

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO CEFALEXINA NA
FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULA**

ALESSANDRA VON AHN

Porto Alegre, Novembro/2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALESSANDRA VON AHN

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO CEFALEXINA NA
FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULA**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Química

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos
Orientador

Porto Alegre, Novembro/2019

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao professor Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos, para quem não há agradecimentos que cheguem. Sinto-me imensamente grata a ele por sua admirável dedicação, inestimável confiança, excelente e preciosa orientação. Sua permanente disponibilidade e conhecimento que proporciona sempre será uma fonte de motivação para mim. Obrigada por me apoiar incondicionalmente e acreditar em mim.

Meus respeitosos agradecimentos pela participação dos doutores da banca examinadora, por aceitarem o convite de participar da minha tese de doutorado, honrando-me com suas presenças.

Um agradecimento todo especial a Isabella que agüentou cada momento de ausência da mamãe na conclusão desta tese para ser finalmente apresentada. Filha, perdão pelos momentos de ausência exigidos para minha formação no doutorado. Agora a tese chegou ao fim. Prometo ser muito mais sua. Vamos poder dançar juntas, cantar juntas, ler juntas, brincar juntas, passear juntas e viver muito mais vezes juntas.

Ao meu marido Alexandre, pela tolerância e compreensão e ajuda constante nos cuidados com a nossa filha.

À Multilab, em especial aos meus colegas do setor EVA (estabilidade e validação analítica) pela oportunidade, apoio científico e condições para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria: minha família.

RESUMO

Diferentes condições de degradação foram testadas para avaliar o perfil de degradação da cefalexina. As amostras do insumo farmacêutico, produto acabado na forma farmacêutica cápsula e placebo foram expostas a condições de estresse que permitissem a geração de possíveis produtos de degradação tais como o estresse básico em hidróxido de sódio 0,04 M, oxidativo em peróxido de hidrogênio 0,3%, oxidativo em íons metálicos (FeCl_3 50 mM), térmico a 60°C, fotolítico (2,4 Klux.h e 400 W.h/m²) e estresse por umidade controlada a 30°C e 75% de umidade relativa. O estudo permitiu o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos, bem como fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação. Os resultados obtidos para as condições de degradação forçada evidenciaram que, em geral, a cefalexina é estável quando exposta à temperatura até 60°C, em contato com a luz ultravioleta ou visível na gama de comprimento de onda compreendida entre 300 e 800 nm e ambientes úmidos de até 75% de umidade relativa. Porém, em condições ácidas, básicas, oxidativas por peróxido de hidrogênio e íons metálicos, a cefalexina apresentou susceptibilidade demonstrada através da queda no teor e formação de produtos de degradação. Apesar de a cefalexina apresentar alta instabilidade quando em solução, nos estresses realizados em estado sólido (térmico, por umidade e fotolítico) o fármaco não apresentou queda de teor significativa (máximo de 2%). Os resultados obtidos para as condições de degradação forçada ácida, básica, oxidativa e íons evidenciam a necessidade de uma avaliação criteriosa durante os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração do produto, com destaque para a formação da impureza J que além das condições acima, também foi observada em condições de umidade, termólise e fotólise evidenciando a necessidade de avaliação no que diz respeito às condições de armazenamento e embalagem. O estudo de degradação forçada reitera os dados descritos na literatura e indica que se deve tomar cuidado com relação à hidrólise da matéria-prima e do produto acabado e em específico para o produto final também deve-se ter prudência à combinação de altas temperaturas e umidade.

ABSTRACT

Different degradation conditions were tested to evaluate the cephalexin degradation profile. Samples of the pharmaceutical ingredient (API), finished product in capsule form and placebo were exposed to stress conditions which allowed the generation of possible degradation products such as basic stress in 0.04 M sodium hydroxide, oxidative in hydrogen peroxide 0,3%, oxidative in metal ions (50 mM FeCl₃), thermal at 60 °C, photolytic (2.4 Klux.h 400 Wh / m²) and controlled humidity stress at 30 °C and 75% relative humidity. The study allowed the development of a method indicative of stability by ultra-efficient liquid chromatography coupled with diode array detector, as well as providing information about possible degradation routes. The results obtained for the condition forced degradation showed that cephalexin is generally stable when exposed to temperatures up to 60°C, in contact with ultraviolet light or visible in the 300 to 800 nm wavelength range and up to 75% relative humidity. However, under acidic, basic, hydrogen peroxide and metal ions oxidative conditions, cephalexin showed susceptibility demonstrated by the decrease in the content and formation of degradation products. Although cephalexin has high instability when in solution, in the stress performed in solid state (thermal, humidity and photolytic) the drug showed no significant drop (maximum 2%). The results obtained for the conditions of acid, basic, oxidative and ions forced degradation highlight the need for a careful evaluation during the studies of accelerated stability and long duration of the product, with emphasis on the formation of impurity J which, besides the above conditions, It was also observed under conditions of humidity, thermolysis and photolysis, evidencing the need for evaluation regarding storage and packaging conditions. The study of forced degradation reiterates the data described in the literature and indicates that caution should be taken regarding hydrolysis of the raw material (API) and finished product and specific to the final product. Caution should also be exercised when combining high temperatures and humidity.

1. Introdução

Durante o processo de fabricação e ao longo do período estipulado como prazo de validade, os medicamentos estão sujeitos a interações químicas que invariavelmente irão modificar a estrutura do fármaco nele contido ou dos demais componentes da formulação, o que, por sua vez, pode levar à formação de impurezas. A degradação dos fármacos poderá resultar em ineficácia terapêutica e até mesmo efeitos tóxicos. As impurezas oriundas da degradação, assim como qualquer outra impureza presente em um medicamento, devem ser amplamente investigadas com o intuito de garantir que não ultrapassem um nível que comprometa sua eficácia e segurança quanto à administração do mesmo. Conseqüentemente, o perfil de impurezas tornou-se essencial de acordo com vários requisitos regulamentares.

A condução de estudos de degradação forçada gera dados valiosos para segurança e avaliação da potência de um produto. No medicamento podem ocorrer alterações químicas que podem levar à redução da atividade terapêutica, bem como levar a efeitos indesejados, uma vez que há uma grande variedade estrutural nos compostos utilizados como fármacos, muitas espécies de reação de decomposição são possíveis. Recentemente, entre janeiro 2018 a outubro de 2019, desvios no cumprimento de limite máximo de impureza em medicamentos levaram ao recolhimento de cerca de 20% do total de medicamentos que sofreram notificação de não conformidade, de acordo com dados emitidos pela Food and Drug Administration (FDA)¹.

Para resolver problemas relacionados à degradação, é necessário investir em ferramentas que podem prever a formação inicial desses produtos e impurezas. No Brasil, como consequência, foi publicada a RDC 53 pela ANVISA, que fornece diretrizes para que sejam verificados adequadamente os produtos de degradação em medicamentos, que podem apresentar toxicidade relevante ou provocar ineficácia terapêutica e também fornecer informações com relação ao estudo do perfil de degradação forçada, cujos resultados serão utilizados para a determinação de Método Indicativo de Estabilidade (MIE). Assim, atualmente são exigidos tais estudos das indústrias farmacêuticas no momento do registro do produto.

O composto cefalexina é um antibiótico semissintético¹ que é resultado da junção entre os compostos fenilglicina e do ácido 7-aminodesacetoxicefalosporânico (7-ADCA) com amplo espectro de ação da classe dos β lactâmicos α amino substituídos derivado da classe das cefalosporinas² (Figura 1). A cefalexina faz parte da primeira geração de cefalosporínicos sendo muito utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório, das urinárias, e da pele e dos ossos³.

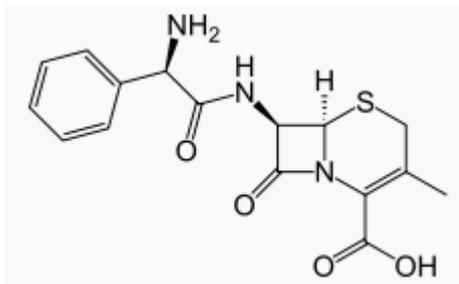
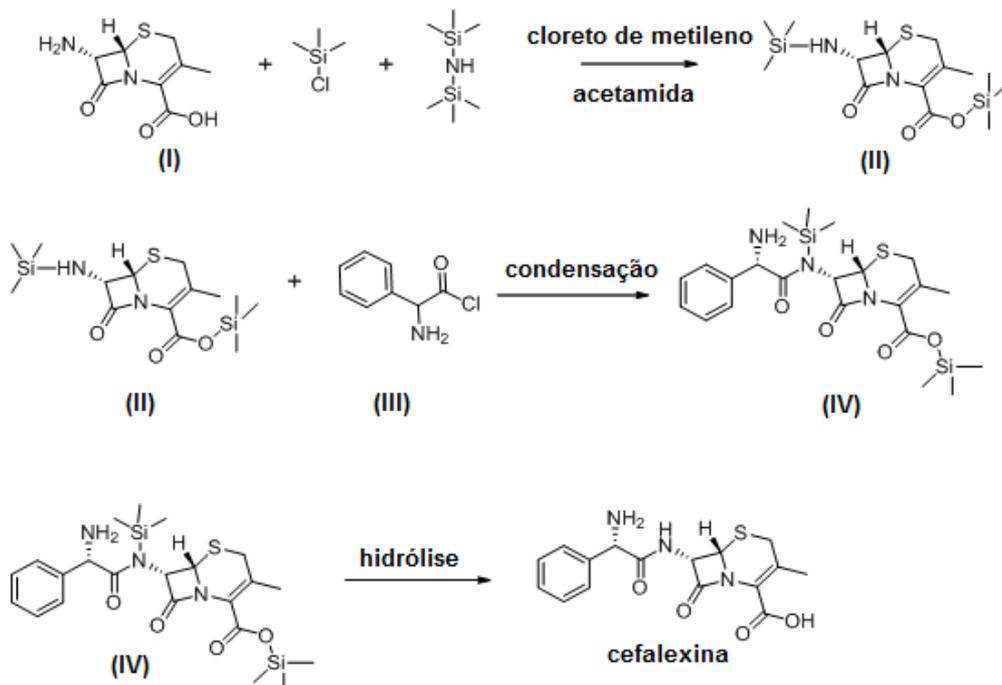


Figura 1. Estrutura da cefalexina.

A rota de síntese do fármaco em questão está baseada resumidamente em três etapas (Esquema 1). A primeira etapa consiste em uma reação para a proteção do ácido carboxílico presente na estrutura do 7-ADCA (I). A segunda etapa é a condensação entre a estrutura silanada do 7-ADCA (II) e um cloreto de acila (III). O último passo é a hidrólise para a eliminação dos grupos trimetilsilanóis. Esta última etapa é crítica para a substância em questão uma vez que o anel β -lactâmico é bastante sensível a reações de hidrólise, favorecendo a possibilidade de formação de impurezas nessa fase do processo.

¹Semissintéticos são compostos produzidos a partir de um composto natural e quimicamente alterados em laboratório, de acordo com a consulta pública nº 1/2013 – Registro de Medicamentos Sintéticos e Semissintéticos (ANVISA).



Esquema 1. Reação de obtenção da cefalexina extraído do DMF – *Drug Master File* (Arquivo Mestre da Droga)⁴.

Apesar da complexidade para a síntese da cefalexina, os compêndios oficiais apresentam método para substâncias relacionadas sem a inclusão de nenhuma impureza específica ou apenas no máximo uma e desta maneira os limites impostos são aplicados apenas aos compostos relacionados desconhecidos^{5,6,7}. Até o presente verificou-se não haver estudos publicados sobre o perfil de degradação da cefalexina na forma farmacêutica cápsula na literatura científica consultada. Assim surgiu o questionamento sobre a estabilidade, possíveis interações químicas e conseqüentemente formação de impurezas relacionadas que o fármaco cefalexina e forma farmacêutica cápsulas poderão apresentar ao longo do período estipulado como prazo de validade, nas condições recomendadas pelos órgãos fiscalizadores.

Frente às situações expostas, julgaram-se necessários a avaliação do perfil de degradação e do desenvolvimento e da validação da metodologia para análise desse fármaco e de sua forma farmacêutica, pois estudos de perfil de degradação realizados com a forma farmacêutica do fármaco em questão não constam na literatura pesquisada, tampouco em compêndios oficiais.

A presente tese encontra-se organizada da seguinte maneira: o capítulo de revisão bibliográfica, que se constitui em um estudo teórico de avaliação da segurança do fármaco cefalexina discutindo possíveis degradações e incompatibilidades. Após a apresentação dos objetivos, o capítulo da parte experimental descreve os materiais e procedimentos utilizados com o intuito de se obter o perfil de degradação nas amostras de matéria-prima e produto acabado, os testes realizados no estudo de degradação forçada e a validação da metodologia analítica empregada para a separação das impurezas.

Finalmente, o último capítulo relata as principais conclusões obtidas das impurezas formadas das rotas de degradação, perfil de degradação potencial cujos produtos de degradação podem estar presentes durante o estudo de estabilidade do produto.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Impurezas e perfil de degradação

De acordo com a definição presente no Guia nº 4/2015 da ANVISA⁸, impurezas são quaisquer componentes presentes no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s). Correspondem às substâncias químicas indesejáveis que permanecem nos insumos ativos, ou que são produzidas durante a formulação bem como mediante o envelhecimento do insumo e/ou formulação⁹.

As impurezas presentes no medicamento podem ser classificadas em impurezas inorgânicas, solventes residuais e impurezas orgânicas. A Figura 2 apresenta resumidamente os principais tipos de impurezas presentes em medicamentos, de acordo com USP (United States Pharmacopeia), ICH (International Conference Harmonization) e FDA (Food and Drug Administration)^{10, 11, 12}.

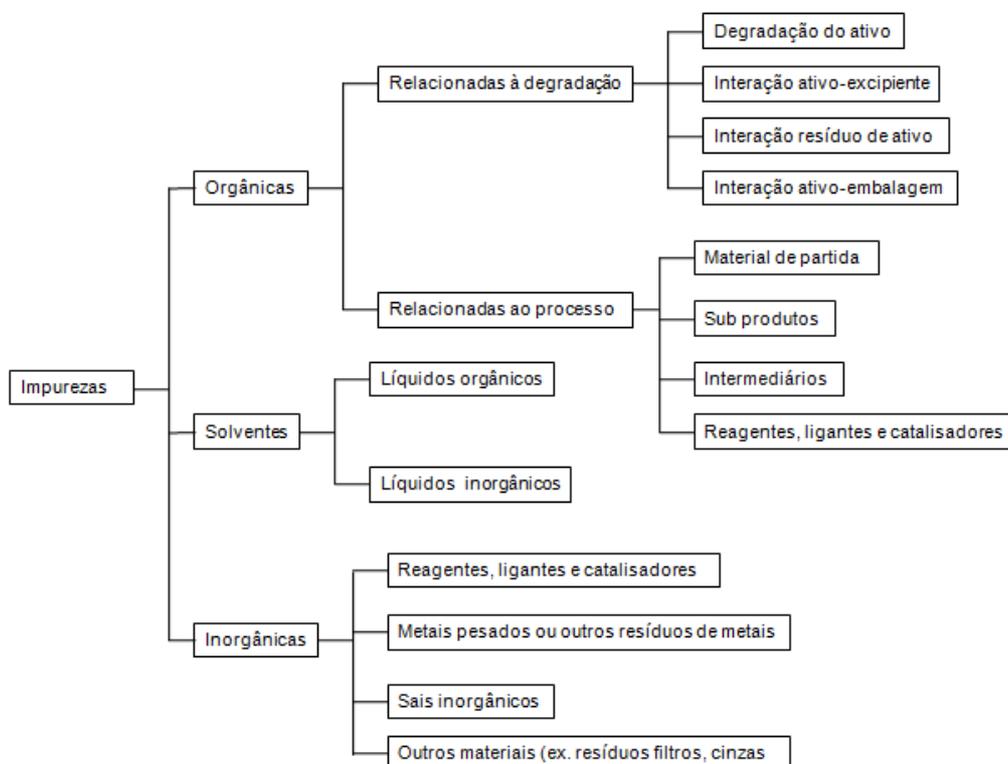


Figura 2. Principais grupos de impurezas presentes em medicamentos. Adaptado de [13].

O perfil de degradação é o conjunto de produtos de degradação observados no insumo farmacêutico ativo ou no medicamento quando exposto a determinada condição. Por “condição”, entende-se um conjunto de parâmetros, por exemplo, temperatura, pH, tempo, umidade. O perfil de degradação de interesse sanitário é aquele gerado pela condição a qual o medicamento é exposto em sua vida útil, que é simulada no estudo de estabilidade em longa duração. Portanto, o perfil de degradação de interesse sanitário é aquele obtido após a exposição do medicamento ou insumo farmacêutico ativo (IFA) à temperatura e umidade da estabilidade de longa duração, pelo tempo equivalente à sua vida útil. O perfil de degradação de interesse sanitário é definido como perfil de degradação “real”. O perfil de degradação do produto em estudo de estabilidade acelerado, apesar de ser primariamente preditivo, pode ser relevante em situações especiais, como nos casos de concessão de prazo de validade provisório⁸.

Com isso, pode-se afirmar que se faz necessário realizar estudos visando avaliar a degradação do ativo as quais poderiam antecipar o perfil de degradação que seria obtido ao fim da vida útil do medicamento. Além disso, é importante conhecer previamente o perfil de degradação do fármaco através de um estudo relacionado à estrutura do fármaco com o objetivo de identificar possíveis reações químicas em que a molécula possui maior susceptibilidade para gerar produtos de degradação.

2.2. Teste de degradação forçada

O teste de estresse ou degradação forçada é a principal ferramenta usada para prever e conhecer a estabilidade de um determinado fármaco e/ou medicamento. O objetivo do teste de estresse inclui investigar prováveis produtos de degradação que podem ser formados para que, ao longo do desenvolvimento da metodologia analítica, possam ser separados, detectados e quantificados¹⁴.

O estudo de degradação forçada deve ser realizado por meio da exposição do medicamento a agentes químicos e ou físicos (ou ambientes de estresse) capazes de promover uma degradação do IFA a partir de reações específicas de modo a prever possíveis reações que possam ocorrer com o medicamento durante o seu prazo de validade. Para isso, são utilizadas diversas condições com características reacionais distintas, para a determinação do perfil de degradação do medicamento

como, por exemplo, soluções com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH baixo, alto), agentes oxidantes, exposição à luz, exposição a elevadas temperaturas, catalisadores metálicos e exposição à umidade elevada¹⁵. A escolha destas condições e do agente degradante deve ser consistente com a degradação do produto sem que haja formação de produtos de degradação secundários, ou seja, aqueles gerados a partir de uma primeira degradação do IFA. De acordo com Blessy *et al.*¹⁶, a escolha do tipo de degradação vai depender da forma farmacêutica em estudo e do tipo de amostra (ativo ou produto acabado), não sendo obrigatória a realização de todas as condições descritas. Referências na literatura podem ser utilizadas como ponto de partida para definir os *endpoints* (tempo final para atingir a degradação desejada) para cada condição de estresse avaliada experimentalmente.

Os testes devem promover degradações superiores a 10% e inferiores àquelas que levariam à degradação completa das amostras, comprometendo o teste. Uma degradação superior a 20%, no entanto, pode levar a degradação dos próprios produtos de degradação, um caso de degradação não representativa daquilo que de fato ocorreria em condições normais de estabilidade longa duração¹⁷. A partir das informações obtidas no estudo de degradação forçada, as substâncias podem ser classificadas como oxidáveis, fotoinstáveis, hidrolisáveis, termolábeis muito ou levemente suscetíveis em uma ou mais condições¹⁸.

2.2.1. Degradação por hidrólise ácida e alcalina

A hidrólise é uma reação que envolve a clivagem de ligações químicas a partir da interação com moléculas de água. Essa água necessária para a reação pode estar presente na formulação, no próprio IFA quando na forma de hidrato, nos excipientes ou ser proveniente do ambiente em que se encontra a amostra. A hidrólise pode ser catalisada por ácidos ou por bases e é necessário que as moléculas possuam bons grupos abandonadores para favorecer sua ocorrência. Os grupos funcionais mais susceptíveis à hidrólise são: ésteres, lactonas, amidas e lactamas¹⁷.

De acordo com o Guia nº 04 da ANVISA, a degradação por hidrólise ácida deve ser feita utilizando-se uma solução tampão em pH abaixo de 7,0 ou um ácido mineral, como por exemplo HCl. Na hidrólise básica, pode ser utilizada uma solução tampão com pH acima de 7,0 ou um hidróxido de metal alcalino, como o NaOH.

No caso de fármacos que sofrem hidrólise em solução ácida, deve ser avaliado o impacto na administração do medicamento como a mudança de pH no trato gastro-intestinal. A hidrólise do fármaco na forma farmacêutica comprimidos pode ser evitada pela utilização de um revestimento adequado à base de derivados de celulose, polimetacrilatos ou álcool polivinílico¹⁹.

2.2.2. Degradação oxidativa

A oxidação é uma das principais causas de instabilidade de fármacos. Tal oxidação pode ocorrer pela remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. A maior parte das oxidações de fármacos são reações em cadeia que ocorrem sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação. Fármacos suscetíveis à oxidação devem ser estabilizados e esse processo envolve a tomada de várias precauções durante a manufatura e estocagem do mesmo. Recomenda-se a substituição do oxigênio em recipientes farmacêuticos por nitrogênio ou dióxido de carbono. Deve-se evitar ainda o contato da droga com íons de metais pesados, que catalisam oxidação. A estocagem desses IFAs deve ser a temperaturas reduzidas²⁰.

O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30%. Fármacos que sofrem degradação oxidativa podem ser protegidos pela utilização de antioxidantes, por exemplo, butilidroxianisol e ácido ascórbico. Em alguns casos deve-se substituir o ambiente dentro da embalagem por gás inerte e utilizar embalagens adequadas com baixa permeação de gases²¹.

2.2.3. Degradação térmica

O aumento da temperatura, por vezes, fornece energia suficiente para acelerar a decomposição química de fármacos. O aumento da temperatura antecipa degradações que poderiam ocorrer após um longo tempo de armazenamento a fim de verificar se o produto manterá suas características durante o tempo de armazenamento da vigência do prazo de validade. Recomenda-se utilizar uma temperatura maior do que a utilizada no estudo de estabilidade acelerada (40°C) para realização desse tipo de estudo de degradação forçada. Os medicamentos

devem ser submetidos a essa condição sem elevação da umidade. As principais reações catalisadas por essa condição de estresse são reações de hidrólise/desidratação, isomerização/epimerização, decarboxilação, polimerização e rearranjos²⁰.

Devem ser criteriosamente selecionados os cuidados de armazenamento para fármacos que são susceptíveis a temperaturas elevadas e o processo de fabricação do medicamento não deve incluir aquecimento.

2.2.4. Degradação fotolítica

A luz UV e visível são as fontes de radiação eletromagnéticas mais energéticas às quais os fármacos são tipicamente expostos. Os estudos de degradação fotolítica representam um mecanismo relevante de verificação da estabilidade de fármacos, pois a radiação luminosa é muito energética e pode catalisar inúmeras reações químicas. Nessa condição, as amostras devem ser expostas variando a quantidade de lux hora e/ou watt hora por metro quadrado^{8, 22}.

O estudo de fotoestabilidade deve ser conduzido em câmaras com emissão de luz ultravioleta e fluorescente e o tempo de exposição irá depender da intensidade da luz que está sendo emitida. Produtos farmacêuticos fotossensíveis podem ser protegidos da decomposição induzida pela luz com o uso de recipientes de vidro colorido. Além da utilização de embalagens fotoprotetoras, o revestimento de comprimidos com um filme polimérico contendo absorventes de radiação ultravioleta tem sido sugerido como um método adicional para proteção contra a luz²⁰.

2.2.5. Degradação úmida

A umidade é um fator ambiental que exerce grande influência na estabilidade de produtos farmacêuticos podendo afetar a cinética de degradação do fármaco principalmente associada a temperaturas elevadas. As reações de degradação química provocadas pela umidade são catalisadas pelas moléculas de água por duas vias. Primeiramente, a água pode participar do processo de degradação química por si só, como um reagente, induzindo a hidrólise, hidratação, isomerização ou outras reações químicas bimoleculares. Nestes casos, a velocidade de degradação é

diretamente proporcional à concentração da água, do íon hidrônio ou hidróxido. A água também pode ser adsorvida na superfície do produto e formar uma camada de hidratação na qual a substância é dissolvida e degradada. A adsorção da água na superfície do produto farmacêutico pode alterar o seu estado físico e, conseqüentemente, afetar sua reatividade, exercendo, desta forma influência indireta na degradação do produto²³. A degradação por umidade deve ser realizada com as amostras no estado sólido, sob uma condição de umidade relativa superior a do ambiente⁸.

2.3. Balanço de massa

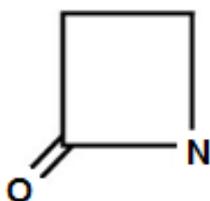
O balanço de massas é o processo de adição do teor e dos níveis de produtos de degradação encontrados para avaliar a proximidade de sua soma a 100% do valor inicial de teor, com a devida consideração da margem de precisão e exatidão analítica⁸. Do ponto de vista teórico, qualquer diminuição real na massa de composto principal após a degradação é necessariamente equivalente à massa total de todos os produtos de degradação formados. Em um sistema fechado, o balanço de massa ficaria assim assegurado se fossem utilizados métodos para quantificar com precisão todas as espécies presentes no material degradado e em seu ambiente. No entanto, o sistema fechado nunca é obtido. Por exemplo, a degradação pode produzir substâncias voláteis que escapam da matriz de amostra. A adsorção ou outras perdas físicas também podem resultar em erro na avaliação das quantidades de material degradado ou produzido²⁴.

O estudo do balanço de massa é sempre um desafio a ser calculado na prática, pois um desequilíbrio de massas, além de respostas variáveis dos picos cromatográficos do analito e degradação, podem levar a suspeita sobre a capacidade do método para quantificar todos os produtos de degradação com precisão²⁵.

2.4. Antibióticos beta-lactâmicos

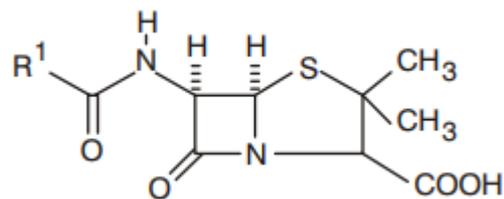
Os beta-lactâmicos pertencem ao grupo de antibióticos definidos pela presença do anel beta-lactâmico em sua estrutura química, também conhecida estruturalmente como uma propanamida cíclica. Constituem uma classe de elevada

importância devido a sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade. O anel beta-lactâmico determina não só o mecanismo de ação, sendo esse a inibição da síntese do peptidoglicano, como também a baixa toxicidade direta, visto que atuam na parede celular. É também determinante no principal mecanismo de resistência por parte das bactérias, as beta-lactamases²⁶. O anel beta-lactâmico (Esquema 2) é constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogênio, podendo conter diversos grupos substituintes que o tornam ativo.

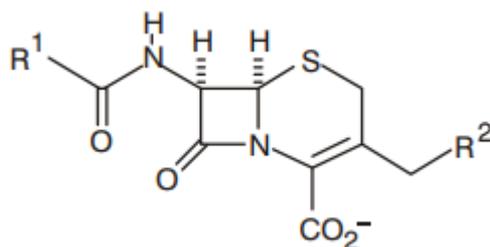


Esquema 2. Estrutura do anel β -lactâmico.

A família dos beta-lactâmicos é formada por carbapenemos, penicilinas, cefalosporinas e monobactams. O anel beta-lactâmico pode estar fundido com diversos anéis, criando cada grupo desta família. Pode ser um anel tiazolidina, no caso das penicilinas, anel dihidrotiazina, no caso das cefalosporinas, ou anel pirrólico nos carbapenemos. Tanto nas penicilinas, como nas cefalosporinas (Esquemas 3 e 4) existem locais onde podem ser adicionados diversos grupos (R1 e R2) que permitem modificar diversas propriedades da molécula base. Desde esta descoberta, há um enorme esforço por parte dos cientistas para tentar melhorar a estrutura básica de forma a obter moléculas mais solúveis, com diferentes vias de administração, com melhor farmacocinética, com amplo espectro de ação, resistente ao suco gástrico, entre muitas outras possibilidades^{27, 28}. É então, a partir do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) no caso das penicilinas e do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) para as cefalosporinas, obtidos por fermentação ou via química, que são produzidos vários antibióticos por semi-síntese.



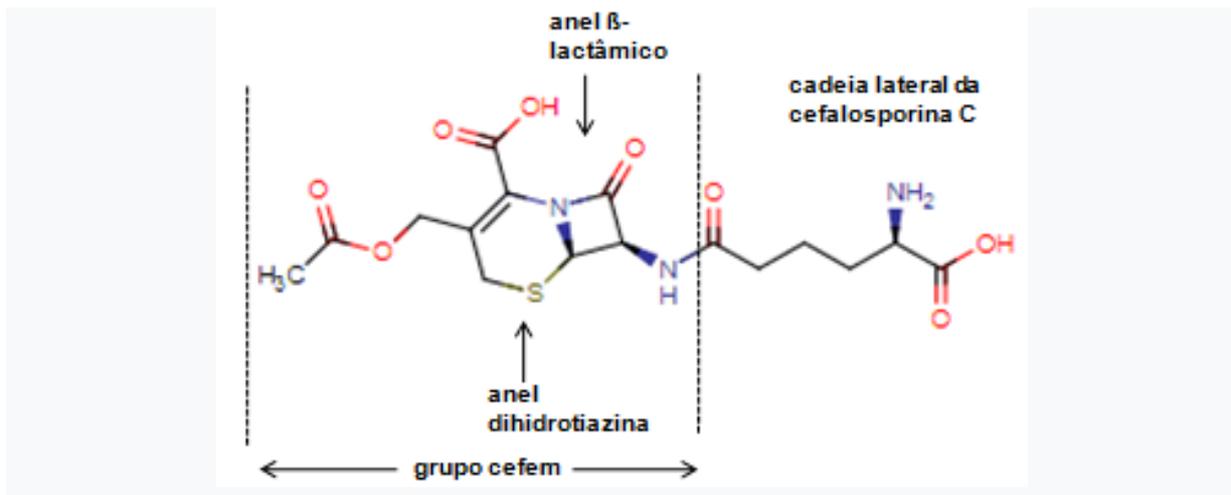
Esquema 3. Estrutura da penicilina.



Esquema 4. Estrutura da cefalosporina.

2.4.1. Cefalosporinas

As cefalosporinas são uma classe de antibióticos β -lactâmicos na qual o anel β -lactâmico é fundido com outro anel de seis membros, o anel di-hidrotiazina²⁹. Todas as cefalosporinas em uso clínico são derivados semi-sintéticos do 7-aminocefalosporânico (7-ACA), o qual foi obtido inicialmente de um antibiótico natural, a cefalosporina C, oriundo do fungo *Cephalosporinum acremonium* (atual *Acremonium chrysogenum*). A partir deste fungo, também foram identificadas as cefalosporinas P e N. No entanto, apenas a Cefalosporina C demonstrou atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de estabilidade na presença de penicilinas³⁰. Na estrutura química da molécula de cefalosporina C (Esquema 5), observa-se que este composto difere da penicilina N pela presença do anel dihidrotiazina no lugar do anel tiazolidina e pela presença de um grupo acetoximetila ligado ao C-3 dos sistema de anéis das cefalosporinas. Este conjunto de anéis é denominado grupo cefem³¹.



Esquema 5. Estrutura química da cefalosporina C. (Fonte Pubchem).

Estão entre os antimicrobianos mais prescritos na prática clínica atual, por conta de seu amplo espectro, baixa toxicidade, facilidade de administração e perfil farmacocinético favorável. Um problema que tem sido enfrentado é o aumento da resistência das bactérias aos antibióticos beta-lactâmicos. Pesquisas têm sido feitas no sentido de aumentar a resistência das cefalosporinas semi-sintéticas às beta-lactamases. As cefalosporinas semi-sintéticas são classificadas como de primeira, segunda e terceira geração dependendo do seu espectro de ação e sua resistência à degradação enzimática. A quarta geração inclui moléculas com um espectro similar à da terceira, mas com um notável aumento da estabilidade à hidrólise por beta-lactamases³².

2.5. Cefalexina

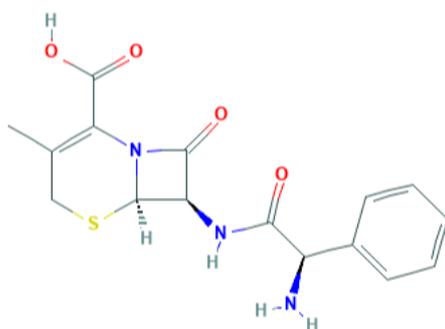
2.5.1. Aspectos gerais

A cefalexina insere-se nesse contexto como uma cefalosporina de primeira geração pertencente ao grupo dos antibióticos beta-lactâmicos clássicos que apresentam as mesmas características estruturais das penicilinas e é resultado da junção entre os compostos fenilglicina e do ácido 7-amino desacetoxicefalosporânico (7-ADCA) com amplo espectro de ação da classe dos β -lactâmicos α -amino substituídos derivado da classe das cefalosporinas. A cefalexina é indicada para o tratamento de infecções do trato respiratório, otite, infecções da pele, ósseas e infecções do trato geniturinário. Devido à cefalexina pertencer a um dos antibióticos mais amplamente prescritos no mundo³³ e tendo

em vista o reduzido número de estudos referentes à análise de impurezas no produto cefalexina cápsula, o estudo do perfil de degradação do fármaco e forma farmacêutica cápsula representa uma demanda relevante para garantia da eficácia, segurança e qualidade no uso deste medicamento.

2.5.2. Propriedades físico-químicas

A cefalexina (Esquema 6) é quimicamente conhecida como ácido (6R, 7R)-7-[[[(2R)-2-amino-2-fenilacetil]amino]-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxílico hidratado (1:1), possui fórmula molecular $C_{16}H_{17}N_2O_4S$ e massa molecular 347,38 Da.



Esquema 6. Estrutura da cefalexina. (Fonte Pubchem³⁴)

A cefalexina é um pó cristalino branco de odor característico. Apresenta-se como levemente solúvel em água, praticamente insolúvel em etanol, clorofórmio e éter³⁵. É uma molécula com grupamentos ionizáveis, com valores de pKa e de distribuição de cargas conforme mostrado na Figura 2. Apresenta os seguintes grupos funcionais: amina, amida, tioéter e ácido carboxílico.

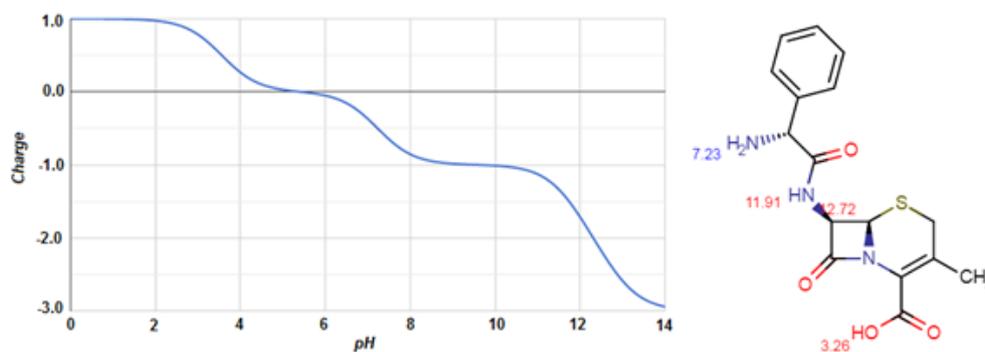


Figura 3. Distribuição de cargas e valores de pKa para a cefalexina (Fonte ChemAxon³⁶).

Além das funções orgânicas presentes na estrutura da cefalexina há também a presença de uma cadeia lateral, composta por uma amina primária, uma amida e um anel benzênico. A Figura 3 apresenta a estrutura da cefalexina, onde a cadeia lateral e o esqueleto característico da classe das cefalosporinas estão destacados (Figura 3(A)) bem como os grupos funcionais presentes na molécula da cefalexina (Figura 3(B)).

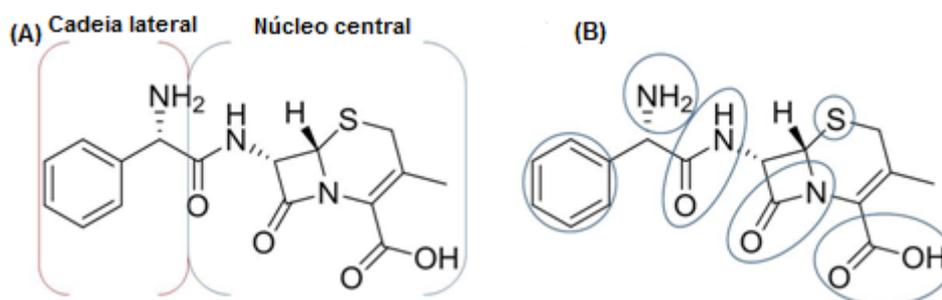


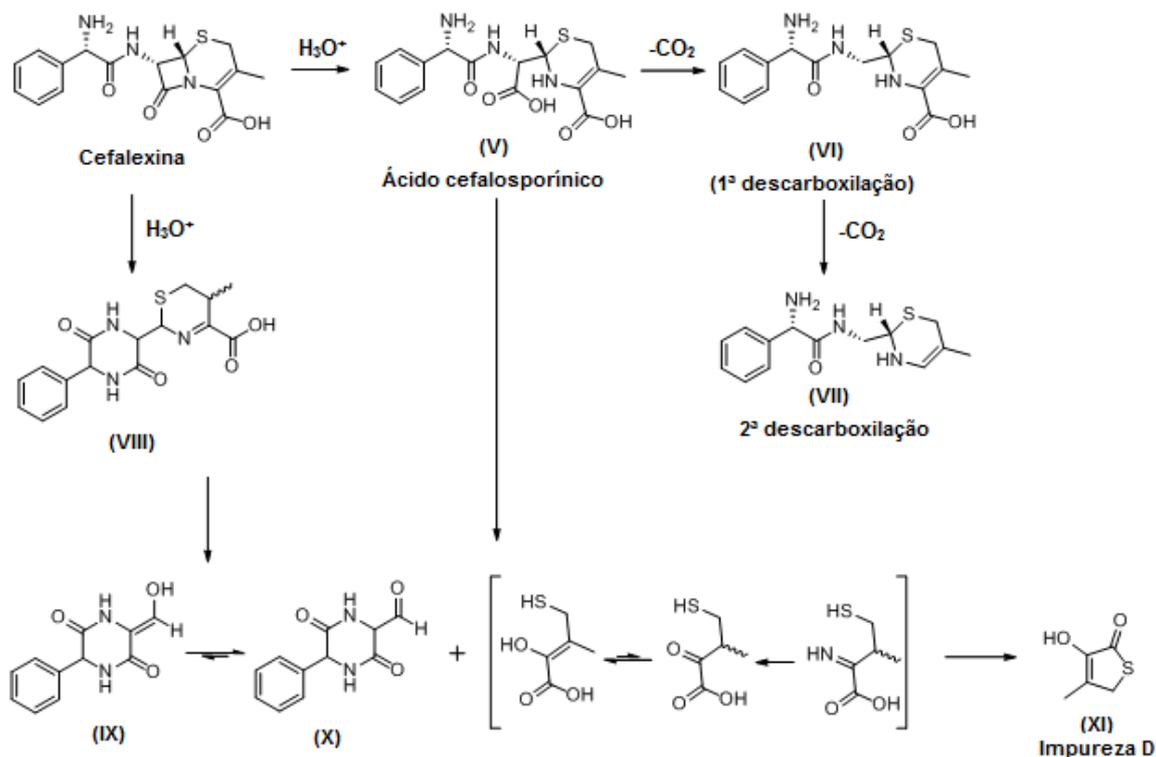
Figura 4. Estrutura química da cefalexina: (A) cadeia lateral e núcleo central, (B) principais funções orgânicas presentes na estrutura da cefalexina.

Devido à presença de diferentes grupos funcionais em sua estrutura química, espera-se que a cefalexina seja lábil quando exposta às condições de degradação forçada. Outro ponto importante é que a presença de três centros quirais, dois no núcleo central (6R e 7R) e um na cadeia lateral, no carbono α grupo fenil (2R), pode levar à formação de produtos de degradação diastereoisoméricos, aumentando a complexidade da análise.

A presença do grupo β -lactâmico na estrutura da cefalexina favorece a formação de produtos de degradação resultantes da abertura do anel via reações

de hidrólise catalisadas por meio ácido, básico, na presença de íons metálicos e via térmica. Estes compostos podem sofrer as descarboxilações dos ácidos carboxílicos resultante da abertura do anel, bem como daquele presente no anel diidrotiazínico³⁷. O anel de seis membros acoplado ao grupo β lactâmico das cefalosporinas confere uma característica planar a molécula, diminuindo a tensão do anel de quatro membros o que torna essa classe menos lábil se comparada às penicilinas que possuem em seu esqueleto um anel de 5 membros²⁶.

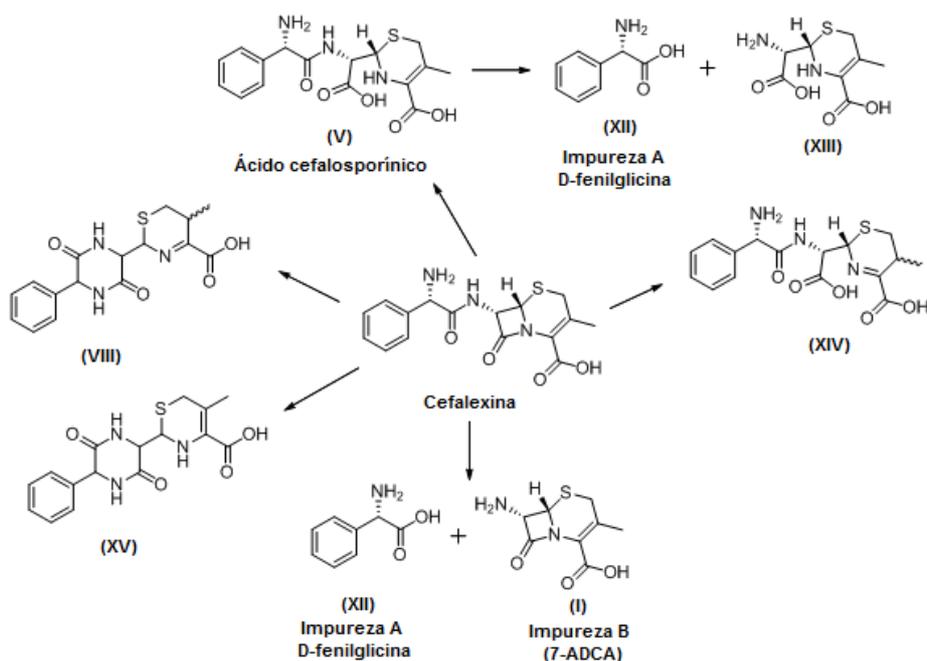
O anel β lactâmico da cefalexina é a região mais reativa da molécula e inúmeras reações de degradação são iniciadas através da sua abertura. O produto de degradação principal para as reações em meio ácido é o ácido cefalosporínico (V) que é resultado do ataque nucleofílico de uma molécula de água ao anel β lactâmico. Esse produto de degradação primário pode, a seguir, sofrer uma descarboxilação fornecendo VI e VII. Paralelamente, reações de hidrólise podem fornecer VIII, IX e X. (Esquema 8)³⁷. Nos casos em que as reações em meio ácido são conduzidas com temperatura, observa-se também a formação do produto de degradação de estrutura VIII (Esquema 8) que pode ainda continuar reagindo e formando também os produtos secundários de estrutura IX – estrutura X e estrutura XI (identificada estruturalmente como impureza D de cefalexina) (Esquema 8)³⁸.



Esquema 7. Etapas das principais vias de possíveis produtos de degradação relacionados à cefalexina por hidrólise ácida. Adaptado de [37] e [38].

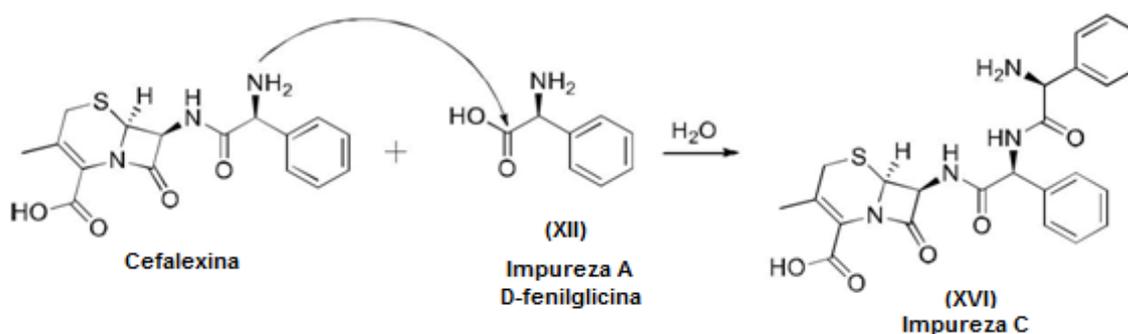
As principais impurezas formadas em meio ácido apresentam a manutenção do anel aromático permitindo a detecção por detectores do tipo arranjo de diodos. Devido às modificações estruturais observadas para alguns produtos de degradação, espera-se que ocorram modificações nos espectros de absorção já que, em alguns casos, a movimentação de elétrons pode ser favorecida ou prejudicada. O deslocamento dos comprimentos de onda de máxima absorção para as moléculas pode acarretar em desvios no balanço de massas durante a realização do estudo de degradação.

A cefalexina apresenta comportamentos similares nas hidrólises catalisadas por base e por ácido, sendo a que a diferença primordial está na maior velocidade de reação em meios alcalinos. Outro ponto é que o mecanismo da hidrólise básica ocorre via S_N2 devido à presença de um nucleófilo forte (OH^-). As reações majoritárias ocorrem com o ataque na carbonila do anel β lactâmico e conseqüente formação do ácido cefalosporínico (estrutura V – Esquema 9), a partir desse composto, reações secundárias passam a ocorrer de maneira similar à hidrólise ácida³⁹.



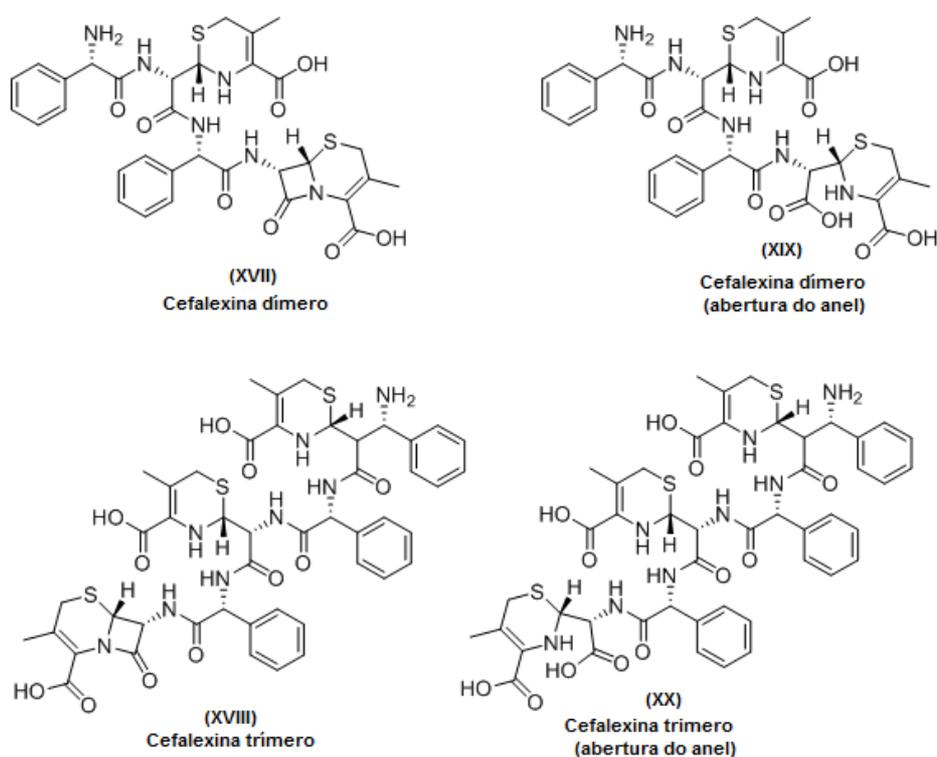
Esquema 8. Possíveis produtos de degradação relacionados à cefalexina por hidrólise básica. Adaptado de [39].

Denominada na Farmacopéia Britânica como impureza A, a impureza D-Fenilglicina, que é um dos principais produtos de degradação da hidrólise da cefalexina, poderá, em teoria, reagir com uma molécula de cefalexina e formar o composto conhecido como impureza C. Apesar dessa impureza ser descrita na Farmacopéia Britânica⁴⁰, na literatura não é encontrado a formação delas em estudos de estresse, podendo ser considerada como um produto de degradação secundário ou como impureza de síntese. O Esquema 10 apresenta o mecanismo proposto para a formação da impureza C da Farmacopéia Britânica através da reação da impureza A com uma molécula da cefalexina.



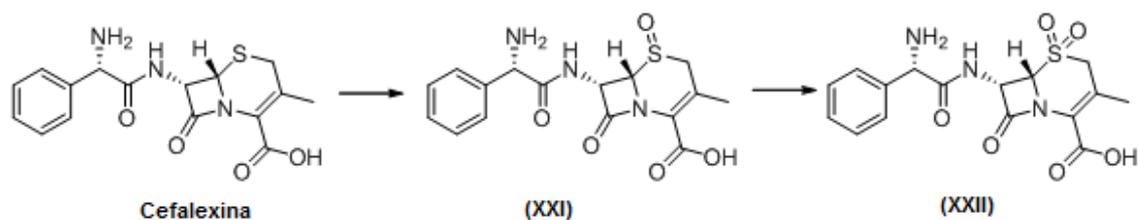
Esquema 9. Reação de formação da impureza C. Adaptado de [40].

Conforme mencionado anteriormente, a cefalexina apresenta uma amina primária na cadeia lateral que pode desencadear reações intramoleculares formando a impureza desconhecida (VIII) em meio básico (Esquema 9). Além disso, a amina primária também poderá participar de reações intermoleculares, atuando como nucleófilo e atacar a carbonila do anel β -lactâmico de outra molécula de cefalexina, formando um dímero. Essa reação poderá continuar, uma vez que novamente terá uma amina primária livre para reagir e assim sucessivamente, desencadeando a formação de oligômeros. Essa reação de polimerização já é conhecida na literatura sendo o grau de polimerização da cefalexina dependente do pH e da concentração. Quanto maior o pH e a concentração, maior o grau de polimerização, mas em meio ácido e básico é possível detectar dímeros da cefalexina. As impurezas poliméricas da cefalexina são relacionadas a reações de alergia em pacientes e devem ser controladas³⁷. O Esquema 11 apresenta as principais estruturas resultantes da polimerização da cefalexina encontradas em ensaios de estresse, dímeros e trímeros com a cadeia β -lactâmica aberta ou fechada.



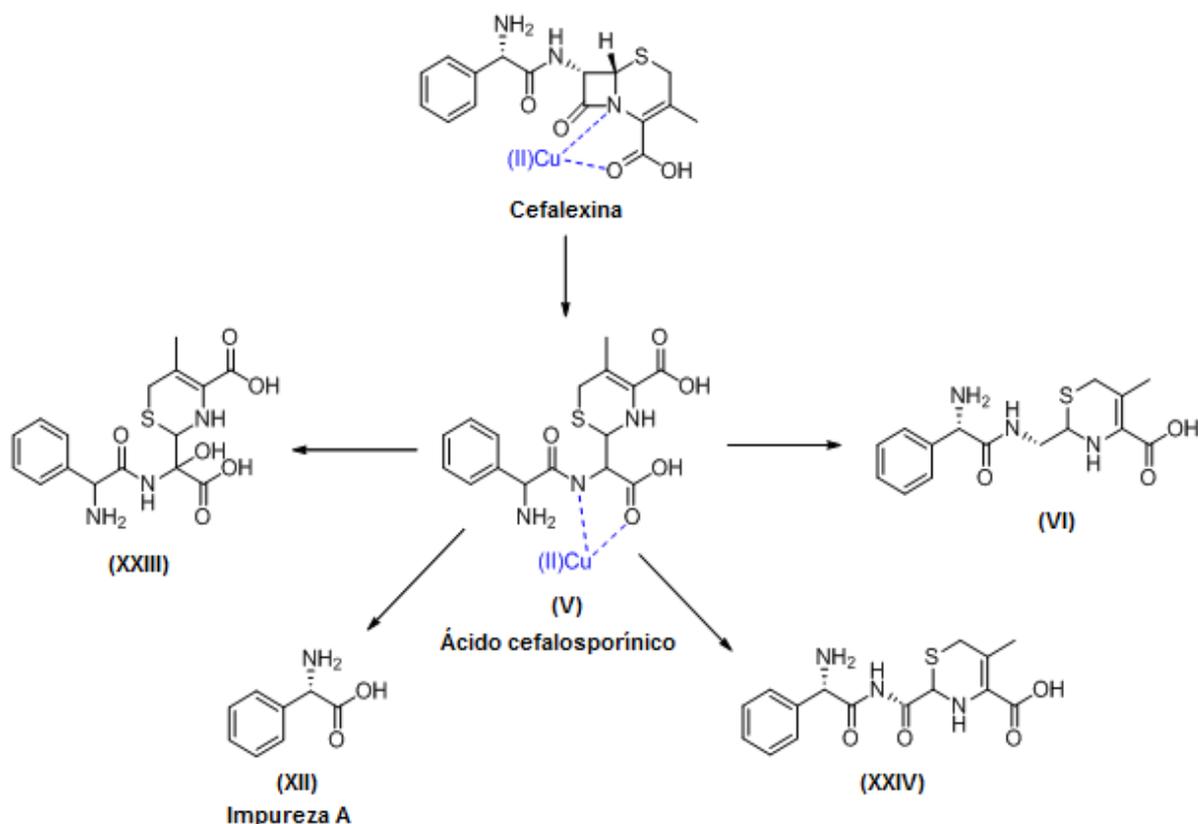
Esquema 10. Polimerização da cefalexina em dímeros e trímeros. Adaptado de [37].

Com relação à labilidade da cefalexina frente às reações de oxidação, estas podem ocorrer por dois mecanismos distintos: nucleofílicos ou radicalares. Considerando o mecanismo de oxidação nucleofílica, com a utilização de peróxido de hidrogênio, a cefalexina por apresentar o grupo tioéter pode produzir inicialmente o sulfóxido como degradante primário e a sulfona como produto secundário, proveniente da oxidação do sulfóxido (Esquema 12).



Esquema 11. Possíveis produtos de degradação relacionados à cefalexina em reações de oxidação via mecanismo nucleofílico. Adaptado de [41].

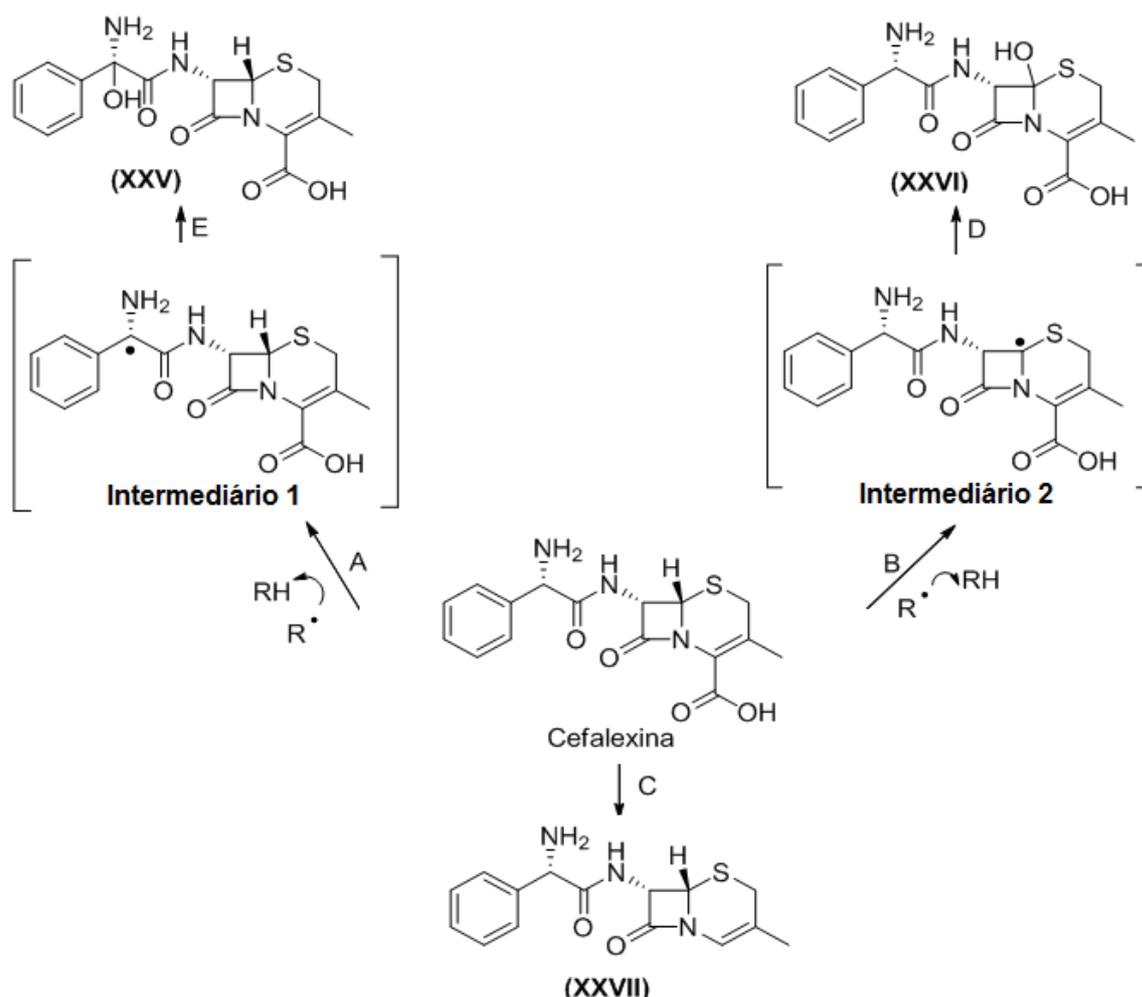
A oxidação do grupo tiol pode ser também obtida em exposições fotoquímicas na presença de oxigênio como em reações com íons metálicos como Cu (II) e Fe (III). No entanto, na literatura é mencionado que soluções neutras com a presença de Cu (II) ocasionam a degradação do anel β -lactâmico pela complexação majoritária com o ácido carboxílico do anel di-hidrotiazínico e amida (β - lactâmica), resultando na formação do ácido cefalosporínico. Este pode complexar novamente com o Cu (II) e resultar na formação do composto majoritário, impureza A (XII), como produto de oxidação e outros compostos minoritários, como os produtos de degradação XXIII e XXIV (Esquema 13)⁴¹.



Esquema 12. Possíveis produtos de degradação formados no ensaio por íons metálicos (Cu (II)). Adaptado de [41].

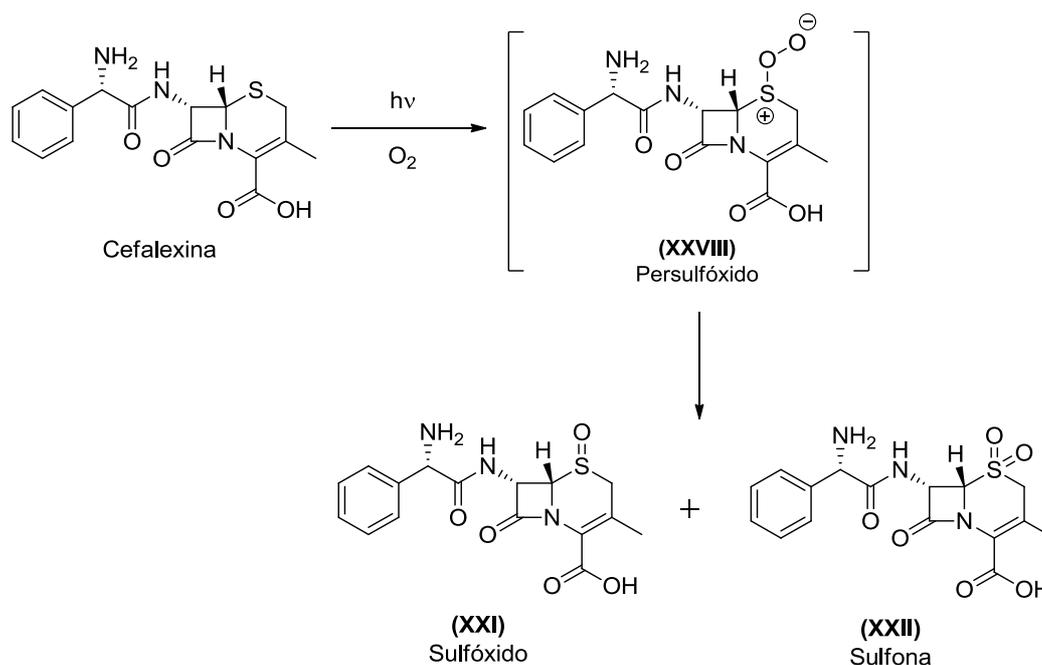
Considerando o mecanismo de oxidação radicalar, do qual pode ser desencadeado por exposição fotoquímica ou pela ação de iniciadores de radicais presentes na formulação do produto acabado, os hidrogênios presentes nos carbonos α heteroátomos podem sofrer quebra homolítica²⁴.

Dessa forma, a cefalexina, poderá formar dois intermediários de reação (Esquema 14) dos quais podem ocasionar, em teoria, a formação dos derivados hidroxilados. A reação de descarboxilação do anel diidrotiazínico (Esquema 14) ocorre de forma rápida e direta⁴². Vale ressaltar que rearranjos podem ocorrer principalmente com os produtos de degradação XXIII (Esquema 13), XXV e XXVI (Esquema 14) levando à formação de derivados cetônicos como também outros rearranjos envolvendo os grupos funcionais da cefalexina, com a formação de produtos secundários e terciários. O intermediário 1 (Esquema 14) poderá resultar na formação de um fenol, uma vez que o radical ligado ao carbono α da amina será estabilizado pelo anel aromático, podendo ocorrer a entrada da hidroxila na posição orto e/ou para do anel possibilitando a obtenção de isômeros de posição⁴².



Esquema 13. Possíveis produtos de degradação relacionados à cefalexina via reação radicalar.

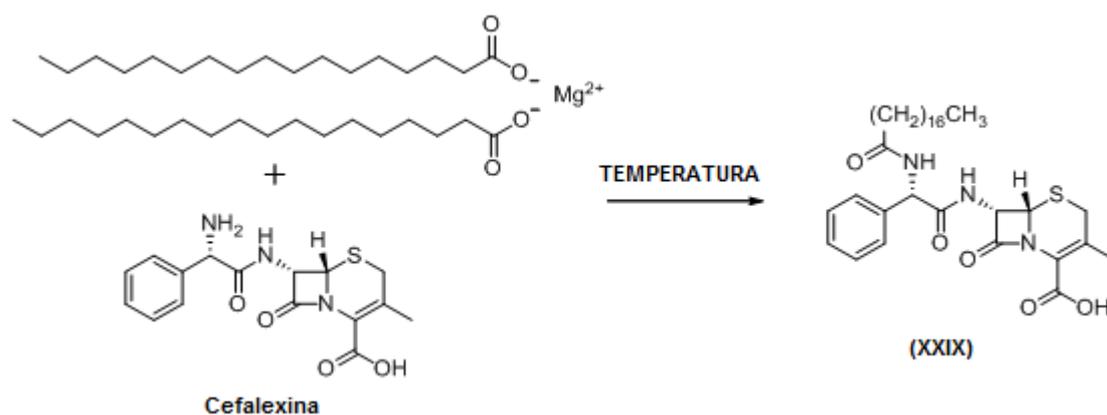
O grupo tiol presente na cefalexina poderá sofrer oxidação através da exposição fotoquímica com a formação do oxigênio singleto que promoverá a oxidação para sulfóxido e/ou sulfona através da formação do intermediário persulfóxido (Esquema 15).



Esquema 14. Possíveis produtos de degradação relacionados a cefalexina pela reação por oxidação por oxigênio singlete.

Os excipientes e suas impurezas são um dos principais responsáveis pela formação de produtos de degradação. Além de atuarem como catalisadores, sobretudo, em reações de auto oxidação e de hidrólise, podem também interagir diretamente com o insumo farmacêutico ativo sendo reagentes para a reação de degradação⁴³.

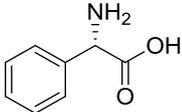
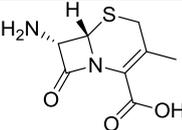
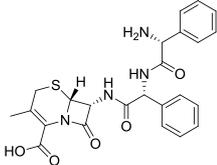
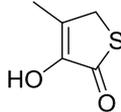
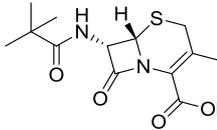
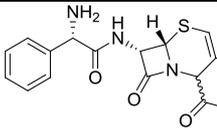
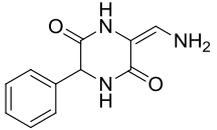
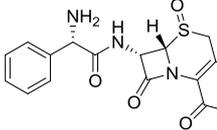
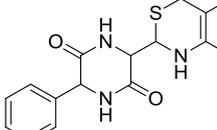
O estearato de magnésio presente na formulação do produto na forma farmacêutica cápsula, é conhecido por possuir bastante interação com insumos farmacêuticos ativos, em especial, os que possuem aminas primárias ou secundárias em sua estrutura química. No caso da cefalexina, poderá ocorrer a hidrólise catalisada por íon metálico havendo a formação do produto de degradação ácido cefalosporínico. Além disso, em teoria, a cefalexina poderá atacar o estearato de magnésio, em condições de estabilidade acelerada, para a formação de uma amida (Esquema 16)⁴³.



Esquema 15. Reação da cefalexina com estearato de magnésio.

Existem diversos compostos relacionados à cefalexina descritos em literatura científica e em compêndios oficiais. Nas farmacopéias apenas as impurezas A e B são vendidas para a realização dos testes de substâncias relacionadas. No entanto, é possível encontrar padrões de impurezas da cefalexina em catálogos de fornecedores de padrões de trabalho. A Tabela 1 apresenta alguns compostos relacionados relatados em literatura. Vale salientar que alguns dos produtos de degradação apresentados como possíveis de serem observados durante estudo de degradação forçada podem não ser disponíveis comercialmente.

Tabela 1. Compostos relacionados à cefalexina, relatados em literatura.

Composto	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Estrutura Química	Referência
Impureza A (<i>D</i> -phenylglycine)	C ₈ H ₉ NO ₂	151,16		[7]
Impureza B (7-ADCA)	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	214,24		[7]
Impureza C	C ₂₄ H ₂₄ N ₄ O ₅ S	480,50		[7]
Impureza D	C ₅ H ₆ O ₂ S	130,17		[7]
Impureza E	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	298,36		[7]
Impureza F	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347,39		[7]
Impureza de cefalexina (3-aminomethylene-6-phenylpiperazine-2,5-dione)	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂	217,22		[27]
Cefalexina Sulfóxido (Impureza J)	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅ S	363,39		[28]
Cefalexina dicetopiperazina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347,40		[29]

Conforme observado na Tabela 1, todos os produtos de degradação relacionados à cefalexina possuem grupos cromóforos com certa absorvidade, não sendo esperado, portanto, que haja a formação de produtos de degradação sem grupo cromóforo. Através da análise crítica da estrutura química da cefalexina e da formulação do produto na forma farmacêutica cápsula é possível inferir que há a possibilidade de muitos produtos de degradação serem formados durante estudo de degradação forçada. Além disso, tendo em vista que o composto possa apresentar três centros quirais, a formação de isômeros é possível.

Apesar da complexidade para a síntese da cefalexina, a Farmacopéia Americana (USP)³⁵ apresenta um método para substâncias relacionadas sem a inclusão de nenhuma impureza específica e desta maneira os limites impostos são aplicados apenas aos compostos relacionados desconhecidos. A Farmacopéia Britânica (BP)⁴⁰ apresenta na monografia da matéria-prima limite específico apenas para a impureza B e de forma complementar indica as estruturas de outros possíveis compostos relacionados, que não estão contemplados no método cromatográfico, mas que seguem o limite para impurezas desconhecidas. Para a forma farmacêutica em cápsulas, a Farmacopéia Britânica traz um método por cromatografia em camada delgada onde impõe o limite de 1,0 % para as impurezas conhecidas A e B, bem como para as impurezas desconhecidas. A Tabela 2 apresenta os limites adotados na USP, BP e no DMF e as nomenclaturas adotadas na USP e na BP para as impurezas conhecidas. O DMF do fabricante do insumo avaliado apresenta os limites da Farmacopéia Britânica (BP) como critério para o controle da matéria-prima.

Tabela 2. Impurezas controladas pela literatura (USP e BP) e DMF.

Impureza	Limites (%)				
	BP (cápsula)	BP (matéria- prima)	USP (cápsula)	USP (matéria- prima)	DMF
Impureza A (<i>D-phenylglycine</i>)	1,0	1,0	NA	NA	NA
Impureza B (7-ADCA)	1,0	1,0	NA	NA	1,0
Impureza C	1,0	1,0	NA	NA	NA
Impureza D	1,0	1,0	NA	NA	NA
Impureza E	1,0	1,0	NA	NA	NA
Impureza F	1,0	1,0	NA	NA	NA
Impurezas desconhecidas	1,0	1,0	NA	1,0	1,0
Total de impurezas	NA	3,0	NA	5,0	3,0

Poucos trabalhos em alusão a estudos de degradação do fármaco cefalexina são encontrados na literatura. Conforme estudos propostos por Gawande *et al.*³³, a cefalexina demonstrou estabilidade frente à degradação fotolítica e térmica avaliada no estado sólido durante um período de oito dias exposta à luz fluorescente (1,25 million lux h) e luz UV (200 Whm⁻²) e exposta em estufa com temperatura de até 90°C analisadas por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos. No entanto, condições de degradação hidrolítica em meio ácido e alcalino através da mistura de 1 mL de uma solução estoque de cefalexina com 1 mL de solução utilizada como degradante demonstraram a intensa labilidade da molécula através da degradação de aproximadamente 23% em contato com HCl 1 mol L⁻¹ a 50°C durante 4 h e aproximadamente 21% de degradação em meio básico utilizando NaOH 0,001 mol L⁻¹ a temperatura ambiente por 18 h. Nesse mesmo estudo, a cefalexina foi avaliada em condição de estresse oxidativo com a utilização de 1 mL H₂O₂ 30% em contato com 1 mL de solução estoque de cefalexina (1000 µg mL⁻¹) resultando em degradação de 16%.

Reddy *et al.*⁴⁴ desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de ultra eficiência para estimar as impurezas do produto cefalexina suspensão oral e, para avaliação do parâmetro especificidade, a cefalexina foi submetida a condições de degradação ácida a 70°C durante 3 horas, apresentando cerca de 15% de degradação da matéria prima. Em condições básicas (NaOH 1 mol L⁻¹), a solução do produto foi injetada imediatamente após o preparo (0 horas de exposição) e apresentou cerca de 2% de degradação. Cerca de 6% de degradação foi encontrado no produto quando submetido a condições oxidativas em peróxido de hidrogênio 1%. Exposição a condições fotolíticas em luz visível por 290 h e UV por 54 h, térmica a 100°C por 22 horas e condições de umidade relativa de 90% durante 288 h não demonstraram degradação significativa, indicando sua estabilidade nessas condições.

Rao⁴⁵ e sua equipe desenvolveram um método para cefalexina associada ao fármaco bromexina na forma farmacêutica comprimidos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a detector do tipo ultravioleta e detecção monitorada no comprimento de onda 215 nm. Foi empregada uma coluna C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel composta por 0,1% de ácido fosfórico e acetonitrila na proporção 45:55 (v/v). O método foi validado e posteriormente foram conduzidos estudos de degradação forçada para avaliar a estabilidade intrínseca do fármaco com exposição da associação cefalexina e bromexina comprimidos em HCl 2 mol L⁻¹ e NaOH 2 mol L⁻¹ em refluxo durante 30 min. a 60 °C, H₂O₂ 20% e em estufa a 105 °C durante 6 h para avaliação degradação térmica. Os autores concluíram que, além do método apresentar resultados satisfatórios para todos os parâmetros analíticos validados, ambos fármacos são estáveis em condições de degradação forçada. No entanto, aproximadamente 5% do fármaco cefalexina sofreu degradação em apenas 30 min. exposta à condição de hidrólise ácida.

Outros métodos para determinação da estabilidade da cefalexina foram desenvolvidos por outras técnicas. Um estudo sobre a estabilidade da cefalexina sob condições de estresse (Jeswani R. M. et.al. 2009)⁴⁶ utilizou um método por cromatografia líquida em camada delgada composta de placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel 60 F254 como fase estacionária com dimensões de 10 cm x 10 cm com 250 mm de espessura da camada, fase móvel composta por acetato de etila: metanol e hidróxido de amônio (6:4:1, v/v/v), fator de retenção de 0,56 para cefalexina e análise densiométrica da cefalexina usada no modo de

absorbância em 260 nm. A análise das amostras mostrou queda de cerca de 60% de seu teor sob condição de hidrólise ácida após 1 h a 80 °C em HCl 1 mol L⁻¹ (com surgimento de um produto de degradação com fator de retenção 0,76), queda de teor de aproximadamente 30% em NaOH 0,01 mol L⁻¹ durante 30 min. (com surgimento de quatro produtos de degradação com fatores de retenção 0,15, 0,62, 0,78 e 0,82) e aproximadamente 15% de queda no teor da cefalexina quando exposta em peróxido de hidrogênio 30% durante três dias a temperatura ambiente, com aparecimento de apenas um produto de degradação com fator de retenção de 0,73. A Tabela 3 apresenta um resumo dos estudos de degradação descritos em literatura para a cefalexina.

Tabela 3. Resultados das condições de degradação forçada da cefalexina relatadas em literatura.

Ácida	Básica	Térmica	Fotólise	Oxidação	Umidade	Referência
Lábil (HCl 1M, 50°C, 4 hs)	Lábil (NaOH 0,001M, 25°C, 18 hs)	Estável (90°C, 8 dias)	Estável (Fluoresc. e UV, 25°C, 8 dias)	Lábil (H ₂ O ₂ 30%, 25°C, 45 min.)	-	[33]
Lábil (HCl 1M, 80°C, 1 hora)	Lábil (NaOH 0,01M, 25°C, 30 min.)	-	-	Lábil (H ₂ O ₂ 30%, 25°C, 3 dias)	-	[46]
Lábil (HCl 1M, 70°C, 3 hs)	Lábil (NaOH 1M, 25°C, 0 horas)	Estável (100°C, 22 horas)	Estável (Visível 25°C, 290 horas; UV 25°C, 54 horas)	Lábil (H ₂ O ₂ 1%, 25°C)	Estável (90%U.R., 288 horas)	[44]
Lábil (HCl 0,1M, 25°C, 45 min.)	Lábil (NaOH 0,01M, 25°C, 45 min.)	Lábil (80°C, 45 min.)	Lábil (365 nm, 25 min.)	Lábil (H ₂ O ₂ 3%, 25°C, 45 min.)	-	[47]
Lábil (HCl 2 M, 60°C, 30 min.)	Lábil (NaOH 2 M, 60°C, 30 min.)	Estável (105°C, 6 horas)	-	Estável (H ₂ O ₂ 20%, 60°C, 30 min.)	-	[45]

Nenhum destes estudos apresentados na Tabela 3, no entanto, faz uma abordagem ampla, com a utilização de impurezas conhecidas, envolvendo as diversas condições de degradação estudadas em medicamentos. De maneira complementar a maioria dos métodos disponíveis na literatura não se apresenta como melhor alternativa para determinação das impurezas orgânicas, da identidade e do conteúdo dos potenciais produtos de degradação.

Diante do exposto, é previsto que o produto cefalexina na forma farmacêutica cápsula seja bastante lábil frente a condições de degradação ácida,

básica, oxidativa, térmica e fotolítica. Há também possibilidade de produtos de degradação ser formados durante o estudo de exposição térmica e fotoquímica, apesar da forma do produto ser cápsula. No entanto, a avaliação da labilidade ou estabilidade de um composto através de referências bibliográficas deve ser feito de maneira criteriosa, já que estudos de degradação forçada podem ser realizados em diferentes condições reacionais. Além disso, a sensibilidade da detecção deve ser suficiente para quantificar as impurezas, pois se tratando de perfis de impurezas usando cromatografia líquida os analitos podem impor vários desafios. O princípio de detecção mais comum para a maior parte desses analitos é a detecção ultravioleta. Por outro lado, podem ser formadas impurezas que não possuem um cromóforo e também alguns desses compostos podem ter estruturas que venham a dificultar sua separação por HPLC convencional utilizando colunas de fase reversa devido à alta hidrofiliabilidade e/ou devido ao seu caráter iônico.

Assim, considerando os constantes estudos envolvendo impurezas e produtos de degradação em fármacos que compreende técnicas de separação de última geração seguida por meio de detecção apropriada e diante dessa escassez de estudos apresentada e levando em consideração que o fármaco objeto de estudo é comercializado mundialmente e apresenta um histórico de instabilidade na formulação surgiu-nos o questionamento da viabilidade de desenvolver um método alternativo de características modernas para investigar e separar impurezas conhecidas e produtos de degradação formados, contribuindo para um cenário mais favorável para rotina do laboratório no controle de qualidade de matéria-prima e produto contendo cefalexina.

Dessa forma a hipótese da presente tese é que a combinação da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo com monitoramento de impurezas conhecidas e desconhecidas em dois comprimentos de onda é capaz de fornecer uma ferramenta analítica capaz de quantificar produtos de degradação da cefalexina com base em sua absorvidade molar.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Investigar as potencialidades e limitações do estudo de degradação forçada da cefalexina cápsula quanto à capacidade indicativa de estabilidade do método em identificar, separar e quantificar impurezas e produtos de degradação através da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo.

3.2. Objetivos Específicos

- Correlacionar o efeito da condição de estresse gerada no estudo de degradação forçada para avaliar a susceptibilidade do fármaco;
- Avaliar a sensibilidade da detecção do método analítico frente à determinação quantitativa das impurezas conhecidas e produtos de degradação formados;
- Avaliar o perfil de impurezas da cefalexina conforme RDC 53/2015 e monitorar os níveis das mesmas ao longo da validade do produto;
- Correlacionar os produtos de degradação formados com seu respectivo balanço de massas;
- Fundamentar a relevância das impurezas e produtos de degradação obtidos.

3.2.1. Validação do método proposto

O método analítico foi validado seguindo os requerimentos estabelecidos pela RDC 166/2017 (Brasil, 2017), utilizando os parâmetros de validação recomendados para quantificação de impurezas que são exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), seletividade, limite de quantificação, linearidade e intervalo.

A exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação, analisado a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações distintas: um ponto inferior, um ponto superior e ponto médio da curva analítica. As amostras correspondentes aos três níveis de fortificação foram preparadas em triplicata e o método foi considerado exato quando o resultado médio obtido para recuperação esteve compreendido entre 80 e 110 % do valor teórico e o desvio padrão relativo entre as amostras apresentou-se menor que o valor estipulado como critério de aceitação conforme demonstrado na Tabela 8.

A precisão (repetibilidade) foi avaliada segundo as condições de preparo e do sistema cromatográfico que permaneceram adequadas após injeção de uma sextuplicata de amostras preparadas através da fortificação do placebo com os compostos de interesse. Este parâmetro foi expresso através do desvio padrão relativo entre as áreas de cada um dos picos das seis injeções de cada amostra. A precisão intermediária foi realizada com o intuito de expressar dentro de um mesmo laboratório a variação entre diferentes analistas em diferentes dias através de uma sextuplicata de amostras preparadas através da fortificação do placebo associado com os compostos de interesse.

A seletividade é definida como a capacidade do método em determinar o conteúdo dos compostos de interesse na amostra mesmo com a presença de outros compostos que possam estar presentes, como impurezas, produtos de degradação ou componentes do placebo. Foi demonstrada através do cálculo da resolução entre os compostos e através de cromatogramas representativos.

O limite de quantificação determinou a menor concentração dos analitos que podiam ser quantificados com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação de tal parâmetro foi realizada pelo método da relação sinal ruído no qual preparou-se uma solução do padrão de

cefalexina e impurezas conhecidas em uma concentração teórica de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e determinou-se a relação sinal/ruído fornecida pelo cálculo através do software do equipamento.

A linearidade é a capacidade do método em gerar respostas que são diretamente proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, sendo a faixa de linearidade definida pelo intervalo entre os limites de quantificação superior e inferior em que foi demonstrada a exatidão, precisão e linearidade apropriadas. Para avaliação desse parâmetro utilizaram-se cinco concentrações diferentes a partir das soluções das substâncias químicas de referência preparadas em triplicata. Os parâmetros da regressão foram calculados pelo método dos mínimos quadrados (MMQ). Na análise de regressão foram realizados testes estatísticos de normalidade, homocedasticidade e testes de F para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação dos valores de significância da regressão.

A robustez foi avaliada para verificar a capacidade do método de permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método, obtendo assim uma indicação da sua confiabilidade durante o seu uso. Foram realizadas mudanças na vazão da fase móvel, temperatura da coluna e proporção dos componentes da fase móvel.

4. Referências

1. FDA – U.S. Food & Drug Administration. Disponível em <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>. Acesso em 01 de novembro de 2019.
2. El-Shaboury, S. R.; Saleh, G.A.; Mohamed, F. A.; Rageh, A. H. Analysis of cephalosporin antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 45, 1-19.
3. Kalman, D.; Barriere, S. L. Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Texas Heart Institute Journal*. 1990, 3, 203-215.
4. LUPIN Limited. Common technical document active substance master file applicants parts for cephalexin. Mumbai: India, 2016.
5. United States Pharmacopeia (USP). Cephalexin e Cephalexin Cápsules. 2018, USP 42 NF37.
6. British Pharmacopeia (BP). Cefalexin e Cefalexin Cápsules. 2018.
7. Farmacopeia Brasileira 5ª edição, Monografia Cefalexina. 2010, p. 758.
8. Guia nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902?version=1.0>>. Acesso em 11 de maio de 2019.
9. Savkare, D. A.; Kalaskar, S. P.; Sarode, K. S.; Potkule, E. M. Recent advances in impurities profiling of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2017, 8, 3206.
10. United States Pharmacopeial. Capítulo <1086> Impurities in drug substances and drug products. USP 42 NF37.
11. ICH - International Conference on Harmonization. ICH FHarmonized Tripartite Guideline. Impurities in new drug substances. Q3A (R2) (2006). Disponível em:

- https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf. Acesso em 10 de maio de 2019.
12. FDA – Food and Drug Administration Guidance. ANDAs: Impurities in Drug Substances (2009). Disponível em <https://www.fda.gov/media/77324/download>. Acesso em 10 de maio de 2019.
 13. Pereira, P. A. R. In *Quality Management and Quality Control – New Trends and Developments*; IntechOpen: Londres, 2019, p. 858.
 14. Baertschi, S. W.; Dill, A. L.; Kramer, T. T.; Scrivens, G.; Suruzhon, M.. Degradation rate observations as a function of drug load in solid-state drug products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 108, 1746-1755.
 15. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, nº 234, de 8 de dezembro de 2015.
 16. Blessy, M.; Patel, D. R.; Prajapati, N. P.; Agrawal K. Y. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014, 4, 159-165.
 17. Baertschi, S. W.; Alsante, K. M.; Reed, R. A. In *Pharmaceutical Stress Testing*; Informa Helthcare: North Carolina, USA, 2011.
 18. Allen, L. V.; Popovich, N. G.; Ansel, H. C. *Em Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. Artmed: Porto Alegre, 2007.
 19. Porter, S. C.; Sackett, G.; Liu, L. In *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*; Burlington: Academic Press: Cambridge.
 20. Florence, A. T.; Attwood, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. Edusp: São Paulo, 2003.
 21. Alsante, K. M.; Ando, A.; Brown, R.; Hatajik, T. D.; Tsuda, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced drug delivery reviews*, 2007, 59, 29-37.
 22. Patel, M.; Surati, J.; Chaudhari, D. Review: Forced Degradation Studies. *Pharma Science Monitor* 2016, 148-161.

23. Yoshioka, S.; Stella, V. S. In *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer Academic Publishers, 2000.
24. Baertschi, S. W. In *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*; CRC Press: New York, 2011.
25. Sharma, M. K.; Murugesan, M. Forced degradation study an essential approach to develop stability indicating method. *Journal of Chromatography Separation Techniques*, 2017, 8:1, 1-3.
26. Suarez, C.; Gudiol, F. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica* 2009, 27, 116-129.
27. Rosário, N. A.; Grumach, A. S. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. *Jornal de Pediatria* 2006, 82, p S181.
28. Sousa, J. C. Em *Manual de Antibiótico Antibacterianos*. Porto. Fundação Fernando Pessoa, 2006.
29. Antonin, V. S.; Aquino, J. M.; Silva, B. F.; Silva, A. J.; Filho, R. C. R. Comparative study on the degradation of cephalexin by four eletrochemical advanced oxidation processes: Evolution of oxidation intermediates and microbial activity. *Chemical Engineering Journal* 2019, 372, 1104-1112.
30. Bennett, J. E.; Dolin, R., Blaser, M. J. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*; Elsevier; Philadelphia, 2015 p.278.
31. Abraham, E. P. Cephalosporins 1945 – 1986. *Drugs* 1987, 34, 1-14.
32. Demain, A. L.; Elander, R. P. The beta-lactam antibiotics: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999, 75.
33. Gawande, V. T.; Bothara, K. G.; Marathe, A. M. Stress studies and identification of degradation products of cephalexin using LC-PDA and LC-MS/MS. *Chromatographia* 2017, 80, 1545-1552.
34. PUBCHEM. NIH – U.S. National Library of Medicine. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/27447>>. Acesso em 20 junho 2019.
35. United States Pharmacopeial. *Cephalexin*. 2018. USP 42 NF37.
36. CHEMAXON (Org.). Chemicalize.org. Disponível em <<http://www.chemicalize.org>>. Acesso em 01 julho 2019.
37. Deshpande, A. D.; Baheti, K. G.; Chaterjee, N. R. Degradation of beta-lactam antibiotics. *Current Science* 2004, 8712, 1684-1695.

38. Dinner, A. Cephalosporin degradations. *Journal of Medicinal Chemistry* 1977, 20, 963-965.
39. Tsuji, A.; Nakashima, E.; Deguchi, Y.; Nishide, K.; Shimizu, T.; Horiuchi, S.; Ishikawa, K.; Yamana, T. Degradation kinetics and mechanism of aminocephalosporins in aqueous solution: cefadroxil. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1981, 70, 1120-1128.
40. British Pharmacopeia. *Cefalexin*. 2018.
41. Min Li. *Organic Chemistry of Drug*; RSC Publishing: Cambridge, 2012.
42. Wang, X. H.; Lin, A. Y. C. Phototransformation of cephalosporin antibiotics in an aqueous environment results in higher toxicity. *Environmental Science & Technology* 2012, 46, 12417-12426.
43. Wu, Y.; Levons, J.; Narang, A. S.; Raghavan, K.; Rao, V. M. Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2011, 12, 1248-1263.
44. Reddy, M. R. P.; Sreeramulu, J.; Naidu, P. Y.; Reddy, A. R. Stability indicating fast LC method for the estimation of impurities in cephalixin for oral suspension. *Asian J. Research Chem.* 2010, 3, 1090-1094.
45. Rao, A. L.; Prasanthi, T.; Spandana, U. S. Stability indicating RP-HPLC method development and validation for the analysis of cephalixin and bromhexine in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Research in AYUSH and Pharmaceutical Sciences* 2017, 137-147.
46. Jeswani, R. M.; Sinha, P. K.; Topagi, K. S.; Damle, M. C. A validated stability HPTLC method for determination of cephalixin in bulk and pharmaceutical formulation. *International Journal of Pharm. Tech. Research* 2009, 1, 527-536.
47. Panda, S. S.; Kumar, R. V. V. B.; *et al.* Determination of cephalixin monohydrate in pharmaceutical dosage form by stability-indicating RP-UFLC and UV spectroscopy methods. *Scientia Pharmaceutica* 2013, 81, 1029-1041.