto.pdf). [Acedido a 13 março 2025].
- [57] USP. (2018). *Reagents: Buffer Solutions*. [http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0\\_ris1s119.html](http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_ris1s119.html). [Acedido a 06 maio 2025].

- [58] Reygaert, W. (2018). *An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria*. AIMS Microbiol, vol. 4, no. 3, pp. 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
- [59] Angulo, C. *et al.* (2024). *Stratification of cephalosporins based on physicochemical and pharmacokinetic variables using multivariate statistical tools*. Intelligent Pharmacy. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.09.004>.
- [60] TCI. *Cefazolin Sodium Salt* 27164-46-1. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C2242#documentsSectionPDP>. [Acedido a 3 março 2025].
- [61] TCI. *Cefuroxime Sodium*. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C3747>. [Acedido a 3 março 2025].
- [62] TCI. *Cefoxitin Sodium*. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C3602>. [Acedido a 3 março 2025].
- [63] TCI. *Cefotaxime Sodium Salt*. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C2224>. [Acedido a 3 março 2025].
- [64] TCI. *Ceftazidime (contains ca. 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)*. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C2225>. [Acedido a 3 março 2025].
- [65] TCI. *Ceftriaxone Disodium Salt Hemiheptahydrate*. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C2226>. [Acedido a 3 março 2025].
- [66] TCI. *Ceftizoxime*. <https://www.tcichemicals.com/OP/en/p/C2622>. [Acedido a 3 março 2025].
- [67] MCE. *Cefepime Dihydrochloride Monohydrate*. <https://www.medchemexpress.com/Cefepime-Dihydrochloride-Monohydrate.html?srsIid=AfmBOop6WW6zcpITS1nHP-vM6hgalpemC2NyzM5PRANXKbzsGBQ8IRgP>. [Acedido a 3 março 2025].
- [68] MetwareBio. *LC vs. HPLC vs. UHPLC: Tracing the Evolution of Chromatographic Techniques*. <https://www.metwarebio.com/lc-vs-hplc-vs-uhplc-evolution-chromatography/>. [Acedido a 6 março 2025].
- [69] Merck Millipore. *Potassium dihydrogen phosphate*. [https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA\\_CHEM-104877?Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA_CHEM-104877?Origin=PDP). [Acedido a 18 março 2025].
- [70] Merck Millipore. *Methanol*. [https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA\\_CHEM-106018?Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA_CHEM-106018?Origin=PDP). [Acedido a 18 março 2025].
- [71] Merck Millipore. *Acetonitrilo*. [https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA\\_CHEM-100030?Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA_CHEM-100030?Origin=PDP). [Acedido a 21 março 2025].

- [72] Honeywell International Inc. *Phosphoric acid*.  
<https://advancedmaterials.honeywell.com/us/en/rc/sds?search=30417-6X1L>.  
[Acedido a 21 março 2025].
- [73] Merck Millipore. *Ficha de dados de segurança*.  
[https://www.merckmillipore.com/Web-DE-Site/de\\_DE/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\\_CHEM-109956&DocumentType=MSD&DocumentId=109956\\_SDS\\_PT\\_PT.PDF&DocumentUID=405786&Language=PT&Country=PT&Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/Web-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-109956&DocumentType=MSD&DocumentId=109956_SDS_PT_PT.PDF&DocumentUID=405786&Language=PT&Country=PT&Origin=PDP). [Acedido a 13 novembro 2025].
- [74] Merck Millipore. *Potassium hydrogen phthalate*.  
[https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA\\_CHEM-104874?Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/msds/MDA_CHEM-104874?Origin=PDP). [Acedido a 9 maio 2025].
- [75] Honeywell Research Chemicals. *Hydrochloric acid*.  
<https://lab.honeywell.com/shop/hydrochloric-acid-30721>. [Acedido a 9 maio 2025].
- [76] Sigma-Aldrich. *Citric acid anhydrous for synthesis 77-92-9*.  
<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/mm/818707?srsId=AfmBOorM8uBMq46Fy1vA3KVcHZ0D50AHilKEKSA5hSj2ydQSz4Q4sCg8>. [Acedido a 9 maio 2025].
- [77] ITW Reagents. *tri-Sodium Citrate 2-hydrate (Reag. USP) for analysis, ACS*.  
<https://itwreagents.com/italy/en/product/tri-sodium-citrate-2-hydrate-for-analysis-acs/131655>. [Acedido a 9 maio 2025].
- [78] WG CriticalCare, LLC. (2015). *Cefepime for Injection, USP SDS*.  
<https://www.wgcriticalcare.com/wp-content/uploads/2020/08/WGCC-Cefepime-for-Injection-USP-SDS-2.4-1.pdf>. [Acedido a 21 março 2025].
- [79] USP. *Ceftazidime Pentahydrate (300 mg) - CAS [78439-06-2]*.  
<https://store.usp.org/product/1098130>. [Acedido a 21 março 2025].



**ANEXOS**

<u>Anexo 1 - Atividade e Resistência das Diferentes Gerações de Cefalosporinas</u> .....	84
<u>Anexo 2 - Cefalosporinas Produzidas na Hikma 2 e suas Características</u> .....	85
<u>Anexo 3 – Diferenças entre os Processos de LC, HPLC e UPLC</u> .....	87
<u>Anexo 4 – Estrutura Química de Modificações de Sílica para Fase Estacionária de Cromatografia de Fase Reversa</u> .....	88
<u>Anexo 5 – Atributos de Desempenho Necessários para a Validação de Métodos das Diferentes Categorias</u> .....	89
<u>Anexo 6 – Preparações e Condições Cromatográficas do Método para HPLC, na Hikma Sintra, que Deteta as 8 Cefalosporinas Produzidas no Local</u> .....	90
<u>Anexo 7 – Segurança dos Reagentes Utilizados para Preparação da Fase Móvel, Solução Stock e Padrões</u> .....	91
<u>Anexo 8 – Proporções 85:10:5, 87:8:5, 88:7:5, 87:7:6, 89:7:4, 89:6:5, 86:8:6, 86:9:5, 84:10:6, 85:9:6, 87,5:7,5:5, 83:10:7, 87:7,5:5,5 Utilizando a Coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7µm (2,1 × 50mm)</u> .....	98
<u>Anexo 9 – Reports dos Espetros (200-400 nm), das Soluções STD 5ppm de Cada Cefalosporina, com Comprimento de Onda, cuja Absorção é Máxima, Representado</u> .....	103
<u>Anexo 10 – Proporções 90:6:4, 89:6:5, 86:6:8, 85:6:9, 87:6:7, 88:5:7, 90:3:7, 91:2:7 e 93:0:7 Utilizando a Coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm)</u> .....	111
<u>Anexo 11 – Linearidade: Resultados Obtidos</u> .....	114
<u>Anexo 12 – Linearidade: Análise de Regressão Linear da Concentração vs Área Média do Pico de Cada Cefalosporina</u> .....	120
<u>Anexo 13 – Especificidade: Cromatogramas de Solvente Referentes às Diferentes Amostras Injetadas (Padrão, Swab Challenge, PVC e INOX), Decomposição Térmica e Degradação por Exposição à Luz</u> .....	123

## ANEXO 1 - ATIVIDADE E RESISTÊNCIA DAS DIFERENTES GERAÇÕES DE CEFALOSPORINAS

Geração	Atividade contra		Resistência a beta-lactamases	Exemplos
	Bactérias Gram +	Bactérias Gram -		
1ª geração	++++	+	+	Cefalotina Cefaloridina Cefradina Ceradroxil Cefazolina Cefalexina Cefatrizina
2ª geração	+++	++	++	Cefamandol Cefaclor Cefuroxima Cefonicida Cefoxitina Cefotetana
3ª geração	++	+++	++	Cefotaxima Cefsulodina Ceftazidima Cefoperazona Ceftriaxona Cefixima Ceftizoxima
4ª geração	++++	++++	+++	Cefepima Cefpiroma
5ª geração	++++	++++	+++	Ceftarolina Ceftobiprole

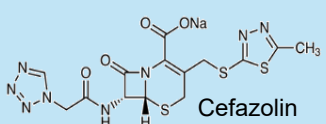
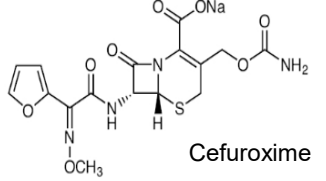
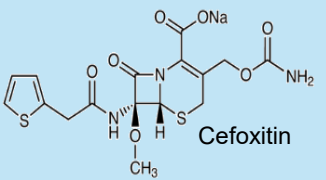
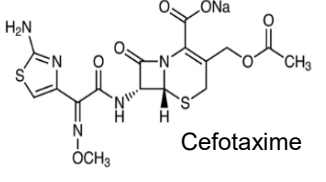
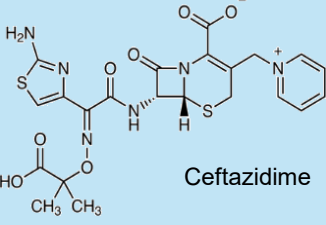
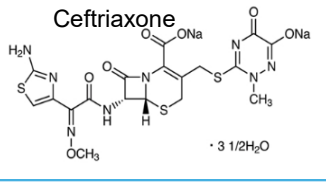
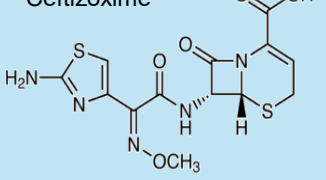
Legenda:

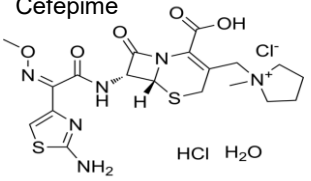
- + - quantidade vestigial;
- ++ - quantidade pequena;
- +++ - quantidade moderada;
- ++++ - quantidade grande.

Figura 63 – Atividade e resistência das diferentes gerações de Cefalosporinas [16, 58].

## ANEXO 2 - CEFALOSPORINAS PRODUZIDAS NA HIKMA 2 E SUAS CARACTERÍSTICAS

Tabela 26 - Cefalosporinas produzidas na Hikma 2 e suas características [59].

Cefalosporinas Hikma 2	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Aparência	Solubilidade (mg/mL)	pKa	Referência
 <p>Cefazolin</p>	$C_{14}H_{13}N_8Na$ $O_4S_3$	476,48	Pó a Cristal Branco a Laranja a Verde	0,487	2,84	[60]
 <p>Cefuroxime</p>	$C_{16}H_{15}N_4Na$ $O_8S$	446,37	Pó a Cristal Branco a Amarelo- Claro	0,284	2,96	[61]
 <p>Cefoxitin</p>	$C_{16}H_{16}N_3Na$ $O_7S_2$	449,43	Pó a Cristal Branco a Amarelo- Claro	0,195	3,39	[62]
 <p>Cefotaxime</p>	$C_{16}H_{16}N_5Na$ $O_7S_2$	477,44	Pó a Cristal Branco a Amarelo- Claro	0,146	2,73	[63]
 <p>Ceftazidime</p>	$C_{22}H_{22}N_6O_7S$ 2	546,57	Pó a Cristal Branco a Laranja a Verde	0,00573	2,42	[64]
 <p>Ceftriaxone</p>	$C_{18}H_{16}N_8Na_2$ $O_7S_3 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$	661,58	Pó a Cristal Branco a Laranja a Verde	0,105	2,70	[65]
 <p>Ceftizoxime</p>	$C_{13}H_{13}N_5O_5S$ 2	383,40	Pó a Cristal Branco a Quase Branco	0,229	2,66	[66]

<p>Cefepime</p>  <p><math>C_{19}H_{28}Cl_2N_6</math> <math>O_6S_2</math></p> <p>HCl H<sub>2</sub>O</p>		571,50	Pó a Cristal Branco a Amarelo- Claro	0,0173	2,82	[67]
---	--	--------	---	--------	------	------

**ANEXO 3 – DIFERENÇAS ENTRE OS PROCESSOS DE LC, HPLC E UPLC**

Tabela 27 - LC vs. HPLC vs. UPLC [68].

<b>Característica</b>	<b>Cromatografia Líquida (LC)</b>	<b>HPLC</b>	<b>UPLC</b>
<b>Tamanho da partícula</b>	≥ 10 µm	≤ 5 µm	≤ 2 µm
<b>Pressão</b>	Baixa (gravidade ou baixa pressão)	~ 400 bar	Até 1500 bar
<b>Eficiência de separação</b>	Baixa resolução Separações mais lentas	Resolução moderada Separações mais rápidas	Alta resolução Separações ultrarrápidas
<b>Velocidade</b>	Lenta	Mais rápida que LC	Mais rápida das três
<b>Sensibilidade</b>	Baixa	Moderada	Alta
<b>Custo</b>	Baixo (acessível)	Mais elevado (equipamento avançado)	Mais elevado (equipamento dispendioso)
<b>Manutenção</b>	Baixa	Moderada	Elevada (necessária frequentemente)
<b>Aplicações</b>	Separações básicas Escolas	Indústria Farmacêutica Indústria Alimentar Pesquisa	Análises de alto rendimento Proteômica (estruturas e funções das proteínas) Metabolômica (metabolismo)

#### ANEXO 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DE MODIFICAÇÕES DE SÍLICA PARA FASE ESTACIONÁRIA DE CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

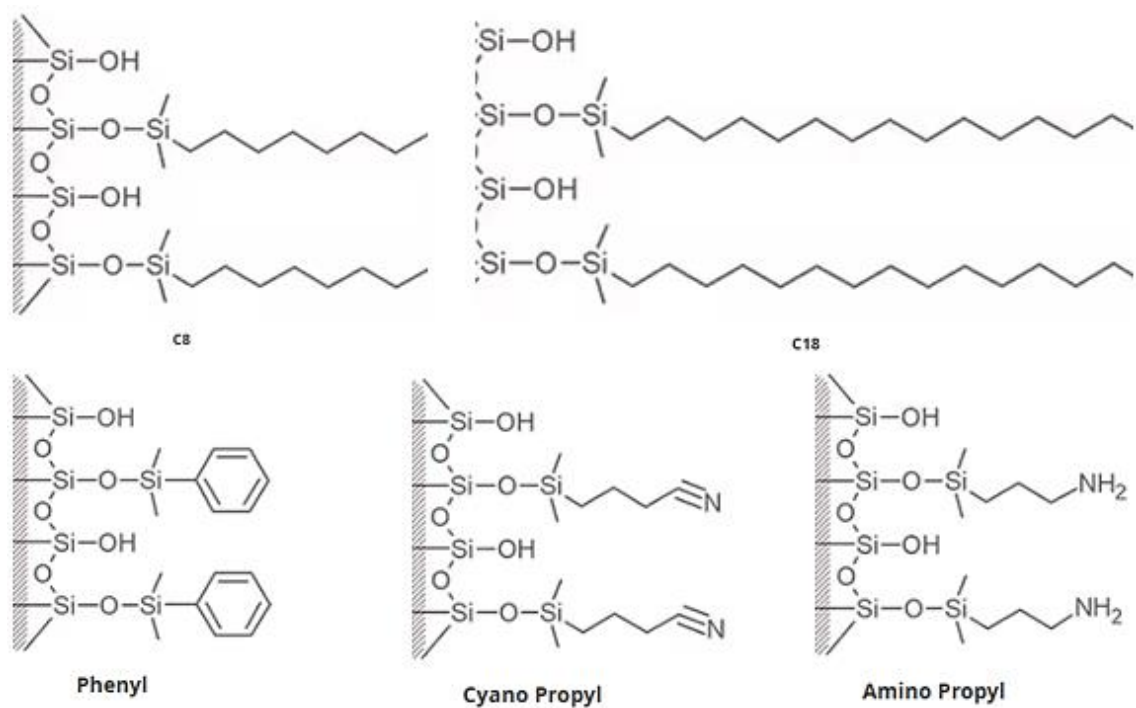


Figura 64 - Estrutura química de algumas fases estacionárias, de modificações de sílica, para cromatografia de fase reversa [42].

## ANEXO 5 – ATRIBUTOS DE DESEMPENHO NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DAS DIFERENTES CATEGORIAS

Tabela 28 - Atributos de desempenho necessários para a validação de métodos das diferentes categorias (tabela adaptada dos SOPs da empresa).

Caraterísticas do desempenho analítico		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaaios de limites		
Precisão	Precisão de sistema	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Precisão de método	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
	Precisão intermediária (ruggedness)	Sim	Sim	Não	Sim	Não
<b>Exatidão (accuracy)</b>		Sim	Sim	*	Sim	Não
Especificidade	Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Degradação forçada	Sim*	Sim*	*	Não	Não
<b>Gama (range)</b>		Sim	Sim	*	Sim	Não
<b>Limite de deteção</b>		Não	Sim	Sim	*	Não
<b>Limite de quantificação</b>		Não	Sim	Não	*	Não
<b>Robustez</b>		Sim	Sim	*	Sim	*
<b>Compatibilidade do filtro</b>		*	*	*	Sim	*
<b>Estabilidade das soluções</b>		Sim	Sim	*	Sim	*
<b>Linearidade</b>		Sim	Sim	Não	Sim	Não
<b>Adequação do sistema</b>		Sim	Sim	*	*	Não

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



Nota: Com base na técnica, alguns ensaios do quadro podem não ser aplicáveis.



## ANEXO 6 – PREPARAÇÕES E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO MÉTODO PARA HPLC, NA HIKMA SINTRA, QUE DETETA AS 8 CEFALOSPORINAS PRODUZIDAS NO LOCAL



Tabela 29 – Preparações e condições cromatográficas de HPLC.

Parâmetro	Descrição
<b>Preparações</b>	
<b>Fase móvel</b>	Dissolver 5,45 g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio (tampão) em 820 mL de água desmineralizada. Adicionar 130 mL de metanol e 50 mL de acetonitrilo, misturar bem. Ajustar o pH a 3,2 com ácido fosfórico.
<b>Solvente</b>	Água desmineralizada, metanol e acetonitrilo (82:13:5)
<b>Solução Stock</b>	Pesar com exatidão o equivalente a 20 mg de cada uma: Cefizoxime Na, Cefotaxime Na, Cefuroxime Na, Cefazolin Na, Cefoxitin Na, Ceftriaxone Na, Cefepime e Ceftazidime, para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolver e diluir com o solvente.
<b>STD 5 ppm</b>	Diluir 5 mL da Solução Stock para um balão volumétrico de 250 mL, com o solvente.
<b>STD 0,02 ppm</b>	Diluir 1 mL de STD 5 ppm para 25 mL e diluir mais 1 mL para 10 mL utilizando o solvente.
<b>Condições cromatográficas</b>	
<b>Coluna</b>	XBridge C18 5 µm (250 mm × 4,6 mm)
<b>Fluxo</b>	1,2 mL/ min
<b>Detetor UV-Vis</b>	260 nm
<b>Temperatura da coluna</b>	32°C
<b>Temperatura das amostras</b>	8 °C
<b>Tempo de corrida</b>	30 min
<b>Volume de injeção</b>	25 µL
<b>Eluição</b>	Isocrática


## ANEXO 7 – SEGURANÇA DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL, SOLUÇÃO STOCK E PADRÕES


REAGENTE	FÓRMULA	PICTOGRAMA(S)	ADVERTÊNCIAS DE PERIGO	PROTEÇÃO	REFERÊNCIA
Di-Hidrogenofosfato de Potássio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Não é exigido nenhum pictograma de perigo	Nenhuma declaração de perigo	<b>Olhos:</b> Óculos de proteção; <b>Pele:</b> Luvas de borracha de nitrilo; <b>Respiratória:</b> Necessária em caso de formação de poeiras (filtro tipo P1)	[69]
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$		H225: Líquido e vapor altamente inflamáveis; H301: Tóxico por ingestão; H331: Tóxico por inalação; H311: Tóxico em contacto com a pele; H370: Provoca danos nos órgãos.	<b>Olhos:</b> Óculos de proteção; <b>Pele:</b> Luvas de borracha butílica ou Viton; <b>Corpo:</b> Vestuário de proteção antiestático retardador de chama; <b>Respiratória:</b> Necessária quando são produzidos vapores/aerossóis (filtro tipo AX) <b>Ambiente:</b> Não deixar que o produto entre nos esgotos. Risco de explosão.	[70]
Acetonitrilo	$\text{CH}_3\text{CN}$		H225: Líquido e vapor altamente inflamáveis; H302 + H312 + H332: Nocivo por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação; H319: Provoca irritação ocular grave.	<b>Olhos:</b> Óculos de proteção; <b>Pele:</b> Luvas de borracha butílica ou cloropreno; <b>Corpo:</b> Vestuário de proteção antiestático retardador de chama; <b>Respiratória:</b> Filtro A, para vapores de compostos orgânicos; <b>Ambiente:</b> Não deixar que o produto entre nos esgotos. Risco de explosão.	[71]

<p><b>Ácido Fosfórico</b></p>	<p>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></p>		<p>H290: Pode ser corrosivo para os metais; H314: Provoca queimaduras graves à pele e lesões oculares graves.</p>	<p><b>Olhos:</b> Óculos de proteção; <b>Pele:</b> Luvas de Látex natural; <b>Corpo:</b> Equipamento de proteção conveniente; <b>Respiratória:</b> No caso de formação de vapores (filtro tipo P2); <b>Ambiente:</b> Manusear de acordo com as regulamentações ambientais locais e com as boas práticas industriais.</p>	<p>[72]</p>
<p><b>Hidróxido de Sódio</b></p>	<p>NaOH</p>		<p>H290: Pode ser corrosivo para os metais. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.</p>	<p><b>Proteção dos olhos/face:</b> Utilizar óculos de proteção com proteção lateral. Proteção facial; <b>Proteção da pele:</b> Luvas de borracha de nitrilo; <b>Proteção respiratória:</b> no caso de formação de poeiras, filtro recomendado: P1; <b>Controlo da exposição ambiental:</b> Manter afastado dos esgotos, águas superficiais e subterrâneas.</p>	<p>[73]</p>
<p><b>Ftalato de Potássio</b></p>	<p>C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub></p>	<p>Não é exigido nenhum pictograma de perigo</p>	<p>Nenhuma declaração de perigo</p>	<p><b>Proteção dos olhos/face:</b> Utilizar óculos de proteção; <b>Proteção da pele:</b> Luvas de borracha nitrílica; <b>Proteção respiratória:</b> no caso de formação de poeiras, filtro recomendado: P1; <b>Controlo da exposição ambiental:</b> Não deixar o produto entrar nos esgotos.</p>	<p>[74]</p>

<p><b>Ácido Clorídrico</b></p>	<p>Clorídrico HCl</p>		<p>H290: Pode ser corrosivo para os metais. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias.</p>	<p><b>Proteção respiratória:</b> No caso de uma formação de vapores utilizar um aparelho respiratório com um filtro apropriado; <b>Proteção das mãos:</b> Luvas de Cloropreno; <b>Proteção dos olhos:</b> Óculos de proteção; <b>Proteção do corpo e da pele:</b> Roupa de proteção à prova de ácidos; <b>Controle da exposição ambiental:</b> Manusear de acordo com as regulamentações ambientais locais e com as boas práticas industriais.</p>	<p>[75]</p>
<p><b>Ácido Cítrico</b></p>	<p>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub></p>		<p>H319: Provoca irritação ocular grave. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias.</p>	<p><b>Proteção ocular/ facial:</b> Óculos de Segurança; <b>Proteção para a pele:</b> Luvas de borracha nitrílica; <b>Proteção do corpo:</b> Vestuário de proteção; <b>Proteção respiratória:</b> No caso de formação de pós. Tipo de Filtro recomendado: P2; <b>Controle da exposição ambiental:</b> Não permitir a entrada do produto nos esgotos.</p>	<p>[76]</p>
<p><b>Citrato de Sódio</b></p>	<p>Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>•2H<sub>2</sub>O</p>	<p>Não é exigido nenhum pictograma de perigo</p>	<p>Nenhuma declaração de perigo</p>	<p><b>Medidas gerais de proteção e higiene:</b> Despir imediatamente a roupa contaminada e embebida. Lavar as mãos antes das</p>	<p>[77]</p>

				<p>pausas e no fim do trabalho;</p> <p><b>Proteção respiratória:</b> No caso de formação de pós (Filtro P1);</p> <p><b>Proteção das mãos:</b> Luvas de Borracha nitrílica (NBR);</p> <p><b>Proteção ocular/facial:</b> Óculos de proteção;</p> <p><b>Proteção da pele:</b> Vestuário de proteção no trabalho.</p>	
<b>Ceftizoxime Sodium</b>	$C_{13}H_{13}N_5O_5S_2$	Não é exigido nenhum pictograma de perigo	Nenhuma declaração de perigo	<p><b>Respiratória:</b> Respirador de poeiras. Respeitar os regulamentos locais e nacionais;</p> <p><b>Mãos:</b> Luvas de proteção;</p> <p><b>Olhos:</b> Óculos de proteção. Proteção facial, se a situação o exigir;</p> <p><b>Pele e corpo:</b> Vestuário de proteção. Botas de proteção, se a situação o exigir.</p>	[66]
<b>Cefotaxime Sodium</b>	$C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$		<p>Pode provocar sintomas de alergia, de asma ou dificuldades respiratórias em caso de inalação.</p> <p>Pode provocar reação alérgica cutânea.</p>	<p><b>Respiratória:</b> Respirador de pó. Respeitar os regulamentos locais e nacionais;</p> <p><b>Mãos:</b> Luvas de proteção;</p> <p><b>Olhos:</b> Óculos de proteção. Uma proteção facial, se a situação o exigir;</p> <p><b>Pele e corpo:</b> Vestuário de proteção. Botas de proteção, se a situação o exigir.</p>	[63]
<b>Cefuroxime Sodium</b>	$C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$	Não é exigido nenhum pictograma de perigo	Nenhuma declaração de perigo	<p><b>Respiratória:</b> Respirador de pó. Respeitar os regulamentos locais e nacionais;</p> <p><b>Mãos:</b> Luvas de proteção;</p> <p><b>Olhos:</b> Óculos de proteção. Uma proteção</p>	[61]

				facial, se a situação o exigir; <b>Pele e corpo:</b> Vestuário de proteção. Botas de proteção, se a situação o exigir.	
<b>Cefazolin Sódium</b>	$C_{14}H_{13}N_8NaO_4S_3$	Não é exigido nenhum pictograma de perigo	Nenhuma declaração de perigo	<b>Respiratória:</b> Respirador de pó. Respeitar os regulamentos locais e nacionais; <b>Mãos:</b> Luvas de proteção; <b>Olhos:</b> Óculos de proteção. Uma proteção facial, se a situação o exigir; <b>Pele e corpo:</b> Vestuário de proteção. Botas de proteção, se a situação o exigir.	[60]
<b>Cefoxitin Sódium</b>	$C_{16}H_{16}N_3NaO_7S_2$	Não é exigido nenhum pictograma de perigo	Nenhuma declaração de perigo	<b>Respiratória:</b> Respirador de pó. Respeitar os regulamentos locais e nacionais; <b>Mãos:</b> Luvas de proteção; <b>Olhos:</b> Óculos de proteção. Uma proteção facial, se a situação o exigir; <b>Pele e corpo:</b> Vestuário de proteção. Botas de proteção, se a situação o exigir.	[62]
<b>Ceftriaxone Sódium</b>	$C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$		Provoca irritação cutânea e irritação ocular grave. Pode provocar sintomas de alergia, de asma ou dificuldades respiratórias em caso de inalação. Pode provocar reação alérgica cutânea.	<b>Respiratória:</b> Respirador de pó. Respeitar os regulamentos locais e nacionais; <b>Mãos:</b> Luvas de proteção; <b>Olhos:</b> Óculos de proteção. Uma proteção facial, se a situação o exigir; <b>Pele e corpo:</b> Vestuário de proteção. Botas de proteção, se a situação o exigir.	[65]

<p><b>Cefepime for Injection, USP</b></p>	<p><b>Cefepime HCl</b>  <math>C_{19}H_{25}ClN_6O_5S_2 \cdot HCl \cdot H_2O</math>  <b>L-Arginine</b>  <math>C_6H_{14}N_4O_2</math></p>	<p>Não é exigido nenhum pictograma de perigo</p>	<p>Pode provocar irritação das vias respiratórias, dos olhos e da pele. Pode provocar reações alérgicas respiratórias e cutâneas.</p>	<p>Recomenda-se a utilização de óculos de segurança com proteções laterais ou óculos de proteção. A ventilação geral da sala é geralmente satisfatória. Se necessário, utilizar ventilação local por exaustão. Proteger pele com vestuário descartável se estiver previsto o contacto direto com a mesma. Luvas resistentes a produtos químicos.</p>	<p>[78]</p>
<p><b>Ceftazidime Pentahydrate</b></p>	<p><math>C_{22}H_{22}N_6O_7S_2 \cdot 5H_2O</math></p>		<p>Provoca irritação ocular. Pode provocar reação alérgica cutânea. Pode provocar sintomas de alergia, de asma ou dificuldades respiratórias se inalado.</p>	<p>Utilizar óculos de segurança com proteções laterais, óculos de proteção contra salpicos de produtos químicos ou uma proteção facial completa, se necessário. Usar luvas de nitrilo ou outras luvas impermeáveis se for possível o contacto com a pele. Usar bata de laboratório. Os respiradores não são geralmente necessários para as atividades laboratoriais. Usar vestuário de proteção térmica adequado, quando necessário.</p>	<p>[79]</p>



**ANEXO 8 – PROPORÇÕES 85:10:5, 87:8:5, 88:7:5, 87:7:6, 89:7:4, 89:6:5, 86:8:6, 86:9:5, 84:10:6, 85:9:6, 87,5:7,5:5, 83:10:7, 87:7,5:5,5 UTILIZANDO A COLUNA ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ M (2,1  $\times$  50MM)**

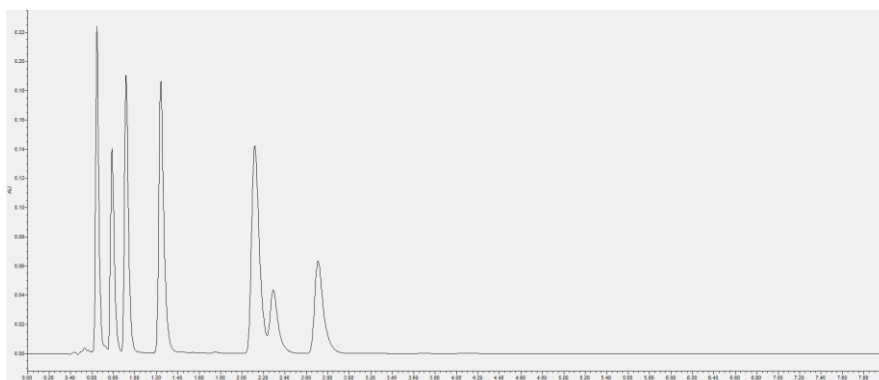


Figura 65 - Cromatograma 5ppm com proporção 85:10:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

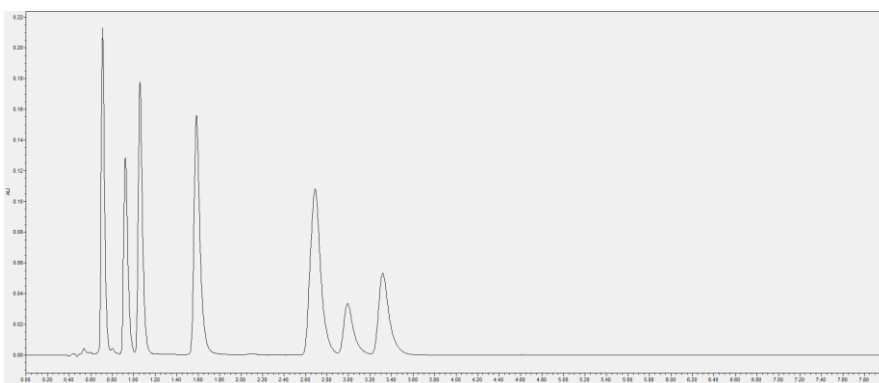


Figura 66 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:8:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

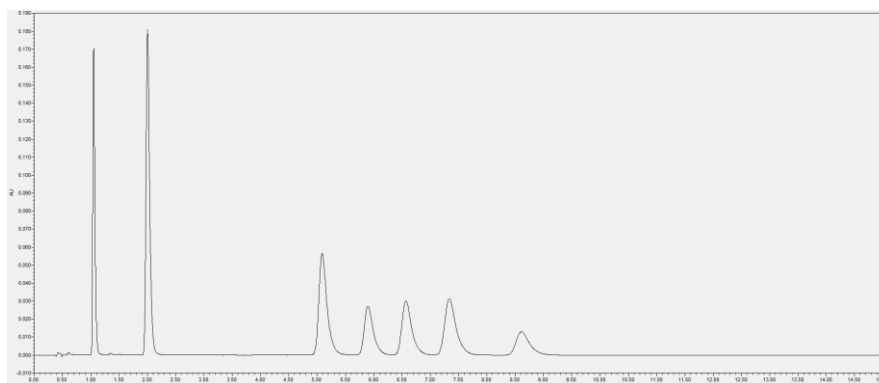


Figura 67 - Cromatograma 5ppm com proporção 88:7:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

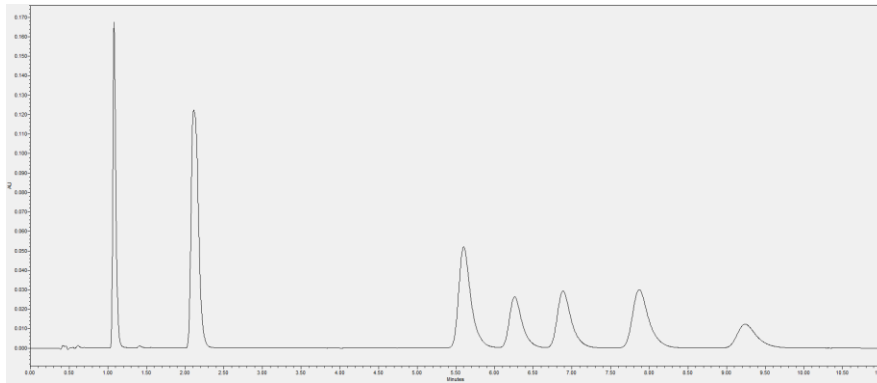


Figura 68 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:7:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1 x 50mm).

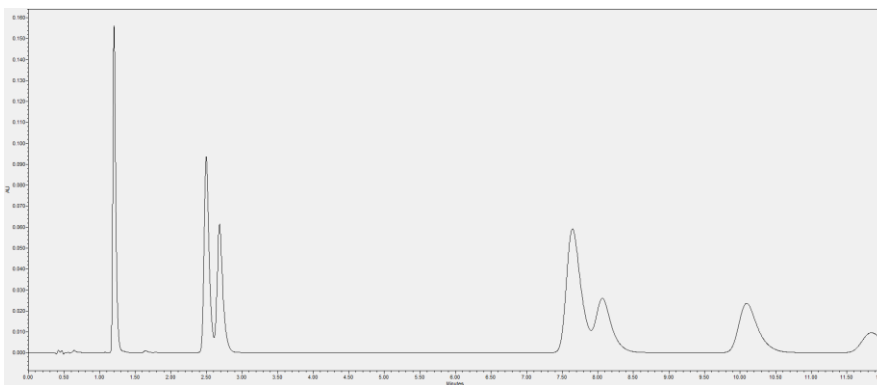


Figura 69 - Cromatograma 5ppm com proporção 89:7:4 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1 x 50mm).

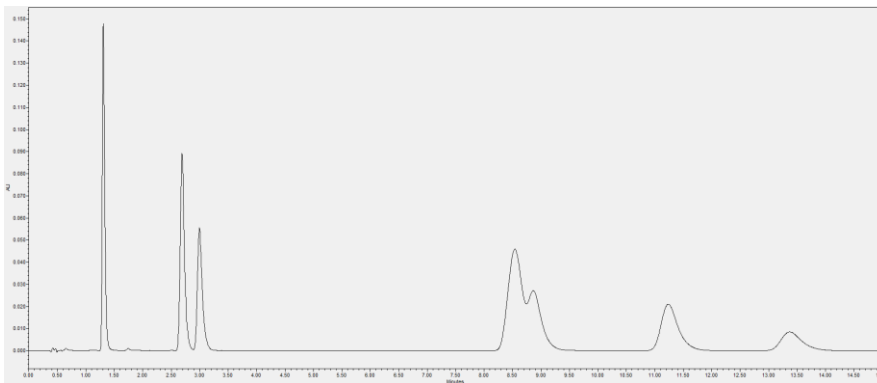


Figura 70 - Cromatograma 5ppm com proporção 89:6:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1 x 50mm).

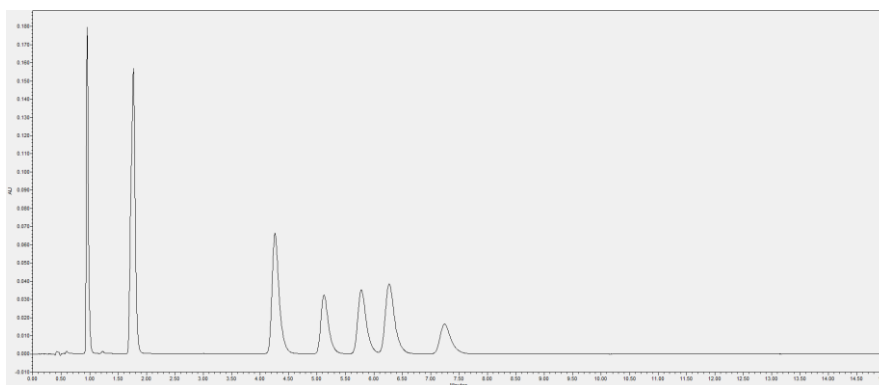


Figura 71 - Cromatograma 5ppm com proporção 86:8:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

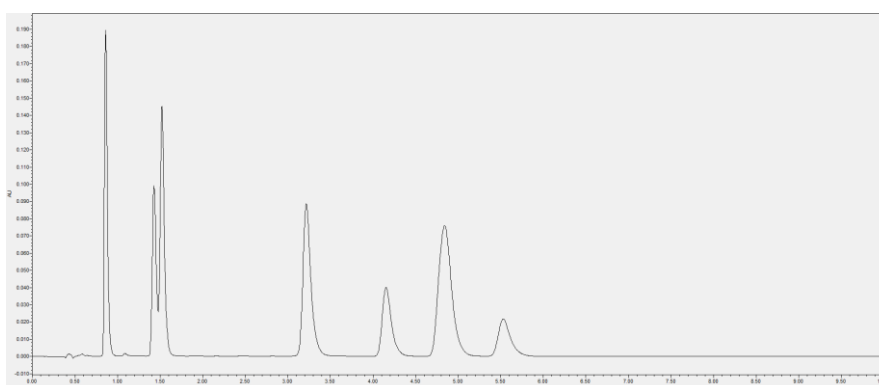


Figura 72 - Cromatograma 5ppm com proporção 86:9:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

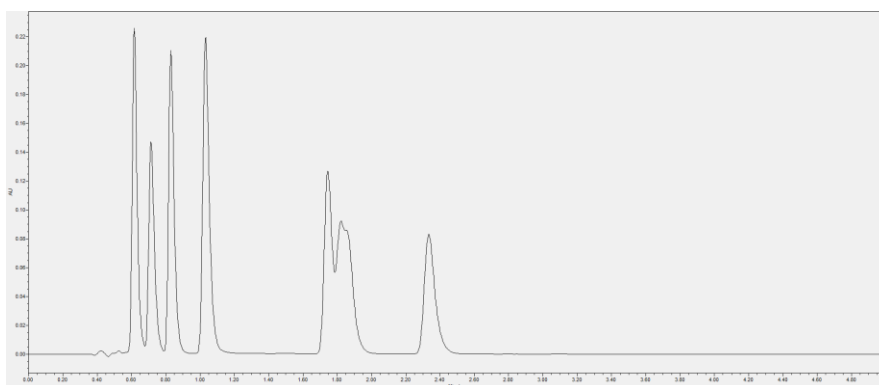


Figura 73 - Cromatograma 5ppm com proporção 84:10:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

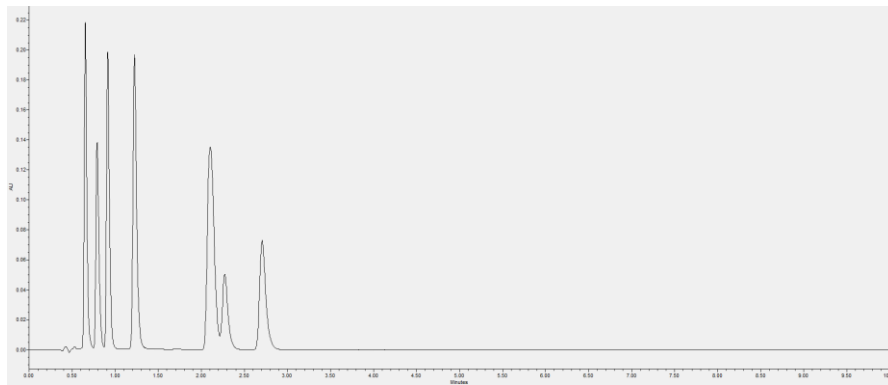


Figura 74 - Cromatograma 5ppm com proporção 85:9:6 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

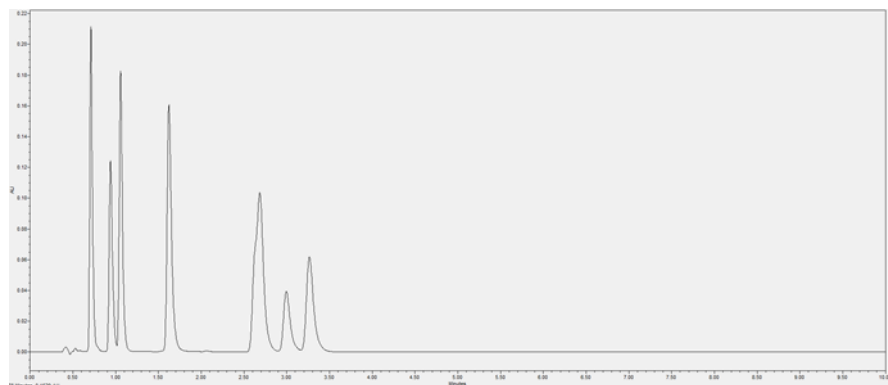


Figura 75 - Cromatograma 5ppm com proporção 87,5:7,5:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

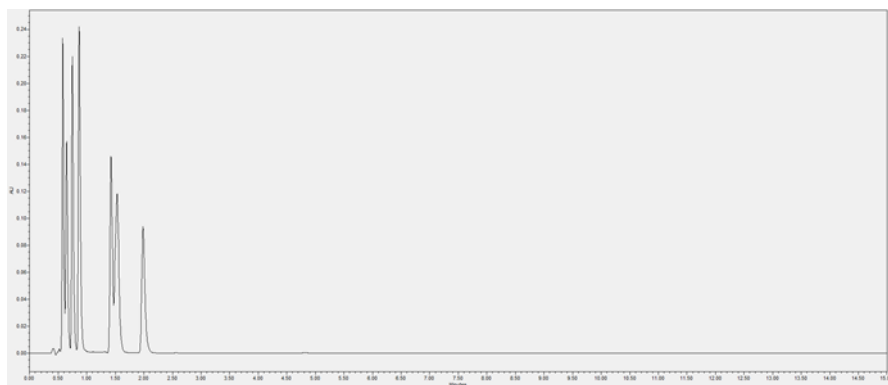


Figura 76 - Cromatograma 5ppm com proporção 83:10:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

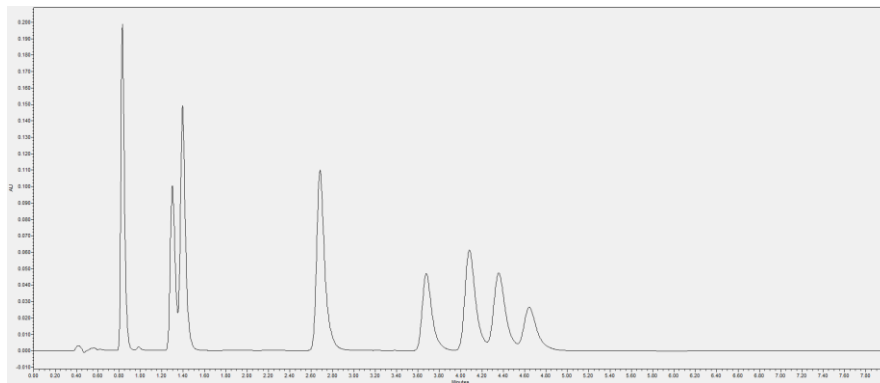


Figura 77 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:7,5:5,5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m (2,1  $\times$  50mm).

**ANEXO 9 – REPORTS DOS ESPETROS (200-400 NM), DAS SOLUÇÕES STD 5PPM DE CADA CEFALOSPORINA, COM COMPRIMENTO DE ONDA, CUJA ABSORÇÃO É MÁXIMA, REPRESENTADO**

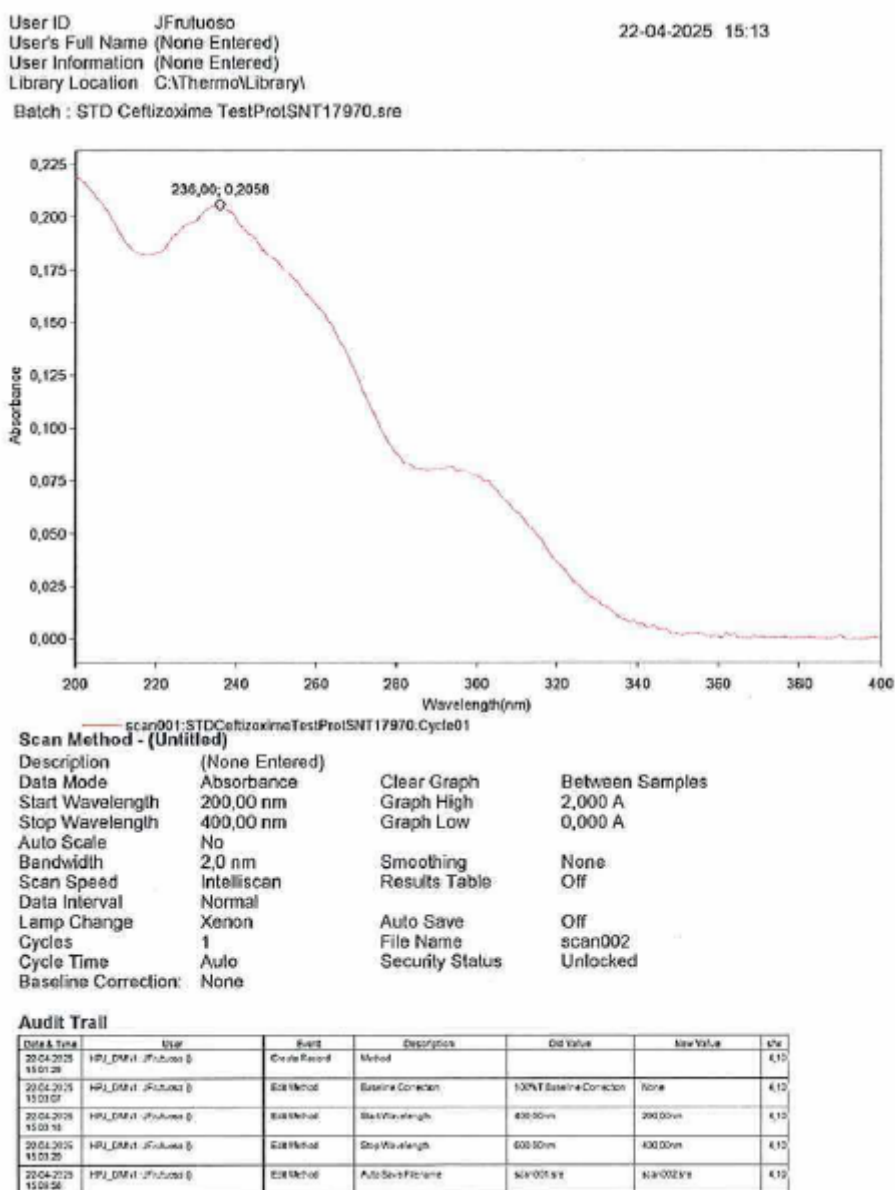
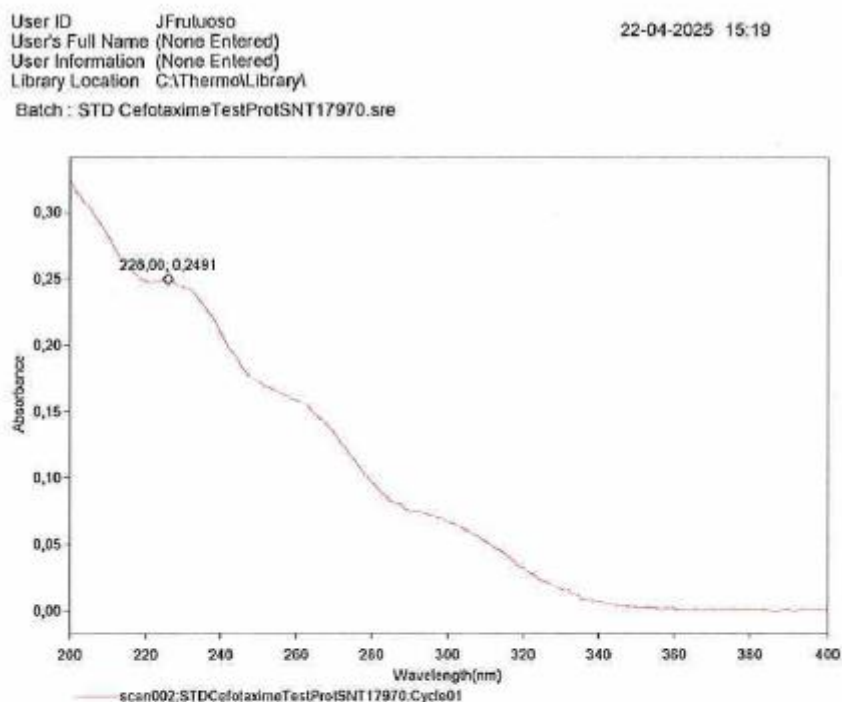


Figura 78 - Espectro STD 5ppm Cefprozime.



**Scan Method - (Untitled)**

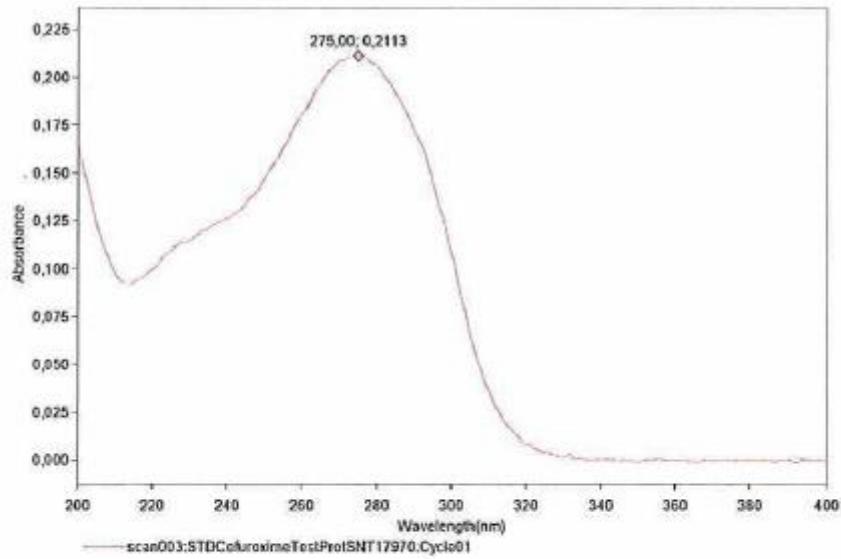
Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm	Smoothing	None
Auto Scale	No	Results Table	Off
Bandwidth	2,0 nm	Auto Save	Off
Scan Speed	Intelliscan	File Name	scan003
Data Interval	Normal	Security Status	Unlocked
Lamp Change	Xenon		
Cycles	1		
Cycle Time	Auto		
Baseline Correction	None		

**Audit Trail**

Date & Time	SW	Event	Description	Old Value	New Value	SW
20-04-2025 15:01:22	HP1_DNA1_JFruoso@	Create Record	Method			4.10
20-04-2025 15:03:07	HP1_DNA1_JFruoso@	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correction	None	4.10
20-04-2025 15:03:15	HP1_DNA1_JFruoso@	Edit Method	Start Wavelength	400,00nm	200,00nm	4.10
20-04-2025 15:03:25	HP1_DNA1_JFruoso@	Edit Method	Stop Wavelength	400,00nm	400,00nm	4.10
20-04-2025 15:05:28	HP1_DNA1_JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan001.sre	scan003.sre	4.10
20-04-2025 15:17:41	HP1_DNA1_JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan002.sre	scan003.sre	4.10

Figura 79 - Espectro STD 5ppm Cefotaxime.

User ID JFruoso 22-04-2025 15:24  
 User's Full Name (None Entered)  
 User Information (None Entered)  
 Library Location C:\Thermo\Library\  
 Batch : STD CefuroximeTestProtSNT17970.sre



**Scan Method - (Untitled)**

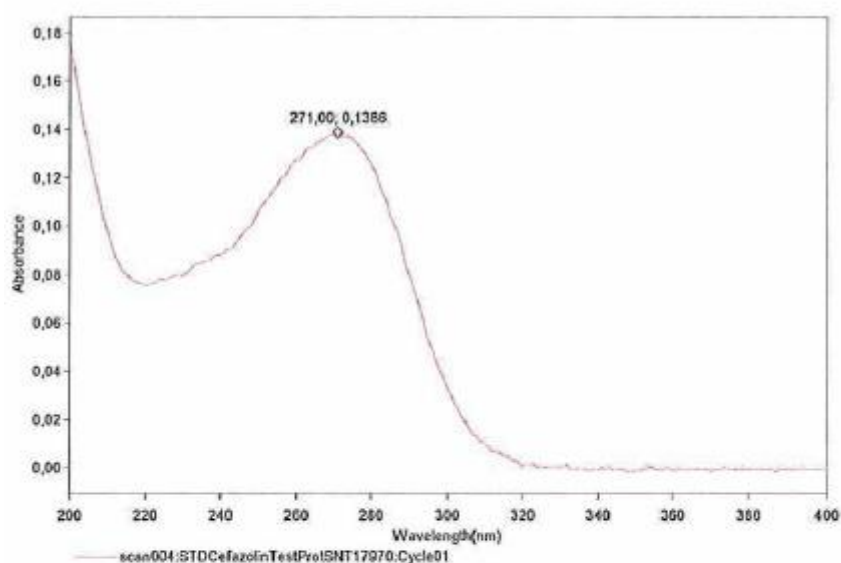
Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm	Smoothing	None
Auto Scale	No	Results Table	Off
Bandwidth	2,0 nm	Auto Save	Off
Scan Speed	Intelliscan	File Name	scan004
Data Interval	Normal	Security Status	Unlocked
Lamp Change	Xenon		
Cycles	1		
Cycle Time	Auto		
Baseline Correction	None		

**Audit Trail**

Date & Time	User	Event	Description	Old Value	New Value	Act.
22-04-2025 15:01:26	HPU_DSM11_JFruoso @	Create Recpt	Method			4,10
22-04-2025 15:03:07	HPU_DSM11_JFruoso @	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correction	None ^	4,10
22-04-2025 15:03:16	HPU_DSM11_JFruoso @	Edit Method	Start Wavelength	600,00nm	200,00nm	4,10
22-04-2025 15:03:20	HPU_DSM11_JFruoso @	Edit Method	Stop Wavelength	600,00nm	400,00nm	4,10
22-04-2025 15:09:56	HPU_DSM11_JFruoso @	Edit Method	Auto Save Filename	scan003.sre	scan004.sre	4,10
22-04-2025 15:11:42	HPU_DSM11_JFruoso @	Edit Method	Auto Save Filename	scan002.sre	scan003.sre	4,10
22-04-2025 15:21:11	HPU_DSM11_JFruoso @	Edit Method	Auto Save Filename	scan003.sre	scan004.sre	4,10

Figura 80 - Espectro STD 5ppm Cefuroxime.

User ID JFruoso  
 User's Full Name (None Entered)  
 User Information (None Entered)  
 Library Location C:\Thermo\Library\  
 Batch : STD CefazolinTestProtSNT17970.sre  
 22-04-2025 15:28



**Scan Method - (Untitled)**

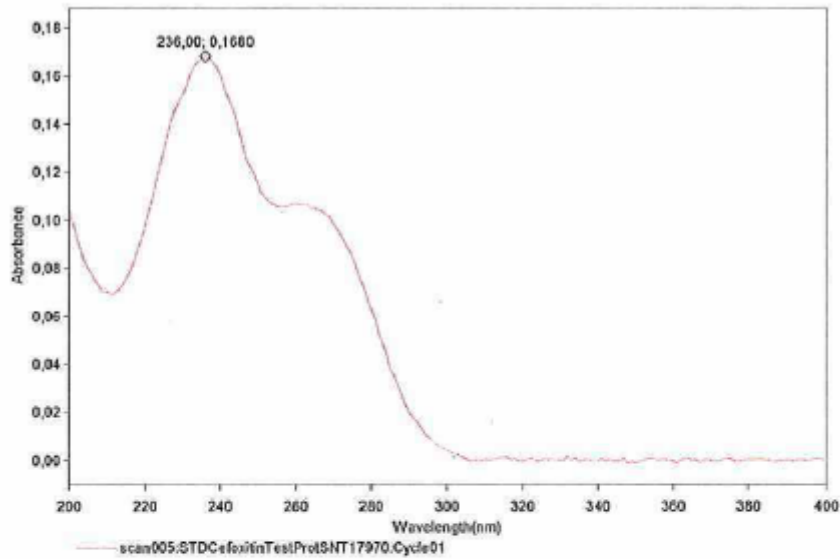
Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm	Smoothing	None
Auto Scale	No	Results Table	Off
Bandwidth	2,0 nm	Auto Save	Off
Scan Speed	Intelliscan	File Name	scan005
Data Interval	Normal	Security Status	Unlocked
Lamp Change	Xenon		
Cycles	1		
Cycle Time	Auto		
Baseline Correction	None		

**Audit Trail**

Date & Time	User	Event	Description	Old Value	New Value	Qty
22-04-2025 15:04:29	HPQ_DASU\JFruoso 0	Create Record	Method			4,10
22-04-2025 15:05:07	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correction	None	4,10
22-04-2025 15:05:15	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Start Wavelength	430,00nm	200,00nm	4,10
22-04-2025 15:05:23	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Stop Wavelength	600,00nm	400,00nm	4,10
22-04-2025 15:09:58	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Auto Save Filename	scan004.sre	scan005.sre	4,10
22-04-2025 15:17:40	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Auto Save Filename	scan003.sre	scan004.sre	4,10
22-04-2025 15:22:17	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Auto Save Filename	scan002.sre	scan003.sre	4,10
22-04-2025 15:27:53	HPQ_DASU\JFruoso 0	Edit Method	Auto Save Filename	scan001.sre	scan002.sre	4,10

Figura 81 - Espectro STD 5ppm Cefazolin.

User ID JFruoso  
 User's Full Name (None Entered)  
 User Information (None Entered)  
 Library Location C:\Thermo\Library\  
 Batch : STD CefoxitinTestProtSNT17970.sre



Scan Method - (Untitled)

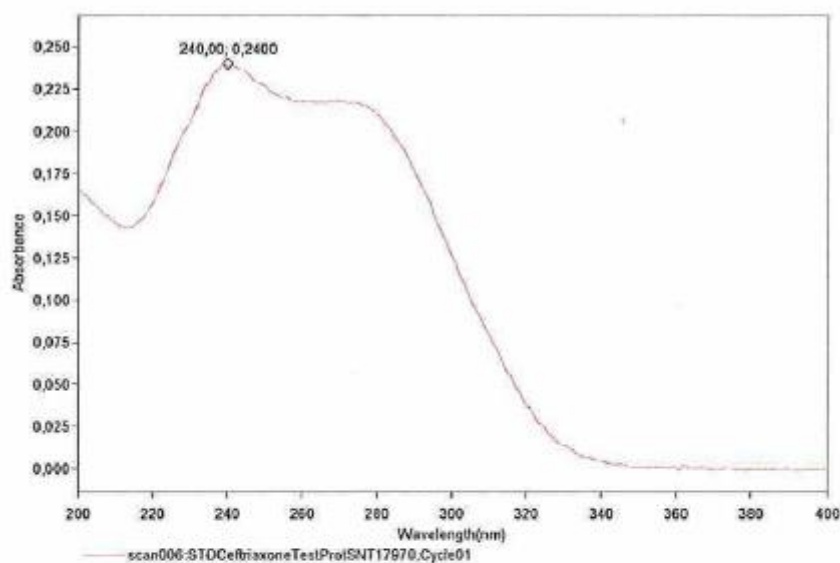
Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm	Smoothing	None
Auto Scale	No	Results Table	Off
Bandwidth	2,0 nm	Auto Save	Off
Scan Speed	Intelliscan	File Name	scan006
Data Interval	Normal	Security Status	Unlocked
Lamp Change	Xenon		
Cycles	1		
Cycle Time	Auto		
Baseline Correction:	None		

Audit Trail

Date & Time	User	Event	Description	Old Value	New Value	Site
22-04-2025 15:01:39	HFU_DMB@JFruoso@	Create Record	Method			412
22-04-2025 15:03:07	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correction	None	412
22-04-2025 15:03:18	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Start Wavelength	200,00nm	200,00nm	412
22-04-2025 15:03:29	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Stop Wavelength	200,00nm	400,00nm	412
22-04-2025 15:03:39	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan005.sre	scan002.sre	412
22-04-2025 15:11:42	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan002.sre	scan003.sre	412
22-04-2025 15:23:17	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan003.sre	scan004.sre	412
22-04-2025 15:27:58	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan004.sre	scan005.sre	412
22-04-2025 15:31:07	HFU_DMB@JFruoso@	Edit Method	Auto Save Filename	scan005.sre	scan006.sre	412

Figura 82 - Espetro STD 5ppm Cefoxitin.

User ID JFruoso  
 User's Full Name (None Entered)  
 User Information (None Entered)  
 Library Location C:\Thermo\Library\  
 Batch : STD Ceftriaxone TestProtSNT17970.sre



**Scan Method - (Untitled)**

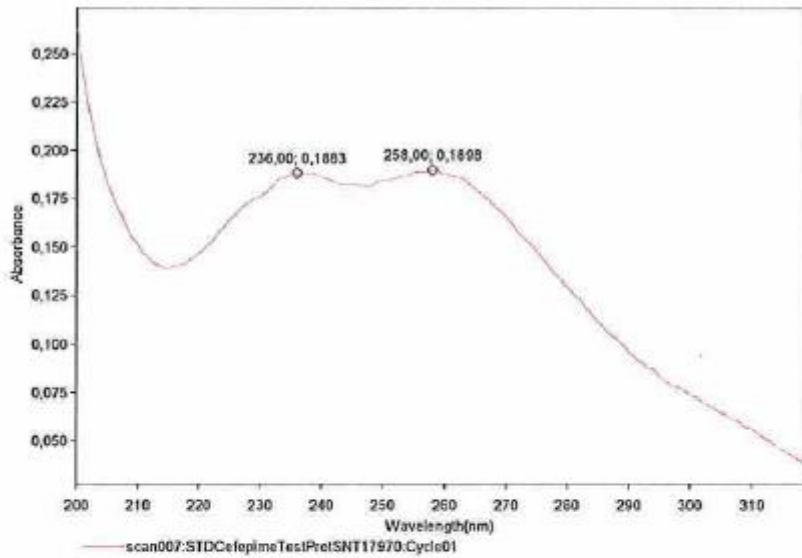
Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm		
Auto Scale	No		
Bandwidth	2,0 nm	Smoothing	None
Scan Speed	Intelliscan	Results Table	Off
Data Interval	Normal		
Lamp Change	Xenon	Auto Save	Off
Cycles	1	File Name	scan007
Cycle Time	Auto	Security Status	Unlocked
Baseline Correction:	None		

**Audit Trail**

Date & Time	User	Event	Description	Old Value	New Value	g/s
22-04-2025 15:01:26	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Create Record	Method			4,10
22-04-2025 15:03:07	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correction	None	4,10
22-04-2025 15:03:18	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Start Wavelength	400,00nm	200,00nm	4,10
22-04-2025 15:03:29	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Stop Wavelength	600,00nm	400,00nm	4,10
22-04-2025 15:09:36	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan001.sre	scan002.sre	4,10
22-04-2025 15:11:42	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan002.sre	scan003.sre	4,10
22-04-2025 15:23:17	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan003.sre	scan004.sre	4,10
22-04-2025 15:23:55	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan004.sre	scan005.sre	4,10
22-04-2025 15:31:47	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan005.sre	scan006.sre	4,10
22-04-2025 15:39:28	HFJ_DBN(J.Fruoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan006.sre	scan007.sre	4,10

Figura 83 - Espectro STD 5ppm Ceftriaxone.

User ID JFrutoso  
 User's Full Name (None Entered)  
 User Information (None Entered)  
 Library Location C:\Thermo\Library\  
 Batch : STD CefepimeTestProtSNT17970.sre



**Scan Method - (Untitled)**

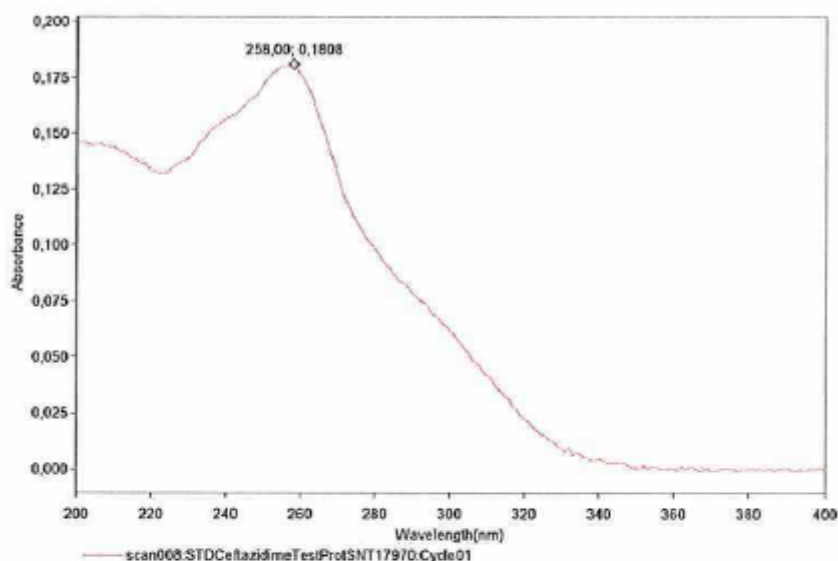
Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm		
Auto Scale	No		
Bandwidth	2,0 nm	Smoothing	None
Scan Speed	Intelligscan	Results Table	Off
Data Interval	Normal		
Lamp Change	Xenon	Auto Save	Off
Cycles	1	File Name	scan008
Cycle Time	Auto	Security Status	Unlocked
Baseline Correction:	None		

**Audit Trail**

Event Time	User	Event	Description	Old Value	New Value	Ver.
22-04-2025 15:41:29	HPZ_DMV (JFrutoso)	Create Record	Method			4,10
22-04-2025 15:55:47	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correction	None	4,10
22-04-2025 15:55:16	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Start Wavelength	400,00nm	200,00nm	4,10
22-04-2025 15:55:20	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Stop Wavelength	600,00nm	400,00nm	4,10
22-04-2025 15:55:55	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10
22-04-2025 15:17:42	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10
22-04-2025 15:25:17	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10
22-04-2025 15:29:53	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10
22-04-2025 15:31:47	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10
22-04-2025 15:35:28	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10
22-04-2025 15:42:22	HPZ_DMV (JFrutoso)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	4,10

Figura 84 - Espectro STD 5ppm Cefepime.

User ID JFruoso 22-04-2025 15:47  
 User's Full Name (None Entered)  
 User Information (None Entered)  
 Library Location C:\ThermoLibrary\  
 Batch : STD CeftezidimeTestProtSNT17970.sre



**Scan Method - (Untitled)**

Description	(None Entered)	Clear Graph	Between Samples
Data Mode	Absorbance	Graph High	2,000 A
Start Wavelength	200,00 nm	Graph Low	0,000 A
Stop Wavelength	400,00 nm	Smoothing	None
Auto Scale	No	Results Table	Off
Bandwidth	2,0 nm	Auto Save	Off
Scan Speed	Intelligscan	File Name	scan009
Data Interval	Normal	Security Status	Unlocked
Lamp Change	Xenon		
Cycles	1		
Cycle Time	Auto		
Baseline Correction:	None		

**Audit Trail**

Date & Time	User	Event	Description	OldValue	NewValue	Lot
22-04-2025 15:01:29	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Create Record	Method			410
22-04-2025 15:03:07	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Baseline Correction	100% Baseline Correct	None	410
22-04-2025 15:03:18	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Start Wavelength	400.00nm	200.00nm	410
22-04-2025 15:03:20	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Stop Wavelength	600.00nm	400.00nm	410
22-04-2025 15:09:54	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan001.sre	scan001.sre	410
22-04-2025 15:17:42	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan002.sre	scan002.sre	410
22-04-2025 15:23:17	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan003.sre	scan003.sre	410
22-04-2025 15:27:53	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan004.sre	scan004.sre	410
22-04-2025 15:31:47	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan005.sre	scan005.sre	410
22-04-2025 15:34:28	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan006.sre	scan006.sre	410
22-04-2025 15:40:22	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan007.sre	scan007.sre	410
22-04-2025 15:43:43	JPJ_DMN1 (JFruoso @)	Edit Method	Auto Save Filename	scan008.sre	scan008.sre	410

Figura 85 - Espectro STD 5ppm Ceftezidime.

**ANEXO 10 – PROPORÇÕES 90:6:4, 89:6:5, 86:6:8, 85:6:9, 87:6:7, 88:5:7, 90:3:7, 91:2:7 E 93:0:7 UTILIZANDO A COLUNA ACQUITY UPLC BEH SHIELD RP18 1,7 µM (2,1×50 MM)**

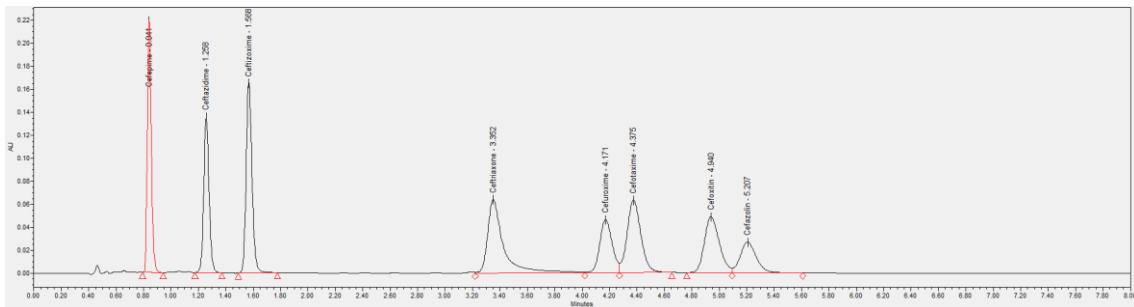


Figura 86 - Cromatograma 5ppm com proporção 90:6:4 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm),

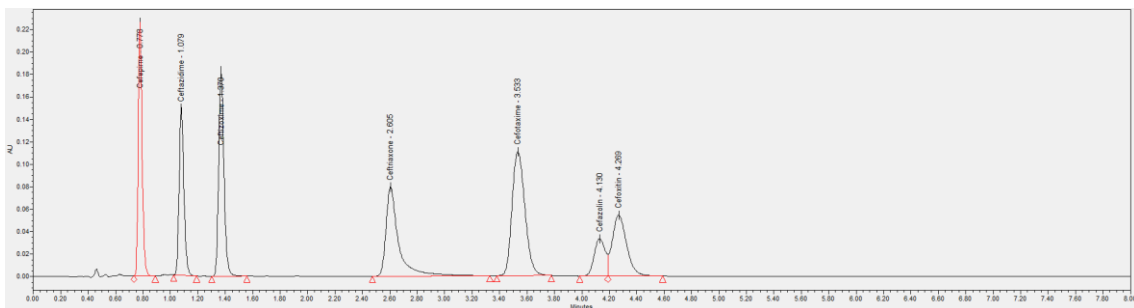


Figura 87 - Cromatograma 5ppm com proporção 89:6:5 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm).

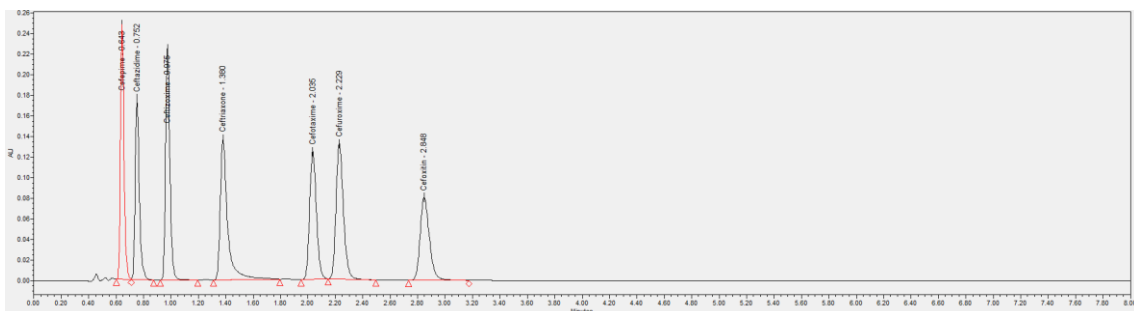


Figura 88 - Cromatograma 5ppm com proporção 86:6:8 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1×50 mm).

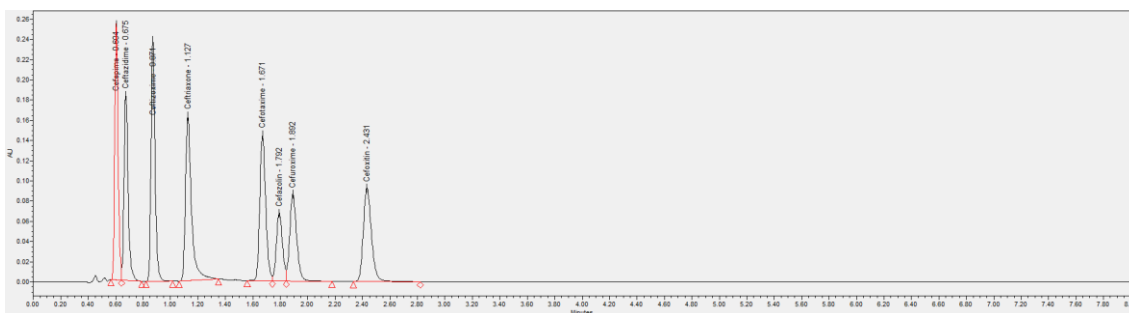


Figura 89 - Cromatograma 5ppm com proporção 85:6:9 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1x50 mm).

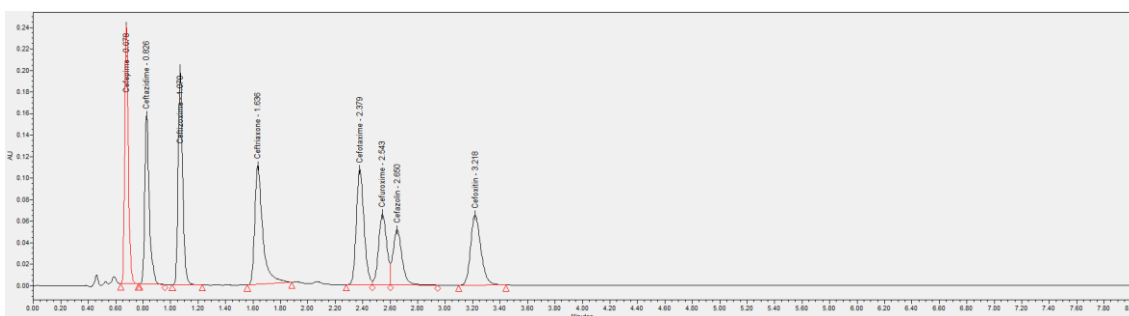


Figura 90 - Cromatograma 5ppm com proporção 87:6:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1x50 mm).

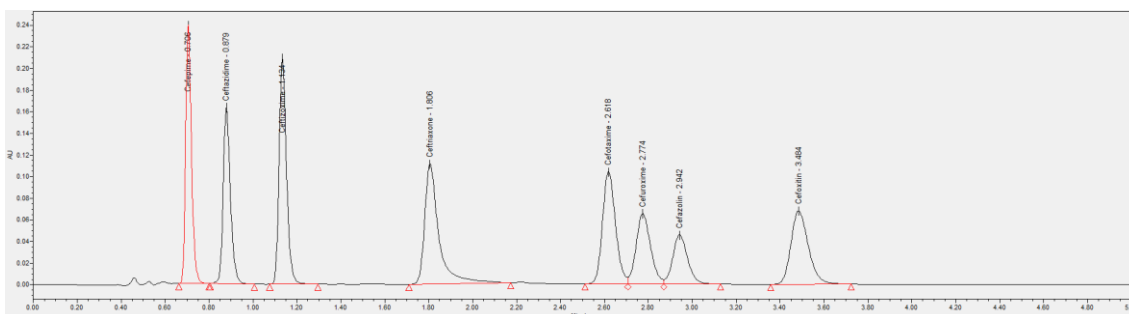


Figura 91 - Cromatograma 5ppm com proporção 88:5:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1x50 mm).

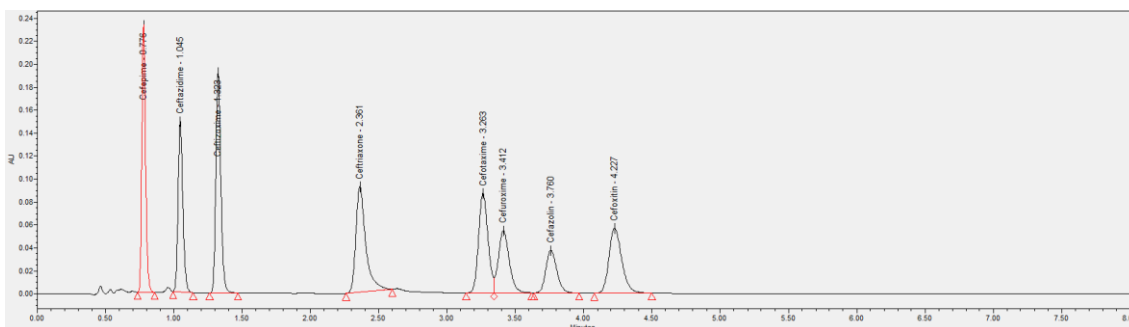


Figura 92 - Cromatograma 5ppm com proporção 90:3:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu$ m (2,1x50 mm).

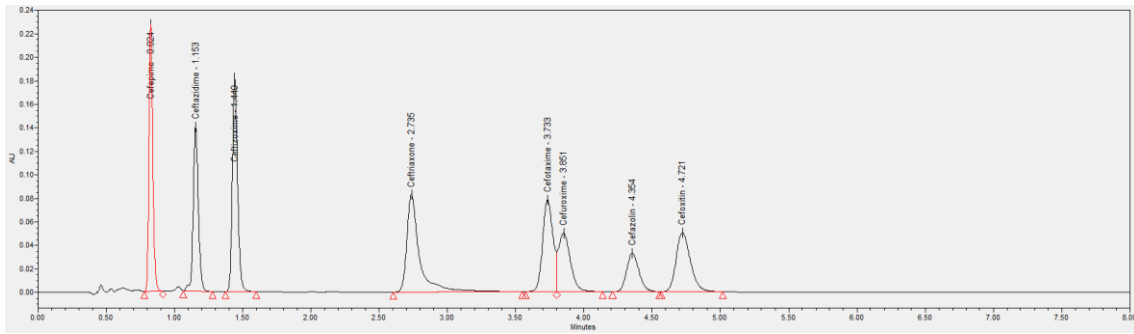


Figura 93 - Cromatograma 5ppm com proporção 91:2:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1x50 mm).

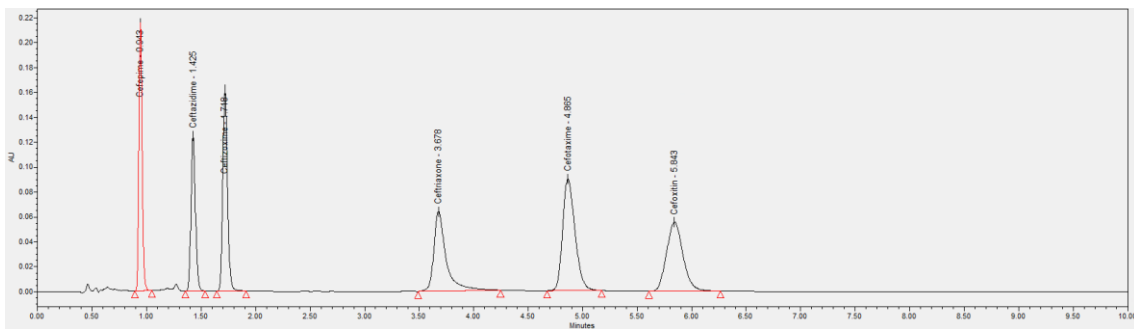


Figura 94 - Cromatograma 5ppm com proporção 93:0:7 (tampão fosfato 4,0, metanol, acetonitrilo) utilizando a coluna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1,7 µm (2,1x50 mm).

**ANEXO 11 – LINEARIDADE: RESULTADOS OBTIDOS**

Tabela 30 - Nível de linearidade 150%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado #	Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
150	Cefepime for injection	1	7,5	654999	654835	0,03
		2		654626		
		3		654880		
	Ceftazidime	1		539465	539287	0,03
		2		539115		
		3		539282		
	Ceftizoxime sodium	1		705965	705637	0,04
		2		705368		
		3		705579		
	Ceftriaxone sodium	1		706661	713647	0,85
		2		716658		
		3		717623		
	Cefotaxime sodium	1		656251	655899	0,06
		2		655482		
		3		655963		
	Cefuroxime sodium	1		455834	455776	0,16
		2		456489		
		3		455004		
	Cefazolin sodium	1		332095	332185	0,07
		2		332457		
		3		332003		
	Cefoxitin sodium	1		573966	573677	0,06
		2		573796		
		3		573268		

Para o Nível 150% de concentração, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, não foi superior a 0,85%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD ≤ 10,0%).

Tabela 31 - Nível de linearidade 120%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado #	Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
120	Cefepime for injection	1	6	519626	519408	0,11
		2		519835		
		3		518764		
	Ceftazidime	1		434816	434706	0,11
		2		435129		
		3		434173		
	Ceftizoxime sodium	1		564490	564239	0,12
		2		564757		
		3		563471		
	Ceftriaxone sodium	1		589634	589039	0,15
		2		589450		
		3		588032		
	Cefotaxime sodium	1		522652	522576	0,09
		2		523009		
		3		522068		
	Cefuroxime sodium	1		364684	363442	0,32
		2		363247		
		3		362394		
	Cefazolin sodium	1		264165	264415	0,11
		2		264748		
		3		264332		
	Cefoxitin sodium	1		457763	457253	0,17
		2		457614		
		3		456381		

Para o Nível 120% de concentração, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, não foi superior a 0,32%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD ≤ 10,0%).

Tabela 32 - Nível de linearidade 100%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
100	Cefepime for injection	1	5	440735	440373	0,17
		2		440860		
		3		439523		
	Ceftazidime	1		362915	362595	0,17
		2		362984		
		3		361886		
	Ceftizoxime sodium	1		473451	473026	0,17
		2		473510		
		3		472116		
	Ceftriaxone sodium	1		481614	502944	3,68
		2		514272		
		3		512947		
	Cefotaxime sodium	1		440693	447872	1,43
		2		453015		
		3		449907		
	Cefuroxime sodium	1		304087	310997	1,93
		2		313996		
		3		314909		
	Cefazolin sodium	1		221573	232408	4,04
		2		238229		
		3		237422		
	Cefoxitin sodium	1		383237	390549	1,63
		2		394828		
		3		393582		

Para o Nível 100% de concentração, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, não foi superior a 4,04%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD  $\leq$  10,0%).

Tabela 33 - Nível de linearidade 50%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado #	Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
50	Cefepime for injection	1	2,5	220461	220028	0,17
		2		219776		
		3		219847		
	Ceftazidime	1		180910	180830	0,18
		2		180474		
		3		181107		
	Ceftizoxime sodium	1		236397	235990	0,15
		2		235856		
		3		235716		
	Ceftriaxone sodium	1		227019	225711	0,51
		2		225247		
		3		224866		
	Cefotaxime sodium	1		219231	218700	0,28
		2		218026		
		3		218842		
	Cefuroxime sodium	1		152203	151800	0,47
		2		152227		
		3		150969		
	Cefazolin sodium	1		110193	110032	0,13
		2		109920		
		3		109983		
	Cefoxitin sodium	1		191010	190505	0,23
		2		190273		
		3		190231		

Para o Nível 50% de concentração, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, não foi superior a 0,51%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD ≤ 10,0%).

Tabela 34 - Nível de linearidade 10%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado #	Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
10	Cefepime for injection	1	0,5	44229	44234	0,11
		2		44285		
		3		44189		
	Ceftazidime	1		36203	36329	0,46
		2		36519		
		3		36266		
	Ceftizoxime sodium	1		47403	47270	0,52
		2		46987		
		3		47421		
	Ceftriaxone sodium	1		46274	45925	0,79
		2		45947		
		3		45553		
	Cefotaxime sodium	1		45625	45697	0,17
		2		45689		
		3		45778		
	Cefuroxime sodium	1		31925	31959	0,12
		2		31999		
		3		31953		
	Cefazolin sodium	1		23957	24176	0,79
		2		24271		
		3		24301		
	Cefoxitin sodium	1		39079	39188	0,25
		2		39224		
		3		39262		

Para o Nível 10% de concentração, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, não foi superior a 0,79%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD ≤ 10,0%).

Tabela 35 - Nível de linearidade 1,2%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado #	Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
1,2	Ceftriaxone sodium	1	0,06	4544	4404	2,80
		2		4354		
		3		4313		

Para o Nível 1,2% de concentração, correspondente ao LOQ para Ceftriaxone sodium, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção foi 2,80%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD ≤ 10,0%).

Tabela 36 - Nível de linearidade 0,3%.

Nível (%)	Cefalosporina	Replicado #	Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU* min)	Área média do pico (mAU* min)	% RSD
0,3	Cefepime for injection	1	0,015	1312	1316	1,50
		2		1337		
		3		1298		
	Ceftazidime	1		1015	1005	1,11
		2		993		
		3		1007		
	Ceftizoxime sodium	1		1510	1499	1,03
		2		1481		
		3		1505		
	Cefotaxime sodium	1		1432	1359	5,87
		2		1274		
		3		1372		
	Cefuroxime sodium	1		977	959	1,78
		2		958		
		3		943		
	Cefazolin sodium	1		707	723	6,04
		2		689		
		3		772		
	Cefoxitin sodium	1		1074	1095	1,92
		2		1116		
		3		1096		

Para o Nível 0,3% de concentração, a %RSD entre as três réplicas de cada injeção, para cada cefalosporina, não foi superior a 6,04%, cumprindo o critério de aceitação (%RSD ≤ 10,0%).

## ANEXO 12 – LINEARIDADE: ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR DA CONCENTRAÇÃO VS ÁREA MÉDIA DO PICO DE CADA CEFALOSPORINA

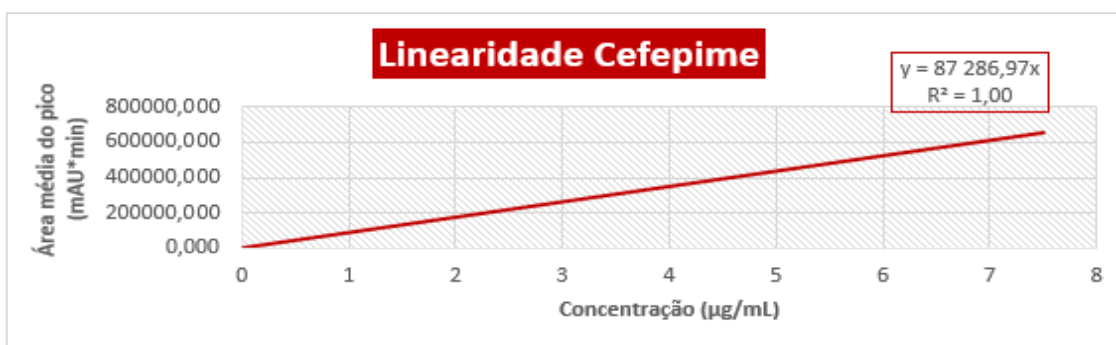


Figura 95 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefepime.

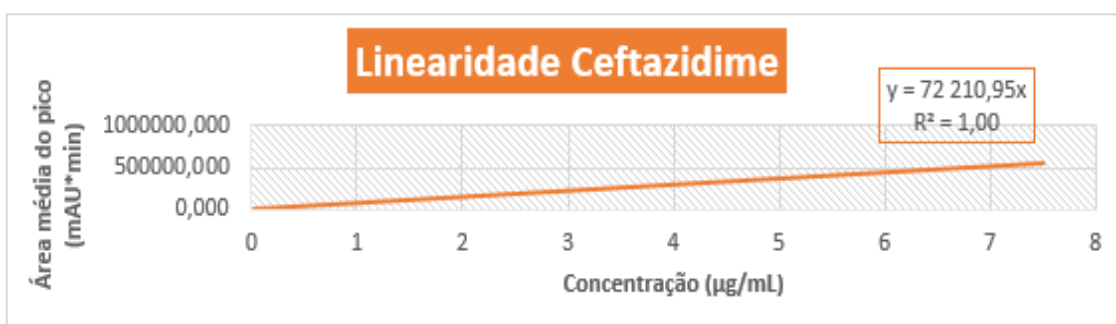


Figura 96 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Ceftazidime.

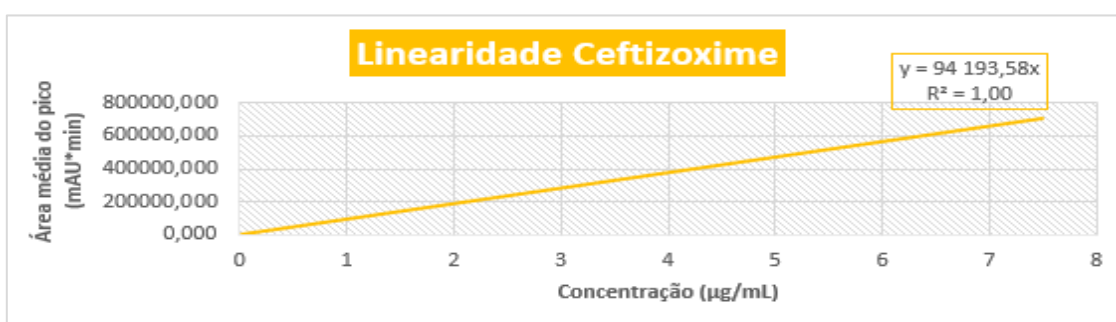


Figura 97 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Ceftizoxime.

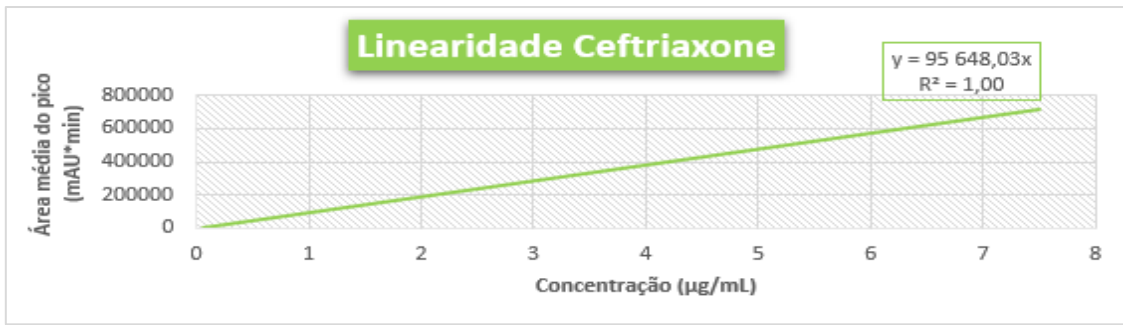


Figura 98 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Ceftriaxone.

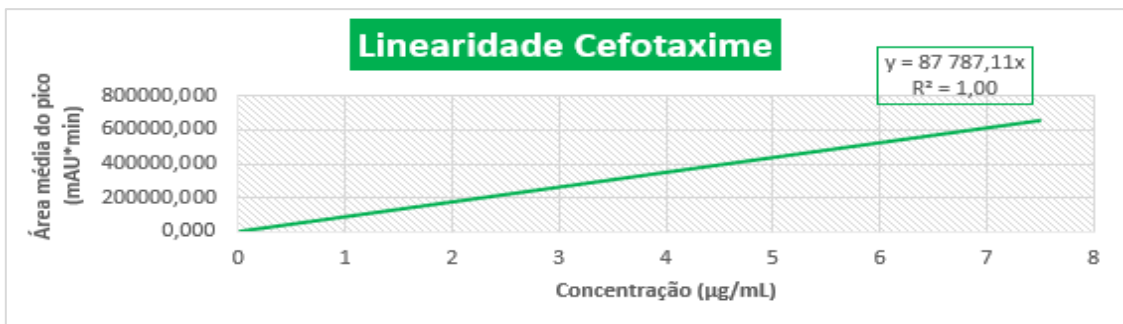


Figura 99 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefotaxime.

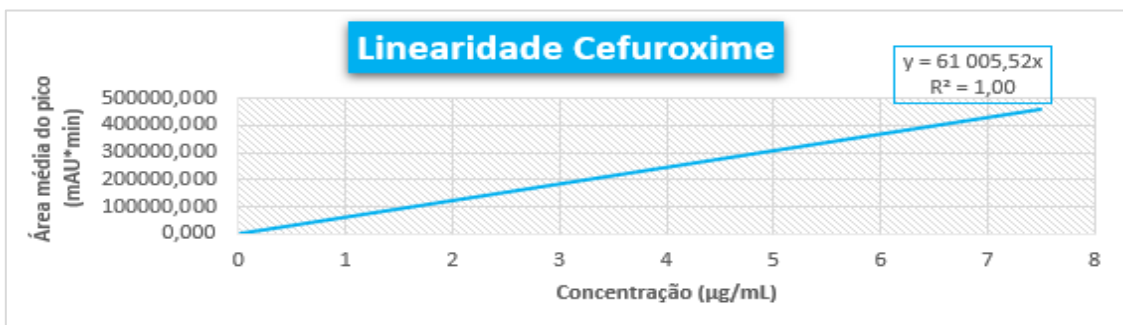


Figura 100 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefuroxime.

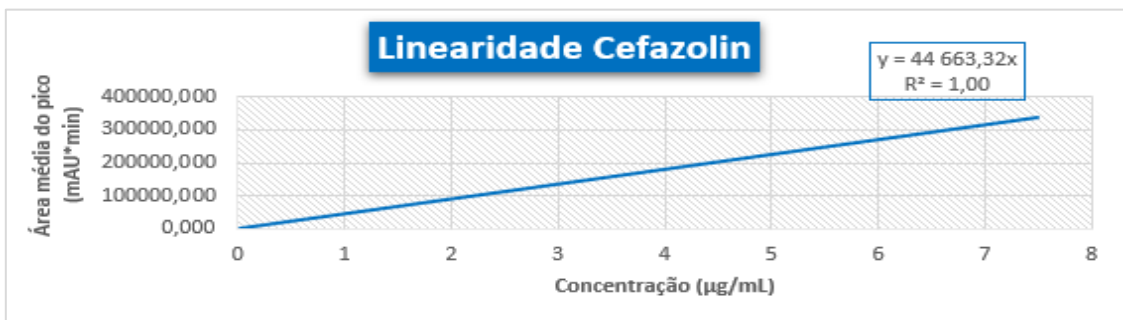


Figura 101 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefazolin.

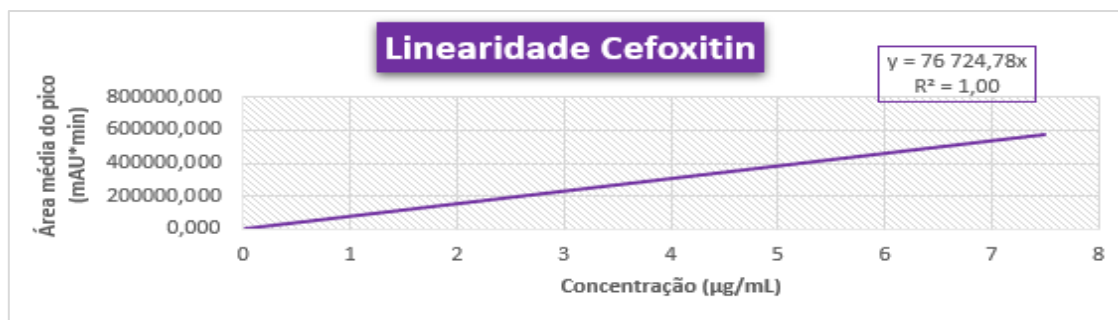


Figura 102 - Regressão linear da Concentração vs Área média do pico de Cefoxitin.

**ANEXO 13 – ESPECIFICIDADE: CROMATOGRAMAS DE SOLVENTE REFERENTES ÀS DIFERENTES AMOSTRAS INJETADAS (PADRÃO, SWAB CHALLENGE, PVC E INOX), DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA E DEGRADAÇÃO POR EXPOSIÇÃO À LUZ**

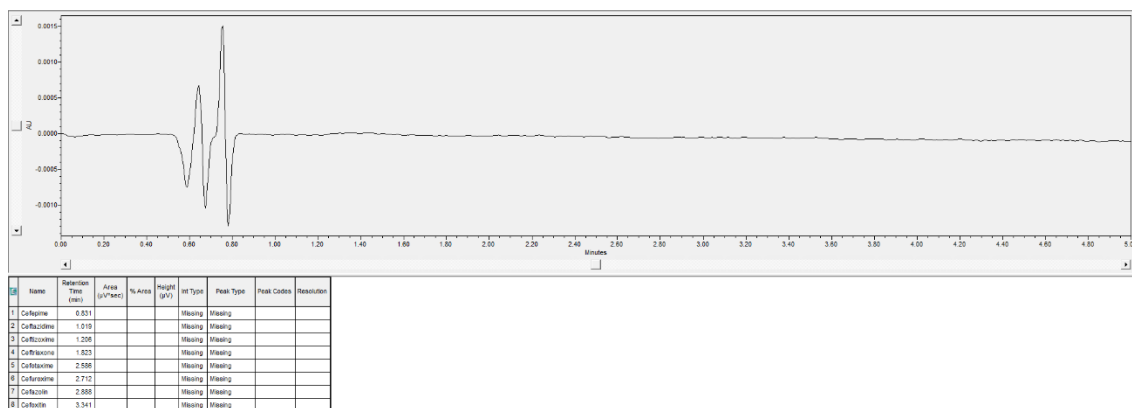


Figura 103 - Cromatograma integrado do solvente injetado diretamente.

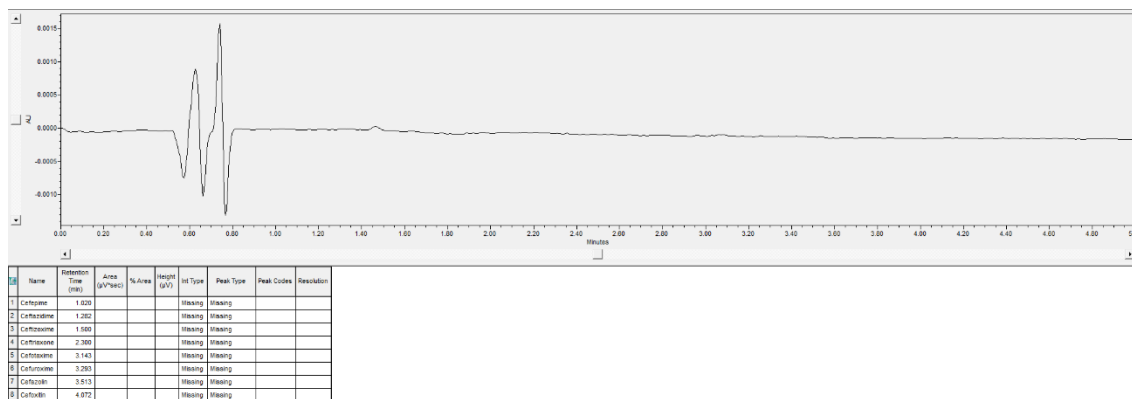


Figura 104 - Cromatograma integrado do solvente utilizado no Swab challenge.

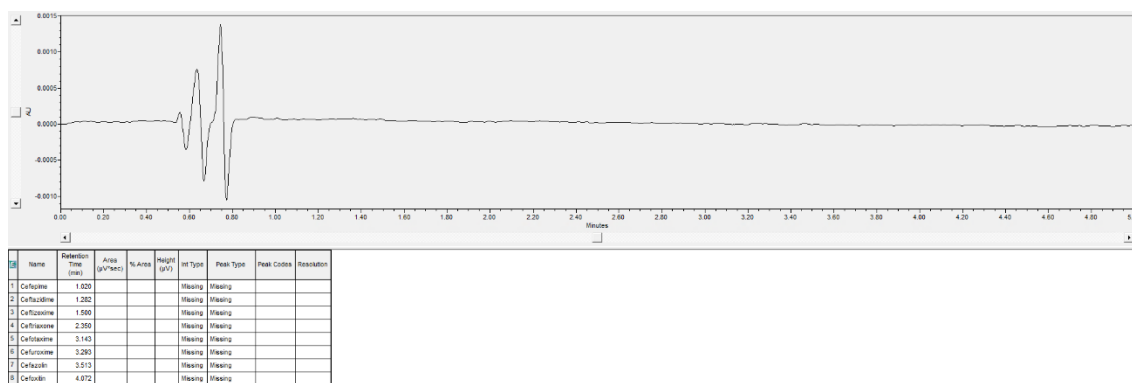


Figura 105 - Cromatograma integrado do solvente amostrado em placa de PVC.

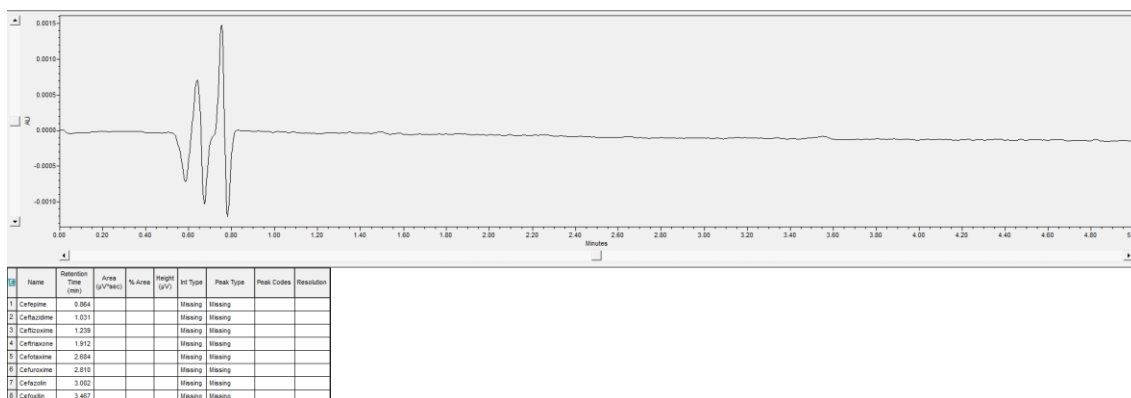


Figura 106 – Cromatograma integrado do solvente amostrado em placa de INOX.

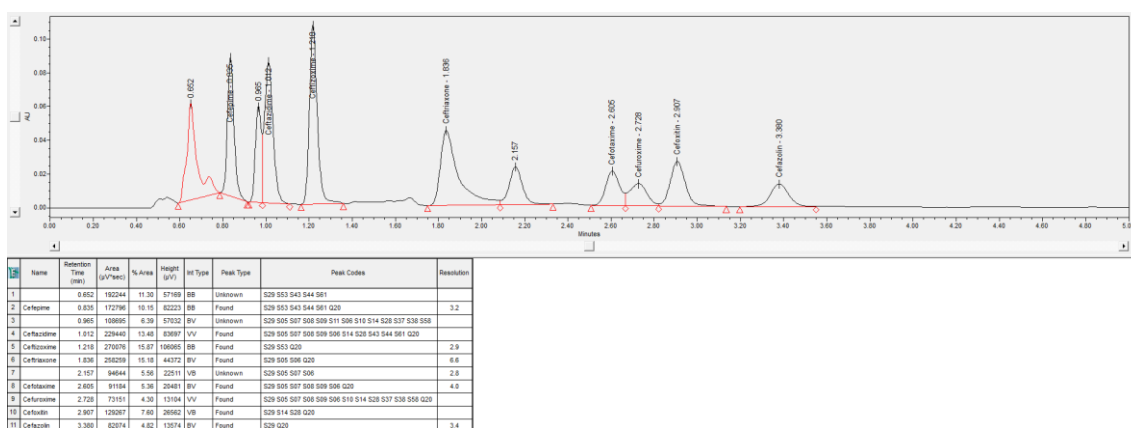


Figura 107 - Cromatograma Integrado da Decomposição Térmica do Nível de Linearidade 100%, em INOX.

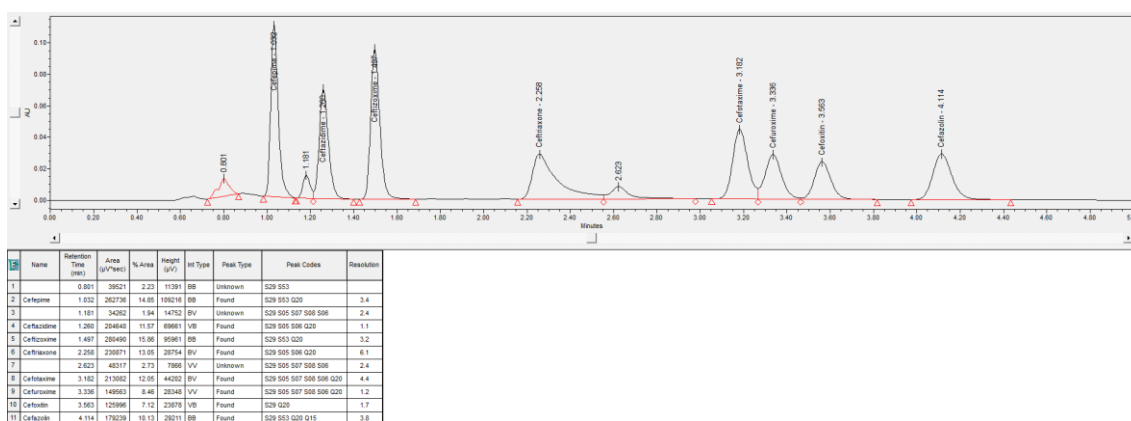


Figura 108 – Cromatograma Integrado da Degradação por Exposição à Luz do Nível de Linearidade 100%, em INOX.