UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos sustentáveis e triagem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila monoidratada em cápsulas

Bianca Aparecida de Marco Segatto

Processo CAPES n° 88882.180456/2018-01

Araraquara-SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos sustentáveis e triagem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila monoidratada em cápsulas

Bianca Aparecida de Marco Segatto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Hérida Regina Nunes Salgado

Coorientadora: Dra. Ana Carolina Kogawa

Araraquara-SP

2019

S454d

Seqatto, Bianca Aparecida de Marco.
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos sustentáveis e triaqem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila monoidratada em cápsulas / Bianca Aparecida de Marco Seqatto. – Araraquara, 2019.
214 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Proqrama de Pós-qraduação Em Ciências Farmacêuticas. Área de Desenvolvimento de Fármacos E Medicamentos.

Orientadora: Hérida Regina Nunes Salgado.
Coorientadora: Ana Carolina Koqawa.

1. Cefadroxila. 2. Turbidimetria. 3. Química verde. 4. Polimorfismo. 5. Espectrofotometria na reqião do infravermelho médio. 6. Cromatoqrafia líquida de alta eficiência (CLAE). 7. Espectrofotometria na reqião do visível. I. Salqado, Hérida Reqina Nunes, orient. II. Koqawa, Ana Carolina, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta Ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS SUSTENTÁVEIS E TRIAGEM PARA MODELO DE ESTUDO DE POLIMORFOS DE CEFADROXILA MONOIDRATADA EM CÁPSULAS

AUTORA: BIANCA APARECIDA DE MARCO SEGATTO

ORIENTADORA: HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

COORIENTADORA: ANA CAROLINA KOGAWA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF/UNESP – Araraquara

Prof. Dr. FELIPE REBELO LOURENÇO

Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. JACQUELINE NAKAU MENDONÇA

Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF/UNESP – Araraquara

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB

Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF/UNESP – Araraquara

Araraquara, 23 de abril de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus maiores exemplos,

***Edvaldo** e **Tereza Cristina**,*

pais maravilhosos e grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a aquele, que me permitiu chegar até aqui, a aquele que me guiou ao longo de toda a minha vida e nunca desistiu de cuidar de mim. A Deus, dirijo minha maior gratidão.

Agradeço imensamente meus pais, que compartilharam comigo cada etapa difícil e cansativa que muitas vezes enfrentei, ensinando sempre buscar apoio nos que amamos e fazendo com que eu nunca desistisse de minhas escolhas.

Agradeço minha irmã Beatriz de Marco, que por ser mais nova, sempre cuidou de mim como se fosse a mais velha, obrigada por ser a minha "psicóloga" preferida.

Agradeço meu marido Rafael Segatto, que viveu cada minuto de minha carreira acadêmica junto a mim, me apoiando em todas as direções que resolvi seguir e me ensinando que a paciência é uma bela virtude que se adquire com muito treino. Obrigada por ser o meu "porto seguro", eu Amo você!

Agredeço meus irmãos de coração Bernardo e Nice, que me amaram mesmo quando eu deixei de passear ou brincar.

Agradeço meu avô Álvaro (*in memorian*), que sempre fez questão de me dizer o quanto o estudo é importante, torcendo pelo meu futuro.

Agradeço aos meus amigos e familiares, vó, tias e tios, primas e primos, que torceram por mim nesta jornada e fizeram meu caminho parecer mais simples.

Agradeço meus sobrinhos Alice (afilhada) e Enzo, por não esquecerem de mim nas minhas ausências.

Um agradecimento especial aos queridos amigos Marina, Rômulo e Flavinha, que me incentivaram nesta caminhada, mostrando carinhosamente do que são feitas as verdadeiras amizades.

Agradeço à minha querida orientadora, professora Doutora Hérida Regina Nunes Salgado, pela oportunidade e confiança em me orientar, colaboração, dedicação ao nosso trabalho, incentivo e amizade.

Agradeço à minha querida coorientadora, Doutora Ana Carolina Kogawa, pelo incentivo, dedicação e principalmente amizade, obrigada por me ensinar que a Qualidade é um atributo adquirido por poucos.

Agradeço aos meus amigos de laboratório de Araraquara, que cresceram e dividiram comigo aprendizado, conquistas, alegrias, anseios e algumas tristezas que o ambiente acadêmico é capaz de nos proporcionar: Mariana Teixeira, Felipe Hugo, Eliane Tótoli, Caroline Magnani, Lívia, Lígia, Ivone, Mariana Menezes, Patrícia, Rúbia, Danilo, Tahisa, Josi, Ketylin, Jéssica Lima, Jéssica Richardi, Lóren, Bárbara, Clara e Isabela. Foi um imenso prazer dividir com vocês esta etapa de minha vida, com certeza vocês foram capazes de tornar meus dias mais alegres!

Um agradecimento especial à Mariana Teixeira e Felipe Hugo, que estiveram sempre ao meu lado durante a realização deste trabalho, me apoiando e trocando conhecimentos e alegrias.

Agradeço à Maria de Fátima Rodrigues, pelos ensinamentos quando fui estagiária e discente, pela amizade, cuidados com todos e exemplo de profissionalismo.

Agradeço em especial aos professores Doutores Marlus Chorilli e Selma Gutierrez Antonio por abrirem as portas de seus laboratórios, contribuindo com o desenvolvimento deste trabalho e de minha formação científica.

Agradeço o Prof. Doutor Rubén Mariano Maggio, pesquisador do departamento de química orgânica da Universidade Nacional de Rosário da Argentina, por ter me aceitado em meu estágio no exterior. Foi um enorme prazer fazer parte de sua equipe.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do laboratório de química orgânica da Universidade Nacional de Rosário da Argentina, por serem tão companheiros comigo nos meus três meses de estágio no exterior: Duvernis, Mariana, Natalia, Alberto, Dra. Patrícia, Dra. Silvana, Griselda, Dra. Alessandra, vocês com certeza fizeram meus dias mais leves.

Agradeço à EMS Indústria Farmacêutica (Hortolândia, SP, Brasil) pela gentil doação da cefadroxila substância química de referência e cápsulas.

Agradeço ao CNPq e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio financeiro concedido.

À Capes, agradeço a bolsa concedida - Código de financiamento: 88882.180456/2018-01.

EPÍGRAFE

“Para aqueles que estão determinados a voar, não ter asas é apenas um detalhe.”

Autor desconhecido

RESUMO

As infecções são a segunda maior causa de mortalidade mundial e diversos são os motivos que justificam a necessidade de novos estudos de agentes antimicrobianos. A cefadroxila é um antimicrobiano β-lactâmico pertencente ao grupo das cefalosporinas de primeira geração, sendo muito prescrita para tratamentos de infecções causadas principalmente por bactérias Gram-positivas. A realização de estudos relacionados ao controle de qualidade é imprescindível aos setores industriais, pois garantem as características dos medicamentos e a segurança e saúde dos pacientes. De acordo com esta importância, o objetivo do trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos físico-químicos e microbiológico para a identificação e quantificação da cefadroxila monoidratada cápsulas, além de desenvolver um modelo de triagem rápido para obtenção de polimorfos da cefadroxila, o qual permitiu caracterizar as diferentes formas obtidas e compará-las com a forma comercial monoidratada, tanto em aspectos físico-químicos como solubilidade e estabilidade, quanto em atividade antimicrobiana. Os métodos desenvolvidos e validados foram espectrofotometria na região do infravermelho médio, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do visível e ensaio microbiológico turbidimétrico, baseados na química verde e estando seus resultados em concordância com guias do ICH e legislação brasileira. No estudo de polimorfos, foram obtidas quatro diferentes formas a partir da cefadroxila anidra, com atividade contra o micro-organismo testado. Estatisticamente, os métodos validados mostraram-se rápidos, econômicos, confiáveis e seguros, bem como equivalentes, podendo ser intercambiáveis nas análises rotineiras das indústrias farmacêuticas e laboratórios de controle de qualidade. O modelo de triagem foi prático e seguro, podendo ser implantado nos setores de pesquisa e desenvolvimento para o estudo de polimorfismo de cefadroxila.

Palavras-chave: Cefadroxila. Espectrofotometria na região do infravermelho médio. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Espectrofotometria na região do visível. Turbidimetria. Química verde. Polimorfismo.

ABSTRACT

Infections are the second largest cause of worldwide mortality and several reasons for the need of new studies of antimicrobial agents. Cefadroxil is a β-lactam antimicrobial that belongs to the first-generation cephalosporin group and is highly prescribed for treatment of infections caused mainly by Gram-positive bacteria. The studies performance is related to quality control is essential for the industrial sectors, as they will guarantee the characteristics of the medicines, the safety and health of the patients. According to this importance, the objective of the work was to develop and validate physical-chemical and microbiological analytical methods for the identification and quantification of cefadroxil monohydrate capsules, in addition to develop a rapid screening model to obtain cefadroxil polymorphs, which is allowed to characterize different forms obtained and compare them with the commercial monohydrate form, both in physical-chemical aspects as solubility and stability as in antimicrobial activity. The methods developed and validated were spectrophotometry in the medium infrared region, high performance liquid chromatography (HPLC), spectrophotometry in the visible region and turbidimetric microbiological assay. All methods based on green chemistry and their results were in agreement with ICH guides and Brazilian legislation. In the study of polymorphs, were obtained four different forms obtained from the anhydrous cefadroxil, having presented all the different forms among themselves and activity against the tested microorganism. Statistically, the validated methods proved to be fast, economical, reliable and safe. They were all equivalent, and could be interchangeable in the analyzes routine of the pharmaceutical and quality control laboratories, besides the triage model proved to be practical and safe, can be implemented in the research and development sectors for the study of cefadroxil.

Keywords: Cefadroxil. Spectrophotometry in the medium infrared region. High performance liquid chromatography (HPLC). Spectrophotometry in the visible region. Turbidimetry. Green chemistry. Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos dos antimicrobianos β-lactâmicos e inibidores das β-lactamases. R: cadeia lateral 30
Figura 2. Estrutura química da cefalosporina C 31

Figura 3. Estrutura química geral das cefalosporinas 32

Figura 4. Esquema representativo das paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....34

Figura 5. Estrutura química da cefadroxila anidra (CAS 50370-12-2)…….....35

Figura 6. Síntese da cefadroxila.....36

Figura 7. Arranjo espacial do sistema cristalino da cefadroxila (A) e célula unitária da cefadroxila (B).....62

Figura 8. Representação esquemática (Energia livre/Temperatura) de dois tipos de polimorfos. Com temperaturas de transições (T_0) entre polimorfos (enantiotrópicos) e de livres de transições (monotrópicos).....65
Figura 9. Medidas relacionadas à determinação dos fatores de cauda (FC) e assimetria (As) do pico.....87

Figura 10. Fluxograma apresentando modelo de triagem sobre os métodos utilizados como ferramenta para obtenção de polimorfos obtidos a partir da cefadroxila anidra....103

Figura 11. Peso médio realizado para as cápsulas de cefadroxila monoidratada 500 mg.....108

Figura 12. Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho de cefadroxila monoidratada cápsulas e SQR.....109

Figura 13. Espectro de absorção por infravermelho da cefadroxila monoidratada SQR com suas principais bandas de absorção marcadas.....110

Figura 14. Espectro de absorção no UV para a cefadroxila monoidratada em solução aquosa a 50 µg/mL no desenvolvimento do método por CLAE.....112

Figura 15. Cromatogramas das soluções de cefadroxila monoidratada cápsulas (azul) e cefadroxila monoidratada SQR (preto) (50 µg/mL) sobrepostos obtidos no desenvolvimento do método por CLAE com coluna Zorbax SB C_{18}, fase móvel de água

+ ácido ortofosfórico 0,1% e etanol 92:8 (v/v), vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 230 nm.....113

Figura 16. Sobreposição dos espectros de absorção da cefadroxila monoidratada SQR (verde) e cefadroxila monoidratada cápsulas (vermelho) em 552 nm.....115

Figura 17. Diferentes concentrações de cefadroxila monoidratada SQR (A 15 µg/mL, B 35 µg/mL, C 55 µg/mL, D 75 µg/mL, E 95 µg/mL e F 115 µg/mL) em contato com o reagente colorido complexante composto por 1% de fenolftaleína + NaOH 0,1 *M*.....115

Figura 18. Espectro de absorção por infravermelho da cefadroxila monoidratada SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa em 1757,15 cm^{-1}, a qual corresponde à banda característica da carbonila da molécula.....117

Figura 19. Representação gráfica da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....119

Figura 20. Gráfico de resíduos padronizados referente à cefadroxila monoidratada SQR obtido com a técnica de espectrofotometria na região do infravermelho médio.....120

Figura 21. Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho de cefadroxila monoidratada SQR (azul), cefadroxila monoidratada cápsulas (vermelho) e adjuvantes (preto).....121

Figura 22. Gráfico de Pareto das interações das variáveis da robustez para o método espectrofotométrico na região do infravermelho médio.....124

Figura 23. Representação gráfica da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR pelo método CLAE.....127

Figura 24. Gráfico de resíduos padronizados referente à cefadroxila monoidratada SQR obtido com o método CLAE.....128

Figura 25. Cromatograma das soluções de cefadroxila monoidratada SQR (preto), cefadroxila monoidratada cápsulas (azul) e (50 µg/mL) e adjuvantes (verde) sobrepostos obtidos na seletividade do método por CLAE.....129

Figura 26. Cromatogramas das degradações de cefadroxila monoidratada cápsulas: (A) ácida; (B) alcalina; (C) oxidativa; (D) neutra e (E) fotolítica.....130

Figura 27. Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações superiores no teste de robustez por CLAE.....134

Figura 28. Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações inferiores no teste de robustez por CLAE.....135

Figura 29. Representação gráfica da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR através do método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....138

Figura 30. Gráfico de resíduos padronizados referente à cefadroxila monoidratada SQR obtido através do método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....139

Figura 31. Espectros de absorção apresentando a não interferência dos adjuvantes e reagente colorido complexante com a cefadroxila monoidratada no método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....140

Figura 32. Representação gráfica das curvas analíticas referentes à cefadroxila monoidratada SQR e cápsulas para o método turbidimétrico.....144

Figura 33. Representação gráfica da obtenção da forma anidra da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 110°C por 30 min.....153

Figura 34. Representação gráfica da obtenção da forma hemi-hidratada da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 70°C por 30 min.....154

Figura 35. Espectros de absorção na região do infravermelho médio das formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila.....156

Figura 36. Espectros de absorção na região do infravermelho próximo das formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila.....158

Figura 37. (A) Amostra contendo cefadroxila monoidratada SQR em 25°C, (B) amostra contendo cefadroxila monoidratada SQR em 197°C e (C) visualização do termômetro no momento em que a amostra foi fundida.....159

Figura 38. Representação gráfica das curvas TGA (A) e DTG (B) para as formas monoidratada, hemi-hidratada e anidra da cefadroxila em atmosfera inerte de nitrogênio.....160

Figura 39. Representação gráfica das curvas de aquecimento DSC para as formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila.....161

Figura 40. Cristais visualizados por microscopia óptica para as formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila com aumento total de 100x.....162

Figura 41. Curva analítica de soluções de cefadroxila monoidratada SQR, em concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL, obtida pela técnica espectrofotométrica na região do UV a 260 nm.....163

Figura 42. Perfil de dissolução para as amostras CFD-A (■), CFD-H (●) e CFD-M (▲), utilizando água purificada como meio de dissolução (37 ± 0,5°C), aparato II e velocidade de agitação de 100 rpm analisado em 260 nm.....165

Figura 43. Espectros de região de infravermelho médio das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 14 e CFD-A numa faixa de 400-1800 cm^{-1}.....168

Figura 44. Espectros de região de infravermelho médio das amostras 1, 15, 16, 17, 18 e CFD-A na faixa de 400-1800 cm^{-1}.....170

Figura 45. Espectros de região de infravermelho médio das amostras 1, 7, 8, 9, 12, 13, 15 e CFD-A na faixa de 400-1800 cm^{-1}.....171

Figura 46. Curvas de DSC das amostra 1, 7, 8, 9, 12, 13 e 15 (preto), sobrepostas com a curva de DSC da CFD-A (cinza).....173

Figura 47. Cristais obtidos por microscopia óptica para as amostras 1, 7, 8, 9, 12, 13 e 15 com aumento total de 100x.....175

Figura 48. Espectros de absorção na região do infravermelho próximo das amostras 1 (b), 7 (c), 8 (d), 13 (e) e 15 (f) obtidas a partir da cefadroxila anidra (a).....177

Figura 49. Perfil de dissolução das amostras de CFD-M (●) e amostras 1 (▲), 7 (○), 8 (∆), 13 (X) e 15 (■) obtidas a partir da cefadroxila anidra utilizando água como meio de dissolução (37 ± 0,5°C), aparato II, velocidade de agitação de 100 rpm em 260 nm.....181

Figura 50. Difratograma da cefadroxila anidra.....183

Figura 51. Difratograma da amostra 1 obtida a partir da cefadroxila anidra.....183

Figura 52. Difratograma da amostra 8 obtida a partir da cefadroxila anidra.....184

Figura 53. Difratograma da amostra 15 obtida a partir da cefadroxila anidra.....184

Figura 54. Difratogramas sobrepostos das amostras 1 (preto) e 8 (cinza) obtidas a partir da cefadroxila anidra.....185

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das cefalosporinas 33

Tabela 2. Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila...40

Tabela 3. Testes exigidos para cada categoria de métodos analíticos, de acordo com a finalidade.....56

Tabela 4. Delineamento para tomada de medidas que devem ser realizadas quando um sistema se comporta como monotrópico ou enantiotrópico.....66

Tabela 5. Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método de espectrofotometria por infravermelho médio para cefadroxila monoidratada.....84

Tabela 6. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada para o teste de recuperação do método de CLAE.....89

Tabela 7. Parâmetros utilizados pelo teste de Youden para avaliação da robustez do método por CLAE.....91

Tabela 8. Variações dos parâmetros utilizados no teste de Youden.....91

Tabela 9. Preparo das replicatas dos tubos para o ensaio de recuperação do método microbiológico turbidimétrico para a determinação da potência da cefadroxila monoidratada.....100

Tabela 10. Comparação das bandas de absorção apresentadas pela cefadroxila monoidratada SQR na região do infravermelho com dados apresentados na literatura..110

Tabela 11. Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método analítico para quantificação de cefadroxila monoidratada utilizando coluna Zorbax-SB C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 μm).....112

Tabela 12. Valores das absorbâncias referentes à cefadroxila monoidratada SQR para a construção da curva analítica através do método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.....118

Tabela 13. Análise de variância dos valores das absorbâncias determinados na obtenção da curva analítica de cefadroxila monoidratada SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.....119

Tabela 14. Avaliação estatística das precisões para cefadroxila monoidratada SQR pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.....122

Tabela 15. Determinação da exatidão do método analítico para análise de cefadroxila monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....122

Tabela 16. Parâmetros da avaliação da robustez pelo planejamento fatorial 2^3 do método analítico para análise de cefadroxila monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....123

Tabela 17. Análise da variância para robustez por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....123

Tabela 18. Parâmetros da conformidade do sistema cromatográfico calculados após definir as condições analíticas do método por CLAE.....125

Tabela 19. Valores das áreas referentes à cefadroxila monoidratada SQR para a construção da curva analítica através do método de CLAE.....126

Tabela 20. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de cefadroxila monoidratada SQR, utilizando o método CLAE.....127

Tabela 21. Parâmetros para avaliação da pureza dos picos e resultados de degradação acelerada da cefadroxila monoidratada cápsulas.....131

Tabela 22. Avaliação estatística das precisões para cefadroxila monoidratada SQR pelo método de CLAE.....132

Tabela 23. Determinação da exatidão do método analítico para análise de cefadroxila monoidratada por CLAE.....133

Tabela 24. Porcentagem dos teores encontrados para a cefadroxila monoidratada cápsulas nos ensaios superiores e inferiores e seus efeitos calculados para a robustez por CLAE.....134

Tabela 25. Valores das absorbâncias referentes à cefadroxila monoidratada SQR na construção da curva analítica pelo método miniaturizado por espectrofotometria na região do visível.....137

Tabela 26. Análise de variância dos valores das absorbâncias determinados na obtenção da curva analítica de cefadroxila monoidratada SQR pelo método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....138

Tabela 27. Avaliações estatísticas realizadas para o parâmetro da precisão para cefadroxila monoidratada SQR pelo método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....141

Tabela 28. Determinação da exatidão do método miniaturizado de espectrofotometria da região do visível pela comparação entre métodos.....142

Tabela 29. Valores calculados no teste-*t* para os parâmetros variados na robustez do método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....143

Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) determinada pelo ensaio turbidimétrico para a construção da curva analítica de cefadroxila monoidratada.....145

Tabela 31. Estudo comparativo da degradação no ensaio turbidimétrico e no método CLAE para o parâmetro de seletividade.....145

Tabela 32. Avaliações estatísticas realizadas para o parâmetro da precisão para cefadroxila monoidratada SQR no ensaio turbidimétrico.....146

Tabela 33. Determinação da exatidão do ensaio microbiológico turbidimétrico para a análise cefadroxila monoidratada.....147

Tabela 34. Valores calculados de teste-*t* para variáveis de parâmetro de robustez no método turbidimétrico para a determinação de cefadroxila monoidratada cápsulas.....148

Tabela 35. Valores obtidos na determinação do teor de cefadroxila monoidratada cápsulas utilizando os métodos propostos.....149

Tabela 36. Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento da cefadroxila monoidratada pelos métodos propostos.....150

Tabela 37. Valores obtidos na determinação do teor de cefadroxila monoidratada cápsulas utilizando os métodos propostos e análise estatística.....151

Tabela 38. Umidade percentual na obtenção da forma anidra da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 110°C por 30 min.....154

Tabela 39. Umidade percentual na obtenção da forma hemi-hidratada da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 70°C por 30 min.....155

Tabela 40. Bandas de absorção apresentadas para todas as formas de CFD por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....157

Tabela 41: Principais sinais e diferenças apresentadas para todas as formas de CFD por espectrofotometria na região do infravermelho próximo.....158

Tabela 42. Valores das absorbâncias determinadas na curva analítica pela técnica espectrofotométrica na região do UV em 260 nm.....163

Tabela 43. Valores referentes aos perfis de dissolução das amostras de cefadroxila anidra, hemi-hidratada e monoidratada.....164

Tabela 44. Termos descritos para designar a solubilidade dos compostos.....166

Tabela 45. Solubilidade da cefadroxila monoidratada SQR em diferentes solventes a 25°C.....166

Tabela 46. Principais sinais e diferenças apresentadas para as amostras 1, 7, 8, 13 e 15 obtidas a partir da CFD-A por espectrofotometria na região do infravermelho próximo.....178

Tabela 47. Valores referentes aos perfis de dissolução das amostras 1, 7, 8, 13 e 15 obtidas a partir da cefadroxila anidra.....180

Tabela 48. Porcentagens determinadas para a cefadroxila monoidratada cápsulas e formas obtidas a partir da cefadroxila anidra.....187

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Fator de assimetria
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
ATCC	*American Type Culture Collection*
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BHI	*Brain heart infusion*
CAS	*Chemical Abstract Service*
CFD	Cefadroxila
CFD-A	Cefadroxila anidra
CFD-H	Cefadroxila hemi-hidratada
CFD-M	Cefadroxila monoidratada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMOS	*Complementary metal-oxide semiconductor*
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMF	Dimetilformamida
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPR%	Desvio padrão relativo em porcentagem
DSC	*Differential scanning calorimetry*
DTG	Termogravimetria derivada
FC	Fator de cauda
Fcal	Valor de F calculado
FDA	*Food and Drug Administration*
FI-CL	Quimioluminescência por injeção de fluxo
FM	Fase móvel
Ftab	Valor de F tabelado
FT-IR	Espectrofotometria com transformada de Fourier no infravermelho
gl	Graus de liberdade
IAL	*Instituto Adolfo Lutz*
ICDD	*International Center for Diffraction Data*

ICH	*International Conference on Harmonization*
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IR	*Infrared*
ISO	*International Standard Organization*
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
IV	Infravermelho
k	Fator de retenção
kN	Quilonewtons
M	Concentração molar
MQ	Mínimos quadrados
N	Número de pratos
NIR	*Near infrared spectroscopy*
OMS	Organização Mundial de Saúde
PF	Ponto de fusão
POP	Procedimentos Operacionais Padrão
PSD	*Position sensitive detector*
QM	Quadrados médios
r	Coeficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
TGA	Análise termogravimétrica
TPSA	*Topological polar surface area*
$\mathbf{t_R}$	Tempo de retenção
TSA	*Tryptic soy agar*
$\mathbf{t_0}$	Tempo zero
USP	*United States Pharmacopoeial Convention*
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....27
2. REVISÃO DE LITERATURA.....29
2.1. Antimicrobianos β-lactâmicos.....29
2.2. Cefalosporinas.....31
2.3. Cefadroxila.....35
2.3.1. Modificação estrutural.....36
2.3.2. Mecanismo de ação.....37
2.3.3. Farmacocinética e farmacodinâmica.....37
2.3.4. Propriedades físico-químicas.....37
2.3.5. Interações medicamentosas.....38
2.3.6. Contra-indicações.....38
2.3.7. Métodos analíticos para determinação da cefadroxila.....39
2.4. Controle de qualidade.....53
2.5. Química verde.....54
2.6. Validação de métodos.....55
2.7. Complexos e polimorfos da cefadroxila na literatura.....58
2.8. Polimorfismo.....59
2.9. Classificação e nomenclatura dos polimorfos.....60
2.10. Polimorfismo na indústria farmacêutica.....61
2.10.1. Propriedades cristalinas.....61
2.10.2. Biodisponibilidade.....62
2.10.3. Estabilidade química.....64
2.10.4. Aspectos regulatórios na área farmacêutica.....66
2.11. Técnicas utilizadas no estudo de polimorfos.....68
2.11.1. Microscopia.....68
2.11.2. Difratometria de raios X.....69
2.11.3. Determinação do ponto de fusão.....70
2.11.4. Análise térmica.....70
2.11.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....70
2.11.4.2. Análise termogravimétrica (TGA).....71
2.11.4.3. Termogravimetria derivada (DTG).....71
2.11.5. Espectroscopia vibracional.....71

2.11.5.1. Espectroscopia no infravermelho próximo.....71
2.11.5.2. Espectroscopia no infravermelho médio.....72
2.11.6. Dissolução.....72
3. OBJETIVOS.....73
3.1. Objetivo geral.....73
3.2. Objetivos específicos.....73
4. MATERIAL.....74
4.1. Substância química de referência (SQR).....74
4.2. Amostra da forma farmacêutica cápsulas.....74
4.3. Adjuvantes.....75
4.4. Equipamentos utilizados para o desenvolvimento e validação de métodos.....75
4.4.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio.....75
4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....75
4.4.3. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....76
4.4.4. Método microbiológico turbidimétrico.....76
4.5. Equipamentos utilizados no estudo de triagem de polimorfos da cefadroxila.....77
4.5.1. Obtenção dos polimorfos da cefadroxila.....77
4.5.2. Espectrofotometria na região do infravermelho médio e próximo.....77
4.5.3. Análise térmica (TGA/DTG e DSC).....78
4.5.4. Determinação do ponto de fusão.....78
4.5.5. Difração de raios X.....78
4.5.6. Dissolução intrínseca.....78
4.5.7. Microscopia óptica.....78
5. MÉTODOS.....79
5.1. Análise qualitativa.....79
5.1.1. Peso médio.....79
5.1.2. Características físicas.....79
5.1.3. Espectrofotometria na região do infravermelho médio.....79
5.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....79
5.1.5. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....80
5.2. Análise quantitativa.....81
5.2.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio.....81
5.2.1.1.Obtenção da curva analítica.....81
5.2.1.2.Preparo das pastilhas de cefadroxila monoidratada SQR.....82

5.2.1.3.Preparo das pastilhas de cefadroxila monoidratada em cápsulas.....82
5.2.1.4.Preparo das pastilhas dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada.....82
5.2.1.5.Validação do método.....82
5.2.1.5.1. Linearidade.....83
5.2.1.5.2. Seletividade.....83
5.2.1.5.3. Precisão.....83
5.2.1.5.4. Exatidão.....83
5.2.1.5.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....84
5.2.1.5.6. Robustez.....84
5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....85
5.2.2.1.Obtenção da curva analítica.....85
5.2.2.2.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR.....85
5.2.2.3.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas.....85
5.2.2.4.Preparo das soluções dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada.....86
5.2.2.5.Validação do método.....86
5.2.2.5.1. Conformidade do sistema.....86
5.2.2.5.2. Linearidade.....88
5.2.2.5.3. Seletividade.....88
5.2.2.5.4. Precisão.....89
5.2.2.5.5. Exatidão.....89
5.2.2.5.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....90
5.2.2.5.7. Robustez.....90
5.2.3. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....91
5.2.3.1.Obtenção da curva analítica.....91
5.2.3.2.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR.....92
5.2.3.3.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas.....92
5.2.3.4.Preparo das soluções dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada.....93
5.2.3.5.Preparo da solução do reagente colorido complexante.....93
5.2.3.6.Validação do método.....93
5.2.3.6.1. Linearidade.....93
5.2.3.6.2. Seletividade.....93

5.2.3.6.3. Precisão.....94
5.2.3.6.4. Exatidão.....94
5.2.3.6.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....95
5.2.3.6.6. Robustez.....95
5.2.4. Método microbiológico turbidimétrico.....95
5.2.4.1.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR.....95
5.2.4.2.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas.....96
5.2.4.3.Preparo das soluções dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada.....96
5.2.4.4.Preparação e padronização do inóculo.....96
5.2.4.5.Ensaio Microbiológico.....97
5.2.4.6.Validação do método.....97
5.2.4.6.1. Linearidade.....98
5.2.4.6.2. Seletividade.....98
5.2.4.6.3. Precisão.....99
5.2.4.6.4. Exatidão.....99
5.2.4.6.5. Robustez.....100
5.2.5. Análise comparativa entre os métodos validados.....100
5.2.5.1.Análise comparativa entre os métodos físico-químicos.....100
5.2.5.2.Análise comparativa entre métodos microbiológico e físico-químico.....101
5.3. Triagem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila.....101
5.3.1. Obtenção das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada da cefadroxila.....101
5.3.2. Ensaio de solubilidade.....101
5.3.3. Obtenção das formas polimórficas da cefadroxila.....101
5.3.4. Técnicas analíticas para caracterização das formas da cefadroxila.....104
5.3.4.1.Espectrofotometria na região do infravermelho médio e próximo.....104
5.3.4.2.Determinação do ponto de fusão.....104
5.3.4.3.Análise térmica (TGA/DTG e DSC).....104
5.3.4.4.Difração de raios X.....105
5.3.4.5.Dissolução intrínseca.....105
5.3.4.6.Microscopia óptica.....106
5.3.5. Aplicação das formas polimórficas da cefadroxila no ensaio microbiológico por turbidimetria.....106
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....108

6.1. Análise qualitativa.....108
6.1.1. Peso médio.....108
6.1.2. Características físicas.....108
6.1.3. Espectrofotometria na região do infravermelho médio.....109
6.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....111
6.1.5. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....114
6.2. Análise quantitativa.....116
6.2.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio.....116
6.2.1.1.Linearidade.....117
6.2.1.2.Seletividade.....120
6.2.1.3.Precisão.....121
6.2.1.4.Exatidão.....122
6.2.1.5.Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....123
6.2.1.6.Robustez.....123
6.2.1.7.Análise conclusiva sobre o método validado.....124
6.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....125
6.2.2.1.Conformidade do sistema.....125
6.2.2.2.Linearidade.....125
6.2.2.3.Seletividade.....128
6.2.2.4.Precisão.....131
6.2.2.5.Exatidão.....132
6.2.2.6.Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....133
6.2.2.7.Robustez.....133
6.2.2.8.Análise conclusiva sobre o método validado.....135
6.2.3. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.....136
6.2.3.1.Linearidade.....136
6.2.3.2.Seletividade.....139
6.2.3.3.Precisão.....140
6.2.3.4.Exatidão.....141
6.2.3.5.Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....142
6.2.3.6.Robustez.....142
6.2.3.7.Análise conclusiva sobre o método validado.....143
6.2.4. Método microbiológico turbidimétrico.....144
6.2.4.1.Linearidade.....144

6.2.4.2.Seletividade.....145
6.2.4.3.Precisão.....146
6.2.4.4.Exatidão.....146
6.2.4.5.Robustez.....147
6.2.4.6.Análise conclusiva sobre o método validado.....148
6.2.5. Análise comparativa entre os métodos validados.....149
6.2.5.1.Análise comparativa entre os métodos físico-químicos.....149
6.2.5.2.Análise comparativa entre métodos microbiológico e físico-químico.....151
6.3. Triagem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila.....153
6.3.1. Obtenção das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada da cefadroxila.....153
6.3.1.1.Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....156
6.3.1.2.Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho próximo.....157
6.3.1.3.Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por determinação do ponto de fusão.....159
6.3.1.4.Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por análises térmicas de TGA/DTG e DSC.....160
6.3.1.5.Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por microscopia óptica.....162
6.3.1.6.Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por teste de dissolução intrínseca.....162
6.3.2. Ensaio de solubilidade.....165
6.3.3. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila.....167
6.3.3.1.Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por espectrofotometria na região do infravermelho médio.....167
6.3.3.2.Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por análise térmica (DSC)..... 172
6.3.3.3.Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por determinação do ponto de fusão.....174
6.3.3.4.Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por microscopia óptica.174
6.3.3.5.Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por espectrofotometria na região do infravermelho próximo.....176

6.3.3.6.Caracterização das polimórficas da cefadroxila pelo teste de dissolução intrínseca.....179
6.3.3.7.Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por difração de raios X.182
6.3.3.8.Análise conclusiva sobre a triagem para modelo de estudo de polimorfos.....185
6.3.4. Aplicação das formas polimórficas da cefadroxila no ensaio microbiológico por turbidimetria.....186
7. CONCLUSÃO.....188
8. REFERÊNCIAS.....188

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas pelas infecções sempre estiveram presentes na história da humanidade (JONES & VARNAM, 2002). Sendo a segunda maior causa de mortalidade mundial, diversos são os motivos que justificam a necessidade de estudos de novos agentes antimicrobianos, como exemplo, a resistência microbiana e as más condições de higiene que favorecem a proliferação de bactérias e sua alta capacidade de adaptação a fatores diversos (ARAÚJO et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo inapropriado de antimicrobianos tem sido muito preocupante devido ao uso desnecessário destes medicamentos pela população que os consomem sem prescrição médica e, consequentemente, acarretam na resistência dos micro-organismos frente à atividade do fármaco (NOVARETTI et al., 2014).

Os antimicrobianos podem ser provindos de fontes sintéticas ou naturais, sendo bactericidas e fungicidas quando causam, respectivamente, a morte de bactérias ou fungos, ou bacteriostáticos e fungistáticos, quando inibem o seu crescimento (GUIMARÃES et al., 2010).

Dentre os vários grupos de antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico, as cefalosporinas se destacam por apresentarem eficácia nos tratamentos de infecções causadas pela maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. São pertencentes ao grupo dos β-lactâmicos e possuem basicamente as mesmas características estruturais da penicilina (MELLA et al., 2001; SALEH et al., 2009).

As cefalosporinas podem ser classificadas em cinco diferentes gerações, as quais se diferenciam pelas características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e às atividades antimicrobianas que possuem (VIEIRA et al., 2012; FERNANDES et al., 2013).

Entre as cefalosporinas de primeira geração, encontra-se a cefadroxila, que apresentou nos últimos anos vendas bastante recorrentes, sendo um dos fármacos de escolha para tratamentos de quase todas as infecções (NICOLINI et al., 2008; FIOL et al., 2010; TANJUNG & NASUTION, 2017; AMBARWATI et al., 2018).

Devido à elevada venda deste antimicrobiano, o aumento da resistência e à ampla diversidade de micro-organismos, o estudo dos antimicrobianos é cada vez mais necessário principalmente sobre o controle de qualidade, que envolve pesquisas e

desenvolvimento de métodos analíticos altamente relevantes para a otimização das análises nas indústrias e a garantia da qualidade do produto já comercializado (HOEFEL & LAUTERT, 2006; BONFILIO et al., 2010).

O controle de qualidade contribui com a eficácia terapêutica e a segurança dos pacientes através da manutenção das especificações estabelecidas dos produtos comercializados, mantendo por sua vez, as características e eficácia terapêutica com padronizações e organizações dos serviços e processos, gerando a confiança, segurança e qualidade dos produtos finais (HOEFEL & LAUTERT, 2006).

A implantação da química verde ao controle de qualidade, permite a preservação do meio ambiente, através da conscientização sobre o uso de solventes tóxicos, diminuição da geração de resíduos, tempo de produção e segurança aos analistas, que, consequentemente conceberão lucros às indústrias farmacêuticas (BONFILIO et al., 2010; HALEEM et al., 2013).

São muitos os métodos analíticos disponibilizados na literatura e compêndios oficiais que identificam e quantificam a cefadroxila, porém a maior parte não se enquadra no conceito da química verde, por utilizar solventes tóxicos, acarretar risco aos operadores e gerar resíduos tóxicos, sendo crescente a preocupação em conscientizar as indústrias farmacêuticas a adotarem métodos ecologicamente corretos, que permitam apresentar resultados confiáveis, simples e com custos reduzidos das despesas e equipamentos (MARCO & SALGADO, 2017).

Além de contribuir com o meio ambiente, desenvolver métodos de análises baseados na química verde irão assegurar a saúde dos operadores e favorecer as indústrias farmacêuticas no controle de qualidade da cefadroxila. Além disso, os métodos existentes na literatura científica apresentam muitas desvantagens, sendo assim, o desenvolvimento de métodos ambientalmente favoráveis só tem a proporcionar benefícios na garantia e confiança nos resultados para a aplicação do fármaco.

Desta forma, o trabalho apresenta o desenvolvimento e a validação de quatro métodos analíticos, sendo três físico-químicos e um microbiológico, os quais apresentaram relevantes contribuições à química verde por mostrarem resultados que garantem e asseguram não somente a saúde dos pacientes como também a dos operadores, uma vez que diminuem consideravelmente a quantidade de solventes orgânicos utilizados e a geração de resíduos tóxicos, além de análises rápidas e economicamente favoráveis.

Além da importância de contribuir com a química verde com a implantação desses métodos analíticos nas indústrias e laboratórios de controle de qualidade e desenvolvimento e pesquisa, o estudo também traz uma triagem de modelo de estudo de polimorfismo, como sendo uma alternativa para implantação nos setores industriais.

O estudo de polimorfismo de fármacos é de extrema importância para a qualidade de medicamentos, uma vez que pode implicar na minimização de riscos à população. Formas polimórficas distintas para o mesmo fármaco podem apresentar maior estabilidade química que a forma anidra, necessitando de pesquisas que comprovem o monitoramento e o controle de qualidade dessas formas cristalinas existentes, as quais podem ser decisivas para determinar uma formulação farmacêutica e assegurar a eficácia dos medicamentos (ARAÚJO et al., 2012).

Baseado nesta importância, implantou-se ao trabalho um modelo de triagem de estudo de polimorfos da cefadroxila, a fim de investigar a presença de outras formas que possam existir nos processos de produção, tornando-se fundamental identificar e caracterizar a diferença entre elas com técnicas de detecção e teste microbiológico, a fim de comprovar a segurança e estabilidade química do fármaco de acordo com a mudança estrutural da sua forma cristalina (BONFILIO et al., 2012; BLANDIZZI et al., 2015; CORRÊA et al., 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Antimicrobianos β-lactâmicos

Os antimicrobianos classificados como β-lactâmicos são amplamente utilizados pela população devido à sua eficácia terapêutica e à baixa toxicidade. Possuem em comum um anel β-lactâmico em seu núcleo estrutural e formam em geral a maior classe familiar de antibacterianos existentes no mercado farmacêutico (SUÁREZ & GUDIOL, 2009; SILVA, 2010; BRASIL, 2019a).

O núcleo β-lactâmico é o esqueleto básico destes antimicrobianos e quando diferentes cadeias lineares se associam com este núcleo formam compostos com propriedades distintas, resultando em grupos de antimicrobianos β-lactâmicos (Figura 1) como: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e grupos com inibidores das β-lactamases (enzimas produzidas por algumas bactérias, sendo

responsáveis pela resistência aos antimicrobianos β-lactâmicos) (SILVA, 2010; NAKANO et al., 2018; BRASIL, 2019a).

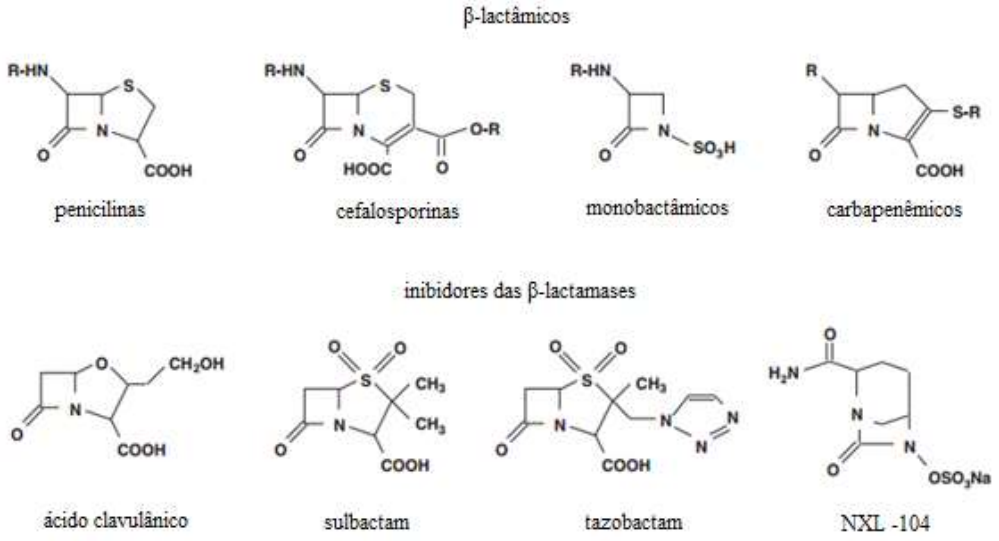


Figura 1. Grupos dos antimicrobianos β-lactâmicos e inibidores das β-lactamases. R: cadeia lateral.
Fonte: adaptado de NORDMANN et al., 2012

As penicilinas, produzidas pelos fungos do gênero *Penicillium*, foram utilizadas pela primeira vez em 1942, as quais promoveram inúmeras curas para uma grande parte de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, porém com baixa atividade contra as Gram-negativas (OLIVEIRA et al., 2009). As cefalosporinas, por sua vez, foram isoladas a partir do fungo *Cephalosporium acremonium* por volta do ano de 1948, quando apresentaram forte atividade contra algumas bactérias Gram-negativas devido à sua maior estabilidade à muitas β-lactamases, possuindo um amplo espectro de atividade (OLIVEIRA et al., 2009; KATZUNG, 2014).

Com o surgimento de micro-organismos multirresistentes, novos antimicrobianos precisaram ser desenvolvidos. Por volta dos anos 1980, os carbapenêmicos e os monobactâmicos surgiram pela primeira vez. Os carbapenêmicos, disponíveis atualmente na prática clínica nos EUA, Europa e Brasil, foram identificados pela primeira vez em 1982, apresentando amplo espectro de ação para uso das infecções sistêmicas e conferindo grande estabilidade às β-lactamases com penetração na maioria dos sítios alvos para cura de infecções graves (NORDMANN et al., 2012; BRASIL, 2019b). Já os monobactâmicos, com espectro não usual de ação, são efetivos contra bastonetes Gram-negativos, demonstrando grande especificidade contra *Pseudomonas aeruginosa,*

surgiram pela primeira vez em 1981, sendo caracterizados por um anel monocíclico em sua estrutura (RANG et al., 2012; ZEITLER et al., 2012; BRASIL, 2019c).

Devido à necessidade de aumentar o espectro de ação das penicilinas, os inibidores das β-lactamases foram reconhecidos no final dos anos 60, mostrando ótima atividade contra micro-organismos produtores das β-lactamases por evitar a inativação do antimicrobiano (LIAO et al., 2006; SUAREZ & GUDIOL, 2009).

2.2. Cefalosporinas

O segundo maior grupo entre os antimicrobianos β-lactâmicos é o das cefalosporinas (GUIMARÃES et al., 2010). A descoberta da molécula precursora do grupo das cefalosporinas, denominada cefalosporina C (Figura 2), surgiu no final dos anos 1940, na Itália, quando o pesquisador italiano Giuseppe Brotzu isolou o fungo *Cephalosporium acremonium* de um esgoto na ilha de Sardenha (ASBEL & LEVISON, 2000; CLIMENI et al., 2009). Mais tarde, o fungo isolado constituiu outras duas diferentes cefalosporinas, a cefalosporina N e a cefalosporina P, sendo a N e a C quimicamente relacionadas às penicilinas, diferindo a cefalosporina P por se assemelhar ao ácido fusídico (MARÍN et al., 1998).

A cefalosporina C é uma das principais substâncias produzidas pelo fungo *C. acremonium*. Após a definição desta molécula, uma modificação nas cadeias laterais fixas ao núcleo ampliou o espectro de ação deste fármaco dando origem a fármacos semi-sintéticos, os quais adquiriram grande importância para tratamentos de infecções bacterianas (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1998).

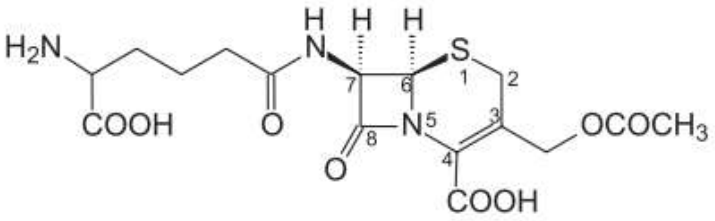


Figura 2. Estrutura química da cefalosporina C.

Fonte: OLIVEIRA et al., 2009

Uma cefalosporina apresenta em sua estrutura molecular o ácido 7-aminocefalosporânico, o qual é responsável pela atividade bacteriana, principalmente quando cadeias laterais substituídas nos carbonos 3 e 7 ocorrem. Este ácido possui um sistema bicíclico unido de um anel β-lactâmico e um anel de diidrotiazina de seis membros, que irão dar a estrutura base (Figura 3) para várias classes de cefalosporinas. Alterações nas posições representadas pelos radicais 1 e 2 irão também influenciar na ação farmacológica e farmacocinética da molécula (EL-SHABOURY et al., 2007; RANG et al., 2012; DERAYEA et al., 2016).

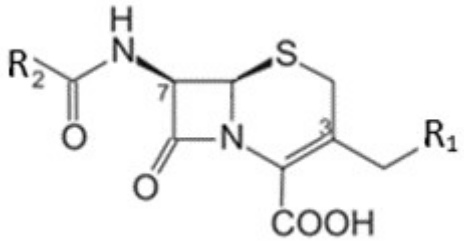


Figura 3. Estrutura química geral das cefalosporinas.
Fonte: adaptado de WILLIAMS, 1999

Através das modificações ocorridas na estrutura geral das cefalosporinas, cinco diferentes classes foram definidas e separadas de acordo com seus espectros antimicrobianos, estabilidade físico-química e à β-lactamase, absorção, metabolismo e efeitos colaterais (FERNANDES et al., 2013). A Tabela 1 apresenta a classificação das gerações das cefalosporinas, bem como o nome de todos os fármacos que nela se encontram e suas específicas atividades.

Tabela 1. Classificação das cefalosporinas.

Geração	Fármacos	Atividades específicas
Primeira Geração	cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefadroxila cefapirina, cefradina	Bastante ativas contra cocos Gram-positivos exceto enterococos e estafilococos resistentes à meticilina e algumas bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*.
Segunda Geração	cefoxitina, cefuroxima cefaclor, cefamandol cefonicida, ceforanida cefmetazol, cefotetam, cefminox	Maior atividade contra enterobactérias, *Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae,* incluindo cepas produtoras de β-lactamases.
Terceira Geração	cefotaxima, ceftizoxima ceftriaxona, ceftazidima cefoperazona, cefixima ceftibuten, cefdinir	Mais potentes contra bacilos Gram-negativos facultativos (incluindo os que apresentam sensibilidade intermediária às penicilinas), entre outros estreptococos.
Quarta Geração	cefepima, cefpiroma	Resistentes a β-lactamases, ativas contra Gram-negativas, incluindo atividade antipseudomonas, bastante ativas contra cocos Gram-positivos especialmente estafilococos sensíveis à oxacilina.
Quinta Geração	ceftarolina, ceftobiprole	São eficazes contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. Ativos contra bactérias Gram-genativas anaeróbicas, apresentam maior espectro contra β-lactamases.

Fonte: BRASIL, 2019d; FERNANDES et al., 2013.

Todas as cefalosporinas possuem como mecanismo de ação a interferência na síntese da parede bacteriana (KATZUNG, 2014). As paredes das bactérias são constituídas de peptideoglicanos (aminoaçúcares unidos por ligações cruzadas de cadeias de peptídeos), os quais irão conferir estabilidade mecânica pelas ligações presentes (PATRICK, 2010). As bactérias Gram-positivas possuem mais de 50% da camada de peptideoglicano em sua parede celular, enquanto que nas Gram-negativas esta camada varia entre 10 e 20%. Como pode ser visto na Figura 4, a diferença entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas não está somente relacionada à quantidade de peptideoglicano, mas também devido à presença de outras estruturas lipídicas e proteicas, que nas Gram-negativas encontram-se presentes em 58% e nas positivas inferiores a 3%, e lipopolissacarídeo, estrutura presente somente na parede celular de Gram-negativas (NAKANO et al., 2013).

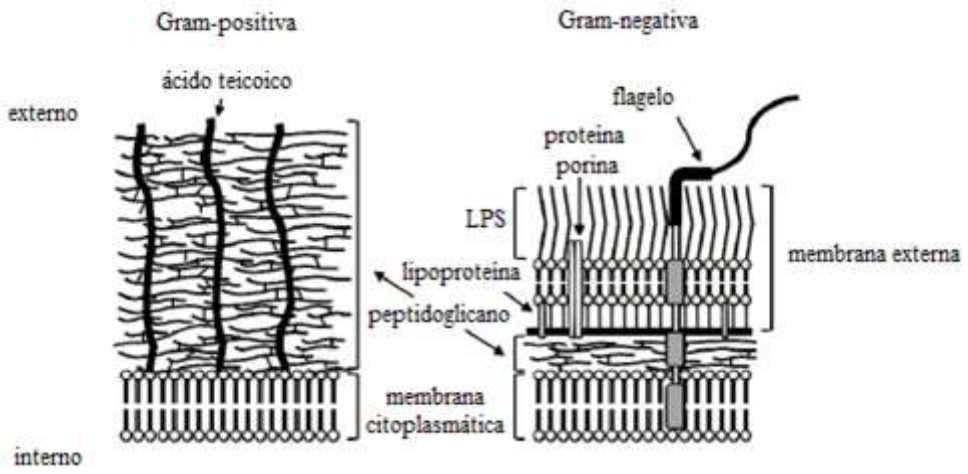


Figura 4. Esquema representativo das paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Fonte: adaptado de NAKANO et al., 2013

Para ocorrer ação farmacológica, os antimicrobianos precisam ultrapassar a camada de peptideoglicano para atingir a membrana citoplasmática (WILDNER et al., 2011). As cefalosporinas apresentam uma estrutura química semelhante aos aminoácidos terminais presentes nos peptídeos dos peptideoglicanos, onde irão se ligar irreversivelmente ao sítio ativo das transpeptidases e impedir que a catalisação da síntese das ligações cruzadas ocorra, gerando lise da célula bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010; KATZUNG, 2014).

Um dos maiores problemas que a população vem enfrentando nos últimos anos é a resistência bacteriana (NOVARETTI et al., 2014). O principal objetivo das cefalosporinas terem sido desenvolvidas em várias gerações foi devido às grandes mudanças nos perfis dos patógenos e à diminuição generalizada da suscetibilidade a esses antimicrobianos (FERNANDES et al., 2013).

Apesar das gerações das cefalosporinas terem sido desenvolvidas, estudos comprovaram que significativas vendas ocorridas de cefalosporinas de primeira geração contribuíram para a resistência microbiana por serem fármacos de primeira escolha para o tratamento de quase todas as infecções, sendo também indicados na profilaxia de várias cirurgias (LICHTENFELS et al., 2007; NICOLINI et al., 2008; FIOL et al., 2010; NAGARAJAN et al., 2013; JAIN et al., 2014; BRASIL, 2019d).

2.3. Cefadroxila

Entre as cefalosporinas de primeira geração, encontra-se a cefadroxila e sua estrutura molecular está mostrada na Figura 5. É um antimicrobiano semi-sintético destinado à administração oral e eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo pneumococos, estreptococos e estafilococos com exceção dos enterococos e estafilococos resistentes à meticilina e algumas bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e cocos anaeróbicos (KATZUNG, 2014).

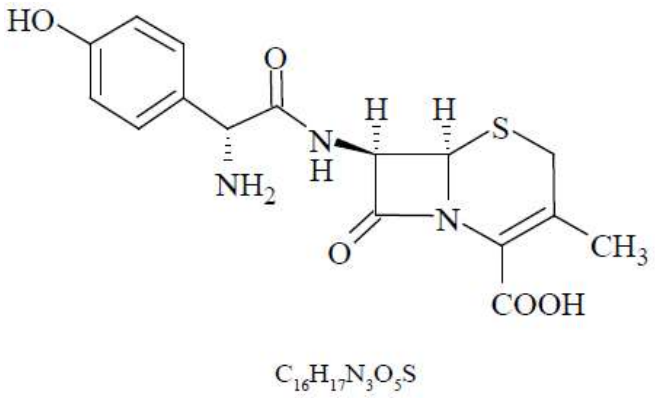


Figura 5. Estrutura química da cefadroxila anidra (CAS 50370-12-2)
Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

Este antimicrobiano se destaca por apresentar elevado potencial quimioterapêutico no combate infecções de pele como lesões estafilocócicas ou até mesmo pequenas infecções polimicrobianas como abscessos de tecido mole e/ou celulites, faringite, amigdalite, gonorreia, infecções de ouvido e trato urinário e infecções pós-cirúrgicas. Porém, a cefadroxila não é recomendada como tratamento de escolha para infecções sistêmicas graves (DELUCIA et al., 2007; SHARIF et al., 2010; KATZUNG, 2014; DRUG BANK, 2018).

A cefadroxila é comercializada no Brasil nas apresentações farmacêuticas: cápsulas duras de 500 mg e em pó para suspensão de 50 mg/mL e 100 mg/mL (BRASIL, 2019e; BRASIL, 2019f).

No Brasil, a cefadroxila pode ser encontrada pelo nome Cefamox® do laboratório Bristol-M-Squibb como produto de referência, ou também são comercializados os

produtos similares: Cedroxil® (Legrand), Neo Cefadril® (Neo Química), Celoxin® (Vitapan) e Drocef® (Eurofarma) (BPR, 2016).

O fármaco também pode ser encontrado pelo nome cefadroxila (assinalado com "G") pela classe dos genéricos produzidos pelas empresas Abbott, Apotex, Biosintética, Brainfarma, EMS, Eurofarma, Medley, Mepha-ratiopharm, Novartis, Rambaxy e Teuto, todos com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento de infecções por micro-organismos sensíveis à cefadroxila (BPR, 2016; BRASIL, 2019f).

2.3.1. Modificação estrutural

De acordo com a Figura 6, é possível analisar a síntese da estrutura molecular da cefadroxila, que procede de um derivado de D-(-)-4-hidroxifenilglicina com grupo amina protegido em forma de enamina + acetoacetato de metila. Esse grupo carboxílico se ativa por conversão de um anidrido por reação com clorofórmio de etila em presença de trietilamina. O derivado ativado reage com 7-ADCA e libera a função amina por hidrólise ácida (GARCIA et al., 2005).

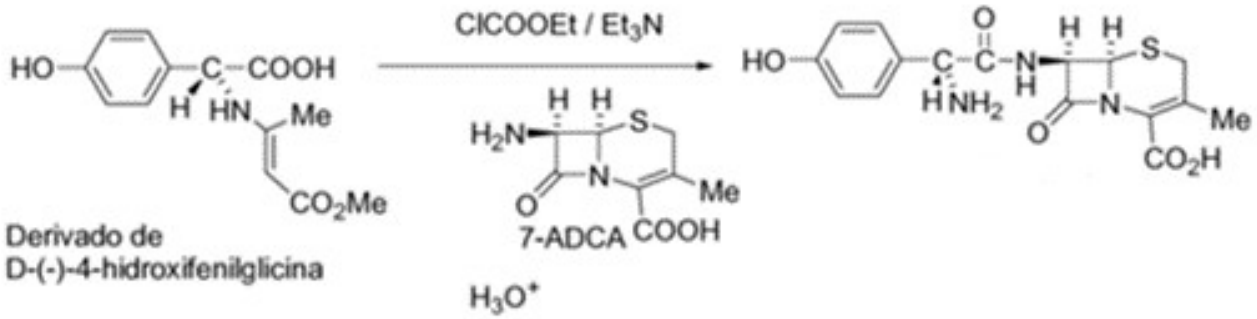


Figura 6. Síntese da cefadroxila.
Fonte: GARCIA et al., 2005

A cefadroxila é encontrada sob três formas: cefadroxila anidra (CAS 50370-12-2), cefadroxila hemi-hidratada (CAS 119922-85-9) e cefadroxila monoidratada (CAS 66592-87-8) (FARMACOPEIA ARGENTINA, 2003; IP, 2007; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JP, 2011; BP, 2012; EP, 2013; USP 37, 2018).

2.3.2. Mecanismo de ação

A síntese da parede celular bacteriana é catalisada por enzimas específicas, denominadas transpeptidases, que tornam semi-rígida a parede celular das bactérias por ligações cruzadas que mantêm uma pressão osmótica elevada, conferindo rigidez, proteção e forma ao micro-organismo (MADIGAN et al., 2016).

Por ser um antimicrobiano β-lactâmico, a cefadroxila irá inibir a síntese da parede celular das bactérias formada pela última etapa na síntese de peptideoglicano, ou seja, a reação da transpeptidação responsável por formar as ligações cruzadas entre as cadeias laterais de polissacarídeos, presentes no peptideoglicano da parede celular, será interrompida. Apesar da parede celular continuar a se formar em outras etapas da síntese, tornará progressivamente mais fraca à medida em que o esqueleto de peptidoglicano for incorporado. Com uma parede celular enfraquecida, a diferença de pressão osmótica entre os meios extra e intracelular provocará a morte das bactérias por lise célular (WILSON et al., 2011).

2.3.3. Farmacocinética e farmacodinâmica

A cefadroxila é o análogo *para*-hidroxi para a cefalexina (cefalosporina de primeira geração), e possui atividade *in vitro* muito semelhante à cefalexina, porém sua concentração no plasma e na urina é ligeiramente maior (DELUCIA et al., 2007).

As formulações farmacêuticas existentes para a cefadroxila se encontram na forma de cápsulas, comprimidos e pó para suspensão. Ao término de 1 – 3 horas após a administração oral, a cefadroxila é rapidamente absorvida, podendo obter as máximas concentrações de sua substância ativa (AHFS, 2014; DEF, 2016).

As ligações proteicas da cefadroxila às proteínas plasmáticas encontram-se no limite entre 15 e 20%, apresentando 90% do ingrediente farmacêutico ativo inalterado quando eliminado pela urina dentro de 24 horas (AHFS, 2014; DEF, 2016).

2.3.4. Propriedades físico-químicas

A cefadroxila é um antimicrobiano semi-sintético destinado à administração oral de cor branca e/ou quase branca, quimicamente é designado como ácido (6*R*,7*R*)-7-[(2*R*)-

2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetilamino]-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabiciclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxílico (BP, 2012; USP 37, 2018).

Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{17}N_3O_5S$, possuindo massa molecular para sua forma anidra (CAS 50370-12-2) de 363,4 g/mol, para a hemi-hidratada (CAS 119922-85-9) 372,4 g/mol e para sua forma monoidratada (CAS 66592-87-8) 381,4 g/mol (FARMACOPEIA ARGENTINA, 2003; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Com baixa solubilidade em água, a cefadroxila é ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter etílico. De acordo com os compêndios oficiais, a potência do fármaco é de no mínimo, 950 µg, e no máximo, 1050 µg de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ por miligrama em relação à substância anidra (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O ponto de fusão é 197°C e seu LogP é -0,4, o pH se encontra na faixa de 4,0 a 6,0, em solução aquosa do fármaco a 5% (p/v) e pKa em 3,45 (ácido) e 7,43 (básico) (DRUG BANK, 2018).

2.3.5. Interações medicamentosas

A cefadroxila não deve ser utilizada com quimioterápicos bacteriostáticos (tetraciclina, eritromicina, sulfonamidas ou cloranfenicol), pois pode causar efeito antagônico. Efeitos tóxicos são causados caso o paciente faça uso de cefadroxila e outros antimicrobianos aminoglicosídeos, polimixina B, colistina ou doses elevadas de diuréticos. A combinação da cefadroxila em altas doses com o uso prolongado de anticoagulantes ou inibidores da agregação plaquetária podem causar hemorragias. O risco de toxicidade é aumentado quando o uso de cefadroxila e probenecida são utilizados juntos, assim como o uso deste antimicrobiano poderá reduzir a segurança dos contraceptivos orais (BPR, 2016; DEF, 2016).

2.3.6. Contra-indicações

Este fármaco não é indicado para pacientes que apresentam reações de hipersensibilidade a cefalosporinas. Durante a gestação, lactação e prematuros, o uso de cefadroxila deve ser conduzido com cuidado (DEF, 2016).

2.3.7. Métodos analíticos para determinação da cefadroxila

Análises quantitativas e qualitativas são extremamente importantes ao controle de qualidade de indústrias e na área científica, pois garantem a qualidade e segurança dos medicamentos, os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, além de parâmetros farmacocinéticos para o monitoramento terapêutico dos fármacos.

O desenvolvimento de métodos analíticos deve ser confiável e eficaz para controlar e garantir a qualidade dos medicamentos, a fim de assegurar as necessidades dos pacientes trazendo segurança à saúde e eficácia terapêutica. Ao atingir os padrões de qualidade desses medicamentos, os serviços de saúde podem se tornar melhores e a produção farmacêutica investir mais em técnicas seguras e simples, consequentemente aumentando o interesse às áreas da saúde para garantir a integridade das produções (WHO, 2007).

A maioria dos métodos desenvolvidos para a determinação da cefadroxila se baseiam em análises por eletroforese capilar, espectrofotometria de absorção no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que possui vantagens em sua utilização devido à seletividade, velocidade (devido ao curto tempo de análise) e precisão com facilidade no monitoramento da técnica. Tais fatores contribuem para a análise da substância e explicam o fato de ter sido encontrada com mais facilidade e grande volume na literatura e compêndios oficiais.

Outros métodos descritos na literatura para identificação da cefadroxila e outras cefalosporinas foram: titulação potenciométrica, titulação em meio não aquoso, titulação iodométrica, titulação espectrofluorimétrica, titulação espectrofotométrica e quimioluminescência por injecção de fluxo (FI-CL), as quais foram relatadas com diferentes condições de análises (KAMINSKI et al., 1979; ALY et al., 1994; EL WALILY et al., 1999; THONGPOON et al., 2006; ANDRASI et al., 2007).

Os métodos analíticos descritos na literatura e as condições das análises para a determinação da cefadroxila estão monstrados na Tabela 2.

Estes métodos descritos juntamente com a revisão de literatura da cefadroxila encontram-se publicados em periódico de circulação internacional:

MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Characteristics, properties and analytical methods of cefadroxil: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 47, n. 2, p. 93-98, 2017.

Tabela 2. Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna Nucleosil AS (200 mm x 4,6 mm). Fase móvel: diidrogenofosfato de amônio 20 *M* com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico e água – metanol – acetonitrila (30:35:35 v/v/v).	240 nm	IFA	Lindgren, 1987
CLAE-UV	Coluna Altex Ultrasphere Octyl de fase inversa C8 (260 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato monossódico e metanol com pH 2,6 (80:20 v/v).	240 nm	Plasma humano	McAteer et al., 1987
CLAE-UV	Coluna LiChrosorb RP-8 (250 mm x 4,0 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico com pH 5,0 e acetonitrila (95: 5 v/v).	280 nm	Urina humana	Eshra et al., 1993
CLAE-UV	Coluna Hypersil C18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico com pH ajustado para 5,0 usando hidróxido de potássio 10 *M* e acetonitrila (96:4 v/v).	230 nm	IFA	Hendrix et al., 1993a

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna PLRP-S (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: acetonitrila 0,2 *M*, 1-octanossulfonato de sódio 0,2 *M* e ácido fosfórico com pH 1,4 (10: 5: 10 v/v/v).	254 nm	IFA	Hendrix et al., 1993b
CLAE-UV	Coluna C18 (200 mm x 4,6 mm) 10 µm, com pré-coluna (150 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato 10 *M* com pH 7,0 e acetonitrila (87:13 v/v).	260 nm	Plasma bovino	Snippe et al., 1994
CLAE-UV	Coluna Hypersil C18 (200 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 3,4 e acetonitrila (87,5:12,5 v/v).	254 nm	IFA	Zhang et al., 1999
CLAE-UV	Coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,02 *M* com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico e acetronitrila (95:5 v/v).	260 nm	Urina humana	El-Gindy et al., 2000

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e acetonitrila (96: 4 v/v).	230 nm	IFA	FARMACOPEIA ARGENTINA, 2003
CLAE-UV	Coluna Spherisorb ODS-2 (250 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante de ácido acético - acetato de sódio com pH 4,0 e metanol (78:22 v/v).	265 nm	Plasma e urina humano	Samanidou et al., 2003
CLAE-UV	Coluna Chromolith®-SpeedROD RP-18e (500 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante de ácido acético - acetato de sódio com pH 4,0 e metanol-ácido acético (90:10 v/v).	265 nm	Plasma e urina humano	Samanidou et al., 2004
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e acetonitrila (96: 4 v/v).	230 nm	IFA	IP, 2007

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna C18 (100 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico com pH 5,0 e metanol (98: 2 v/v).	220 nm	IFA	FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2007
CLAE-UV	Coluna Hypersil C18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de postássio monobásico com pH 5,0 e acetonitrila (96: 4 v/v).	254 nm	Comprimidos	Devaliya & Jain, 2009
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e acetonitrila (96: 4 v/v).	230 nm	IFA	FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e acetronitrila (94: 06 v/v).	225 nm	Comprimidos	Sharif et al., 2010

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e metanol (17: 3 v/v).	262 nm	IFA	JP, 2011
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e acetonitrila (96: 4 v/v).	254 nm	IFA	BP, 2012
CLAE-UV	Coluna Supelco RP C-18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: metanol e solução tamponante hidrogeno-ortofosfato dissódico 0,05 *M* com pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico (60: 40 v/v).	264 nm	IFA	Anjum et al., 2012
CLAE-UV	Coluna Purospher BDS C18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: acetato de amônia 0,5 *M* e acetonitrila com pH ajustado para 7,0 usando ácido ortofosfórico (50:50 v/v).	247 nm	Cápsulas	Dhoka & Chopade, 2012

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna Phenomenex Synergi MAX RP C18 (150 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante dihidrogenofosfato de sódio monoidratado 0,02 *M*, metanol e acetonitrila (90: 8: 2 v/v/v).	230 nm	Plasma humano	Kano et al., 2012
CLAE-UV	Coluna C18 (100 mm x 4,6 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico com pH 5,0 e metanol (98: 2 v/v).	220 nm	IFA	EP, 2013
CLAE-UV	Coluna Purospher® RP-C18 (250 mm x 4,6 mm). Fase móvel: água, metanol e trietilamina com pH 5,5 ajustado com ácido fosfórico (85: 15: 0,1 v/v/v).	258 nm	Comprimidos	Patel & Joshi, 2014
CLAE-UV	Coluna C18 (150 mm x 4,5 mm) 5 µm. Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico com pH 4,0 e metanol (96:4 v/v).	260 nm	Plasma humano	Rahim et al., 2014

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE-UV	Coluna Hypersil C18 (250 mm x 4,6 mm) 5 µm. Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,2 *M* com pH 3,5 ajustado com ácido ortofosfórico e acetonitrila (65: 35 v/v).	220 nm	Comprimidos	Rao et al., 2014
CLAE-UV	Coluna C18 (150 mm x 4,5 mm) 5 µm. Fase móvel: metanol e solução tamponante fosfato de potássio monobásico com pH 4,0 (10:90 v/v).	260 nm	Cápsulas	Rahim et al., 2015
CLAE-UV	Coluna C18 (250 mm x 4 mm). Fase móvel: solução tamponante fosfato de potássio monobásico 0,05 *M* com pH 5,0 e acetonitrila (96: 4 v/v).	230 nm	IFA	USP 37, 2018
CLUE- UV	Coluna Acquity UPLC HSS T3 (210 mm x 5 mm) 1,8 µm. Fase móvel: água com ácido fórmico 0,1 % e acetonitrila (10: 90 v/v).	254 nm	IFA	Schmidt et al., 2012

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
CLAE- EM/EM	Coluna YMC Hydrosphere C18 (150 mm x 4 mm) 5 µm. Fase móvel: acetonitrila em água (0,1%) e ácido fórmico (15: 85 v/v).	Triplo quadrupolo e ionização electrospray (ESI)	IFA	Nygren & Lindahl, 2011
CLAE- EM/EM	Coluna C18 de fase inversa. Fase móvel: metanol, acetonitrila e acetato de amônio 2 *M* com pH 3,5 (25: 25: 50 v/v/v).	Quadrupolo e Ionização Química à Pressão Atmosférica	Plasma humano	Nagarajan et al., 2013
CLAE- EM/EM	Coluna C18 (150 mm x 2,0 mm) 4 µm. Fase móvel: ácido fórmico e metanol (62: 38 v/v).	Operado modo positivo e ionização electrospray (ESI)	Plasma e urina de rato	Jim et al., 2014
Espectrofotometria de absorção na região do visível	Diluição em metanol com concentração de 200 µg/mL.	578 nm	Comprimidos	Patel & Patel, 2011

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Espectrofotometria de absorção na região do visível	Diluição em 100 mL de água com concentração de 10 µg/mL.	475 nm	Comprimidos	Naveed et al., 2014
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em solução tamponante citro-fosfato pH 6,0 (diluições até concentração de 0,002% p/v).	264 nm	IFA	FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em água destilada e metanol (50: 50 v/v) com concentração de 100 µg/mL.	264 nm	IFA	Dey et al., 2010
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em metanol com concentração de 100 µg/mL.	257 nm	Comprimidos	Patel et al., 2010
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição de 1 mL de hidróxido de sódio 1 *M* em 10 mL de água destilada por 30 min.	342 nm	Cápsulas	Shantier et al., 2010

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em água com concentração de 10 µg/mL.	263 nm	IFA	JP, 2011
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em solução tamponante citro-fosfato pH 6,0 (diluições até concentração de 0,002% p/v).	264 nm	IFA	EP, 2013
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em metanol em concentração de 10 µg/mL.	233 nm	Comprimidos	Jain et al., 2014
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em água e metanol (75: 25 v/v) com concentração de 50 µg/mL.	224 nm	Comprimidos	Sethuraman et al., 2014
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em 100 mL de água com concentração de 20 µg/mL.	264 nm	IFA	Pradip et al., 2015
Espectrofotometria de absorção na região do UV	Diluição em água com concentração de 10 µg/mL.	263 nm	IFA	USP 37, 2018

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 48 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: citrato tamponado 50 *M* com pH 6. Voltagem: + 30 kV. Temperatura: 25°C.	210 nm	Urina e bile humana	Mrestani et al., 1997
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 44 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: acetato 50 *M* pH 5,25 e dodecil sulfato de sódio 110 *M*. Voltagem: + 18 kV. Temperatura: 15°C.	254 nm	IFA	Li et al., 1998
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 48 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: hidróxido de potássio 0,5 *M* e ácido clorídrico 0,5 *M* com pH entre 1,8 e 12,2. Voltagem: + 30 kV. Temperatura: 25°C.	270 nm	IFA	Mrestani et al., 1998
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 56 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: di-hidrogenofosfato 0,3 *M* e hidróxido de sódio 0,5 *M*. Voltagem: + 25 kV. Temperatura: 25°C.	270 nm	IFA	Gáspár et al., 2002

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 60 cm e diâmetro interno de 100 µm. Eletrólito: 28,5 *M* de acetato de sódio, 0,95% de ácido acético 19 *M* e isopropanol a 5% em solução de formamida pH 7,0. Voltagem: + 12 kV. Temperatura: 25°C.	254 nm	IFA	Liu et al., 2006
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 48 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: cloreto de potássio 0,2 *M*. Voltagem: + 25 kV. Temperatura: 25°C.	270 nm	IFA	Andrasi et al., 2007
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 50 cm e diâmetro interno de 75 µm. Eletrólito: tetraborato de sódio 50 *M* pH 9. Voltagem: + 30 kV. Temperatura: 25°C.	214 nm	Urina humana	Solangi et al., 2007
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 48 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: fosfato 25 *M*, borato 25 *M* e dodecil sulfato de sódio 50 *M* pH 6,8. Voltagem: + 25 kV. Temperatura: 25°C.	270 nm	IFA	Hancu et al., 2013

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação). Métodos analíticos descritos na literatura para determinação de cefadroxila.

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Eletroforese Capilar	Capilar de sílica fundida de 48 cm e diâmetro interno de 50 µm. Eletrólito: hidrogenofosfato dissódico 25 *M* e di-hidrogenofosfato 25 *M* com pH 7. Voltagem: + 25 kV. Temperatura: 25 °C.	210 nm	IFA	Hancu et al., 2015

CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; CLAE-EM/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; CLUE-UV: Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por ultravioleta e IFA: insumo farmacêutico ativo.

2.4. Controle de Qualidade

O controle de qualidade tem como principal fundamento atender as necessidades do paciente garantindo as características e eficácia dos produtos, ou seja, visa satisfazer o cliente com excelência dos processos no âmbito organizacional, os quais envolvem investimento em planejamentos, gerenciamentos e atividades que vão desde a aquisição de um insumo farmacêutico ativo, como todo o processo de produção até o uso do consumidor (JURAN & GRYNA, 1991; BRASIL, 2010).

A prática do controle de qualidade total envolve ferramentas que formam o sistema, sendo elas: Boas Práticas de Fabricação (BPF), controle de qualidade, garantia da qualidade, Procedimentos Operacionais Padrão (POP), tendo como objetivo envolver a padronização e organização dos serviços prestados, conferindo confiança, segurança e qualidade dos produtos (BRASIL, 2010; HALLEM et al., 2013; ISO, 2018).

A fim de atender as exigências e requerimentos dos clientes, os serviços precisam reconhecer padrões nas produções e manutenções com planejamento de qualidade pelos profissionais, ou seja, todas as pessoas envolvidas no processo como um todo, precisam estar comprometidas a desempenhar sua função da melhor forma, tendo seu envolvimento estimulado pelos profissionais responsáveis por esta atribuição na empresa. Assim sendo, a percepção sobre qualidade não está somente relacionada à satisfação do cliente pelo produto final, como também na formação dos profissionais na produção (FEIGENBAUM, 1994; CROSBY, 1999).

Atingir um sistema ideal para muitas empresas é um assunto preocupante, devido ao controle dos custos relacionados à qualidade serem competitivos dentre as organizações, os quais geram aumento da lucratividade decorrente do aumento da demanda dos clientes pelos produtos. Desta forma, controlar os custos sem perder a qualidade propicia uma evolução com implementação de programas de melhorias da qualidade, sendo estas fundamentais para o progresso da realização das fabricações (HANSEN & MOWEN, 2001).

Portanto, para que o setor industrial possa alcançar a qualidade dos processos e produtos finais e assegurar que as análises indispensáveis sejam executadas de forma correta, ações como: ensaios, procedimentos organizacionais, atividades de amostragem, especificações e monitoramento da estabilidade dos produtos acabados, são realizadas a fim de cumprir com os requisitos do controle de qualidade, uma vez que ao contribuir

com a garantia da qualidade total, também alcançarão a qualidade satisfatória dos produtos pelos consumidores (BRASIL, 2010).

2.5. Química verde

A química verde caracteriza-se pelas mudanças relacionadas ao entendimento sobre a prática química, referindo-se às responsabilidades de reduzir ou eliminar o uso de solventes, reagentes, produtos e insumos, para uma consequente minimização de geração de resíduos tóxicos ao meio ambiente e ao homem (ARMENTA et al., 2008; FARIAS & FÁVARO, 2011; MARCO et al., 2019).

Esta prática necessita ser promovida e adotada pelos meios científicos, governos, indústrias e setores da sociedade para tornar a comunidade química consciente que possíveis problemas ambientais podem ser resolvidos e amenizados com a substituição por substâncias menos tóxicas que sejam tão eficazes quanto os compostos prejudiciais comumente utilizados nos dias atuais (FARIAS & FÁVARO, 2011; ESPINO et al., 2016).

A adoção desta postura ecologicamente correta não somente implicará em melhorias ao ambiente, como aos investimentos das empresas, pois inúmeros fatores também serão alterados para a redução desses processos poluentes, como: a utilização de menores quantidades de amostras, podendo estas estarem diretamente relacionadas às técnicas analíticas diretas; tempo reduzido das análises, acarretando na diminuição da utilização de energia; desenvolvimento de novos métodos miniaturizados ou automáticos, os quais irão diminuir consideravelmente a utilização de solventes e reagentes e realização de tratamentos adequados dos resíduos analíticos, que trarão benefícios ao operador e economia aos setores industriais (MACHADO, 2011; GAŁUSZKA et al., 2013).

Desta forma, é muito importante para o controle de qualidade investir no desenvolvimento de métodos analíticos que contribuam com a química verde, pois o seguimento de introduzir ações ambientais irá promover um desenvolvimento sustentável preventivo com medidas para proteção ambiental no contexto tecnológico e social (ANASTAS & WARNER, 2000; MACHADO, 2011).

2.6. Validação de métodos

Uma das ações implantadas no controle de qualidade é a validação de métodos analíticos. Sendo amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas para quantificação e identificação de medicamentos e insumos farmacêuticos, a validação de métodos é responsável pela liberação dos lotes, estabilidade e estudos envolvendo farmacocinética. Seu principal objetivo é a confirmação de resultados atingidos nas análises dos parâmetros para garantir e assegurar a eficácia dos tratamentos aos pacientes, evitando os possíveis prejuízos para as indústrias (LA ROCA et al., 2007).

A validação de métodos analíticos e bioanalíticos é fundamental no processo de boas práticas de fabricação (BPF) e reproduz resultados confiáveis, precisos e exatos por meio de estudos experimentais como: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação adequados às análises (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Os parâmetros de validação são exigidos de acordo com as características de cada análise. Em análises cromatográficas por exemplo, a conformidade do sistema é recomendada em conjunto com os parâmetros acima mencionados (FDA, 1994; FDA, 2000; ICH, 2005; BRASIL, 2017; USP 37, 2018).

Ao mesmo tempo, a validação de métodos analíticos é o certificado documentado dos resultados encontrados que aprovam os processos, equipamentos, procedimentos, materiais, atividade e sistemas desenvolvidos garantindo a qualidade quando associada ao produto e a confiança necessária à técnica escolhida. Seu objetivo principal é provar que o método é adequado à proposta solicitada e seguro de ser cumprido (ICH, 2005; BRASIL, 2010; BRASIL, 2017).

Os métodos analíticos podem ser classificados em três categorias, de acordo com suas finalidades, sendo: Categoria I - testes de identificação; Categoria II - testes quantitativos e ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em matérias-primas ou produtos farmacêuticos; Categoria III – testes de performance (dissolução, uniformidade de conteúdo e potência) (ICH, 2005; BRASIL, 2017; USP 37, 2018).

Um conjunto de testes a serem realizados é exigido de acordo com cada categoria, na Tabela 3 é possível visualizar quais são eles.

Tabela 3. Testes exigidos para cada categoria de métodos analíticos, de acordo com a finalidade.

	Categoria I	**Categoria II**		**Categoria III**
Parâmetro Avaliado	Identificação	Quantitativo	Ensaio Limite	Testes de performance
Seletividade [2]	Sim	Sim	Sim	Sim
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim [1]	Não	Sim [1]
Limite de Detecção	Não	Não [3]	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não [3]
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim

(1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária; (2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação; (3) Pode ser necessário em alguns casos.

A descrição dos parâmetros de validação pode ser sucintamente descrita conforme destacados em referências oficiais (ICH, 2005; INMETRO, 2011; BRASIL, 2017; USP 37, 2018):

- Seletividade: é a capacidade do método analítico em identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar na amostra como impurezas, diluentes, produtos de degradação e adjuvantes.
- Linearidade: é a capacidade do método em fornecer resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra dentro de uma determinada faixa de aplicação.
- Intervalo: trata-se de uma faixa linear que apresenta os níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade através de limites de quantificação superiores e inferiores.
- Precisão: este parâmetro pode ser avaliado por três diferentes níveis, todos de acordo com a proximidade dos resultados obtidos em medidas de amostragem múltiplas para uma mesma amostra, sendo estas expressas pelo desvio padrão relativo (DPR):

  - Precisão por repetibilidade (intradia): ocorre quando o mesmo analista, em mesmas condições de análise proporciona resultados para tais procedimentos num curto período de tempo;

  - Precisão intermediária (interdia): refere-se à concordância entre os resultados analisados para uma mesma amostra, porém realizados em dias diferentes, analistas diferentes ou equipamentos diferentes;

- Precisão por reprodutibilidade (interlaboratorial): é a concordância de resultados obtidos em diferentes laboratórios, os quais poderão ser aplicados para padronização da metodologia em estudos colaborativos;

- Limite de detecção: trata-se da menor quantidade a ser detectada numa amostra, mesmo não sendo quantificada.
- Limite de quantificação: é a menor quantidade a ser quantificada com precisão e exatidão sobre as condições analíticas.
- Exatidão: é o parâmetro que considera a proximidade dos valores obtidos com o método em relação ao valor visto como verdadeiro; dependendo do objetivo das análises há uma forma de se calcular a exatidão:

  - Para análise do fármaco: a exatidão pode ser determinada ao aplicar um método proposto na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou através da comparação de resultados existentes pela utilização de um outro método já caracterizado e com exatidão estabelecida;

  - Para análise da forma farmacêutica: a exatidão pode ser estudada por adição de uma quantidade conhecida de fármaco em uma mistura contendo adjuvantes do medicamento, ou pelo método de adição de padrão, onde quantidades conhecidas de padrão de referência são adicionadas em quantidades conhecidas de medicamento;

  - Análise de impurezas: no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação no medicamento ou fármaco, pode-se comparar os resultados obtidos com um segundo método já caracterizado.
- Robustez: é a medida da capacidade que um método possui em manter-se inalterado quando pequenas variações ocorrerem nas análises rotineiras.
- Conformidade do sistema: é determinado em análises cromatográficas, onde irá assegurar que os resultados que serão fornecidos pela validação sejam precisos, exatos e confiáveis. Para esta análise, alguns parâmetros são analisados a partir do pico cromatográfico, entre eles:

  - Tempo de retenção (t_R): tempo percorrido desde a injeção do analito no cromatógrafo até a saída do ponto máximo do pico desta substância;

  - Número de pratos (N): é a medida da eficiência das colunas cromatrográficas;

  - Fator de cauda (FC) e de assimetria (As): medidas da simetria de um pico e das distorções frontais ou caudais do pico cromatográfico;

- Fator de capacidade (k): mede a posição do pico em relação ao (t_R) da substância não retida.

A validação de métodos, portanto, é fundamental para assegurar a garantia da qualidade dos produtos fabricados, fazendo com que novos equipamentos e novos métodos de um processo sejam desenvolvidos com resultados confiáveis e certificados.

2.7. Complexos e polimorfos da cefadroxila na literatura

A cefadroxila apresenta-se nas formas monoidratada, hemi-hidratada e anidra de acordo com os compêndios oficiais (FARMACOPEIA ARGENTINA, 2003; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2007; IP, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JP, 2011; BP, 2012; EP, 2013; USP 37, 2018), sendo hoje em dia um antimicrobiano ainda muito prescrito (CHEN & YE, 2017; DEWI & PUSPITASARI, 2018; VIRGEN et al., 2018) apesar de pertencer à classe da primeira geração das cefalosporinas.

Há inúmeros estudos na literatura sobre a eficácia clínica e processos analíticos para a determinação e/ou quantificação da cefadroxila e poucos são os trabalhos científicos publicados que englobam o estudo e/ou a caracterização de polimorfos da cefadroxila ou sua forma cristalina incluindo patentes e compêndios oficiais.

Os estudos realizados por Mohite e colaboradores (2016) e Mohite e colaboradores (2017) apresentaram a caracterização da cefadroxila monoidratada em preparações de dispersões sólidas usando goma guar (polímero solúvel em água) por técnicas microscópicas, espectrofotométricas, difratogramas, análises térmicas e solubilidade usando um método de evaporação de solvente, que apresentou resultados positivos quanto à solubilidade do fármaco melhorada com a presença do polímero.

Outro estudo que apresentou a caracterização da cefadroxila monoidratada foi o trabalho de Zayed e Abdallah (2004), porém a caracterização foi realizada através de comparações da substância comercial com os complexos metálicos da cefadroxila formados a partir de íons metálicos como: Fe (II), Fe (III), Co (II), Co (III), Ni (II), Cu (II) e Zn (II). Neste estudo foram avaliados a estabilidade química e o comportamento de coordenação da cefadroxila para essas fases de transições e os resultados indicaram alta estabilidade dos complexos formados pelas técnicas UV-Vis, espectrofotometria na região do infravermelho médio, espectrometria de massas e análise térmica.

A forma anidra da cefadroxila foi estudada também por Lehto e Laine (1998), por meio de técnicas de caracterização como análise térmica, microscopia e difração de raios X, que diferenciaram a forma anidra da monoidratada. Em paralelo às caracterizações, os autores reportaram a estabilidade física das formas de acordo com as diferentes umidades, mostrando serem relativamente diferentes para ambas as formas.

Além dos estudos acima citados, um solvato de cefadroxila formado por dimetilformamida (DMF) foi reportado nos estudos Wang e colaboradores (2013) e uma forma amorfa de cefadroxila formada a partir de moagem e solução de metanol foi reportada nos estudos de Parkkali e colaboradores (2000). Em ambos os estudos a caracterização seguiu de técnicas de microscopia, análise térmica e difração de raios X. Entretanto, o ensaio de solubilidade foi realizado somente no estudo de Wang e colaboradores (2013).

Algumas patentes também foram encontradas na literatura, nas quais são descritos métodos de obtenção das diferentes formas da cefadroxila, dentre elas: anidra (EP0295333B1), hemi-hidratada (US4962195) e monoidratada (US4504657), bem como a caracterização das formas pela técnica de difração de raios X.

Embora a cefadroxila seja bastante conhecida em relação aos aspectos farmacológicos e tenha sido muito estudada por pesquisadores da área de controle de qualidade, realizar estudos de seus polimorfos é imprescindível para o fármaco, uma vez que os dados da literatura não reportam outras formas polimórficas e também nenhum processo de desenvolvimento de triagem com modelos rápidos para obtenção de polimorfos, além dos estudos de formas polimórficas serem fundamentais aos processos industriais de produção (PROHENS & PUIGJANER, 2007; CHIENG et al., 2011).

2.8. Polimorfismo

O fenômeno no qual uma substância é capaz de existir em duas ou mais formas que apresente a mesma composição química e se difere apenas em suas conformações moleculares é denominado polimorfismo (THAKURIA & TAKUR, 2017).

Os polimorfos podem ser definidos também como estruturas amorfas (substâncias que apresentam seus átomos e/ou moléculas distribuídos aleatoriamente) e pseudopolimorfas, que são divididas em solvatos e hidratos (possuindo solvente ou água, respectivamente, aprisionados em sua estrutura de rede molecular) (BAUMHARDT & CANEVALORO, 2004).

Os guias FDA e ICH (Q6A) abrangem os termos solvatos, hidratos e amorfos como sendo todos polimorfos (ICH, 1999; FDA, 2007). Estas formas, por sua vez, possuem significados distintos, uma vez que todas as formas irão apresentar diferenças, mesmo que mínimas, na conformação molecular e em seu empacotamento (VIPPAGUNTA et al., 2001; SPONG et al., 2004).

Os polimorfos de qualquer substância química de referência (SQR) podem apresentar distintas propriedades químicas e físicas, entre elas: solubilidade e taxa de dissolução, ponto de fusão, densidade, reatividade química e propriedades ópticas, as quais influenciam diretamente no processamento dos fármacos, estabilidade química e biodisponibilidade do produto farmacêutico, a qual afetará a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos (BRITTAIN, 2009; THAKURIA & TAKUR, 2017).

2.9. Classificação e nomenclatura dos polimorfos

Quando o estudo de polimorfismo é realizado deve-se levar em consideração a maneira de se nomear as diferentes formas encontradas. Para tal propósito, a nomenclatura é de extrema importância para estabelecer um sistema adequado que evite confusões de classificar as formas obtidas.

Até o momento, não foi encontrado na literatura um guia "padrão" para seguir regras de nomenclaturas ao estudo de polimorfos, porém a maioria dos estudos encontrados nomeiam as formas obtidas como: forma e/ou polimorfo seguido de numerais romanos (I, II, III, …) ou letras alfabéticas (A, B, C, …) e até mesmo estudos que utilizam o alfabeto grego (α, β, δ, …) (MISHRA et al., 2014; REILLY & TKATCHENKO, 2014; GONG et al., 2015; HENRIQUE et al., 2015; NARANG & BODDU, 2015; BELENGUER et al., 2016; GONNADE & SANGTANI, 2017; SMITH et al., 2017; MOHARA et al., 2018).

Devido à falta de um guia para nomenclatura, fica livre a escolha aos pesquisadores nomear suas formas obtidas como pensam ser mais adequadas. A escolha pode ser recorrida pelas características amostrais térmicas, de acordo com as formas microscópicas, métodos de obtenção, entre outras. Porém, vale ressaltar que independente da escolha, as formas devem ser nomeadas a fim de estabelecer ordem na diferenciação de suas propriedades.

2.10. Polimorfismo na indústria farmacêutica

Há décadas o polimorfismo é conhecido e estudado, e diante de sua grande aplicabilidade e importância nos setores industriais, conhecer suas características físicas, químicas e biológicas é extremamente relevante no desenvolvimento de fármacos, devido estes apresentarem em suas diferenças estruturais fatores que poderão comprometer diretamente a estabilidade e a solubilidade dos fármacos (ARAÚJO et al., 2012).

2.10.1. Propriedades cristalinas

Os materiais sólidos podem se apresentar sob duas principais formas: as formas cristalinas, as quais se apresentam estruturadas espacialmente com formas geométricas definidas e as formas amorfas, as quais se apresentam espacialmente desorganizadas ou com algum grau de organização, porém sem forma definida (BAUMHARDT & CANEVALORO, 2004).

Os cristais são materiais macroscópicos, os quais apresentam diferentes dimensões e tamanhos que englobam aproximadamente 10^{20} moléculas em seu arranjo espacial (BERNSTEIN et al., 1999). Cada cristal apresenta uma identidade básica, ou seja, uma célula unitária que o caracteriza através de sua menor unidade de organização.

Quando há mudança de temperatura e/ou pressão, por exemplo, um mesmo cristal pode sofrer mudança em sua forma, modificando totalmente suas células unitárias, porém, a molécula que compõe a estrutura química se mantém a mesma (CHAVES, 2001). Um exemplo típico é o carbono. Este elemento químico, que há muitos anos é estudado, apresenta grande versatilidade em suas estruturas químicas, podendo se apresentar sob a forma de grafite, fibras de carbono, diamante e até mesmo como carbono amorfo. (JACOB & MöLLER, 1993; FITZER et al., 2009).

A célula unitária, portanto, irá se agrupar com inúmeras outras células unitárias e constituir num arranjo espacial a forma do material através de eixos simétricos e posições de centro geométrico de cada elemento do cristal (CRUZ-CABEZA et al., 2015; ZHOU et al., 2018). A Figura 7 apresenta o arranjo espacial de células unitárias da cefadroxila em seu sistema cristalino.

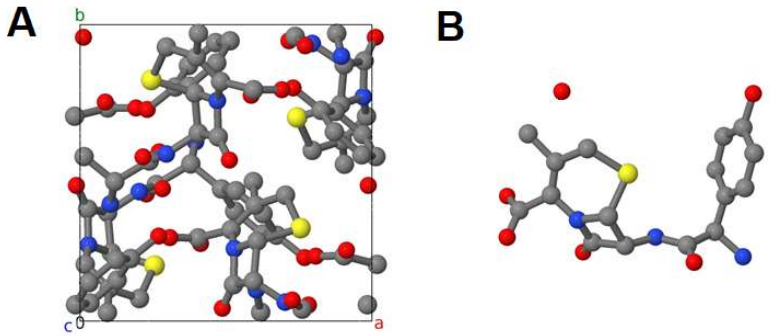


Figura 7. Arranjo espacial do sistema cristalino da cefadroxila (A) e célula unitária da cefadroxila (B).

Existem sete sistemas básicos cristalinos conhecidos na literatura: cúbico, hexagonal, monoclínico, ortorrômbico, tetragonal, tricíclico e trigonal; assim como cada ângulo formado entre eles (α, β e γ) (WANG & ZHOU, 2016).

O estudo de cristais é preconizado nas pesquisas atuais que envolvem os fármacos, polímeros, nanopartículas e engenharia de materiais (BISOYI & LI, 2016; DENGALE et al., 2016; HAQANI et al., 2017; ARBIOL et al., 2018). Assim como qualquer composto químico, os fármacos se apresentam nas formas gasosas, líquidas e sólidas (HILFIKER, 2006). As formas sólidas, por sua vez, podem se arranjar sob distintas conformações espaciais (anidras, solvatos, sais, hidratos, cocristais e amorfos), as quais necessitam de estudos complementares para identificar e caracterizar suas propriedades físicas, químicas e principalmente biológicas.

2.10.2. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade de um fármaco está diretamente relacionada à velocidade de absorção em relação à velocidade de dissolução, sendo este o principal fator que faz do ingrediente farmacêutico ativo menos ou mais tóxico, inativo ou menos ativo (CUFFINI et al., 2011).

O estudo de Ghadi e colaboradores (2014) revela que 40% dos fármacos comercializadas apresentam baixa solubilidade e este número é preocupante do ponto de vista farmacológico, pois reflete diretamente na ação desejada do fármaco podendo ser ausente quando a solubilidade do ativo é baixa.

Além da solubilidade, outros fatores podem afetar a biodisponibilidade de um ativo no organismo, como exemplo a natureza química de uma substância, o tamanho da partícula, tipo e quantidade de adjuvantes, técnica de compressão e/ou granulação, instabilidade do fármaco e polimorfismo (CUFFINI et al., 2011).

Quando se relaciona o estudo de polimorfismo com a biodisponibilidade das formas polimórficas no organismo, se faz necessário o estudo das suas características principalmente quanto à solubilidade, pois é através deste estudo que se avaliará se a taxa de absorção poderá ser aumentada no organismo (SILVA, et al., 2018).

Sabendo-se disso e tendo em vista que a baixa solubilidade é um dos principais fatores que afeta os setores de produção farmacêuticos, estudos de cocristalização têm se tornado cada vez mais importantes nas áreas industriais, melhorando, por sua vez, a solubilidade dos fármacos, devido aos cocristais apresentarem também maior estabilidade e condições de processamento (BABU & NANGIA, 2011; BRITTAIN, 2012).

A FDA define os cocristais como sendo materiais cristalinos compostos de duas ou mais moléculas diferentes, sendo estas moléculas definidas como “coformadores” (FDA, 2016). Diferentemente de sais, os cocristais são estruturas que não irão interagir ionicamente com outras substâncias, porque se apresentam em seu estado neutro, se diferindo da mesma forma de estruturas amorfas e polimórficas, pois estas são formadas de apenas um único componente.

Os cocristais podem ser comparados aos solvatos e/ou hidratos do ponto de vista físico-químico, por serem estruturas que se apresentam “arranjadas” com um segundo componente no meio, porém se divergirão pelo fato dos cocristais apresentarem um coformador não volátil (ROCHA et al., 2016; BRASIL, 2018).

Um estudo realizado por Rocha e colaboradores (2016) descreve os cocristais como sendo substâncias que maior apresentam solubilidade, taxa de dissolução e consequentemente melhor biodisponibilidade, quando comparados com qualquer forma cristalina existente.

Os autores realizaram um extenso levantamento bibliográfico de trabalhos publicados na literatura entre os anos de 1999 e 2015 que revelou uma crescente produção de trabalhos que envolviam o desenvolvimento de formulações contendo cocristais. Apesar dos resultados terem sido positivos quanto à solubilidade destas formas, os resultados do estudo apontaram que ainda há a necessidade de ampliar as pesquisas quanto aos testes de dissolução, estabilidade química, composição dos meios (pH) e presença de aditivos dos cocristais (ROCHA et al., 2016).

A biodisponibilidade de fármacos altamente solúveis não gera preocupações quanto à presença de seus polimorfos. Por outro lado, no caso de fármacos que são fracamente solúveis este fator deve ser rigorosamente controlado e levado em

consideração, para que a biodisponibilidade do medicamento no organismo não seja alterada e consequentemente não altere a atividade do ativo (SNIDER et al., 2004).

De acordo com os conceitos do ICH de polimorfismo, procedimentos que auxiliam numa árvore de decisão devem ser realizados num processo de fabricação, a fim de primeiramente avaliar se há presença de polimorfismo das substâncias produzidas, além de avaliar o quanto essa "outra forma" influenciará na estabilidade e biodisponibilidade do medicamento para então, realizar procedimentos que controlem a produção destas formas polimórficas (ICH, 2018).

2.10.3. Estabilidade química

A estabilidade química de um fármaco apresenta importância primordial no desenvolvimento de medicamentos, uma vez que esta necessita garantir a vida útil do produto nos quesitos: tempo de armazenamento, temperatura, umidade e composição química (SINGHAL & CURATOLO, 2004).

É importante ressaltar que quanto mais estável for um fármaco, menor energia livre terá o sistema, seu ponto de fusão será mais alto assim como sua solubilidade será mais lenta. Este fato ocorre porque a integridade química da molécula se mantém dentro de limites de acordo com suas propriedades e características durante o armazenamento e uso deste produto (RAW et al., 2004; VISHWESHWAR et al., 2006).

Diante da importância da estabilidade dos produtos farmacêuticos, estudos de pré-formulações devem ser avaliados rigorosamente, devido à possibilidade de ocorrer transições polimórficas durante o processamento dos fármacos, as quais irão interferir diretamente na segurança e na eficácia do produto final quando passarem por processos como compressão, podendo resultar na redução no tamanho das partículas e temperatura de processamento, a qual interferirá na temperatura de armazenamento do produto (SANTOS et al., 2014).

Apesar das substâncias estáveis serem de grande importância, nem sempre a forma que se apresenta como a mais estável será a forma de preferência nos processos industriais. Isso ocorre por que na maioria das vezes, as formas mais estáveis (menos solúveis) terão por consequência uma menor biodisponibilidade, e como dito anteriormente a biodisponibilidade é um fator também de extrema importância durante o processamento das formulações farmacêuticas (RAW et al., 2004; CUFFINI et al., 2011).

Outro ponto de vista a respeito da estabilidade química dos polimorfos são as transições de sistemas enantiotrópicos e monotrópicos. Quando uma forma é definida como enantiotrópica, pode ocorrer uma transição reversível entre os polimorfos, ou seja, a temperatura de transição ocorrerá abaixo do ponto de fusão e o cristal irá passar de sua forma menos estável para a mais estável, o que não acontecerá com uma substância monotrópica (LI et al., 2018). A Figura 8 representa um esquema para explicar estes dois tipos de polimorfos. O enantiotrópico, com livre transição abaixo do ponto de fusão (processo reversível) e o monotrópico sem possível transição.

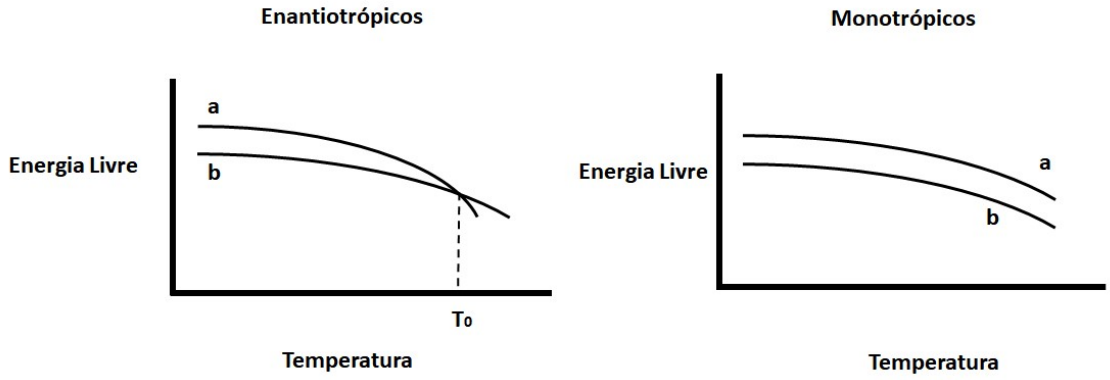


Figura 8. Representação esquemática (Energia livre/Temperatura) de dois tipos de polimorfos. Com temperaturas de transições (T_0) entre polimorfos (enantiotrópicos) e de livres de transições (monotrópicos).

Fonte: adaptado de Li et al., 2018

De acordo com a Figura 8, é possível notar que para um sistema monotrópico, não há cruzamento das formas, o que indica que qualquer transição polimórfica ocorrida abaixo do ponto de fusão será irreversível. Entretanto, para o sistema enantiotrópico, o cruzamento (T_0) ocorrido antes do ponto de fusão representa a possibilidade de uma troca reversível de duas formas polimórficas, onde essa troca poderá ocorrer através de vias térmicas, contato físico ou resfriamento por exemplo (BERNSTEIN et al., 1999; MAO et al., 2005; LI et al., 2018).

Através deste entendimento sobre a estabilidade dessas possíveis formas polimórficas, é necessário compreender que quando o sistema da natureza de um polimorfo é definida, a estabilidade deste composto é termodinamicamente também definida, pois existe uma tendência termodinâmica de a forma menos estável se transformar numa forma mais estável, sendo a forma mais estável aquela que apresenta a menor energia livre (BERNSTEIN et al., 1999; HILFIKERI, 2006).

Com este propósito, durante uma etapa de pré-formulação, é possível selecionar e direcionar qual forma é a mais desejável. A Tabela 4 apresenta um delineamento que permite identificar com mais facilidade uma tomada de decisão sobre o que se deve evitar e/ou exercer quando uma forma se comporta como mais ou menos estável.

Tabela 4. Delineamento para tomada de medidas que devem ser realizadas quando um sistema se comporta como monotrópico ou enantiotrópico.

	Polimorfo termodinamicamente estável	**Polimorfo termodinamicamente instável**
Sistema monotrópico	Não há transformações entre as formas; não há precauções e cautelas no processamento.	Pode ocorrer transformações, porém são cineticamente controladas; precauções sobre condições drásticas de umidade, pressão e temperatura devem ser realizadas no processamento.
Sistema enantiotrópico	Há transformações entre as formas; precauções e cautela sobre a umidade, pressão e temperatura devem ser realizadas no processamento.	Todos os processos de transformações são mediados e controlados no diagrama de energia livre/temperatura a fim de evitar falhas no processamento.

Fonte: BERNSTEIN et al., 1999.

2.10.4. Aspectos regulatórios na área farmacêutica

Atualmente, o Brasil se encontra no 6° lugar no ranking de consumo no mercado farmacêutico mundial. De acordo com os dados da Interfarma (2018), até o ano de 2022 esta colocação deve atingir o top 5, superando a França, mas permanecendo atrás dos Estados Unidos, China, Japão e Alemanha (INTERFARMA, 2018).

O mercado farmacêutico brasileiro tem apresentado crescimento principalmente na movimentação da economia, pelos altos investimentos sobre a produção de medicamentos genéricos e na área da pesquisa, as quais apresentam inovações pelo desenvolvimento de novas moléculas, principalmente, na produção de fármacos oncológicos, dislipidêmicos e vacinas (PGIFARMA, 2018; PROGENERICOS, 2018). Este fator é extremamente importante para o país, pois refere-se não somente à economia como também à saúde da população.

No que diz respeito ao investimento de novas moléculas, inclui-se o desenvolvimento de novas formas polimórficas. De acordo com o Instituto Nacional de

Propriedade Intelectual (INPI), um polimorfo não pode ser patenteado devido não apresentar atividade inventiva (INPI, 2018).

No entanto, há diferenças significantes do ponto de vista farmacológico, uma vez que suas propriedades físico-químicas, sua estabilidade e biodisponibilidade são diferentes do fármaco inicialmente desenvolvido. Por este motivo as indústrias têm apresentado grandes interesses nos estudos de novos polimorfos, tanto na área farmacêutica, como também na química e alimentícia, dos quais têm contribuído fortemente para o crescimento da economia desses setores (SÁNCHEZ et al., 2007).

Assim sendo, os aspectos regulatórios na área da farmácia para as formas polimórficas devem ser rigorosamente seguidos pelas empresas e laboratórios, a fim de manter a padronização na produção e comercialização destes produtos, para que sejam desenvolvidos e comercializados de modo a contribuir com a segurança e saúde dos pacientes.

Vários são os regulamentos encontrados na literatura que reportam os polimorfos e seus conceitos dentro da área farmacêutica. Dentre eles, podemos citar a Nota técnica n° 2/2017 da ANVISA, que dispõe sobre o registro de medicamentos novos, genéricos e similares contendo solvatos e cocristais como insumo farmacêutico ativo, trazendo o item 4.1.1 da publicação da ANVISA de 12 de agosto de 2016, que diz sobre a confirmação de registrar um medicamento genérico e/ou similar com diferente grau de hidratação ou forma polimórfica do medicamento de referência, sendo esta posição regulatória possível somente quando for devidamente comprovada e igualada a estabilidade química, equivalência terapêutica e possuir a mesma concentração do ingrediente ativo da nova substância com o produto de referência (BRASIL, 2018).

A resolução n° 57 de 17 de novembro de 2009, que refere-se ao registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências, reporta sobre o conceito de polimorfismo, os ensaios físico-químicos que permitem caracterizar a estrutura dos polimorfos, bem como as metodologias analíticas adotadas para a análise dos polimorfos, tendo em vista os resultados dos testes de determinação da área do controle de qualidade (BRASIL, 2009).

Outro regulamento que também menciona os polimorfos, é a resolução n° 73 de 7 de abril de 2016, que dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências, reporta as mudanças que relacionam o insumo farmacêutico ativo que apresentam polimorfos associando a necessidade de apresentar o teste de estabilidade química do

polimorfo no relatório da produção do medicamento; a contemplação estereoquímica como elucidação da estrutura, presença de impurezas, informação sobre a presença de isômeros, índice de refração e quiralidade, além de descrever os métodos do controle de qualidade acompanhados de relatório de validação dos métodos analíticos (BRASIL, 2016).

Além destas resoluções, os guias internacionais como International Conference on Harmonisation (ICH) e Food and Drug Administration (FDA) também trazem notas importantes sobre os ensaios de determinações dos polimorfos, identificação, caracterização e influência das novas formas sobre a produção industrial e sobre a terapêutica, a importância das investigações dos polimorfismos, bem como quando e como estas formas devem ser monitoradas e controladas nos processos industriais (ICH, 1999; FDA, 2007).

2.11. Técnicas utilizadas no estudo de polimorfos

Os estudos voltados aos polimorfos são extremamente importantes a fim de evitarem consequências graves ao setor farmacêutico e garantirem o bem estar dos pacientes. Para que haja controle das formas polimórficas dos fármacos, técnicas de caracterização dos estados sólidos são direcionadas para avaliar os principais fundamentos dos polimorfos, bem como garantir as características físicas, químicas e principalmente biológicas (YU et al., 2004a; FAUDONE, 2009).

As técnicas existentes podem ser divididas em cinco grupos principais: técnicas para determinação da estrutura cristalina, técnicas termoanalíticas, técnicas espectroscópicas, técnicas para caracterização morfológica e técnicas para avaliação de desempenho.

2.11.1. Microscopia

Esta técnica permite ao analista observar o material para caracterizar, identificar e inspecionar os padrões das substâncias como a forma geométrica e cor. Sendo uma das técnicas mais antigas existentes nos laboratórios, a microscopia envolve dois principais tipos de análise: a mais simples (microscopia óptica) e uma mais complexa (microscopia eletrônica) (CUFFINI et al., 2011).

O microscópio óptico é um instrumento que apresenta duas lentes: objetiva e ocular. A lente objetiva tem por finalidade focar a substância e ampliar a observação e a lente ocular tem por finalidade ampliar a imagem ampliada que a lente objetiva formou (DAVIS et al., 1996).

A microscopia eletrônica é uma técnica mais recente, muito utilizada para caracterização de polimorfos. Difere do microscópio óptico devido à amostra interagir com um feixe fino de elétrons que irá irradiar a amostra e como resposta ampliará a imagem em até 300.000 vezes com alta resolução (CUFFINI et al., 2011).

2.11.2. Difratometria de raios X

A difração de raios X é muito eficaz no estudo de polimorfos. Esta técnica engloba inúmeros aspectos importantes na caracterização dos compostos, pois permite identificar com precisão uma estrutura cristalina, além de permitir avaliar quais são os parâmetros da célula unitária que determinam este cristal, bem como as posições atômicas das moléculas (FAUDONE, 2009).

Um feixe de raios X incide na amostra que contém átomos ordenados em determinados planos cristalinos, e interage com os mesmos, formando o fenômeno de difração. Assim como a difração, é também possível avaliar se há interações intra ou extramoleculares, qual a conformação da estrutura e como está o empacotamento da molécula (ANTONIO, 2010).

O difratômetro é mais utilizado que as câmaras de monocristais. Apesar de ambos serem instrumentos padrões de medidas, este último apresenta uma pequena escala de utilização nas indústrias farmacêuticas devido à maioria dos insumos farmacêuticos ativos serem distribuídos em forma de pós (KLUG & LEROY, 1974).

A captação do eixo difratado é realizada através de um detector que irá expressar a obtenção do ângulo do arranjo geométrico através de picos que irão se ordenar numa linha de base e assim, cada molécula apresentará sua determinada altura, largura, área de integração, posição angular e caudas. Para identificar e/ou comparar uma estrutura cristalina será necessário posteriormente à análise utilizar um *software* específico que apresente difratogramas padrões conhecidos e disponibilizados pelo ICDD - International Center for Diffraction Data (KLUG & LEROY, 1974).

2.11.3. Determinação do ponto de fusão

Quando um determinado composto químico transita do estado sólido para o estado líquido, denota-se ponto de fusão. Todas as substâncias, depois de aquecidas, apresentam ponto de fusão a uma determinada temperatura, a qual converte o calor em energia cinética. As moléculas presentes nessas estruturas cristalinas sofrem perda de seu estado ordenado, passando para um estado maior de liberdade de movimento.

Esta técnica é muito utilizada para determinação de pureza das substâncias. Quando uma substância não se apresenta pura, ocorre a mudança do ponto de fusão, devido à maior facilidade na quebra das forças de interação moleculares (LENZI, 2004).

Sendo uma das técnicas mais antigas do controle de qualidade, a determinação do ponto do fusão é realizada em fusiômetros, nos quais se introduz a substância que se quer analisar e, através de uma fonte de calor provinda diretamente do equipamento, aumenta-se progressivamente a temperatura até o ponto em que se verifica a mudança de fase da substância (LENZI, 2004).

No estudo de polimorfismo esta técnica é utilizada para caracterizar as substâncias, uma vez que as alterações das estruturas cristalinas apresentam diferentes propriedades físico-químicas, sendo possível confirmar a diferença entre os compostos.

2.11.4. Análise térmica

2.11.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Dentre as técnicas termoanalíticas utilizadas para caracterização de compostos polimórficos, a calorimetria exploratória diferencial ou *differential scanning calorimetry* (DSC) é a mais utilizada devido aos polimorfos absorverem e liberarem energia de formas distintas (CUFFINI et al., 2011).

No equipamento de DSC, um fluxo de calor entre um material de referência e a amostra são medidos em função de um aumento gradativo de temperatura, onde se realizará uma medida exata de calor de transição entre estes materiais (BERNAL et al., 2002) e como resposta à sua interpretação, os resultados são apresentados em forma de gráficos mostrando eventos exotérmicos com picos acima da linha de base, que correspondem à liberação de calor e com eventos endotérmicos com picos abaixo da linha de base que irão corresponder à absorção de calor (CUFFINI et al., 2011).

2.11.4.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Nesta técnica, se avalia a variação de massa (ganho ou perda), a qual será determinada em função da temperatura e/ou tempo, quando a amostra é comparada, da mesma forma que a técnica de DSC, com um material de referência numa termobalança (CANEVAROLO, 2003).

Quando a amostra é aquecida com temperatura gradativa e controlada, a técnica permite avaliar se há alterações da amostra com este aquecimento, que pode ser interpretada como reações de desidratação, oxidação, decomposição, entre outras e, da mesma forma, vai permitir com que se estabeleça uma faixa de temperatura fixa em que a amostra não se altere quimicamente e como resultado desta análise, gráficos também são gerados com representações de curvas que referenciam respostas quanto à estabilidade da amostra e do produto final (CANEVAROLO, 2003; IONASHIRO, 2014).

2.11.4.3. Termogravimetria derivada (DTG)

A DTG é a derivada primeira da curva TGA. Nesta técnica os "degraus" correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que irão delimitar áreas proporcionais às variações de massa, tornando visualmente as informações com melhor resolução e mais acessíveis (CUFFINI et al., 2011).

Esta técnica, apesar de trazer as mesmas informações que a TGA, permite obter a razão de variação de massa a partir da altura do pico em qualquer temperatura, além de calcular a variação dessa massa no caso de sobreposição de reações, obtendo temperaturas que correspondem ao início e final das reações com maior exatidão, ou seja, ela apresenta as mesmas informações obtidas na curva TGA de forma diferente (WENDLANDT, 2003; CUFFINI et al., 2011).

2.11.5. Espectroscopia vibracional

2.11.5.1. Espectroscopia no infravermelho próximo

A espectroscopia na região do infravermelho próximo é uma técnica que vem sendo muito utilizada devido à sua versatilidade e rapidez, porém quando comparada com a espectroscopia na região do infravermelho médio, esta técnica apresenta menor resolução e sensibilidade sendo, portanto, associada, na maioria das vezes, com estudos quimiométricos (MASSART et al., 1986; CUFFINI et al., 2011).

A amostra é exposta à radiação de luz eletromagnética em comprimento de onda que abrange região espectral de 780 a 2500 nm (12800 a 4000 cm^{-1}). Quando a amostra é exposta à radiação, as vibrações moleculares irão resultar em *overtones*, também chamados de transições harmônicas, sobretons e bandas de combinações, os quais, serão absorvidos nesta região resultando em espectros de absorbâncias, reflectâncias ou transmitâncias, dependendo do equipamento (SKOOG et al., 2001; BURNS & CIURCZAK, 2008).

2.11.5.2. Espectroscopia de infravermelho médio

Por ser uma técnica simples, rápida e não destrutiva, a espectroscopia na região do infravermelho médio é muito utilizada nos setores industriais, principalmente na área farmacêutica para identificação e quantificação de compostos (KOGAWA & SALGADO, 2013; MARCO & SALGADO, 2016). Apesar de apresentar propriedades muito parecidas com a espectroscopia na região do infravermelho próximo, irá de diferir pela região espectral compreendida e pelos espectros de absorbâncias e/ou transmitâncias emitidos.

Baseada também nas interações moleculares, esta técnica abrange uma região do espectro eletromagnético que está situada entre de 2500 a 50000 nm (4000 a 200 cm^{-1}), a qual provocará vibrações das ligações covalentes existentes na molécula das amostras através de uma radiação eletromagnética que resultará com precisão bandas de absorção dos grupos funcionais presentes na amostra provindos de estiramentos e dobramentos que serão absorvidos e interpretados como bandas características nos espectros gerados (SKOOG et al., 2001; SOLOMONS et al., 2013).

2.11.6. Dissolução

A velocidade de dissolução de um fármaco envolve duas principais etapas: desintegração da forma farmacêutica e solubilização das partículas do meio, que está diretamente associada a fatores como polimorfismo, tamanho de partículas e área superficial (FAUDONE, 2009; CUFFINI et al., 2011).

Sabendo-se da grande importância que este estudo apresenta ao processo de qualidade de medicamentos e caracterização de fármacos, é imprescindível realizar o teste de dissolução quando se estuda os fenômenos de polimorfismo, devido aos polimorfos

poderem apresentar alterações significativas na eficácia dos medicamentos (BONFILIO et al., 2012; ROSA & VILHENA, 2012).

Assim, a dissolução intrínseca tem se apresentado indispensável no estudo de caracterização de sólidos, permitindo prevenir problemas sobre a biodisponibilidade dos mesmos. Este ensaio apresenta procedimentos padrões para avaliação das taxas de dissolução, em que uma determinada quantidade de fármaco é compactada sob a forma de um disco que apresenta uma constante superfície de área definida e conhecida, sendo adicionada a um meio (líquido) de melhor escolha e sob condições padronizadas de procedimento como velocidade de rotação, temperatura do meio, pressão da compressão do pó, aparato e pH, avaliando qual foi a quantidade dissolvida de fármaco, baseada na área conhecida do pó compactado, em relação ao tempo (MARCOLONGO, 2003; YU et al., 2004b).

A área de superfície, o tamanho da partícula e a solubilidade de uma substância são parâmetros físicos que irão definir a taxa de dissolução de sólidos num meio líquido e assim, permitir confirmar a diferença entre as distintas formas obtidas e/ou avaliadas (ROSA & VILHENA, 2012; ZHOU et al., 2014).

Assim, o perfil de dissolução irá contemplar além do estudo da velocidade de dissolução, os dados que envolvem a cinética de liberação do fármaco, podendo este parâmetro comparar não somente a eficiência do processo como também qual será o tempo necessário para determinar uma porcentagem requerida de fármaco dissolvido (SERRA & STORPIRTIS, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O trabalho apresenta como objetivo geral o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos sustentáveis e alternativos que trazem grandes contribuições à química verde para a quantificação da cefadroxila monoidratada na forma farmacêutica cápsulas, além do estudo de triagem para análise de polimorfos do fármaco.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver e validar novo método analítico sustentável e alternativo para identificar e quantificar a cefadroxila monoidratada cápsulas por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho médio;
- Desenvolver e validar novo método analítico sustentável, alternativo e indicativo de estabilidade para quantificação da cefadroxila monoidratada cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Desenvolver e validar novo método analítico miniaturizado e alternativo para identificar e quantificar a cefadroxila monoidratada cápsulas por espectrofotometria na região do visível;
- Desenvolver e validar novo método microbiológico para quantificação da cefadroxila monoidratada cápsulas por turbidimetria;
- Realizar análise comparativa entre os métodos desenvolvidos e validados, a fim de que possam ser utilizados como escolha alternativa nos processos industriais;
- Realizar triagem para desenvolvimento de estudo de polimorfismo da cefadroxila baseada na caracterização das diferentes formas do fármaco através de técnicas e métodos analíticos utilizados nos processos industriais para análise de medicamentos como determinação do ponto de fusão, espectrofotometria, dissolução, microscopia, análise térmica e difração de raios x.

4. MATERIAL

4.1. Substância química de referência (SQR)

As SQR utilizadas neste trabalho foram: cefadroxila monoidratada com teor declarado de 93,027%, lote M777789 e validade 01/04/2019, para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos e cefadroxila monoidratada com teor declarado de 94,638%, lote M0E0102 e validade 01/05/2021, para o estudo de triagem de polimorfos. Ambas as SQR foram gentilmente doadas pela EMS Indústria Farmacêutica (Hortolândia, SP, Brasil).

4.2. Amostra da forma farmacêutica cápsulas

A forma farmacêutica utilizada neste trabalho foi cápsulas de cefadroxila monoidratada de 500 mg, gentilmente doada pela empresa farmacêutica EMS, com lote 788218 e validade 30/10/2017.

4.3. Adjuvantes

Para este trabalho foram utilizados: estearato de magnésio (AUDAZ BRASIL), lote 1104269; croscarmelose sódica (HENRIFARMA), lote ACRMC/1/2103) e talco (IMPEX), lote 42393-QM, gentilmente cedidos pelo Departamento de Fármacos e Medicamentos da UNESP.

4.4. Equipamentos e reagentes utilizados para o desenvolvimento e validação de métodos

4.4.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

O equipamento de infravermelho utilizado foi o espectrofotômetro da Shimadzu Scientific Instruments® FT-IR Prestige-21 (Kyoto, Japão), que permitiu a digitalização dos espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos utilizando o *software* IR Prestige. As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Microsoft Excel (2010). O reagente brometo de potássio (KBr) das marcas Synth e Dinâmica de grau analítico foram utilizados para a confecção das pastilhas. Grau de ágata, estufa modelo Quimis® 702.780 (São Paulo, Brasil) e balança analítica modelo H51 da Mettler (Ohio, EUA) também foram utilizados no desenvolvimento e validação deste método.

4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters®, com módulo de separação modelo Alliance 2695, conectado a detector com arranjo de fotodiodos Waters® 2998 e injetor automático controlado pelo *software* Empower 3. As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Microsoft Excel (2010). A coluna utilizada foi a Zorbax-SB C_{18} (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) da Agilent®. Água ultrapura Milli-Q, ácido orfofosfórico grau CLAE da marca Synth® e etanol de grau CLAE da marca Panreac® constituíam a fase móvel.

Os reagentes ácido clorídrico (Synth®), hidróxido de sódio (Synth®) e peróxido de hidrogênio (Vetec Química Fina®) foram utilizados na validação. Outros equipamentos e instrumentos de trabalho utilizados no desenvolvimento e validação deste método foram: balança analítica modelo H51 da Mettler® (Ohio, EUA), seringa 5 mL BD®, membrana filtrante de seringa de 0,45 μm; aparelho Ultrasonic Cleaner da Unique®, membranas de

politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 μm de poro e 47 mm de diâmetro da Millipore®, câmara espelhada de luz UVC de 254 nm, banho de aquecimento modelo Q334M da Quimis® (São Paulo, Brasil) e equipamento Milli-Q Plus da Millipore® (Massachusetts, EUA). As soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q.

4.4.3. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro SPECTRO Star Nano da BMG LabTech® (Ortenberg, Alemanha), o qual permitiu a digitalização dos espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos utilizando o *software* MARS Data Analysis. As leituras das absorbâncias foram realizadas em microplaca de poliestireno de 96 poços da Greiner Bio-One® (São Paulo, Brasil). As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Microsoft Excel (2010).

A balança analítica modelo H51 da Mettler® (Ohio, EUA) e os reagentes fenolftaleína, hidróxido de sódio 0,1 *M*, ácido ascórbico, vermelho de metila e azul de bromotimol, todos da marca Synth®, foram utilizados no desenvolvimento e validação deste método. As soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q.

4.4.4. Método microbiológico turbidimétrico

Os aparelhos utilizados no ensaio microbiológico foram: aparelho Ultrasonic Cleaner da Unique®, balança semi-analítica da Micronal® (São Paulo, Brasil), balança analítica modelo H51 da Mettler® (Ohio, EUA); autoclave vertical modelo AV da Phoenix Luferco® (São Paulo, Brasil), estufa de incubação ECB Digital 1.2 da Odontobrás® (São Paulo, Brasil), equipamento agitador, modelo MA420 da Marconi® (Goiás, Brasil) e espectrofotômetro DU 530 da Beckman Coulter® (Califórnia, EUA). As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Microsoft Excel (2010).

Os meios de cultura *tryptic soy agar* (TSA) da Oxoid® (Basingstoke, Inglaterra) e o caldo *brain heart infusion* (BHI) da Acumedia® (Califórnia, EUA) e Oxoid® foram utilizados no ensaio. As soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q. Utilizou-se formaldeído de grau analítico da Qhemis® (São Paulo, Brasil) para interromper o crescimento dos micro-organismos. A cepa utilizada no ensaio foi *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 IAL 1851).

Em adição à validação deste método, utilizou-se os materiais descritos no item 4.4.2 para determinação do parâmetro de seletividade.

4.5. Equipamentos e reagentes utilizados no estudo de triagem de polimorfos da cefadroxila

A parte experimental do estudo de polimorfismo da cefadroxila foi realizada no Departamento de Análises de Medicamentos, na unidade de Química Orgânica, do Instituto de Química de Rosário (CONICET-Universidade Nacional de Rosário) na cidade de Rosário, Argentina, sob a supervisão do Prof. Dr. Rubén Mariano Maggio, com exceção da técnica de difração de raios X que foi realizada pelo laboratório LAbCACC no Departamento de Físico-Química da Universidade de São Paulo, em São Paulo-SP, Brasil, sob a supervisão do Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo e Dra. Selma Gutierrez Antonio.

4.5.1. Obtenção dos polimorfos da cefadroxila

Para a obtenção das diferentes formas polimórficas da cefadroxila foram utilizados os equipamentos: balança analítica modelo Explorer da Ohaus® (Nova Jersey, EUA), agitador magnético com aquecimento da Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA), rotaevaporador da Büchi® Rotavapor modelo R-114 conectado a uma bomba a vácuo da Hamilton Laboratory Instruments® (Kansas, EUA), estufa a vácuo da Bioelec® (Santa Fé, Argentina) e analisador de umidade MB da Ohaus® (Nova Jersey, EUA). Também foram utilizados os solventes: acetato de etila, acetona, acetonitrila, etanol, hexano, isopropanol e metanol, todos da marca Cicarelli Reagents® (San Lorenzo, Argentina).

4.5.2. Espectrofotometria na região do infravermelho médio e próximo

Para os estudos de espectrofotometria na região do infravermelho médio, foram utilizados o espectrofotômetro da Shimadzu Scientific Instruments® FT-IR Prestige-21 (Kyoto, Japão), acoplado a atenuador total ATR atenuado da GladiATR, Pike Technologies® (Madison, EUA). Para os estudos espectrofotométricos na região do infravermelho próximo, utilizou-se espectrofotômetro NIR DS2500 FOSS (Hillerod, Dinamarca) e célula de quartzo circular para refletância dos espectros.

4.5.3. Análise térmica (TGA/DTG e DSC)

Para o estudo térmico de TGA/DTG as curvas foram obtidas no equipamento DTG-60H, da Shimadzu Scientific Instruments® (Kyoto, Japão), usando cadinho de alumínio e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2). Para o estudo térmico de DSC foi utilizado o equipamento DSC 60, da Shimadzu Scientific Instruments® (Kyoto, Japão) usando cadinho fechado de alumínio e ar atmosférico. Para ambas as técnicas utilizou-se cápsula de alumínio vazia como referência.

4.5.4. Determinação do ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados usando fusiômetro óptico da Ionomex® (Buenos Aires, Argentina).

4.5.5. Difração de raios X

Os difratômetros: Rigaku Rint 2000 e Rigaku Miniflex da Malvern Panalytical® (São Paulo, Brasil) com anodo de Cu, com fenda de divergência e espalhamento de ¼° e fenda Soller de 2,5° com detector PSD (position sensitive detector) D/tex foram utilizados para a análise de difração de raios X. O programa Topas v 6 foi utilizado para o refinamento das estruturas e análise.

4.5.6. Dissolução intrínseca

O dissolutor da Hanson Research SR8 da Teledyne Hanson® (Chatsworth, EUA) foi utilizado no ensaio de dissolução intrínseca. Aparato II da USP configurado como (pá), espectrofotômetro de UV-DAD Agilent 8453 da Agilent Technologies® (Califórnia, EUA), célula de quartzo (passo óptico de 10 mm) e prensa mecânica da Beckman® (Califórnia, EUA) também foram utilizados nesta técnica.

4.5.7. Microscopia óptica

Para as análises microscópicas utilizou-se microscópio óptico da Seiwa Optical® (Tóquio, Japão) com diferentes lentes objetivas (10x, 40x e 100x) equipado com câmera digital CMOS de 5 mega pixels da Shanghai Beion Medical Technology® (Xangai, China) com ocular 5x e resolução 2592 × 1944 (H × V).

5. MÉTODOS

5.1. Análise qualitativa

5.1.1. Peso médio

O peso médio das cápsulas de cefadroxila monoidratada, descrita no item 4.2, foi realizado adequadamente como preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010). Vinte cápsulas de cafadroxila monoidratada foram pesadas cheias e vazias em balança analítica modelo H51 da Mettler®. Com os valores obtidos da diferença entre as pesagens, determinou-se a média do pó obtido.

5.1.2. Características físicas

As amostras da cefadroxila monoidratada, descritas nos itens 4.1 e 4.2, foram avaliadas em relação ao aspecto e cor.

5.1.3. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

A região espectral compreendida na análise foi de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1}, com intervalos de 2 cm^{-1}. Anteriormente à produção das pastilhas, o KBr foi triturado em grau de ágata e dessecado em estufa em 105°C até peso constante.

O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Após a realização do peso médio, pesou-se massa referente à 2,18 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.2) e diluiu-se em 19,62 mg de KBr (1:10), sendo posteriormente homogeneizada com 128,20 mg de KBr para a formação de pastilhas com 150 mg e concentração teórica de 1,9 mg.

Para a formação das pastilhas de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa referente à 2,04 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) e diluiu-se em 18,36 mg de KBr (1:10), sendo posteriormente homogeneizada com 129,60 mg de KBr para a formação de pastilhas com 150 mg e concentração teórica de 1,9 mg.

As leituras dos espectros foram determinadas em transmitância, sendo realizadas em triplicata.

5.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram analisadas a cefadroxila monoidratada SQR e cápsulas, descritas nos itens 4.1 e 4.2. A fase móvel foi preparada com 92% de água ultrapura e ácido orfofosfórico 0,1% e 8% de etanol de grau CLAE.

O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Posteriormente, pesou-se massa de 11,46 mg, referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 250 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 50 µg/mL.

Para as soluções de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa referente à 10,74 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 250 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 50 µg/mL.

Uma mistura dos adjuvantes presentes nas cápsulas de cefadroxila foi realizada para avaliar se haveria influência dos mesmos na análise cromatográfica. De acordo com Rowe e colaboradores (2009), a quantidade máxima permitida de adjuvantes a serem empregados numa formulação de cápsulas tamanho 00 (tamanho das cápsulas da cefadroxila) de croscarmelose sódica, estearato de magnésio e talco é de 25%, 5% e 30%, respectivamente.

Desta forma, pesou-se massa referente a 1,46 mg de uma mistura dos adjuvantes descritos no item 4.3, que correspondiam à quantidade referente de adjuvantes em 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 250 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 50 µg/mL.

Antes de proceder as análises, a fase móvel foi filtrada em membrana de nylon (0,45 µm) e degaseificada em banho ultrassônico por 30 minutos e as amostras foram também filtradas em filtro de seringa de 0,45 µm. A separação procedida foi estabelecida pela condição isocrática em fase reversa. Os procedimentos para cada amostra foram realizados em triplicata e as análises foram determinadas pela área do pico.

5.1.5. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível

Foram analisadas a cefadroxila monoidratada SQR e cápsulas, descritas nos itens 4.1 e 4.2. O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Posteriormente, pesou-se massa de 11,46 mg, referente a 10 mg de cefadroxila

monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 275 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 55 µg/mL.

Para as soluções de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa referente à 10,74 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 275 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 55 µg/mL.

Uma mistura dos adjuvantes presentes nas cápsulas de cefadroxila foi realizada para avaliar se haveria influência dos mesmos na análise espectrofotométrica. Pesou-se massa referente a 1,46 mg de uma mistura dos adjuvantes descritos no item 4.3, que correspondiam à quantidade referente de adjuvantes em 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 275 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 55 µg/mL.

As soluções do reagente colorido complexante foram preparadas com 800 µL de 1% de fenolftaleína e 400 µL de hidróxido de sódio 0,1 *M* em balão volumétrico de 25 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura para o desenvolvimento e validação do método.

Uma alíquota de 100 µL da solução do fármaco e uma alíquota de 100 µL da solução do reagente colorido complexante foram transferidas aos poços de uma microplaca de 96 poços, as quais foram submetidas à leitura espectrofotométrica. Os procedimentos para cada amostra foram realizados em triplicata e as análises foram determinadas em absorbância em 552 nm.

5.2. Análise quantitativa

5.2.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

5.2.1.1. Obtenção da curva analítica

As pastilhas preparadas para a validação continham teoricamente 1,5/ 1,7/ 1,9/ 2,1/ 2,3 e 2,5 mg de cefadroxila monoidratada SQR e amostra (previamente diluídas em KBr em 1:10, p/p). Quantidade suficiente de brometo de potássio foram diluídas e

misturadas até obtenção de uma mistura homogênea para a preparação das pastilhas com massa total de 150 mg. Após a mistura realizada, o pó foi comprimido com força de compressão de 80 kN em prensa mecânica por 10 minutos para a formação de pastilhas transparentes, através das quais o feixe do espectrofotômetro pode ultrapassar.

5.2.1.2. Preparo das pastilhas de cefadroxila monoidratada SQR

Para a formação das pastilhas de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa referente a 2,04 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) e diluiu-se em 18,36 mg de KBr (1:10) previamente dessecado, sendo posteriormente homogeneizada com 129,60 mg de KBr para a formação de pastilhas com 150 mg e concentração teórica de 1,9 mg. As leituras espectrofotométricas para determinação da substância foram realizadas em triplicata.

5.2.1.3. Preparo das pastilhas de cefadroxila monoidratada em cápsulas

O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Posteriormente a amostra ter sido homogeneizada, foram pesadas massas de 2,18 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.2) e diluiu-se em 19,62 mg de KBr (1:10), sendo posteriormente homogeneizada com 128,20 mg de KBr para a formação de pastilhas com 150 mg e concentração teórica de 1,9 mg. As leituras espectrofotométricas para determinação da substância foram realizadas em triplicata.

5.2.1.4. Preparo das pastilhas dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada

Pesou-se massa referente a 0,28 mg de uma mistura dos adjuvantes descritos no item 4.3, que correspondia à quantidade referente de adjuvantes em 1,9 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e diluiu-se em 2,52 mg de KBr (1:10), sendo posteriormente homogeneizada com 147,20 mg de KBr para a formação de pastilhas com 150 mg e suposta concentração teórica de 1,9 mg.

5.2.1.5. Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com o preconizado pela literatura seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2017; USP 37, 2018).

5.2.1.5.1. Linearidade

A linearidade do método foi determinada por seis concentrações (1,5; 1,7; 1,9; 2,1; 2,3 e 2,5 mg/pastilha) de cefadroxila monoidratada SQR, a qual foi realizada em três dias diferentes. A avaliação do parâmetro seguiu o cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados, sendo realizados cálculos estatísticos através da ANOVA e plotagem do gráfico de resíduos para avaliação da distribuição dos dados.

5.2.1.5.2. Seletividade

Na seletividade do método realizado, avaliou-se a interação entre o fármaco com os adjuvantes presentes nas cápsulas. Este parâmetro foi estudado pela realização da análise de três pastilhas de cefadroxila monoidratada SQR, amostra e adjuvantes.

5.2.1.5.3. Precisão

A precisão do método foi realizada através de dois quesitos, entre eles: repetibilidade (precisão intradia) e intermediária (precisão interdias e entre analistas). A precisão intradia foi realizada pela preparação e análise de seis pastilhas de cefadroxila monoidratada na concentração de 1,9 mg/150 mg, no mesmo dia e em mesmas condições de trabalho, analisando o DPR% entre tais determinações. A precisão interdias foi realizada pela preparação e análise de seis pastilhas de cefadroxila monoidratada na concentração de 1,9 mg/150 mg, em três dias diferentes e em mesmas condições de trabalho e a precisão entre analistas foi realizada pela preparação e análise de seis pastilhas de cefadroxila monoidratada na concentração de 1,9 mg/150 mg, em dias diferentes e por analistas diferentes. A avaliação estatística foi baseada na ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas.

5.2.1.5.4. Exatidão

A exatidão foi realizada pelo ensaio de recuperação, no qual adicionou-se na amostra quantidade conhecida do padrão (SQR), sendo realizado em três níveis (R1, R2 e R3) e preparadas de acordo com a Tabela 5, seguido de triplicata por três dias diferentes.

Tabela 5. Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método de espectrofotometria por infravermelho médio para cefadroxila monoidratada.

	Cefadroxila monoidratada amostra (mg) (diluição 1:10, p/p em KBr	Cefadroxila monoidratada SQR (mg) (diluição 1:10, p/p em KBr	%	Concentração teórica final (mg/pastilha)	Quantidade de brometo de potássio (mg)
Amostra	15	---		1,5	135,0
R1	15	1	80	1,6	134,0
R2	15	5	100	2,0	130,0
R3	15	9	120	2,4	126,0
Padrão	---	15		1,5	135,0

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 1, determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

Equação 1: % R = [(Cr – Ca) / Cp] x 100

Sendo:

Cr = concentração da substância de amostra adicionada de padrão (SQR) (mg/150mg)

Ca = concentração da amostra (mg/150mg)

Cp = concentração teórica da substância química de referência adicionada (mg/150mg)

5.2.1.5.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados por meio das Equações 2 e 3, com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva, conforme descrito na literatura (ICH, 2005).

Equação 2: $LD: 3{,}3\ \sigma/IC$ **Equação 3:** $LQ: 10\ \sigma/IC$

Sendo:

σ = desvio padrão do intercepto;

IC = inclinação da curva analítica.

5.2.1.5.6. Robustez

A robustez permitiu avaliar a confiabilidade do método em relação a pequenas mudanças e/ou variações das condições de trabalho. Os parâmetros variados foram:

tempo (minutos) de compressão das pastilhas, variando 2 minutos abaixo e acima do tempo usual de compressão de trabalho; força de compressão (kN), variando quatro kN acima e abaixo da força usual de compressão de trabalho e marca (Dinâmica) do brometo de potássio. A avaliação foi realizada através do planejamento fatorial 2^3, em que dezesseis pastilhas foram confeccionadas sendo duas referentes a cada um dos oito ensaios correspondentes ao planejamento.

5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.2.2.1.Obtenção da curva analítica

O teor declarado de cefadroxila monoidratada SQR é de 93,027%. Para a realização da curva analítica, pesou-se massa de 10,74 mg de cefadroxila SQR, equivalente a 10 mg do fármaco e adicionou-a em balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, para a obtenção de solução estoque de concentração teórica de 1000 µg/mL. Alíquotas de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, obtendo seus volumes também completados com água ultrapura. As soluções de trabalho, portanto, resultaram em concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL de cefadroxila monoidratada SQR, sendo estas preparadas em triplicata e submetidas à filtração em membranas de 0,45 µm antes das injeções.

5.2.2.2.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR

Para as soluções de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa referente à 10,74 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 300 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 60 µg/mL. Três soluções foram preparadas e submetidas à filtração antes das injeções.

5.2.2.3.Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas

O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Posteriormente, pesou-se massa de 11,46 mg, referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume

completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 300 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 60 µg/mL. Três soluções foram preparadas e submetidas à filtração antes das injeções.

5.2.2.4. Preparo das soluções dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada

Pesou-se massa referente à 1,46 mg de uma mistura dos adjuvantes descritos no item 4.3, que correspondiam à quantidade referente de adjuvantes em 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 300 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica final de 60 µg/mL. Três soluções foram preparadas e submetidas à filtração antes das injeções.

5.2.2.5. Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com o preconizado pela literatura seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2017; USP 37, 2018).

5.2.2.5.1. Conformidade do sistema

Para verificar a conformidade do sistema cromatográfico selecionado, seis soluções de cefadroxila monoidratada SQR foram preparadas e injetadas na concentração de 100 µg/mL. Após esta etapa, foram avaliados parâmetros como: tempo de retenção (t_R), área do pico, número de pratos (N), fatores de cauda (FC) e de assimetria (As) e retenção (k). Além disso, foram calculados e analisados os valores de DPR% para cada um deles. Os valores de t_R e área do pico cromatográfico foram fornecidos pelo *software* do equipamento de CLAE utilizado.

O número de pratos foi calculado segundo a Equação 4:

Equação 4: $N = 5{,}5 \times (t_R/W_{50})^2$

Sendo:

t_R = tempo de retenção (minutos)

W_{50} = largura do pico a meia altura

As Equações dos fatores FC e As, estão dispostas, respectivamente, como Equação 5, que representa 5% da altura do pico, e Equação 6 em que é calculada em 10% da altura do pico.

Equação 5: FC = (a+b)/2ª **Equação 6:** As = b/a

Sendo: a e b = distância entre o sinal máximo do pico até as linhas verticais e perpendiculares à linha de base que interceptam o traço a 5% ou 10% de sua altura (Figura 9).

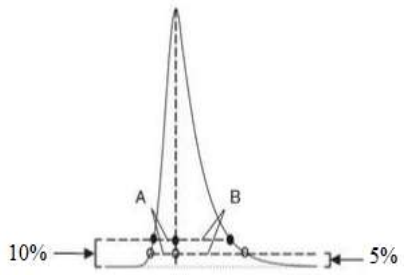


Figura 9. Medidas relacionadas à determinação dos fatores de cauda (FC) e assimetria (As) do pico.
Fonte: SNYDER et al., 2010

O fator de retenção (k) foi calculado pela medida da retenção da amostra na cromatografia líquida, em que:

$$k = t_R - t_0 / t_0$$

sendo:

k = fator de retenção

t_R= tempo de retenção do pico (min)

t_0 = tempo morto (min)

Todos os parâmetros para a conformidade do sistema seguem especificações estabelecidas com limites definidos para garantir que este sistema e operações analíticas sejam adequados e apresentem resultados confiáveis e seguros (FDA, 1994).

- Fator de retenção (k) = > 2;
- Fator de cauda (FC) = ≤ 2;
- Fator de assimetria (As) = ≤ 2;
- Número de pratos (N) = > 2000.

5.2.2.5.2. Linearidade

Para a validação do método, seis concentrações (20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL) de cefadroxila monoidratada SQR foram utilizadas. A linearidade foi avaliada segundo cálculo de regressão linear através dos mínimos quadrados, ANOVA e plotagem do gráfico de resíduos para avaliação da distribuição dos dados.

5.2.2.5.3. Seletividade

A seletividade do método foi determinada por meio de uma mistura dos adjuvantes presentes nas cápsulas de cefadroxila monoidratada, para verificar se poderiam interferir na quantificação do fármaco e pelo teste de degradação acelerada em que as amostras foram submetidas às condições ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica para analisar a interferência de produtos de degradação na quantificação da cefadroxila monoidratada. As preparações das soluções degradadas das cápsulas de cefadroxila monoidratada foram as seguintes:

- *Degradação ácida*

Uma solução da amostra com concentração de 60 µg/mL foi preparada em HCl 1 *M* e mantida durante 3 h em banho termostatizado a 60 °C.

- *Degradação alcalina*

Uma solução da amostra com concentração de 60 µg/mL foi preparada em NaOH 0,01 *M* e mantida durante 2 h em temperatura de 25°C.

- *Degradação oxidativa*

Uma solução da amostra com concentração de 60 µg/mL foi preparada em 3% de H_2O_2 e mantida durante 2 h em temperatura de 25°C.

- *Degradação neutra*

Uma solução da amostra com concentração de 60 µg/mL foi preparada em água purificada e mantida durante 1 h e 30 min em banho termostatizado a 60 °C.

- *Fotodegradação*

Uma solução da amostra com concentração de 60 µg/mL foi preparada em água purificada e exposta à lâmpada UV 254 nm durante 6 h em temperatura de 25°C.

Alíquotas das soluções submetidas às condições acima especificadas foram filtradas antes de serem injetadas em diferentes tempos.

5.2.2.5.4. Precisão

A precisão do método foi realizada através dos quesitos: intradia (repetibilidade) e interdias e entre analistas (precisão intermediária). A precisão intradia foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 60 µg/mL, no mesmo dia e em mesmas condições de trabalho, analisando o DPR% entre tais determinações. A precisão interdias foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 60 µg/mL, em três dias diferentes e em mesmas condições de trabalho e a precisão entre analistas foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 60 µg/mL, em dias diferentes e por analistas diferentes. A avaliação estatística foi baseada na ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas.

5.2.2.5.5. Exatidão

A exatidão foi realizada pelo ensaio de recuperação, em que foram adicionadas na amostra quantidades conhecidas do padrão (SQR), sendo realizada em três níveis (R1, R2 e R3) e preparadas de acordo com a Tabela 6, seguido de triplicata em três dias diferentes.

Tabela 6. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada para o teste de recuperação do método de CLAE.

	Cefadroxila monoidratada amostra (µg/mL)	**Cefadroxila monoidratada SQR (µg/mL)**	**%**	**Concentração teórica final (µg/mL)[1,2]**
Amostra	30	---		30
R1	30	18	80	48
R2	30	30	100	60
R3	30	42	120	72
Padrão	---	30		30

[1]Balão volumétrico de 5 mL; [2] Níveis de concentração preparados em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 1 (descrita no item 5.2.1.5.4), a qual é recomendada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

5.2.2.5.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelas Equações 2 e 3 (descritas no item 5.2.1.5.5), com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva, conforme descrito na literatura (ICH, 2005).

5.2.2.5.7. Robustez

A robustez permitiu avaliar a confiabilidade do método em relação a pequenas mudanças e/ou variações das condições de trabalho. O parâmetro foi desenvolvido pelo teste de Youden, em que a influência de sete parâmetros foi avaliada por meio de oito experimentos (YOUDEN; STEINER, 1975). Soluções de cefadroxila monoidratada cápsulas e cefadroxila monoidratada SQR foram preparadas na concentração de 60 µg/mL, conforme descrito nos itens 5.2.2.2 e 5.2.2.3, sendo determinado o teor em porcentagem do fármaco para cada ensaio.

A Tabela 7 apresenta as variações que foram realizadas (as letras maiúsculas representam as condições normais de trabalho e as letras minúsculas as condições variadas em pequenas alterações); dois testes foram realizados para este parâmetro, um com variações inferiores e um com variações superiores das condições normais estabelecidas (Tabela 8).

Tabela 7. Parâmetros utilizados pelo teste de Youden para avaliação da robustez do método por CLAE.

Variações	Parâmetro	Experimentos							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A/a	Marca do etanol	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	Fonte de água	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	Proporção da FM	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	% de ácido ortofosfórico	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	Vazão	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	Temperatura	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	Comprimento de onda	G	g	g	G	g	G	G	g

FM: Fase móvel

Tabela 8. Variações dos parâmetros utilizados no teste de Youden.

Parâmetro	Condição Normal	Alterações superiores e inferiores
Marca do etanol	A: Panreac	a: Merck
Fonte de água	B: Laboratório CB	b: Laboratório CFQ
Proporção da FM	C: 92:8 (v/v)	c: 91:9 (v/v) e 93:7 (v/v)
% de ácido ortofosfórico	D: 0,10%	d: 0,12% e 0,08%
Vazão	E: 0,8 mL/min	e: 0,9 mL/min e 0,7 mL/min
Temperatura	F: 25°C	f: 27°C e 23°C
Comprimento de onda	G: 230 nm	g: 232 nm e 228 nm

FM: Fase móvel; CB: Controle Biológico; CFQ: Controle Físico-Químico

Os efeitos das variáveis do parâmetro foram calculados após a obtenção das porcentagens dos teores, subtraindo a média dos valores dos teores da condição normal das médias dos valores de teor das condições alteradas. Para que o método possa ser considerado robusto, os valores dos efeitos dos parâmetro não podem ser maiores que duas vezes o desvio padrão das médias dos valores de teor de todos os experimentos (YOUDEN; STEINER, 1975).

5.2.3. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível

5.2.3.1. Obtenção da curva analítica

O teor declarado de cefadroxila monoidratada SQR é de 93,027%. Para a realização da curva analítica, pesou-se massa de 10,74 mg de cefadroxila SQR, equivalente a 10 mg do fármaco e transferiu-se em balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, para a obtenção de solução estoque de concentração teórica de 1000 µg/mL. Alíquotas de 75, 175, 275, 375, 475 e 575 µL desta

solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, obtendo seus volumes também completados com água ultrapura. As soluções de trabalho, resultaram em concentrações de 15, 35, 55, 75, 95 e 115 µg/mL de cefadroxila monoidratada SQR, as quais foram realizadas em triplicata e transferidas para microplaca com posterior adição de 100 µL da solução de reagente colorido complexante.

5.2.3.2. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR

Para as soluções de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa referente à 10,74 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. Em balões volumétricos de 5 mL de capacidade foram transferidos volumes de 275 µL de solução de cefadroxila monoidratada SQR com concentração de 1000 µg/mL. Os volumes foram completados com água ultrapura para obtenção de concentração teórica de 55 µg/mL. Uma alíquota de 100 µL da solução do fármaco e uma alíquota de 100 µL da solução do reagente colorido complexante foram transferidas aos poços de uma microplaca de 96 poços, as quais foram submetidas à leitura espectrofotométrica.

5.2.3.3. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas

O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Posteriormente, pesou-se massa de 11,46 mg, referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. Alíquotas de 275 µL de solução de cefadroxila monoidratada cápsulas foram transferidas para balão volumétrico de 5 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura para obtenção de soluções com concentração de 55 µg/mL. Uma alíquota de 100 µL da solução do fármaco e uma alíquota de 100 µL da solução do reagente colorido complexante foram transferidas aos poços de uma microplaca de 96 poços, as quais foram submetidas à leitura espectrofotométrica.

5.2.3.4. Preparo das soluções dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada

Pesou-se massa referente a 1,46 mg de uma mistura dos adjuvantes descritos no item 4.3, que correspondia à quantidade referente de adjuvantes em 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida alíquota de 275 µL para balão volumétrico de 5 mL, obtendo concentração teórica de 55 µg/mL. Uma alíquota de 100 µL da solução dos adjuvantes e uma alíquota de 100 µL da solução do reagente colorido complexante foram transferidas aos poços de uma microplaca de 96 poços, as quais foram submetidas à leitura espectrofotométrica.

5.2.3.5.Preparo da solução do reagente colorido complexante

O reagente colorido complexante utilizado para a validação foi obtido com mistura de 800 µL de 1% de fenolftaleína e 400 µL de hidróxido de sódio 0,1 *M* em balão volumétrico de 25 mL, tendo seu volume completado com água purificada.

5.2.3.6.Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com o preconizado pela literatura seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e de quantificação (ICH, 2005; BRASIL, 2017; USP 37, 2018).

5.2.3.6.1. Linearidade

A linearidade do método foi determinada por seis concentrações (15, 35, 55, 75, 95 e 115 µg/mL) de cefadroxila monoidratada SQR, a qual foi realizada em três dias diferentes. A avaliação do parâmetro seguiu o cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados, sendo realizados cálculos estatísticos através da ANOVA e plotagem do gráfico de resíduos para avaliação da distribuição dos dados.

5.2.3.6.2. Seletividade

Na seletividade do método realizado, avaliou-se a interação entre o fármaco com os adjuvantes presentes nas cápsulas e com o reagente colorido complexante. Este

parâmetro foi estudado pela realização da análise de três soluções de cefadroxila monoidratada SQR, cefadroxila monoidratada amostra, adjuvantes e reagente.

5.2.3.6.3. Precisão

A precisão do método foi realizada através dos quesitos: intradia (precisão por repetibilidade), interdias e entre analistas (precisão intermediárias). A precisão intradia foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada SQR na concentração de 55 µg/mL, no mesmo dia e em mesmas condições de trabalho, analisando o DPR% entre tais determinações. A precisão interdias foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 55 µg/mL, em três dias diferentes e em mesmas condições de trabalho e a precisão entre analistas foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 55 µg/mL, em dias diferentes e por analistas diferentes. A avaliação estatística foi baseada na ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas.

5.2.3.6.4. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através de uma análise comparativa entre métodos (ICH, 2005), em que os resultados obtidos nesta validação foram comparados com o método físico-químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), descrito no item 5.2.2.

O teste comparativo foi realizado utilizando soluções de cefadroxila monoidratada cápsulas e SQR, através da análise da determinação de seis teores para cada método, calculado pelas Equações 7 e 8. A concentração utilizada para o método cromatográfico foi 60 µg/mL e para o método espectrofotométrico miniaturizado foi de 55 µg/mL e a avaliação estatística foi realizada através do teste-F e test-*t*.

Equação 7: $CA = AA \times CSR \div ASR$ **Equação 8**: $CA\% = CA \times 100 \div Ct$

Em que:

CA: concentração da amostra (µg/mL)

AA: absorbância da amostra (nm)

CSR: concentração da substância química de referência (µg/mL)

ASR: absorbância da substância química de referência (nm)
Ct: concentração teórica da cefadroxila monoidratada cápsulas (µg/mL)

5.2.3.6.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelas Equações 2 e 3 (descritas no item 5.2.1.5.5), com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva, conforme descrito na literatura (ICH, 2005).

5.2.3.6.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada através de três parâmetros variados independentemente: comprimento de onda (552, 554 e 550 nm); fonte de água (laboratório de controle microbiológico e laboratório de controle físico-químico) e tempo de agitação da amostra (120, 180 e 60 segundos). Os resultados da variação deste parâmetro foram obtidos através do teste-F e teste-*t*.

5.2.4. Método microbiológico turbidimétrico

Para o ensaio turbidimétrico, os micro-organismos foram incubados em estufa em 35°C ± 2°C durante ~20 horas. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical e preparados de acordo com as diretrizes de fabricação antes de serem utilizados. As absorbâncias foram determinadas em 530 nm por espectrofotômetro, após 4 h de incubação em equipamento agitador.

O método de cromatografia para o estudo comparativo de degradação foi realizado utilizando os equipamentos e reagentes descritos no item 4.4.2. A separação cromatográfica foi realizada através do método descrito no item 5.1.4.

5.2.4.1. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR

Para as soluções de cefadroxila monoidratada SQR, pesou-se massa de 10,74 mg de cefadroxila monoidratada (descrita no item 4.1) referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. Os volumes foram completados com água ultrapura. Alíquotas de 150, 300 e 600 µL desta

solução foram transferidas para frascos volumétricos de 5 mL e o volume foi completado com água ultrapura para obter soluções de trabalho de 30, 60 e 120 µg/mL, que foram designados P1, P2 e P3, respectivamente, no bioensaio.

5.2.4.2. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas

O peso médio de 20 cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. Posteriormente, pesou-se massa de 11,46 mg, referente a 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. Os volumes foram completados com água ultrapura. Alíquotas de 150, 300 e 600 µL desta solução foram transferidas para frascos volumétricos de 5 mL e o volume foi completado com água ultrapura para obter soluções de trabalho de 30, 60 e 120 µg/mL, as quais foram designados como A1, A2 e A3, respectivamente, no bioensaio.

5.2.4.3. Preparo das soluções dos adjuvantes presentes na amostra de cefadroxila monoidratada

Pesou-se massa referente a 1,46 mg de uma mistura dos adjuvantes descritos no item 4.3, que correspondia à quantidade referente de adjuvantes em 10 mg de cefadroxila monoidratada cápsulas e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, a fim de obter concentração teórica final de 1000 µg/mL. Alíquotas de 600 µL desta solução foram transferidas para frascos volumétricos de 5 mL e o volume foi completado com água ultrapura para avaliar se houve interferência dos adjuvantes presentes nas cápsulas de cefadroxila monoidratada no ensaio.

5.2.4.4. Preparação e padronização do inóculo

O procedimento de padronização do inóculo foi realizado de acordo com as farmacopeias brasileira e americana (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 37, 2018). A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082 foi cultivada e mantida em meio de ágar TSA a -5°C ± 2°C. Antes de realizar o experimento, a cepa foi inoculada em 30 mL de BHI e mantida para crescimento em incubadora microbiológica em temperatura de 35°C ± 2°C durante ~20 h. Posteriormente, o inóculo foi padronizado a 580 nm em espectrofotômetro, de modo a obter transmitância de 25% ± 2%. O meio de

cultura foi preparado de acordo com as diretrizes de fabricação, sendo dissolvido em água e distribuído em tubos de ensaio (10 mL) e autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

5.2.4.5. Ensaio Microbiológico

O ensaio microbiológico foi realizado de acordo com compêndios oficiais, usando o método de ensaio 3x3 (três doses do padrão e três doses da amostra). Em tubos de ensaio contendo 10 mL de BHI estéril, foram adicionados 200 µL das soluções de trabalho de cefadroxila monoidratada SQR (P1, P2 e P3) e amostras (A1, A2 e A3) com concentrações de 30, 60 e 120 µg/mL, respectivamente, tendo sido todas realizadas em triplicata para cada concentração do fármaco. Após este procedimento, 800 µL da suspensão padronizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082 foram adicionadas também aos tubos de ensaio. Foram preparados além dos tubos do ensaio, um controle positivo (contendo apenas 10 mL de caldo BHI e inóculo) e um controle negativo (contendo apenas 10 mL de caldo BHI). Depois disso, os tubos testes foram incubados em um equipamento com agitação de 32 rpm, em temperatura de 35 °C ± 2 °C durante 4 h. Após o período de incubação, 500 µL de solução a 12% de formaldeído foi adicionado em cada tubo de ensaio para interromper a multiplicação dos micro-organismos. Em seguida, o espectrofotômetro foi zerado com o controle negativo e a absorbância foi determinada a 530 nm. Para calcular a potência da cefadroxila monoidratada utilizou-se a Equação de Hewitt (Equação 9) (HEWITT, 2004).

$$\textbf{Equação 9: } \text{Potência } (\%) = Antilog\ \mathrm{M} \times 100$$

Sendo:

$$\mathrm{M} = \frac{{}^{1}/_{4} \times [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) - (\bar{P}1 + \bar{P}2 + \bar{P}3)]}{{}^{1}/_{4} \times [(\bar{A}3 + \bar{P}3) - (\bar{A}1 + \bar{P}1)]/log}$$

log = logarítimo da razão das doses

5.2.4.6. Validação do método

A validação do método foi determinada pelos seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez, todos de acordo com o especificado pela literatura (ICH, 2005; USP 37, 2018).

5.2.4.6.1. Linearidade

A curva analítica foi obtida em três níveis de concentração (30, 60 e 120 µg/mL) e construída a partir da média das três curvas obtidas em três dias diferentes, utilizando o logaritmo da concentração *versus* a média dos valores das absorbâncias. Este parâmetro foi avaliado pelo método de regressão de mínimos quadrados e a análise de variância (ANOVA).

5.2.4.6.2. Seletividade

A seletividade do método microbiológico turbidimétrico foi determinada por meio de uma mistura dos adjuvantes presentes nas cápsulas de cefadroxila monoidratada, para verificar se possuíam efeitos inibitórios que poderiam interferir no ensaio. A amostra também foi submetida sob condições: ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica com concentrações teóricas iguais às realizadas na curva analítica para avaliar a potência do fármaco na presença de possíveis produtos de degradação. Uma análise comparativa dos resultados foi realizada através das amostras degradadas por meio dos ensaios microbiológico e físico-químico (CLAE). As preparações das soluções degradadas das cápsulas de cefadroxila monoidratada foram as seguintes:

- *Degradação ácida*

Uma solução da amostra com concentração de 500 µg/mL foi preparada em HCl 1 *M* e mantida durante 2 h e 20 min em banho termostatizado a 60 °C. Alíquotas desta solução foram removidas e diluídas em água purificada para atingir concentrações teóricas finais de 30, 60 e 120 µg/mL.

- *Degradação alcalina*

Uma solução da amostra com concentração de 500 µg/mL foi preparada em NaOH 0,01 *M* e mantida durante 2 h em temperatura de 25°C. Alíquotas desta solução foram removidas e diluídas em água purificada para atingir concentrações teóricas finais de 30, 60 e 120 µg/mL.

- *Degradação oxidativa*

Uma solução da amostra com concentração de 500 µg/mL foi preparada em 3% de H_2O_2 e mantida durante 2 h e 30 min em temperatura de 25°C. Alíquotas desta solução

foram removidas e diluídas em água purificada para atingir concentrações teóricas finais de 30, 60 e 120 µg/mL.

- *Degradação neutra*

Uma solução da amostra com concentração de 500 µg/mL foi preparada em água purificada e mantida durante 2 h no banho termostatizado a 60 °C. Alíquotas desta solução foram removidas e diluídas em água purificada para atingir concentrações teóricas finais de 30, 60 e 120 µg/mL.

- *Fotodegradação*

Uma solução da amostra com concentração de 500 µg/mL foi preparada em água purificada e exposta à lâmpada UV 254 nm durante 6 h em temperatura de 25°C. Alíquotas desta solução foram removidas e diluídas em água purificada para atingir concentrações teóricas finais de 30, 60 e 120 µg/mL.

5.2.4.6.3. Precisão

A precisão do método foi realizada através dos quesitos: intradia (repetibilidade), interdias e entre analistas (precisão intermediária). A precisão por repetibilidade foi realizada pela preparação e análise de seis soluções estoques de cefadroxila monoidratada SQR com concentração teórica de 60 µg/mL, no mesmo dia e com as mesmas condições experimentais, analisando o desvio padrão relativo DPR% entre tais determinações A precisão interdias foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 60 µg/mL, em três dias diferentes e em mesmas condições de trabalho e a precisão entre analistas foi realizada pela preparação e análise de seis soluções de cefadroxila monoidratada na concentração de 60 µg/mL, em dias diferentes e por analistas diferentes. A avaliação estatística foi baseada na ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas.

5.2.4.6.4. Exatidão

A exatidão foi realizada pelo ensaio de recuperação, em que foram adicionadas na amostra quantidades conhecidas do padrão (SQR), sendo realizada em três níveis (R1, R2 e R3) e preparadas de acordo com a Tabela 9, seguido de triplicata por três dias diferentes.

Tabela 9. Preparo das replicatas dos tubos para o ensaio de recuperação do método microbiológico turbidimétrico para a determinação da potência da cefadroxila monoidratada.

	Cefadroxila monoidratada amostra (µg/mL)	Cefadroxila monoidratada SQR (µg/mL)	%	Concentração teórica final (µg/mL)[1,2]
Amostra	30	---		30
R1	30	18	80	48
R2	30	30	100	60
R3	30	42	120	72
Padrão	---	30		30

[1]Balão volumétrico de 5 mL; [2] Níveis de concentração preparados em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 1 (descrita no item 5.2.1.5.4), a qual é determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002)

5.2.4.6.5. Robustez

A robustez do método foi avaliada através de seis parâmetros variados independentemente: comprimento de onda (525 nm, 530 nm e 535 nm); tempo de incubação do inóculo (3 h 40 min, 4 h 00 min e 4 h 20 min); volume do meio de cultura nos tubos de ensaio (9,5 mL, 10,0 mL e 10,5 mL); volume do inóculo adicionado nos tubos de ensaio (790 µL, 800 µL e 810 µL); rotação por minuto (30 rpm, 32 rpm e 34 rpm) e a marca do meio de cultura BHI (Acumedia e Oxoid). Os resultados foram obtidos por teste F e teste *t* através variações deste parâmetro.

5.2.5. Análise comparativa entre os métodos validados

5.2.5.1. Análise comparativa entre os métodos físico-químicos

Análise estatística dos teores médios da cefadroxila obtidas pelos três métodos físico-químicos desenvolvidos e validados foi realizada, a fim de comparar se os procedimentos seriam analiticamente equivalentes no estudo. Desta maneira, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), considerando nível de significância de 5%.

5.2.5.2. Análise comparativa entre métodos microbiológico e físico-químico

Além da análise comparativa no parâmetro da seletividade para o método turbidimétrico, realizou-se análise estatística baseada no teste-F e teste-*t*, referente aos teores médios da cefadroxila obtidas pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e microbiológica desenvolvidas e validadas, a fim de comparar se os procedimentos seriam equivalentes no estudo.

5.3. Triagem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila

5.3.1. Obtenção das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada da cefadroxila

As formas anidra (CFD-A) e hemi-hidratada (CFD-H) da cefadroxila foram obtidas a partir da SQR da forma monoidratada (CFD-M), descrita no item 4.1.

Para a obtenção da forma anidra, pesou-se quantidade referente a 600 mg de CFD-M, a qual foi adicionada em um analisador de umidade. A amostra foi aquecida até 110°C até que a massa permanecesse constante por 30 min. Seguiu-se o procedimento para a obtenção da forma hemi-hidratada, porém o aquecimento foi realizado até 70°C até que a massa também permanecesse constante por 30 min. A técnica utilizada para a obtenção de ambas as formas foi baseada no estudo de Brittain, 2007.

5.3.2. Ensaio de solubilidade

O ensaio de solubilidade, realizado segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), foi realizado antes de proceder com as técnicas de obtenção de polimorfos. Para cada teste foram pesadas quantidades referentes a 50 mg de CFD-M SQR em béqueres, acrescentando alíquotas crescentes de solventes, até obter dissolução completa da amostra. Os testes foram realizados à temperatura ambiente de 25°C, sob constante agitação. Como solventes foram utilizados: água, acetato de etila, acetona, acetonitrila, etanol, hexano, isopropanol e metanol, descritos no item 4.5.1.

5.3.3. Obtenção das formas polimórficas da cefadroxila

Após a determinação da solubilidade, foram obtidas distintas formas de cefadroxila a partir da forma adquirida anidra, descrita no item 5.3.1, por diferentes métodos. Os solventes utilizados nesta etapa do estudo foram os mesmos testados no

ensaio de solubilidade descritos no item 4.5.1. A Figura 10 apresenta o fluxograma do modelo de triagem sobre os diferentes métodos determinados neste estudo.

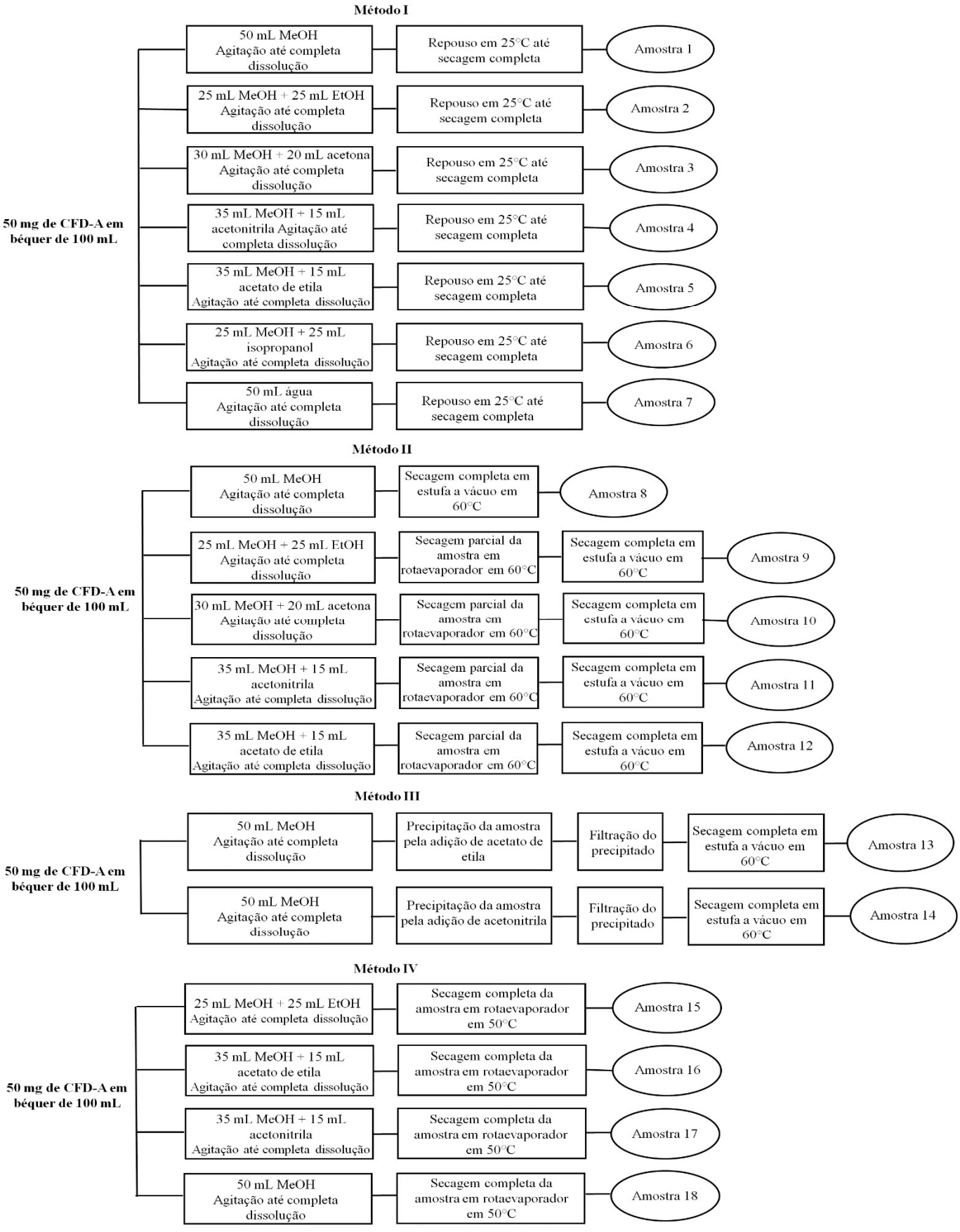


Figura 10. Fluxograma apresentando modelo de triagem sobre os métodos utilizados como ferramenta para obtenção de polimorfos obtidos a partir da cefadroxila anidra.

5.3.4. Técnicas analíticas para caracterização das formas da cefadroxila

As técnicas analíticas espectrofotometria na região do infravermelho médio (IV), espectrofotometria na região do infravermelho próximo (NIR), análise térmica (TGA/DTG e DSC), ponto de fusão (PF), ensaio de dissolução e análise microscópica foram utilizadas como técnicas para identificação e caracterização das formas anidra, hemi-hidratada, monoidratada e formas distintas obtidas a partir da cefadroxila.

5.3.4.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio e próximo

Para os estudos espectrofotométricos na região do infravermelho médio, foram utilizados espectrofotômetro da Shimadzu Scientific Instruments FT-IR Prestige-21 (Kyoto, Japão), acoplado a atenuador total ATR atenuado da GladiATR, Pike Technologies (Madison, EUA), na faixa de 4000-400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1}. Para os estudos espectrofotométricos na região do infravermelho próximo, utilizou-se espectrofotômetro NIR DS2500 FOSS (Hillerod, Dinamarca) na faixa espectral de 400-2500 nm, em que cada amostra analisada (~300 mg) foi colocada em uma célula de quartzo circular para sólidos à temperatura ambiente no modo de refletância. Para obter a relação sinal-ruído suficiente, as amostras foram medidas em triplicata para ambas as técnicas.

5.3.4.2. Determinação do ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados usando fusiômetro óptico da Ionomex (Buenos Aires, Argentina). As amostras foram aquecidas a 10°C/min até atingir temperatura de ±120°C/min e depois as taxas de aquecimentos foram alteradas para 2°C/min.

5.3.4.3.Análise térmica (TGA/DTG e DSC)

Para o estudo térmico de TGA/DTG as curvas foram obtidas no equipamento DTG-60H, da Shimadzu Scientific Instruments (Kyoto, Japão) usando cadinho de alumínio, razão de aquecimento de ~10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2). Para o estudo térmico de DSC foi utilizado o equipamento DSC 60, da Shimadzu Scientific Instruments (Kyoto, Japão) usando cadinho fechado de alumínio, perfurado com orifício para equilíbrio das pressões, razão de aquecimento de ~10°C/min e ar

atmosférico. Para ambas as técnicas utilizou-se cápsula de alumínio vazia como referência.

5.3.4.4. Difração de raios X

A caracterização estrutural das amostras foi realizada pelo método de Rietveld, a partir de dados de difração de raios X por policristais. Para o refinamento das estruturas e análise, foi usado o programa Topas v 6. Para a obtenção dos dados de DRX para as análises foram utilizados os difratômetros: Rigaku Rint 2000 e Rigaku Miniflex com anodo de Cu, com fenda de divergência e espalhamento de ¼° e fenda Soller de 2,5° com detector PSD (position sensitive detector) D/tex.

5.3.4.5. Dissolução intrínseca

Para os testes de dissolução foi utilizado dissolutor da Hanson Research SR8 (Chatsworth, EUA). O teste foi realizado com aparato II da USP configurado como (pá) a uma velocidade de rotação de 100 rpm. Pastilhas contendo 150 mg de CFD e demais formas obtidas foram realizadas em prensa mecânica da Beckman (Califórnia, EUA) com força de compressão de 4 toneladas por 3 minutos, onde posteriormente, foram adicionadas em 400 mL no meio de solução (água purificada) em temperatura de 37°C. Alíquotas de ± 3 mL foram tomadas sem a substituição do meio em tempos de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Posteriormente, as amostras retiradas nos tempos estabelecidos foram diluídas em água purificada (1:10) e determinados em λ modo = 260 nm utilizando espectrofotômetro de UV-DAD Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). As determinações foram feitas em uma célula de quartzo (passo óptico de 10 mm) contra um branco de referência. Para determinar a velocidade de dissolução das amostras foram realizados os cálculos que estão indicados nas Equações 10 e 11.

Equação 10: $\mathrm{conct} = [(\bar{x}\mathrm{Abs} - \mathrm{b})/a]$ **Equação 11:** $\mathrm{c} = [\mathrm{Conc}/(\pi \times \mathrm{r}^2)]$

Sendo:

conct = concentração teórica

$\bar{x}$Abs = valor médio das determinações de três absorbâncias

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular

c = área superficial de massa dissolvida

Conc = Concentrações teóricas multiplicadas por 10 [referente à diluição das amostras (1:10)]

r = raio da pastilha

5.3.4.6. Microscopia óptica

Para as análises microscópicas, quantidades mínimas de ~2 mg das amostras foram adicionadas em microscópio óptico e visualizadas em diferentes lentes objetivas (10x, 40x e 100x) tendo sido observadas em alta resolução pelo computador.

5.3.5. Aplicação das formas polimórficas da cefadroxila no ensaio microbiológico por turbidimetria

Os equipamentos e reagentes utilizados nesta etapa do trabalho encontram-se descritos no item 4.4.4.

5.3.5.1. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada SQR

Uma solução estoque de 1000 µg/mL foi preparada pesando quantidade equivalente a 10 mg de cefadroxila SQR, em balão volumétrico de 10 mL. Os volumes foram completados com água purificada esterilizada. Alíquotas de 150, 300 e 600 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e o volume completado com água purificada esterilizada para obter soluções de trabalho de 30, 60 e 120 µg/mL, que foram designadas, respectivamente, como P1, P2 e P3 no bioensaio.

5.3.5.2. Preparo das soluções de cefadroxila monoidratada em cápsulas

Uma solução estoque de 1000 µg/mL foi preparada pesando quantidade equivalente a 10 mg de cápsulas de cefadroxila monoidratada, baseada no peso médio de 20 cápsulas, em balão volumétrico de 10 mL. Os volumes foram completados com água purificada esterilizada. Alíquotas de 150, 300 e 600 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e o volume foi completado com água purificada esterilizada para obter soluções de trabalho de 30, 60 e 120 µg/mL, as quais foram designadas, respectivamente, como A1, A2 e A3 no bioensaio.

5.3.5.3. Preparo das soluções das formas polimórficas da cefadroxila

Uma solução estoque de 1000 µg/mL foi preparada pesando quantidade equivalente a 10 mg de amostras obtidas a partir da cefadroxila anidra em balão volumétrico de 10 mL. Os volumes foram completados com água purificada esterilizada. Alíquotas de 150, 300 e 600 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e o volume foi completado com água purificada esterilizada para obter soluções de trabalho de 30, 60 e 120 µg/mL, as quais foram designadas, respectivamente, como F1, F2 e F3, no bioensaio.

5.3.5.4. Preparação e padronização do inóculo

Antes da realização do experimento, a cepa foi inoculada em 30 mL de BHI e mantida para crescimento em incubadora microbiológica em temperatura de 35 °C ± 2 °C durante 20 h. Posteriormente, o inóculo foi padronizado a 580 nm em espectrofotômetro, de modo a obter transmitância de 25% ± 2%. O meio de cultura foi preparado de acordo com as diretrizes de fabricação, sendo dissolvido em água e distribuído em tubos de ensaio (10 mL) e autoclavado à 121 °C durante 15 minutos.

5.3.5.5. Ensaio Microbiológico

O ensaio microbiológico foi realizado de acordo com o item 5.2.4, que utilizou o procedimento 3x3 (três doses do padrão e três doses de amostras). Em tubos de ensaio contendo 10 mL de BHI estéril, foram adicionados 200 µL das soluções de trabalho de cefadroxila monoidratada padrão, nomeados de P1, P2 e P3 e amostras, nomeadas de A1, A2 e A3 para as cáspulas e F1, F2, F3 para as formas obtidas, com concentrações de 30, 60 e 120 µg/mL, respectivamente. Cada concentração do fármaco foi realizada em triplicata. Após este procedimento, 800 µL da suspensão padronizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082 foram adicionados aos tubos de ensaio. Foram preparados também controle positivo (contendo apenas 10 mL de caldo BHI e inóculo) e controle negativo (contendo apenas 10 mL de caldo BHI). Depois disso, os tubos testes foram incubados em equipamento agitador com agitação de 32 rpm, em temperatura de 35 °C ± 2°C durante 4 h. Após o período de incubação, 500 µL de solução de formaldeído 12% foram adicionados em cada tubo de ensaio para interromper a multiplicação dos micro-

organismos. Em seguida, o espectrofotômetro foi zerado com o controle negativo e a absorbância foi determinada a 530 nm. Para calcular a potência da cefadroxila monoidratada e das amostras utilizou-se a Equação de Hewitt (HEWITT, 2004).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise qualitativa

6.1.1. Peso médio

O peso médio de vinte cápsulas de cefadroxila monoidratada foi de 573,08 mg. De acordo com a literatura, a forma farmacêutica cápsulas duras com 300 mg ou mais, pode apresentar um limite de variação de ± 7,5% em relação ao peso médio. Na Figura 11, é possível visualizar que as cápsulas apresentaram pesos dentro da faixa preconizada e nenhum dos valores ultrapassaram os limites superior e inferior estabelecidos.

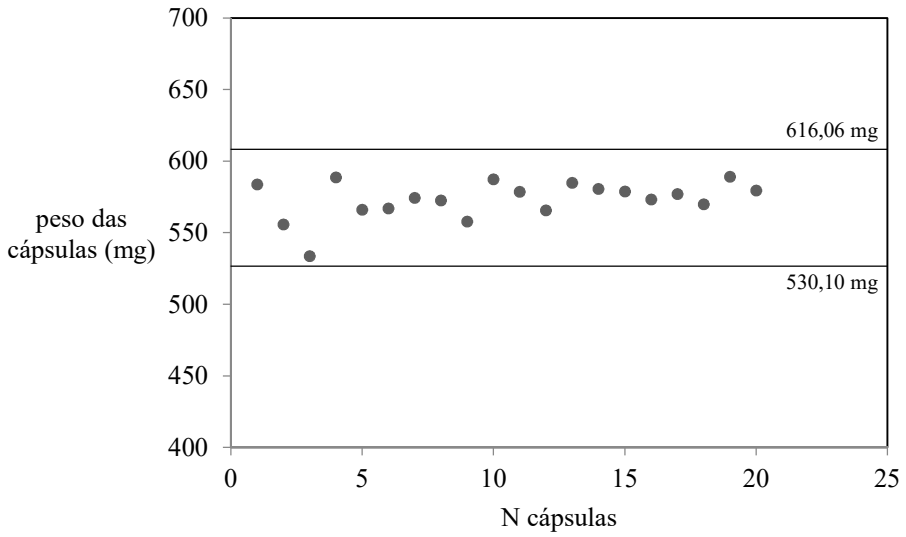


Figura 11. Peso médio realizado para as cápsulas de cefadroxila monoidratada 500 mg.

6.1.2. Características físicas

A cefadroxila monoidratada SQR apresentou-se sob a forma de pó com coloração quase branca a levemente amarelada, condizendo com as características preconizadas na literatura (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 37, 2018).

6.1.3. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

A Figura 12 apresenta os espectros sobrepostos da cefadroxila monoidratada cápsulas e SQR.

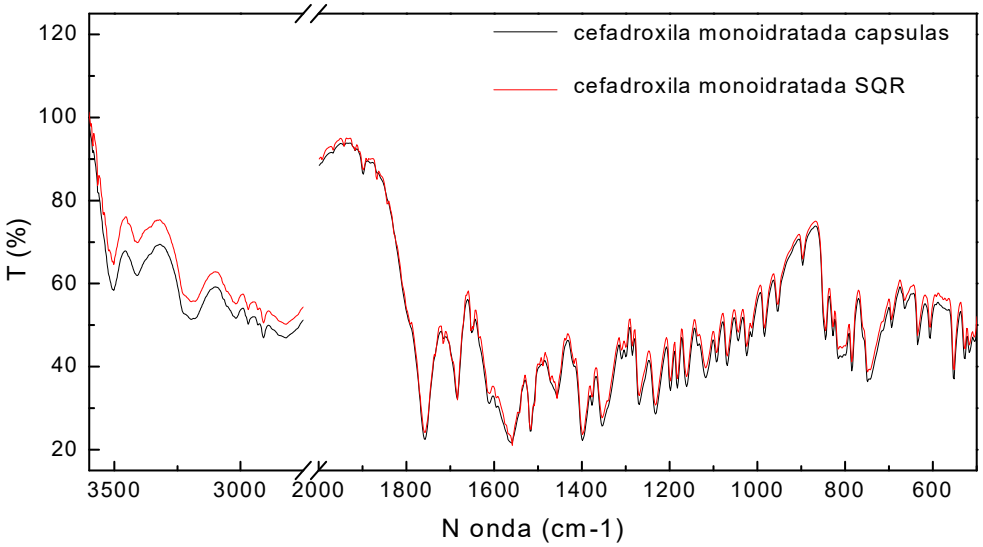


Figura 12. Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho de cefadroxila monoidratada cápsulas e SQR.

Os espectros da SQR e da amostra de cefadroxila monoidratada apresentaram as mesmas bandas de absorção, podendo associar a identidade do fármaco em sua forma farmacêutica apresentada.

O espectro da cefadroxila monoidratada apresenta bandas caraterísticas da estrutura química da molécula que estão representadas pela Figura 13 e Tabela 10.

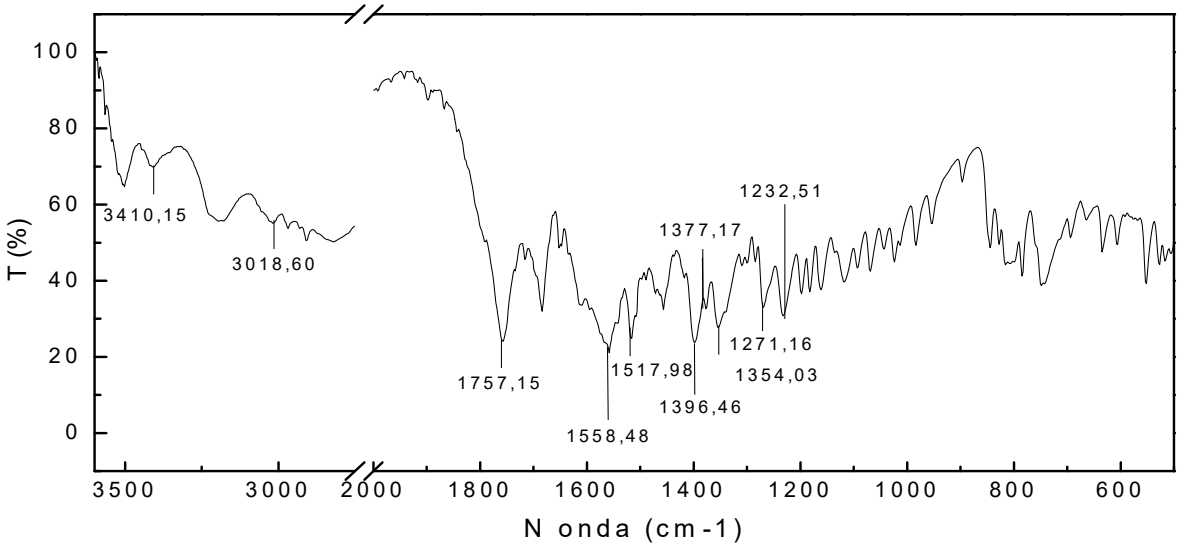


Figura 13. Espectro de absorção por infravermelho da cefadroxila monoidratada SQR com suas principais bandas de absorção marcadas.

Tabela 10. Comparação das bandas de absorção apresentadas pela cefadroxila monoidratada SQR na região do infravermelho com dados apresentados na literatura.

Frequências visualizadas (cm^{-1})	Faixa de frequências de referência (cm^{-1}) [1]	Grupamentos Responsáveis
3410,15	3500-3300	Estiramento N-H
3018,60	3050-3010	Estiramento C_{sp2}-H
1757,15	1760-1665 [2]	Estiramento C=O
1558,48	1640-1560	Dobramento N-H
1517,98	1600-1450 [3]	Estiramento C=C (aromáticos)
1396,46	1400	Estiramento COO
1377,17	1375	Dobramento C_{sp3}-H
1354,03	1350-1000	Estiramento C-N
1271,16	1320-1210	Estiramento C-O
1232,51	1440-1220	Dobramento C-O-H

1 PAVIA et al., 2010; 2 Valores de referência para grupamentos carbonílicos; 3 Podem aparecer até 4 bandas dentro desta faixa

A região vibracional do infravermelho médio é compreendida na faixa de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}, sendo a mais utilizada para identificação de compostos como alimentos, cosméticos e medicamentos. A molécula quando absorvida, apresenta frequências por radiação infravermelha, absorvendo a frequência vibracional natural, a qual origina em um aumento da amplitude do movimento de vibração presente nas ligações químicas das moléculas (PAVIA et al., 2010; TÓTOLI & SALGADO, 2012). De acordo com a

Farmacopeia Brasileira (2010), a espectrofotometria no infravermelho médio é um ensaio de identificação que possui excelência em distinguir substâncias com diferenças estruturais.

A espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica amplamente utilizada pelas indústrias, pesquisas e áreas de química orgânica e inorgânica por ser simples, confiável, de fácil execução e segura para a determinação e quantificação de fármacos (VIEIRA et al., 2012; MORENO & SALGADO, 2012; TÓTOLI & SALGADO, 2012; KOGAWA & SALGADO, 2013; CORRÊA & SALGADO, 2014; CONSORTTI & SALGADO, 2017).

Além de obter grande vantagem sobre os impactos ao meio ambiente devido a não utilização de solventes orgânicos, esta técnica apresenta fácil execução, rapidez nas análises, maior economia, mínimo ou nenhum pré-tratamento nas amostras, permitindo detectar a presença de impurezas quando presentes nessas amostras e fornecendo ótima resolução e precisão nos resultados em análises quantitativas, principalmente em medicamentos e/ou substâncias que apresentam incompatibilidades com solventes (MORENO & SALGADO, 2012; TÓTOLI & SALGADO, 2012; KOGAWA & SALGADO, 2013; CORRÊA & SALGADO, 2014).

6.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

No desenvolvimento da análise, algumas condições cromatográficas foram testadas a fim de escolher o método que apresentasse melhores condições à técnica estabelecida.

A Tabela 11 representa os testes desenvolvidos e as condições realizadas para a escolha do método.

Tabela 11. Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método analítico para quantificação de cefadroxila monoidratada utilizando coluna Zorbax-SB C_{18} (150 x 4,6 mm, 5 µm).

Fase móvel	Concentração da fase móvel	Vazão (mL/min)
Água com ácido acético 2% + etanol	90:10 (v/v)	0,8
	90:10 (v/v)	0,9
	90:10 (v/v)	0,7
	91:9 (v/v)	0,7
	95:5 (v/v)	0,7
	92:8 (v/v)	0,8
Água com ácido ortofosfórico 0,1% + etanol	90:10 (v/v)	0,7
	92:8 (v/v)	0,8

A condição cromatográfica escolhida foi a constituída por fase móvel: água com ácido ortofosfórico 0,1% e etanol grau HPLC, 92:8 (v/v), com a coluna Zorbax-SB C_{18} (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) na vazão de 0,8 mL/min, por apresentar o pico simétrico em tempo de retenção recomendado e número de pratos que indicaram ótima eficiência da coluna. A detecção foi conduzida em 230 nm e o volume de injeção foi de 10 µL para todas condições testadas.

Após definir a condição cromatográfica, foi realizada uma leitura em fotodiodos, a fim de observar o comprimento de onda a ser utilizado na validação do método. A Figura 14 apresenta o espectro da cefadroxila monoidratada com comprimento de onda máximo em 229,7 nm, portanto, optou-se por trabalhar em 230 nm.

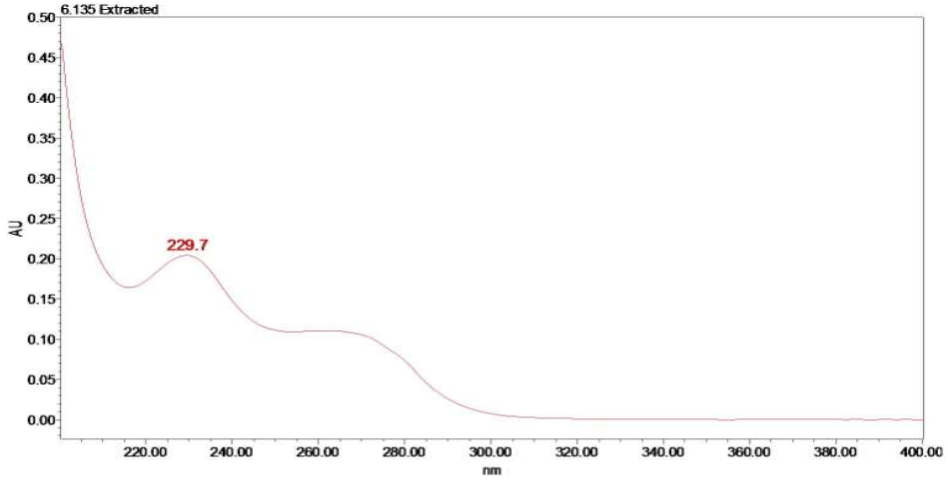


Figura 14. Espectro de absorção no UV para a cefadroxila monoidratada em solução aquosa a 50 µg/mL no desenvolvimento do método por CLAE.

O cromatograma referente às sobreposições das soluções preparadas de cefadroxila monoidratada cápsulas e SQR está representado na Figura 15. Em azul o cromatograma referente à amostra, em preto referindo-se à SQR.

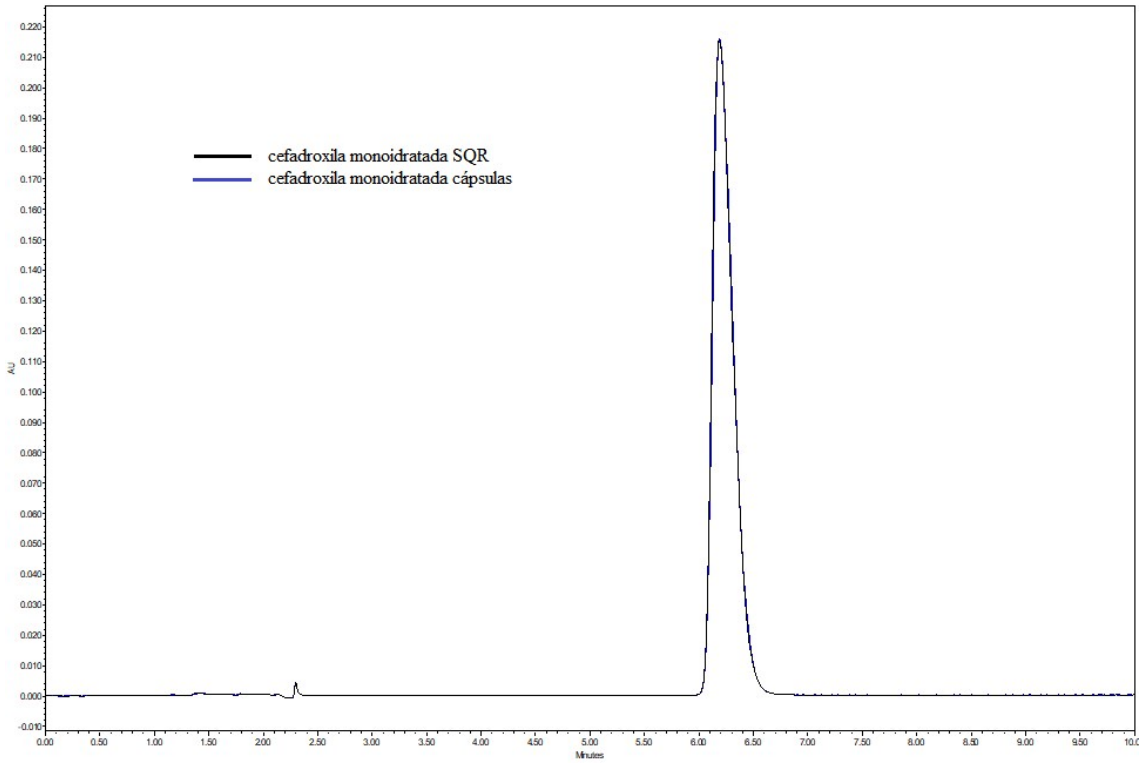


Figura 15. Cromatogramas das soluções de cefadroxila monoidratada cápsulas (azul) e cefadroxila monoidratada SQR (preto) (50 µg/mL) sobrepostos obtidos no desenvolvimento do método por CLAE com coluna Zorbax SB C_{18}, fase móvel de água + ácido ortofosfórico 0,1% e etanol 92:8 (v/v), vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimento de onda de 230 nm.

De acordo com a Figura 15 foi possível observar que as cápsulas de cefadroxila monoidratada indicou a mesma identidade da SQR, uma vez que apresentam os mesmos tempos de retenção (6,1 min) e ausência de impurezas e/ou produtos de degradação devido à ausência de outros picos no cromatograma.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com o uso de aplicações universais é uma técnica de separação altamente eficiente e precisa que permite a detecção e quantificação de substâncias com tempos de análise reduzidos e alta resolução, podendo reproduzir métodos com o uso da mesma coluna e até mesmo analisar um grande número de compostos (JEFFERY et al., 1992; CASS & DEGANI, 2002).

Essa técnica é amplamente utilizada em análises de controle de qualidade de rotina e apresenta grande contribuição para a análise de fármacos, uma vez que também permite

monitorar sua síntese, isolar produtos e detectar e quantificar IFA em medicamentos (RAMBLA-ALEGRE et al., 2011).

É de fundamental importância o desenvolvimento e validação de novos métodos por CLAE baseados na química verde, uma vez que a redução do tempo de análise e produção de resíduos tóxicos minimiza o custo e contribui para o ambiente e a segurança do operador, além de promover maior tempo de vida para o equipamento e colunas cromatográficas quando soluções tamponantes não são utilizadas nas análises (PEDROSO & SALGADO, 2014; TÓTOLI & SALGADO, 2015).

6.1.4. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível

No desenvolvimento do método, alguns reagentes foram testados a fim de escolher o que melhor interagisse com a molécula do fármaco para emitir as absorbâncias necessárias de acordo com as concentrações que seriam estabelecidas na curva analítica.

Assim, testou-se:

- Ácido ascórbico 3%
- Vermelho de metila 0,1%
- Azul de bromotimol 1%
- Fenolftaleína 1% + NaOH 0,1 *M*

Dentre os reagentes testados, a fenolftaleína 1% + NaOH 0,1 *M* foi escolhido para quantificar o fármaco. É importante ressaltar que vários testes utilizando várias concentrações deste corante foram realizados. O reagente composto de 800 µL de 1% de fenolftaleína e 400 µL de hidróxido de sódio 0,1 *M* em balão volumétrico de 25 mL foi o que melhor interagiu com a cefadroxila, apresentando absorbâncias entre 0,2 a 0,8 e correlação linear entre elas e as concentrações do fármaco, segundo Lei de Lambert Beer (OLIVEIRA et al., 2004).

Após definir o reagente e sua concentração, uma leitura da placa foi realizada a fim de observar o comprimento de onda máximo a ser utilizado na validação do método. A Figura 16 apresenta o espectro de absorção da cefadroxila monoidratada SQR e cápsulas sobrepostos no comprimento de onda máximo escolhido em 552 nm.

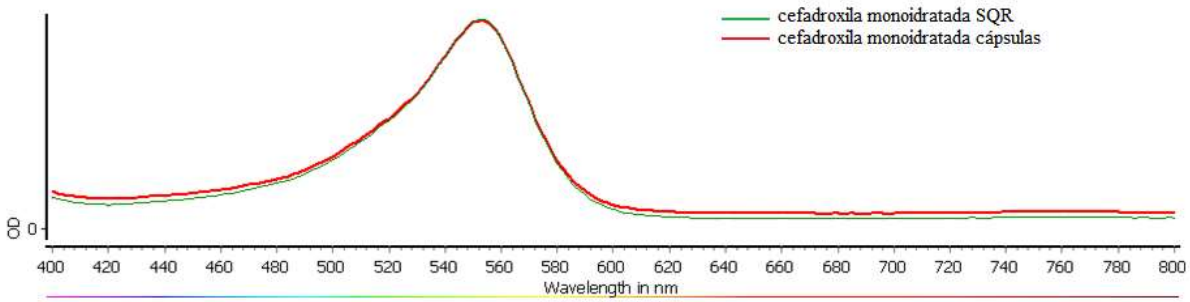


Figura 16. Sobreposição dos espectros de absorção da cefadroxila monoidratada SQR (verde) e cefadroxila monoidratada cápsulas (vermelho) em 552 nm.

A Figura 17 apresenta uma placa contendo 100 µL de diferentes concentrações de soluções de cefadroxila monoidratada SQR com adição de 100 µL do reagente colorido complexante 1% de fenolftaleína + NaOH 0,1 *M* realizados no desenvolvimento do método.

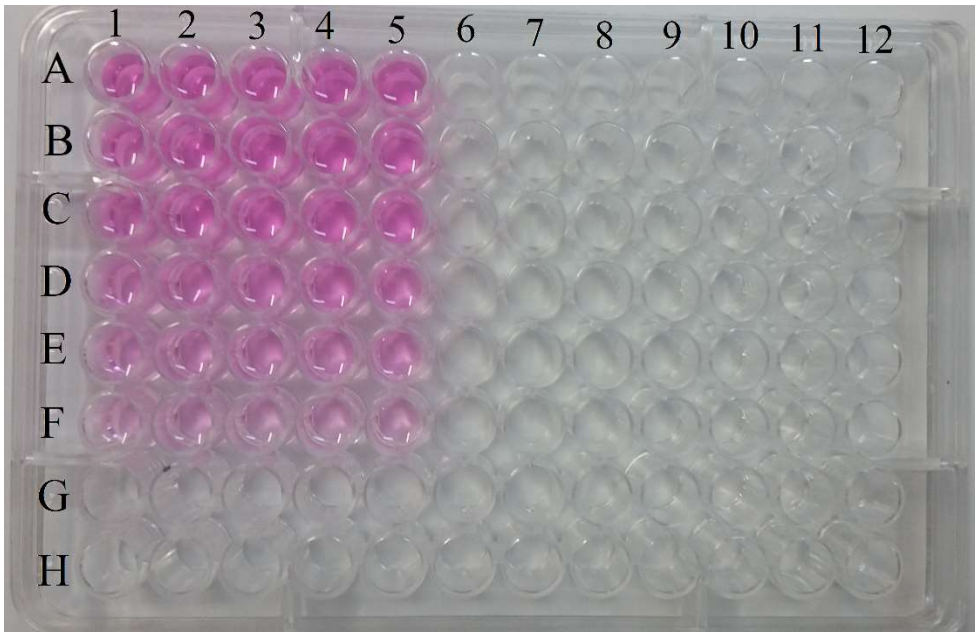


Figura 17. Diferentes concentrações de cefadroxila monoidratada SQR (A 15 µg/mL, B 35 µg/mL, C 55 µg/mL, D 75 µg/mL, E 95 µg/mL e F 115 µg/mL) em contato com o reagente colorido complexante composto por 1% de fenolftaleína + NaOH 0,1 *M*.

De acordo com a Figura 17, foi possível verificar que as menores concentrações de cefadroxila apresentam cores mais fortes quando comparadas às concentrações maiores que por reagirem com o corante, diminuíram a intensidade da cor.

Dentre as técnicas analíticas existentes, a espectrofotometria na região do visível é muito utilizada em análises rotineiras farmacêuticas, bioquímicas, físicas e químicas (GALO & COLOMBO, 2009).

A espectrofotometria na região do visível permite a realização de análises quantitativas e qualitativas com grandes números de aplicações desenvolvidas, sendo elas realizadas com rapidez, simplicidade e possuindo baixo custo operacional (ROCHA & TEIXEIRA, 2004; GALO & COLOMBO, 2009).

A técnica consiste em incidir um feixe de luz de comprimento de onda e intensidade numa amostra, ou densidade óptica, do qual é refratado emitindo resultados em absorbâncias. A absorção na região do visível refere-se à refletância na faixa entre 400-800 nm, a qual afeta diretamente a cor dos produtos químicos utilizados na técnica. Na região eletromagnética, as moléculas e os átomos passam por transições eletrônicas do estado fundamental para o excitado (ALI et al., 2015).

Quando ocorre a associação desta técnica com a miniaturização de sistemas, as vantagens e os benefícios quanto ao meio ambiente são ainda melhores, devido à diminuição considerável do tempo das análises, dos custos de energia, da quantidade de amostras e geração de resíduos, uma vez que pode-se optar pela não utilização de solventes orgânicos.

Assim, esta técnica miniaturizada foi escolhida para determinar e quantificar a cefadroxila monoidratada cápsulas, além de não haver na literatura a validação e quantificação miniaturizada para este fármaco. A técnica apresenta-se como uma ótima alternativa de implantação aos setores industriais para determinação da cefadroxila e outros fármacos, que irá contribuir diretamente com a química verde e meio ambiente.

6.2. Análise quantitativa

6.2.1. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

A região espectral da análise foi de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1}. Após a obtenção dos espectros, a análise quantitativa foi realizada na região espectral de 1800 a 1700 cm^{-1}, que se refere à banda característica da carbonila da molécula da cefadroxila monoidratada (Figura 18).

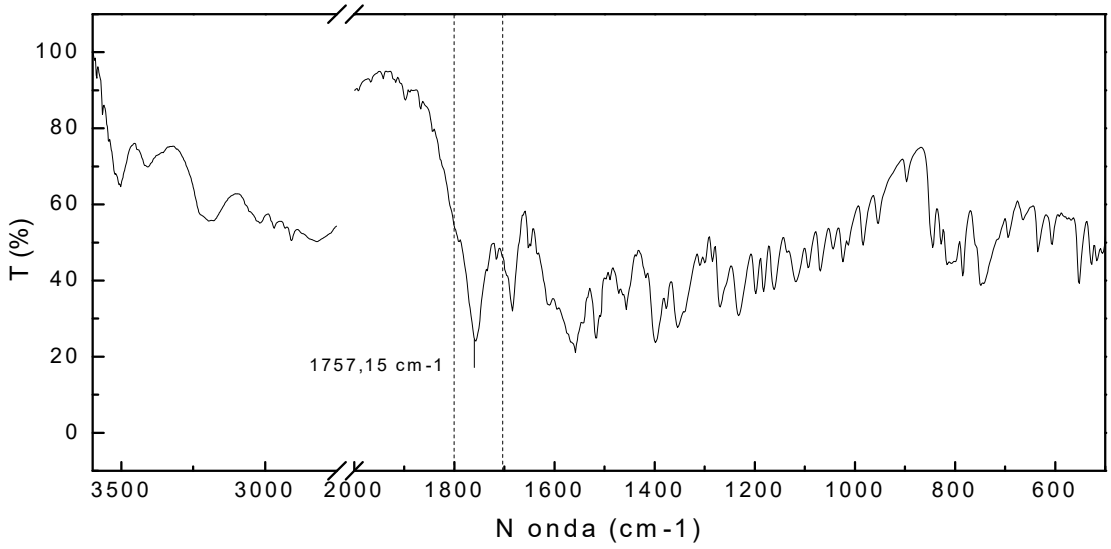


Figura 18. Espectro de absorção por infravermelho da cefadroxila monoidratada SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa em 1757,15 cm^{-1}, a qual corresponde à banda característica da carbonila da molécula.

6.2.1.1. Linearidade

A Tabela 12 apresenta os valores referentes às absorbâncias obtidas para a curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR.

Tabela 12. Valores das absorbâncias referentes à cefadroxila monoidratada SQR para a construção da curva analítica através do método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.

Concentração (mg/150 mg)	Absorbância[1]	Absorbância média ± e.p.m.	DPR%
1,5	0,376 0,370 0,379	0,375 ± 0,005	1,22
1,7	0,439 0,433 0,425	0,432 ± 0,007	1,62
1,9	0,524 0,492 0,524	0,513 ± 0,018	3,60
2,1	0,564 0,569 0,571	0,568 ± 0,004	0,63
2,3	0,654 0,613 0,667	0,645 ± 0,028	4,37
2,5	0,681 0,719 0,717	0,706 ± 0,021	3,03

1 Valor médio de três determinações; e.p.m.: erro padrão da média; DPR: desvio padrão relativo

A curva analítica foi realizada de acordo com a disposição das absorbâncias em relação às concentrações e encontra-se disposta na Figura 19. Na Tabela 13 e na Figura 20 encontram-se a análise estatística ANOVA calculada e o gráfico de resíduos padronizados, respectivamente, para os dados da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR.

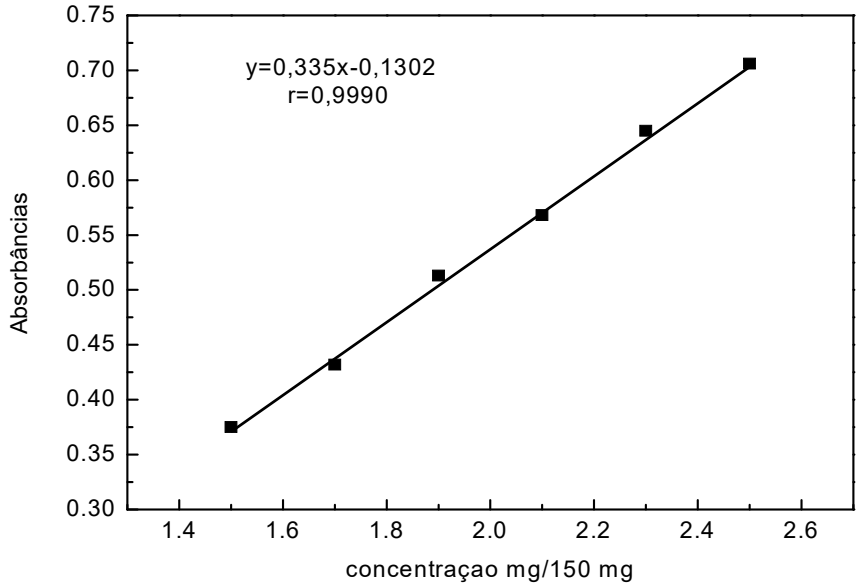


Figura 19. Representação gráfica da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.

Tabela 13. Análise de variância dos valores das absorbâncias determinados na obtenção da curva analítica de cefadroxila monoidratada SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,2361	0,04723	169,04*	3,11
Regressão linear	1	0,2352	0,23521	841,86*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,0009	0,0002327	0,83	3,26
Resíduo	12	0,0034	0,0002794	---	---
Total	17	0,2395	---	---	---

*Significativo para $p < 0,05$

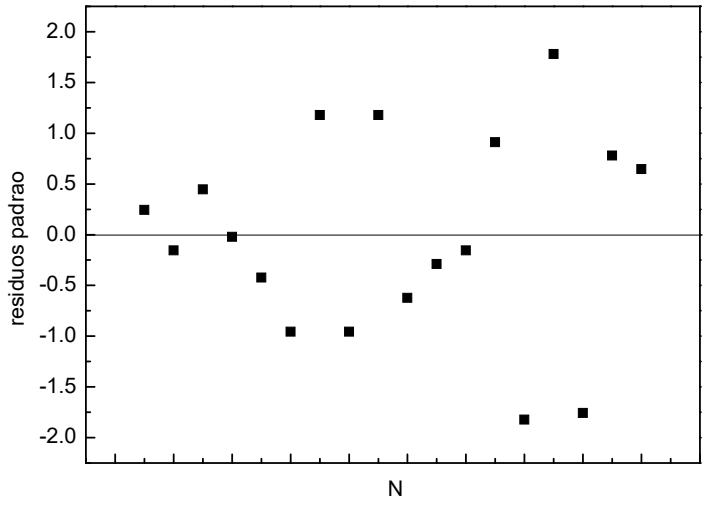


Figura 20. Gráfico de resíduos padronizados referente à cefadroxila monoidratada SQR obtido com a técnica de espectrofotometria na região do infravermelho médio.

De acordo com os resultados, a curva analítica do método apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,9990 e os dados estatísticos não demonstraram desvio da linearidade significativo ao nível de significância de 5%, tendo F calculado (0,83) inferior ao F tabelado (3,26). O gráfico de resíduos apresentou distribuição adequada, o que confirma a linearidade do método através do intervalo de concentrações avaliadas.

6.2.1.2.Seletividade

Foram realizadas as leituras dos espectros e suas respectivas bandas de absorção para a SQR e amostra da cefadroxila monoidratada e adjuvantes presentes na amostra. Os espectros sobrepostos estão demonstrados na Figura 21 e encontram-se destacados em diferentes cores. A cor azul indica o espectro da SQR, a vermelha indica a amostra e em preto, os adjuvantes presentes na formulação sem a presença do fármaco.

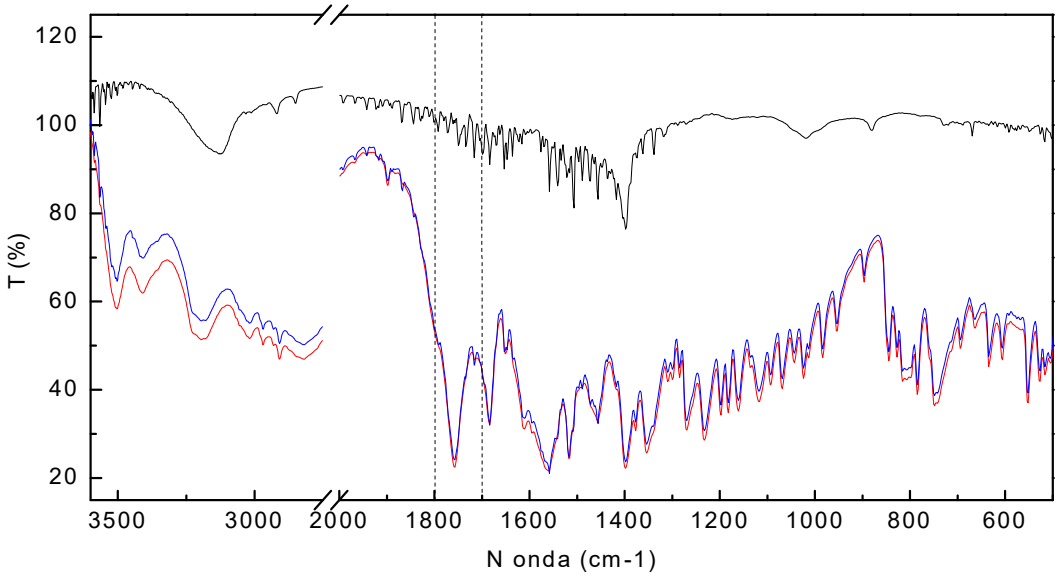


Figura 21. Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho de cefadroxila monoidratada SQR (azul), cefadroxila monoidratada cápsulas (vermelho) e adjuvantes (preto).

Neste parâmetro foi possível observar que os adjuvantes presentes na preparação farmacêutica (cápsulas) da cefadroxila monoidratada não apresentaram bandas de absorção específicas, ou seja, não interferiram com os resultados obtidos para a quantificação do fármaco, provando a seletividade do método.

6.2.1.3.Precisão

A precisão do método foi obtida de acordo com os quesitos intradia (repetibilidade) e interdias e entre analistas (intermediária). A avaliação foi baseada através do desvio padrão relativo (%) para a precisão por repetibilidade, ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas. A Tabela 14 apresenta os dados estatísticos das precisões realizadas.

Tabela 14. Avaliação estatística das precisões para cefadroxila monoidratada SQR pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.

Precisão	Avaliação estatística	Valores das absorbâncias						Resultados
		1	2	3	4	5	6	
Repetibilidade (Intradia)	DPR%	0,510	0,535	0,513	0,519	0,496	0,504	Média = 0,513 DPR% = 2,61
Intermediária (Interdias)	ANOVA: fator único	0,510 0,503 0,494	0,535 0,484 0,511	0,513 0,547 0,541	0,519 0,532 0,470	0,496 0,526 0,527	0,504 0,542 0,498	F_{calc} 0,72 < F_{tab} 3,88 P_{valor} 0,50 > 0,05
Intermediária (Entre analistas)	Teste-F e Teste-*t*	0,494 0,493	0,511 0,493	0,541 0,495	0,470 0,512	0,527 0,517	0,498 0,462	Teste F: duas amostras para variância F_{cal} 1,60 < F_{tab} 6,39 P_{valor} 0,32 > 0,05 Teste *t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes t_{cal} 0,87 < t_{tab} 2,30 P_{valor} 0,40 > 0,05

DPR (%): desvio padrão relativo

A precisão intradia do método foi comprovada devido apresentar valor de DPR% baixo, indicando a proximidade entre os resultados obtidos. A precisão interdias não apresentou diferença estatística significativa para nível de significância de 5% e a precisão entre analistas foi calculada pelos Teste F e Teste *t* presumindo variâncias equivalentes tendo *t* calculado (0,87) inferior ao *t* tabelado (2,30).

6.2.1.4. Exatidão

A exatidão foi realizada por meio do ensaio por recuperação em três níveis diferentes de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Determinação da exatidão do método analítico para análise de cefadroxila monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho médio.

	Cefadroxila monoidratada SQR adicionada (mg)	Cefadroxila monoidratada SQR encontrada (mg)	Recuperação[1] (%)	DPR[2] (%)	Recuperação média (%)
R1	0,1	0,099	99,42	1,85	
R2	0,5	0,507	101,41	0,63	100,35
R3	0,9	0,902	100,23	1,15	

1 média de três determinações; 2 DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada uma média dos valores de 100,35%, estando de acordo com o preconizado na literatura para ensaios de recuperação (AOAC, 2002).

6.2.1.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados para determinar a sensibilidade do método. O valor encontrado para o limite de detecção foi de 0,37 mg e o limite de quantificação foi de 1,11 mg.

6.2.1.6. Robustez

As absorbâncias encontradas nos oito ensaios realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^3 e seus respectivos fatores alterados encontram-se dispostos na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros da avaliação da robustez pelo planejamento fatorial 2^3 do método analítico para análise de cefadroxila monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho médio.

Ensaio	Tempo (min)	Força (kN)	Marca KBr	Abs. I	Abs. II	Média	DPR (%)
1	8	76	Synth	0,496	0,494	0,495	0,28
2	12	76	Synth	0,494	0,520	0,507	3,63
3	8	84	Synth	0,532	0,496	0,514	4,95
4	12	84	Synth	0,513	0,497	0,505	2,24
5	8	76	Dinâmica	0,513	0,508	0,511	0,69
6	12	76	Dinâmica	0,523	0,506	0,515	2,33
7	8	84	Dinâmica	0,494	0,495	0,495	0,14
8	12	84	Dinâmica	0,491	0,508	0,500	2,41

A análise da variância também foi realizada para a robustez, juntamente com o gráfico de Pareto, o qual permitiu avaliar os efeitos em relação às interações. Os dados estão demonstrados pela Tabela 17 e Figura 22.

Tabela 17. Análise da variância para robustez por espectrofotometria na região do infravermelho médio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	F tabelado	valor-P*
Fator 1	1	0,00004	0,00004	0,2031	5,3177	0,6640
Fator 2	1	0,00005	0,00005	0,2764	5,3177	0,6131
Fator 3	1	0,00000	0,00000	0,0056	5,3177	0,4739
Interação fator 1 e 2	1	0,00010	0,00010	0,5642	5,3177	0,9418
Interação fator 1 e 3	1	0,00001	0,00001	0,0508	5,3177	0,8272
Interação fator 2 e 3	1	0,00058	0,00058	3,2496	5,3177	0,1090
Interação fator 1, 2 e 3	1	0,00012	0,00012	0,6827	5,3177	0,4325
Tratamentos	7	0,00089	0,00013	0,7189	3,5005	0,6617
Resíduo	8	0,00142	0,00018	-	-	-

Fator 1 = tempo (min.) /Fator 2 = força (kN) /Fator 3 = marca

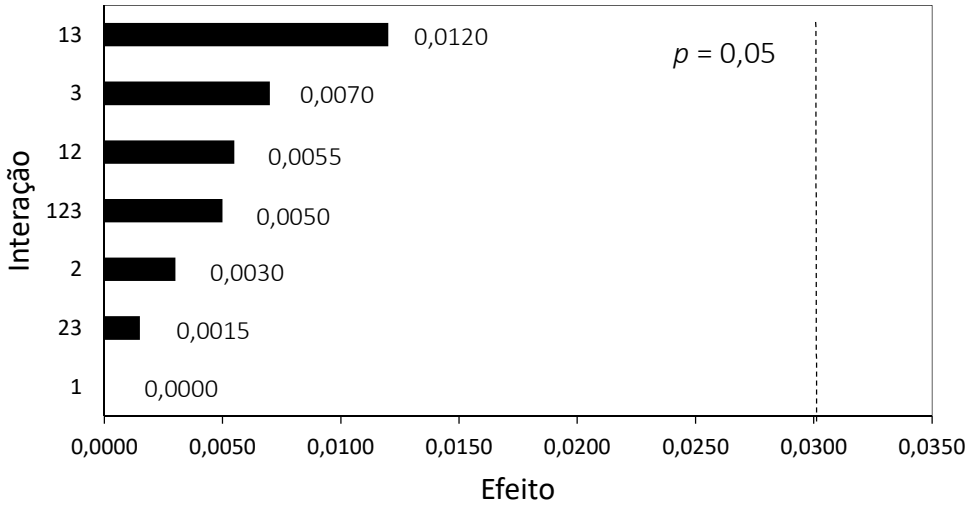


Figura 22. Gráfico de Pareto das interações das variáveis da robustez para o método espectrofotométrico na região do infravermelho médio.

Os valores encontrados das absorbâncias não apresentaram variações significativas aos fatores mudados e os dados estatísticos apresentaram que os valores dos efeitos dispostos no gráfico de Pareto também não obtiveram interferências no sinal do equipamento, e apesar dos fatores alterados tempo e marca terem sido consideravelmente maiores que os demais fatores não apresentaram valor-P igual ou superior a 0,05, provando a robustez do método frente às alterações testadas.

6.2.1.7. Análise conclusiva sobre o método validado

A técnica de espectrofotometria na região do infravermelho apresentou vantagens devido à não utilização de solventes orgânicos, bem como praticidade nas análises, rapidez e bom desenvolvimento da técnica, uma vez que apresentou precisão comparável com outras técnicas do controle de qualidade e não necessitou de pré-tratamento da amostra.

A escolha do método baseou-se na química verde e preservação do meio ambiente, por ser uma técnica alternativa às indústrias, a qual diminui consideravelmente a geração de resíduos tóxicos nos processos rotineiros das análises e por permitir a quantificação da cefadroxila monoidratada.

Os resultados indicaram a confiabilidade do método para a determinação e quantificação da cefadroxila monoidratada 500 mg cápsulas e apresentaram grande

vantagem com relação a outras técnicas existentes do controle de qualidade, além da contribuição à química verde e à não geração de resíduos tóxicos.

Este método validado foi publicado em periódico de circulação internacional: MARCO, B.A.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an innovative method for the determination of cefadroxil monohydrate in capsules. *Physical Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 67-74, 2016.

6.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

6.2.2.1. Conformidade do sistema

Os parâmetros calculados da conformidade do sistema estão inseridos na Tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros da conformidade do sistema cromatográfico calculados após definir as condições analíticas do método por CLAE.

	t_R	Área	k	As	FC	N
1	6,156	2829982	2,95	0,91	0,94	4789,11
2	6,186	2872364	2,97	0,88	0,92	4961,58
3	6,191	2861636	2,97	0,91	0,93	4959,05
4	6,190	2854278	2,97	0,91	0,91	4915,57
5	6,178	2856453	2,96	0,90	0,95	4803,66
6	6,163	2856007	2,95	0,88	0,91	4982,41
Média	6,177	2855120	2,96	0,90	0,93	4901,90
DPR* (%)	0,24	0,49	0,33	1,64	1,76	1,73

* Desvio Padrão Relativo; tR: tempo de retenção; k: fator de retenção; As: fator de assimetria; FC: fator de cauda; N: número de pratos

De acordo com o guia de validação FDA (1994), os parâmetros para o teste da conformidade do sistema devem apresentar valores aceitáveis e adequados para a validação do método. Os resultados deste parâmetro encontram-se de acordo com o preconizado, mostrando boa seletividade, resolução e picos de simetria satisfatórios com tempo de retenção adequado para a quantificação de cefadroxila monoidratada cápsulas.

6.2.2.2.Linearidade

A Tabela 19 apresenta os valores referentes às áreas obtidas para a curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR.

Tabela 19. Valores das áreas referentes à cefadroxila monoidratada SQR para a construção da curva analítica através do método de CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área	Área média ± DP	DPR%
20	575744 555666 568504	566638	1,79
40	1130020 1103535 1104197	1112584	1,36
60	1621987 1679282 1658397	1653222	1,75
80	2191048 2239322 2201926	2210765	1,15
100	2723022 2805987 2754486	2761165	1,52
120	3277218 3359815 3292830	3309954	1,33

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo

A curva analítica foi realizada de acordo com a disposição das áreas em relação às concentrações e encontra-se disposta na Figura 23. Na Tabela 20 e Figura 24 é demonstrada a ANOVA e o gráfico de resíduos calculados, respectivamente, para os dados da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR.

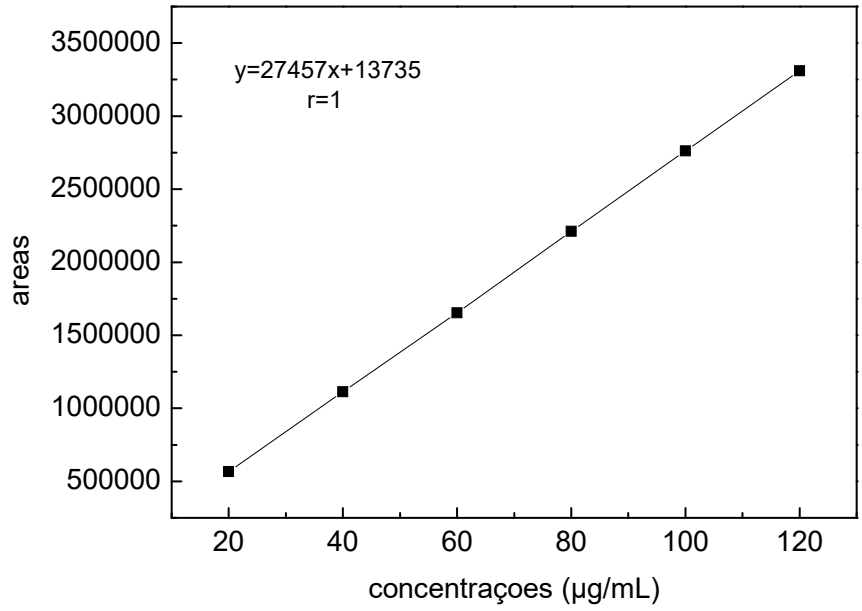


Figura 23. Representação gráfica da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR pelo método CLAE.

Tabela 20. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de cefadroxila monoidratada SQR, utilizando o método CLAE.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	15831818341783	3166363668357	3458,47*	3,11
Regressão linear	1	15831323149240	15831323149240	17291,81*	4,75
Desvio da linearidade	4	495192543	123798136	0,14	3,26
Resíduo	12	10986467659	915538972	---	---
Total	17	15842804809442	---	---	---

*Significativo para $p < 0,05$

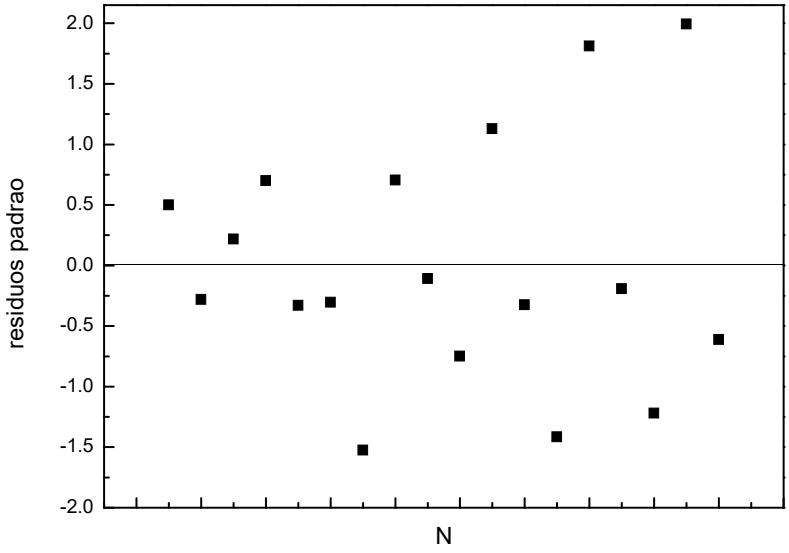


Figura 24. Gráfico de resíduos padronizados referente à cefadroxila monoidratada SQR obtido com o método CLAE.

De acordo com os resultados, a curva analítica do método apresentou coeficiente de correlação (r) de 1 e os dados estatísticos não demonstraram desvio da linearidade significativo ao nível de significância de 5%, tendo F calculado (0,14) inferior ao F tabelado (3,26). O gráfico de resíduos apresentou distribuição adequada, o que confirma a linearidade do método através do intervalo de concentrações avaliadas.

6.2.2.3. Seletividade

Os resultados para o teste de seletividade estão apresentados nas Figuras 25 e 26, mostrando a não interferência dos adjuvantes presentes nas cápsulas do fármaco e os picos da degradação acelerada, respectivamente. A Tabela 21 apresenta os valores de pureza calculados pelo *software* para cada condição de degradação das soluções do produto acabado e para todas as condições de degradação forçada por análise com matriz de detector de fotodiodos. O pico é considerado puro quando o parâmetro do *purity angle* for inferior ao parâmetro do *purity threshold*.

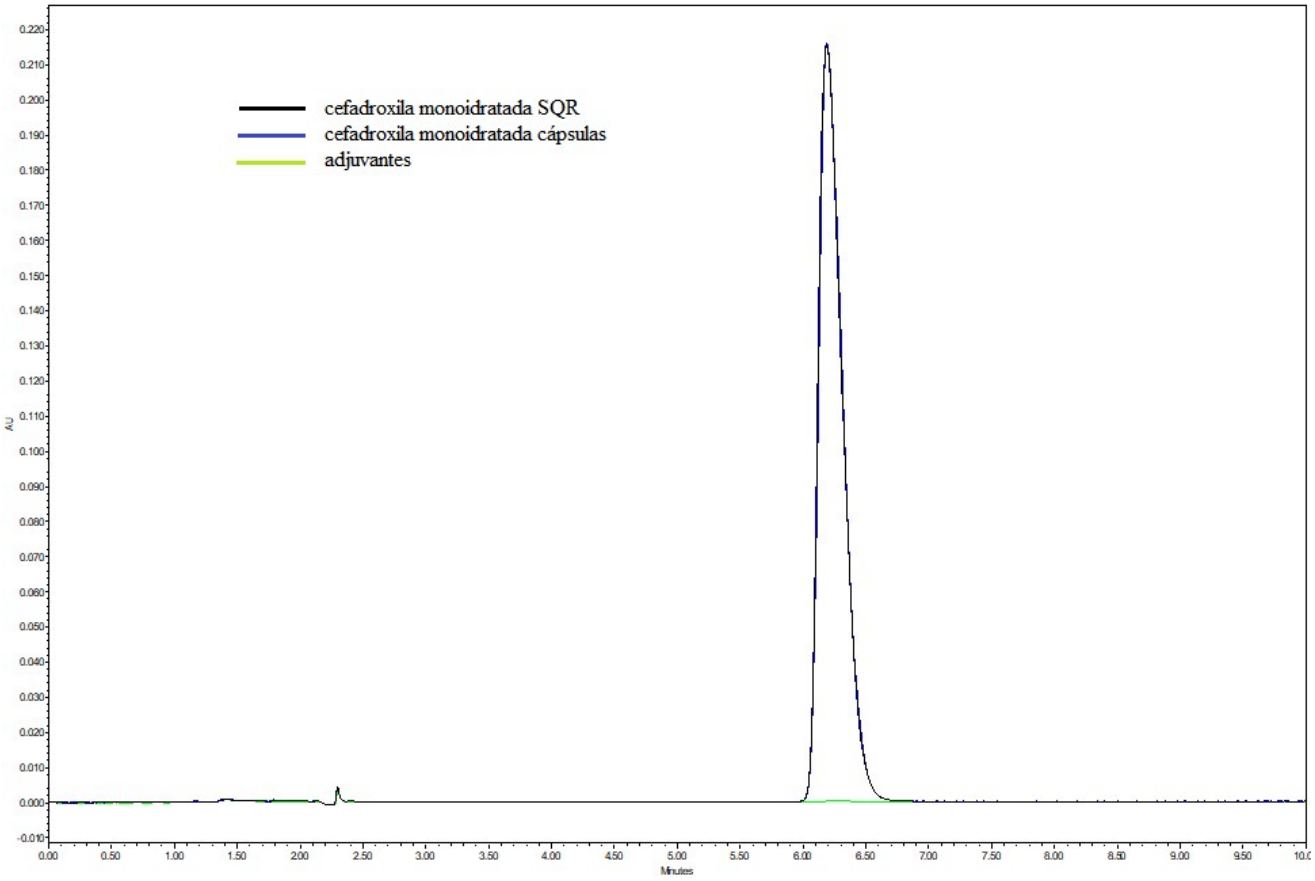


Figura 25. Cromatograma das soluções de cefadroxila monoidratada SQR (preto), cefadroxila monoidratada cápsulas (azul) e (50 µg/mL) e adjuvantes (verde) sobrepostos obtidos na seletividade do método por CLAE.

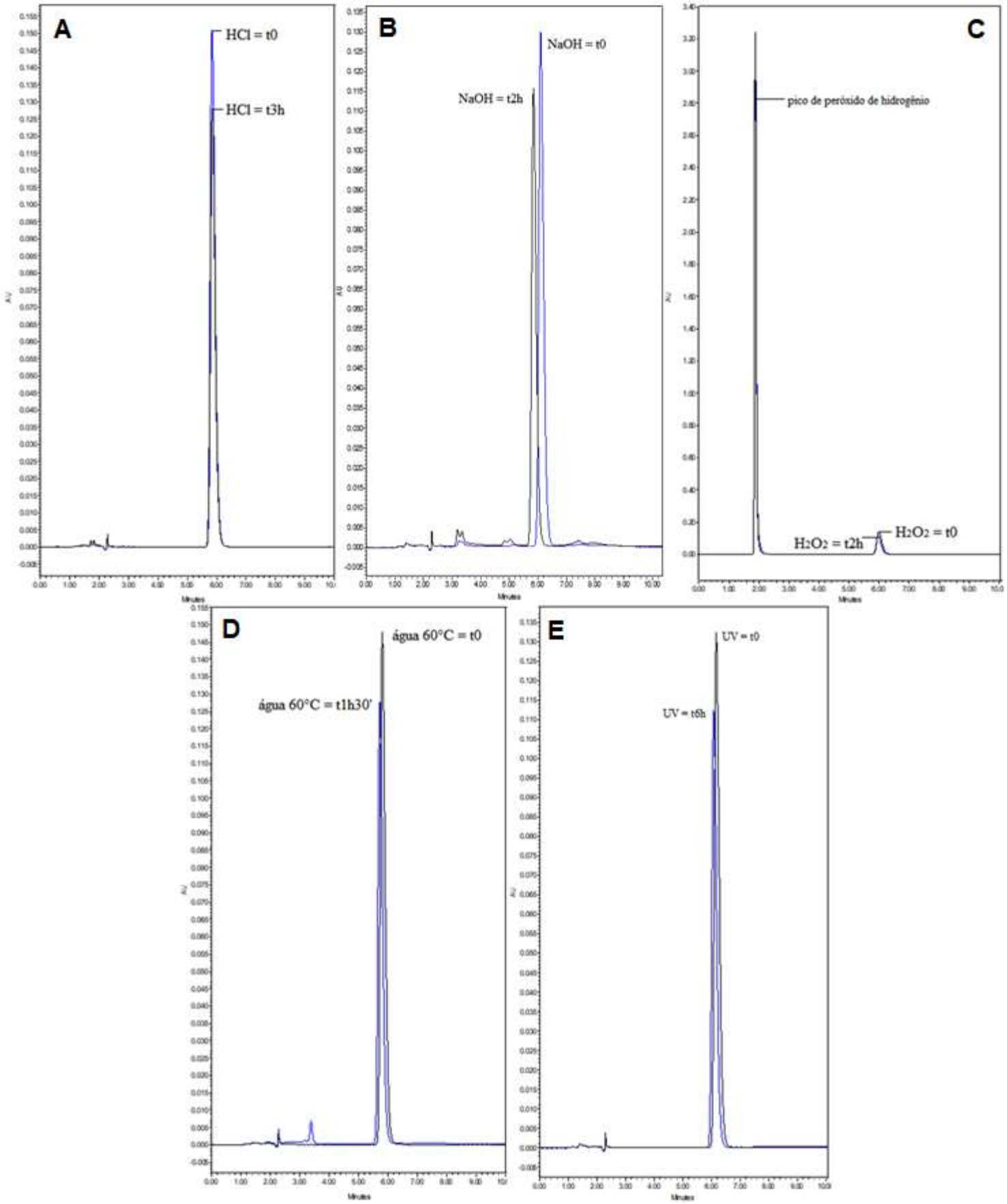


Figura 26. Cromatogramas das degradações de cefadroxila monoidratada cápsulas: (A) ácida; (B) alcalina; (C) oxidativa; (D) neutra e (E) fotolítica.

Tabela 21. Parâmetros para avaliação da pureza dos picos e resultados de degradação acelerada da cefadroxila monoidratada cápsulas.

Condições	Tempo (h)	Área	Degradação (%)	*Purity angle*	*Purity threshold*
Ácida 1 *M*	0	1758815			
	3,0	1321478	24,87	0,132	0,304
Alcalina 0,01 *M*	0	1635905			
	2,0	1322264	19,17	0,131	0,286
Oxidativa 3%	0	1635806			
	2,0	1285429	21,42	0,121	0,293
Fotolítica	0	1617656			
	6,0	1327744	17,92	0,129	0,304
Neutra 60°C	0	1730071			
	1,5	1339015	22,60	0,112	0,277

Os adjuvantes presentes na preparação farmacêutica (cápsulas) da cefadroxila monoidratada não apresentaram picos específicos, ou seja, não interferiram nas áreas obtidas para a quantificação do fármaco, provando a seletividade do método.

O teste de degradação forçada sugere que estudos de estabilidade para a cefadroxila podem ser realizados para melhor compreender o comportamento da estrutura molecular do fármaco. As degradações ocorridas não foram suficientes para a formação de produtos secundários, portanto, o teste está de acordo com os guias de validação, já que o objetivo da realização deste teste não é degradar totalmente o fármaco, mas realizar uma pequena extensão da degradação entre 10 e 30% (SILVA et al., 2009).

No trabalho foi possível verificar que a degradação sob condição fotolítica foi mais lenta do que a condição ácida, alcalina e oxidativa. O fármaco degradou rapidamente em condições oxidativas, alcalinas e neutras e a porcentagem de degradação máxima obtida foi de 24,87% para a condição ácida 1 *M* à 60 °C em três horas. Portanto, os picos dos produtos de degradação e do fármaco apresentaram ótimas resoluções, mostrando pureza do fármaco por não haver co-eluição dos mesmos e devido aos valores de *peak angle* terem sido menores que os valores do *peak threshold* (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

6.2.2.4. Precisão

A precisão do método foi obtida de acordo com os quesitos: intradia (repetibilidade) e interdias e entre analistas (intermediária). A avaliação estatística foi

baseada no desvio padrão relativo para a precisão intradia, ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas. A Tabela 22 apresenta os dados estatísticos das precisões realizadas.

Tabela 22. Avaliação estatística das precisões para cefadroxila monoidratada SQR pelo método de CLAE.

Precisão	Avaliação estatística	Valores das áreas						Resultados
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	
Repetibilidade (Intradia)	DPR%	1659722	1664375	1651094	1645092	1646985	1646573	Média = 1652307 DPR% = 2,61
Intermediária (Interdias)	ANOVA: fator único	1659722 1622481 1679300	1664375 1678534 1678534	1651094 1680013 1680013	1645092 1674753 1674753	1646985 1675041 1675041	1646573 1671711 1671711	F_{calc} 0,17 < F_{tab} 4,38 P_{valor} 0,96 > 0,05
Intermediária (Entre analistas)	Teste-F e Teste-*t*	1659722 1655372	1664375 1660558	1651094 1662722	1645092 1658769	1646985 1661706	1646573 1625671	Teste F: duas amostras para variância F_{cal} 4,02 < F_{tab} 6,39 P_{valor} 0,10 > 0,05 Teste *t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes t_{cal} 0,39 < t_{tab} 2,30 P_{valor} 0,70 > 0,05

DPR (%): desvio padrão relativo

A precisão intradia do método foi comprovada devido apresentar valor de DPR% baixo, indicando a proximidade entre os resultados obtidos. A precisão interdias não apresentou diferença estatística significativa para um nível de significância de 5% e a precisão entre analistas foi calculada pelos Teste F e Teste *t* presumindo variâncias equivalentes tendo *t* calculado (0,39) inferior ao *t* tabelado (2,30).

6.2.2.5. Exatidão

A exatidão foi realizada por meio do ensaio por recuperação, a qual foi realizada em três níveis diferentes de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Determinação da exatidão do método analítico para análise de cefadroxila monoidratada por CLAE.

	Cefadroxila monoidratada SQR adicionada (mg)	Cefadroxila monoidratada SQR encontrada (mg)	Recuperação[1] (%)	DPR[2] (%)	Recuperação média (%)
R1	18	18,08	100,47	1,08	
R2	30	30,62	102,05	1,91	101,30
R3	42	42,58	101,37	1,27	

1-média de três determinações; 2- DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada uma média dos valores de 101,30%, estando de acordo com o preconizado na literatura para ensaios de recuperação (AOAC, 2002).

6.2.2.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados para determinar a sensibilidade do método. O valor encontrado para o limite de detecção foi de 1,402 μg/mL e o limite de quantificação foi de 4,248 μg/mL.

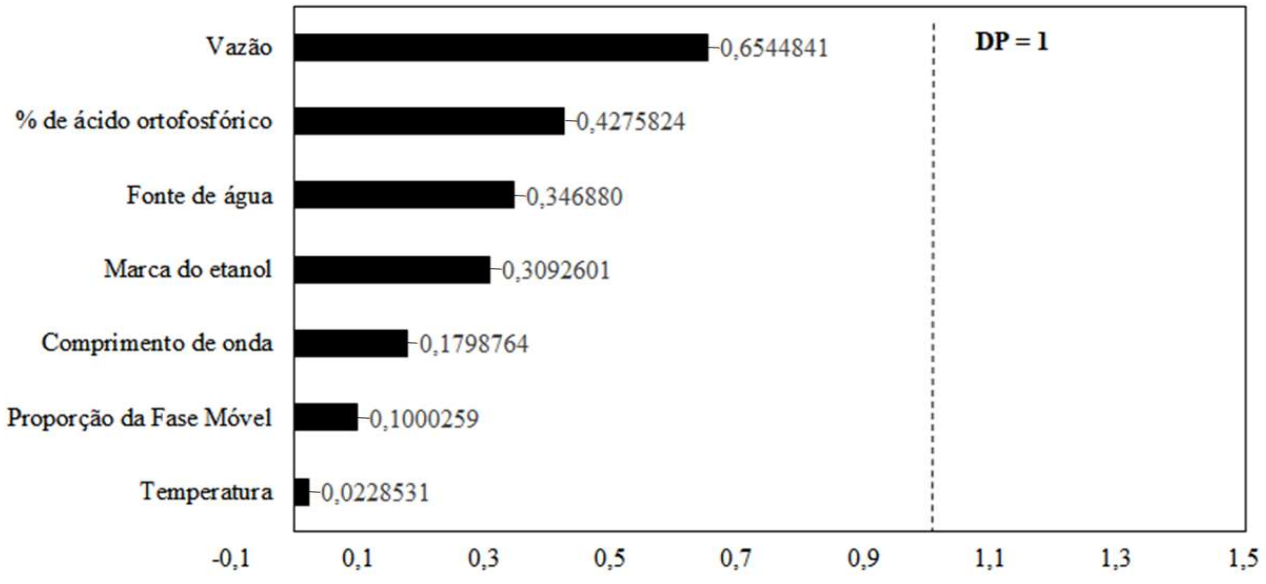
6.2.2.7. Robustez

Os teores encontrados nos ensaios realizados para o parâmetro da robustez encontram-se dispostos na Tabela 24, assim como os efeitos calculados para as variações superiores e inferiores. Nas Figuras 27 e 28, encontram-se as representações gráficas para as variações dos efeitos com relação ao critério de aceitação.

Tabela 24. Porcentagem dos teores encontrados para a cefadroxila monoidratada cápsulas nos ensaios superiores e inferiores e seus efeitos calculados para a robustez por CLAE.

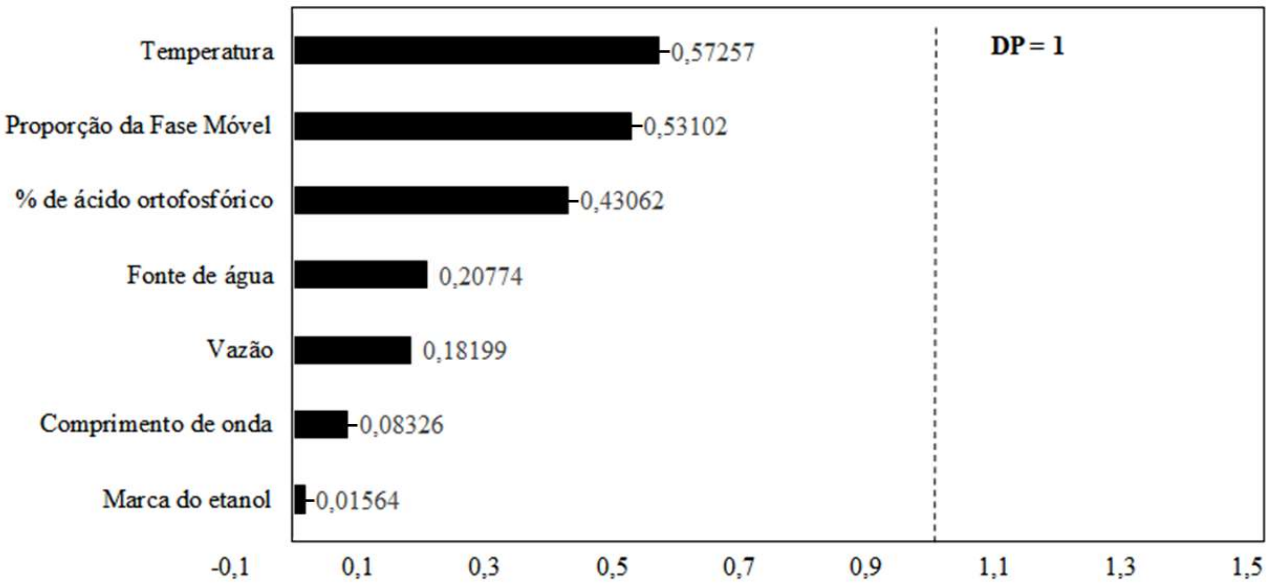
Experimento	Teor da variação superior	Teor da variação inferior	Variável	Efeito da variação superior	Efeito da variação inferior
1	99,97	101,03	**Marca do etanol**	-0,3092601	-0,01564
2	100,93	102,04	**Fonte de água**	-0,346880	0,20774
3	100,95	101,91	**Proporção da FM**	-0,1000259	-0,53102
4	101,50	101,60	**% de ácido ortofosfórico**	-0,4275824	-0,43062
5	101,55	101,38	**Vazão**	-0,6544841	0,18199
6	100,83	102,58	**Temperatura**	-0,0228531	-0,57257
7	101,31	101,23	**Comprimento de onda**	-0,1798764	-0,08326
8	100,91	101,45			
Média	100,99	101,65			
DPR(%)*	0,50 %	0,50 %			

*Desvio Padrão Relativo



DP = desvio padrão

Figura 27. Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações superiores no teste de robustez por CLAE.



DP = desvio padrão

Figura 28. Gráfico de Pareto para os efeitos calculados para variações inferiores no teste de robustez por CLAE.

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden e apresentou as porcentagens dos teores da cefadroxila monoidratada cápsulas juntamente com os efeitos calculados e comparados aos valores iguais a duas vezes o desvio padrão das médias desses teores, resultando em 1,0 nas duas variações (acima e abaixo) das condições normais. Esses valores referentes aos efeitos calculados apresentaram-se inferiores aos valores de referência, mostrando robustez da análise por permitir a confiabilidade do método mesmo com pequenas variações que podem ocorrer nas análises rotineiras do controle de qualidade.

6.2.2.8. Análise conclusiva sobre o método validado

O método de cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido e validado apresentou algumas vantagens com relação a outras técnicas de CLAE descritas na literatura devido à baixa utilização de solventes orgânicos, bem como a rapidez das análises e no desenvolvimento da técnica, uma vez que, apresentou precisão comparável com outras técnicas do controle de qualidade e não necessitou de pré-tratamento da amostra.

A escolha do método baseou-se na química verde e preservação do meio ambiente, por ser uma técnica muito utilizada pelas indústrias, a qual pode diminuir consideravelmente a geração de resíduos tóxicos pela baixa utilização de solventes

orgânicos nos processos rotineiros das análises, por permitir a identificação e quantificação dos fármacos, não utilização de soluções tamponantes e utilização de apenas água e etanol como fase móvel (ANJUM et al., 2012; RAHIM et al., 2014; RAO et al., 2014; RAHIM et al., 2015).

Desta forma, os resultados indicaram a confiabilidade do método para a determinação e quantificação da cefadroxila monoidratada 500 mg cápsulas.

Este método validado foi publicado em periódico de circulação internacional: MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a green RP-HPLC method for quantification of cefadroxil capsules. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, n. 8, p. 2074-2091, 2017.

6.2.3. Método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível

6.2.3.1. Linearidade

A Tabela 25 apresenta os valores referentes às absorbâncias obtidas para a curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR.

Tabela 25. Valores das absorbâncias referentes à cefadroxila monoidratada SQR na construção da curva analítica pelo método miniaturizado por espectrofotometria na região do visível.

Concentração (µg/mL)	Absorbância[1]	Absorbância média ± e.p.m.	DPR%
15	0,823 0,826 0,866	0,838 ± 0,024	2,86
35	0,744 0,748 0,764	0,752 ± 0,010	1,38
55	0,677 0,627 0,619	0,641 ± 0,032	4,93
75	0,542 0,564 0,531	0,546 ± 0,017	3,06
95	0,438 0,453 0,439	0,443 ± 0,008	1,89
115	0,367 0,342 0,354	0,354 ± 0,012	3,48

1 Valor médio de três determinações; e.p.m.: erro padrão da média; DPR: desvio padrão relativo

A curva analítica foi realizada de acordo com a disposição das absorbâncias em relação às concentrações e encontra-se disposta na Figura 29. Na Tabela 26 e Figura 30 encontram-se a ANOVA e o gráfico de resíduos calculados, respectivamente, para os dados da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR.

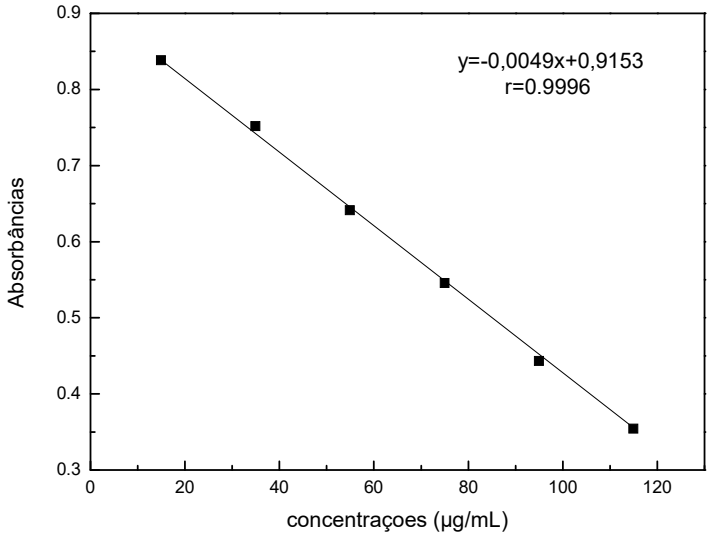


Figura 29. Representação gráfica da curva analítica da cefadroxila monoidratada SQR através do método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.

Tabela 26. Análise de variância dos valores das absorbâncias determinados na obtenção da curva analítica de cefadroxila monoidratada SQR pelo método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,5080	0,10160	278,94*	3,11
Regressão linear	1	0,5075	0,50752	1393,44*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,0005	0,00012	0,32	3,26
Resíduo	12	0,0044	0,00036	---	---
Total	17	0,5124	---	---	---

*Significativo para $p < 0,05$

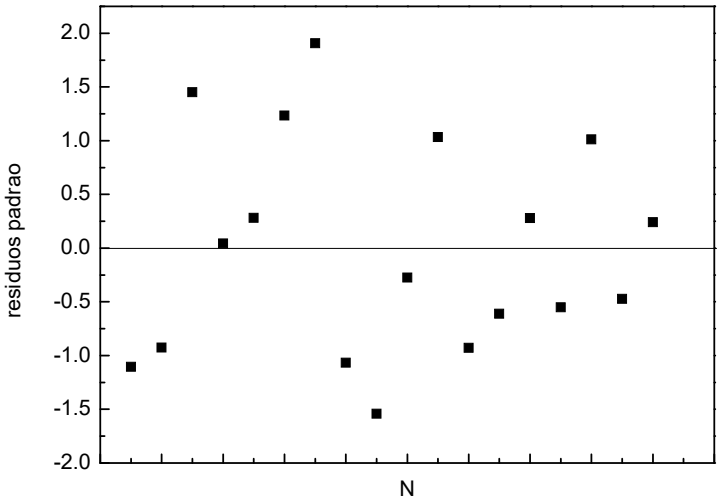


Figura 30. Gráfico de resíduos padronizados referente à cefadroxila monoidratada SQR obtido através do método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.

De acordo com os resultados, a curva analítica do método apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,9996 e os dados estatísticos não demonstraram desvio da linearidade significativo ao nível de significância de 5%, tendo F calculado (0,32) inferior ao F tabelado (3,26). O gráfico de resíduos apresentou distribuição adequada, o que confirma a linearidade do método através do intervalo de concentrações avaliadas.

6.2.3.2. Seletividade

A Figura 31 permite verificar que o reagente colorido contendo 1% de fenolftaleína e 0,1 *M* de NaOH reage com a molécula do fármaco, resultando em uma diminuição da absorbância à medida que as concentrações de fármaco aumentam, exibindo igualmente que os adjuvantes não reagem com o reagente colorido da mesma maneira que o fármaco, o que provam sua não interferência na quantificação de cefadroxila monoidratada.

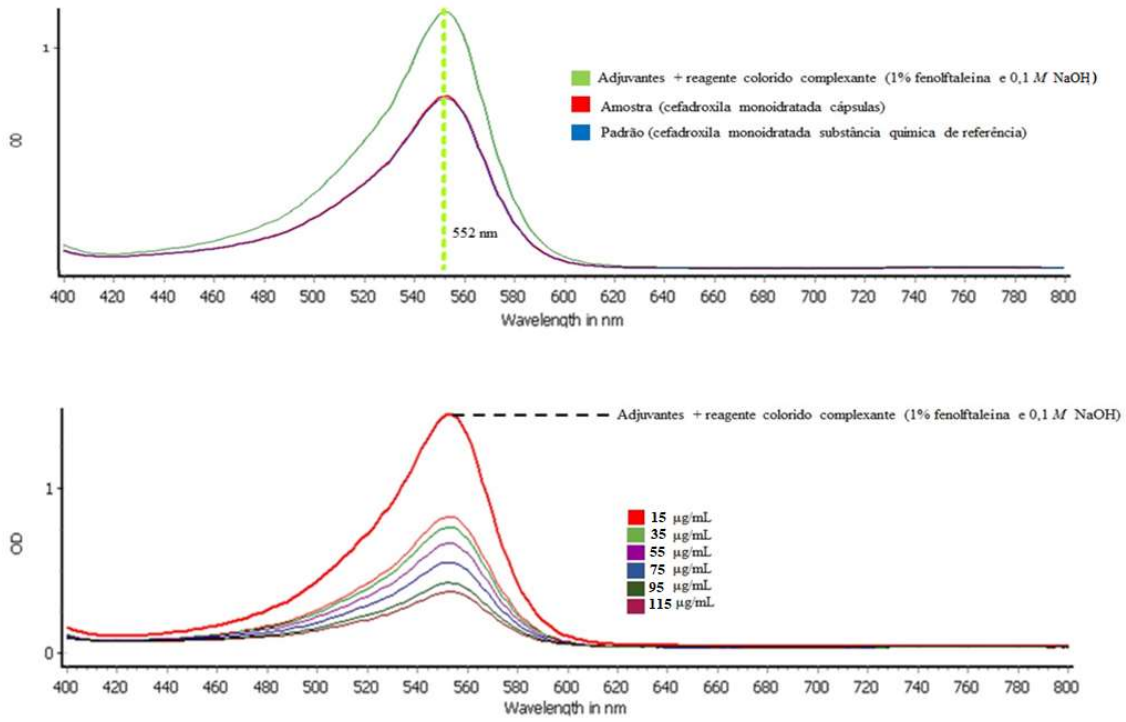


Figura 31. Espectros de absorção apresentando a não interferência dos adjuvantes e reagente colorido complexante com a cefadroxila monoidratada no método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.

Desta forma, a seletividade do método foi comprovada devido aos adjuvantes presentes nas cápsulas de cefadroxila monoidratada e o reagente colorido complexante não interferirem na quantificação e identificação do fármaco.

6.2.3.3.Precisão

A precisão do método foi obtida de acordo com os quesitos intradia (repetibilidade) e interdias e entre analistas (intermediária). A avaliação foi baseada através do desvio padrão relativo (%) para a precisão por repetibilidade, ANOVA: fator único para o ensaio interdias e pelo teste F e teste *t* para a precisão entre analistas. A Tabela 27 apresenta os dados estatísticos das precisões realizadas.

Tabela 27. Avaliações estatísticas realizadas para o parâmetro da precisão para cefadroxila monoidratada SQR pelo método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.

Precisão	Avaliação estatística	Valores das absorbâncias						Resultados
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	
Repetibilidade (Intradia)	DPR%	0,621	0,623	0,580	0,632	0,638	0,613	Média = 0,617 DPR% = 3,32
Intermediária (Interdias)	ANOVA: fator único	0,621 0,581 0,594	0,623 0,628 0,625	0,580 0,630 0,627	0,632 0,607 0,597	0,638 0,644 0,627	0,613 0,603 0,639	F_{calc} 1,52 < F_{tab} 3,11 P_{valor} 0,25 > 0,05
Intermediária (Entre analistas)	Teste-F e Teste-*t*	0,621 0,619	0,623 0,618	0,580 0,600	0,632 0,627	0,638 0,632	0,613 0,593	Teste F: duas amostras para variância F_{cal} 1,79 < F_{tab} 5,05 P_{valor} 0,26 > 0,05 Teste *t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes t_{cal} 0,28 < t_{tab} 2,23 P_{valor} 0,38 > 0,05

DPR (%): desvio padrão relativo

A precisão intradia do método foi comprovada pelo baixo valor de DPR%, indicando a proximidade entre os resultados obtidos. A precisão interdias não apresentou diferença estatística significativa para nível de significância de 5% e a precisão entre analistas foi calculada pelos Teste F e Teste *t* presumindo variâncias equivalentes tendo *t* calculado (0,28) inferior ao *t* tabelado (2,23).

6.2.3.4. Exatidão

Os resultados da exatidão por determinação de teores foram realizados pela comparação entre métodos e estão apresentados na Tabela 28. Os testes foram realizados por técnicas espectrofotométrica e cromatográfica com as concentrações teóricas pré-estabelecidas de 55µg/mL e 60µg/mL, respectivamente, as quais resultaram em valores de teores de 99,95% para a técnica espectrofotométrica e 99,82% para a cromatográfica.

Tabela 28. Determinação da exatidão do método miniaturizado de espectrofotometria da região do visível pela comparação entre métodos.

	Espectrofotometria na região do visível	CLAE
Determinação dos teores (%)	98,22	100,59
	102,44	98,97
	100,32	100,59
	98,69	97,71
	100,34	101,92
	99,72	99,13
Média	99,95	99,82
DPR (%)	1,49	1,50
teste-F e teste-*t*	teste-F: duas amostras para variâncias F_{cal} 1,01 < F_{tab} 5,05 P_{valor} 0,49 > 0,05 teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes t_{cal} 0,15 < t_{tab} 2,22 P_{valor} 0,43 > 0,05	

DPR: desvio padrão relativo

A exatidão do método foi comprovada pelo teste comparativo entre os métodos: espectrofotométrico e cromatográfico com teores de 99,95% e 99,82%, respectivamente, apresentando *t* calculado (0,15) inferior ao *t* tabelado (2,22) para as análises estatísticas.

6.2.3.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados para determinar a sensibilidade do método. O valor encontrado para o limite de detecção foi de 1,672 µg/mL e o limite de quantificação foi de 5,068 µg/mL.

6.2.3.6. Robustez

A robustez do método miniaturizado espectrofotométrico na região do visível foi confirmada por alguns parâmetros apresentados na Tabela 29. Para o parâmetro variado: tempo de agitação, os resultados não foram robustos nas condições testadas.

Tabela 29. Valores calculados no teste-*t* para os parâmetros variados na robustez do método miniaturizado de espectrofotometria na região do visível.

Parâmetros	Variações	Condições	*t* calculado	*t* crítico
Comprimento de onda	p/ cima	552 e 554 nm	0,22	2,77
	p/ baixo	550 e 552 nm	1,55	2,77
Tempo de agitação	p/ cima	120 s e 180 s	9,79*	2,77
	p/ baixo	60 s e 120 s	6,48*	2,77
Fonte de água		CM e CFQ	1,31	2,77

CM: laboratório de controle microbiológico; CFQ: laboratório de controle físico-químico; * resultados não robustos

Na robustez, os valores mostraram que o método não foi robusto para o tempo de agitação, o que indica que o método é extremamente sensível ao tempo em que a cefadroxila está exposta em contato com o reagente colorido na placa, sendo possível analisar que o tempo excedido para esta reação influencia diretamente na metodologia analítica estipulada. É aconselhável realizar uma padronização consistente no tempo de agitação de 120 segundos para este método validado.

6.2.3.7. Análise conclusiva sobre o método validado

A técnica miniaturizada de espectrofotometria na região do visível apresentou muitas vantagens devido à não utilização de solventes orgânicos, praticidade na preparação das amostras, menor consumo na utilização de amostras e reagentes, rapidez, fácil manuseio e baixo custo, apresentando ao mesmo tempo, ótimo desenvolvimento da técnica por apresentar precisão e exatidão nos resultados obtidos comparáveis com outras técnicas desenvolvidas e validadas para a cefadroxila monoidratada.

A escolha do método baseou-se na química verde e preservação do meio ambiente, por ser uma técnica alternativa às indústrias, a qual diminui consideravelmente a geração de resíduos tóxicos nos processos rotineiro das análises e por permitir a quantificação do fármaco estudado.

Desta forma, os resultados indicaram a confiabilidade do método para a determinação e quantificação da cefadroxila monoidratada 500 mg cápsulas.

6.2.4. Método microbiológico turbidimétrico

6.2.4.1.Linearidade

Foram construídas duas curvas para avaliar a linearidade no modelo de linha paralela, uma para cefadroxila monoidratada SQR e outra para cefadroxila monoidratada amostra. Os resultados foram lineares em concentrações entre 30 e 120 µg/mL. Os valores dos coeficientes de correlação (r) foram considerados apropriados para o método. A equação representativa e (r) para cefadroxila monoidratada SQR e cefadroxila monoidratada cápsulas foram y = -0,329ln (x) + 1,8934 (r = 0,9989) e y = 0,338ln (x) + 1,9338 (r = 0,9973), respectivamente. As curvas analíticas para a cefadroxila monoidratada SQR e cefadroxila monoidratada cápsulas construídas a partir da relação da média dos valores das absorbâncias com as respectivas concentrações estão apresentadas na Figura 32.

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% e apresentaram linearidade e desvio de paralelismo não significativo, conforme apresentado na Tabela 30.

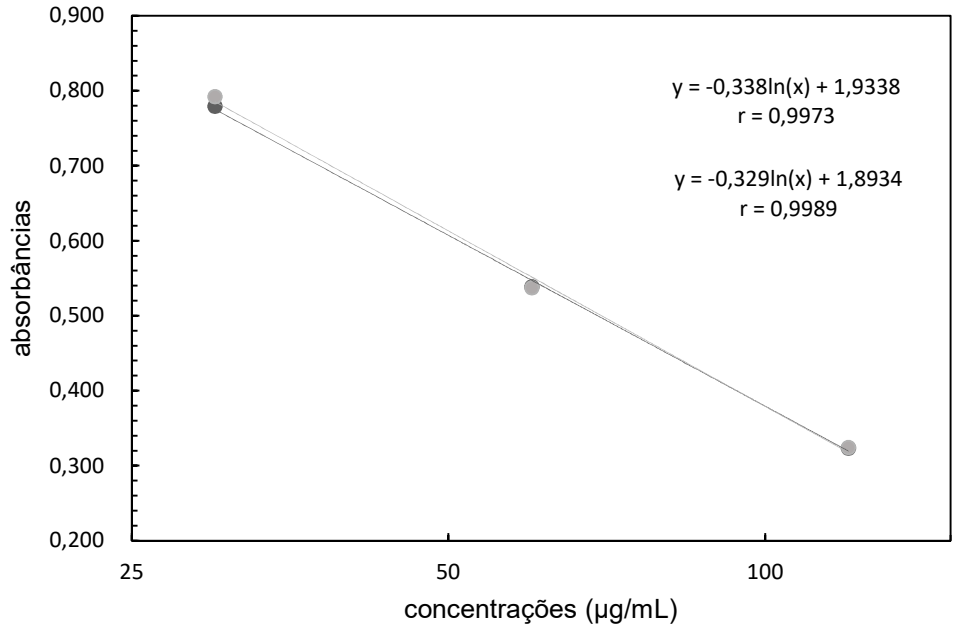


Figura 32. Representação gráfica das curvas analíticas referentes à cefadroxila monoidratada SQR e cápsulas para o método turbidimétrico.

Tabela 30. Análise de variância (ANOVA) determinada pelo ensaio turbidimétrico para a construção da curva analítica de cefadroxila monoidratada.

Fontes de variação	gl	SQ	MQ	F calculado*	F tabelado
Preparação	1	0,0001	0,0001	0,17	4,96
Regressão	1	0,6400	0,6400	1336,73*	4,96
Paralelismo	1	0,0001	0,0001	0,23	4,96
Quadrático	1	0,0011	0,0011	2,40	4,96
Diferença de quadrático	1	0,0001	0,0001	0,14	4,96
Entre doses	5	0,6414	0,1283	267,93*	3,33
Entre tubos	2	0,0039	0,0019	4,07	4,10
Dentro (erro)	10	0,0048	0,0005	-	-
Total	17	0,6501	-	-	-

* Significativo para $p < 0,05$.

A linearidade do método foi comprovada estatisticamente, uma vez que não houve desvios de linearidades para as curvas de cefadroxila monoidratada SQR e cápsulas. O coeficiente de correlação (r) para a curva de cefadroxila monoidratada SQR foi de r = 0,9989 e para a curva de cefadroxila monoidratada cápsulas foi de r = 0,9973.

6.2.4.2. Seletividade

Os adjuvantes das cápsulas não interferiram com a quantificação de cefadroxila monoidratada. O valor da absorbância dos adjuvantes (1,022) foi praticamente idêntico ao controle positivo (1,092), indicando a seletividade do método, devido ao fato de os adjuvantes não terem atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao estudo comparativo de degradação, no método turbidimétrico e no método CLAE, o fármaco foi instável em todas as condições de estresse usadas para validar ambos os métodos, conforme mostrado na Tabela 31.

Tabela 31. Estudo comparativo da degradação no ensaio turbidimétrico e no método CLAE para o parâmetro de seletividade.

Condições	Degradação de cefadroxila por CLAE (%)	Degradação de cefadroxila por ensaio turbidimétrico (%)	Tempo
Ácida	12,78	24,02	2 h 20 min
Alcalina	22,98	46,91	2 h
Oxidativa	29,85	15,29	2 h 30 min
Neutra	34,94	39,81	2 h
Fotolítica	24,85	16,83	6 h

6.2.4.3. Precisão

A precisão do método foi obtida de acordo com os quesitos intradia (repetibilidade), interdias e entre analistas (intermediárias). A avaliação foi baseada no desvio padrão relativo (%) para a precisão por repetibilidade, Anova fator único e teste F e teste *t* para as precisões intermediárias interdias e entre analistas, respectivamente. A Tabela 32 apresenta os dados estatísticos das precisões realizadas.

Tabela 32. Avaliações estatísticas realizadas para o parâmetro da precisão para cefadroxila monoidratada SQR no ensaio turbidimétrico.

Precisão	Avaliação estatística	Valores das absorbâncias						Resultados
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	
Repetibilidade (Intradia)	DPR%	0,442	0,442	0,455	0,475	0,478	0,458	Média = 0,458 DPR% = 3,39
Intermediária (Interdias)	ANOVA: fator único	0,442 0,442 0,440	0,442 0,441 0,434	0,455 0,452 0,457	0,475 0,472 0,464	0,475 0,476 0,480	0,458 0,490 0,486	F_{calc} 0,06 < F_{tab} 3,68 P_{valor} 0,94 > 0,05
Intermediária (Entre analistas)	Teste-F e Teste-*t*	0,440 0,484	0,434 0,464	0,457 0,485	0,464 0,499	0,480 0,476	0,486 0,434	Teste F: duas amostras para variância F_{cal} 1,17 < F_{tab} 5,05 P_{valor} 0,43 > 0,05 Teste *t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes t_{cal} 1,07 < t_{tab} 2,23 P_{valor} 0,15 > 0,05

DPR (%): desvio padrão relativo

A precisão do método foi confirmada, uma vez que o valor DPR foi inferior a 15%, conforme recomendado pela literatura (USP 37, 2018). A precisão por repetibilidade (intradia), mostrou o valor de DPR (%) calculado de 3,39%. A precisão intermediária interdias não apresentou diferença estatística significativa para um nível de significância de 5% e a precisão intermediária entre analistas mostrou *t* calculado (1,07) inferior a *t* tabelado (2,23) e o valor $p = 0,15$, não sendo estatisticamente significativo.

6.2.4.4. Exatidão

A exatidão foi confirmada pelo teste de recuperação e determinou a média de 100,64% e DPR de 0,49% (Tabela 33), o que confirma a capacidade do método para determinar a concentração de cefadroxila monoidratada.

Tabela 33. Determinação da exatidão do ensaio microbiológico turbidimétrico para a análise cefadroxila monoidratada.

	Cefadroxila monoidratada SQR adicionada (mg)	Cefadroxila monoidratada SQR encontrada (mg)	Recuperação[1] (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)
R1	48	48,06	101,21	0,39	
R2	60	59,72	100,37	0,30	100,64
R3	72	72,12	100,34	0,44	

1 média de três determinações; DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

6.2.4.5. Robustez

A robustez do ensaio turbidimétrico foi confirmada por alguns parâmetros, como pode ser observado na Tabela 34. Para o parâmetros variados: tempo de incubação do inóculo com variação superior e número de rotação com variação inferior, o ensaio turbidimétrico não foi robusto.

As absorbâncias obtidas para o tempo da incubação do inóculo de 4 h 20 min, foram superiores às condições normais (4 h) e para o número de rotação foram inferiores.

Tabela 34. Valores calculados de teste-*t* para variáveis de parâmetro de robustez no método turbidimétrico para a determinação de cefadroxila monoidratada cápsulas.

Parâmetros	Variações	Condições	*t* calculado	*t* tabelado
Comprimento de onda	p/ cima	530 e 535 nm	2,07	2,77
	p/ baixo	525 e 530 nm	1,84	2,77
Tempo de incubação do inóculo	p/ cima	4 h e 4 h 20 min	6,20*	2,77
	p/ baixo	3 h 40 min e 4 h	2,09	2,77
Volume do meio de cultura dos tubos testes	p/ cima	10 e 10,5 mL	0,43	4,30
	p/ baixo	9,5 e 10 mL	0,19	2,77
Volume de inóculo adicionados nos tubos testes	p/ cima	800 e 810 µL	2,67	2,77
	p/ baixo	790 e 800 µL	0,23	2,77
Rotação por minuto	p/ cima	32 e 34 rpm	0,70	2,77
	p/ baixo	30 e 32 rpm	19,2*	2,77
Marca do meio de cultura BHI		Acumedia e Oxoid	1,17	2,77

* resultados não robustos

A robustez não confirmada para o tempo de incubação do inóculo com variação acima e rotação por minuto (rpm) com variação abaixo demonstra que é necessário reproduzir o método padronizado com relação a estas variações, as quais apresentariam falsas respostas nos resultados caso fossem realizadas diferentemente.

6.2.4.6. Análise conclusiva sobre o método validado

O ensaio turbidimétrico apresenta uma importante vantagem quando comparado à técnica de difusão em ágar, que é a redução do tempo de análise. Enquanto o ensaio por difusão em ágar requer 24 horas para ser executado, o teste turbidimétrico requer apenas 4 horas (TÓTOLI & SALGADO, 2013; USP 37, 2018).

O ensaio turbidimétrico também possui algumas características importantes como a facilidade e simplicidade de execução do ensaio, provisão de uma medida objetiva da resposta (absorbância) e ausência da matriz constituída pelo ágar, a qual pode dificultar a difusão do fármaco pela placa (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; KOGAWA et al., 2012; USP 37, 2018).

A análise microbiológica por turbidimetria não foi encontrada na literatura para a quantificação da cefadroxila monoidratada cápsulas e desta forma a escolha deste estudo ofereceu uma alternativa muito vantajosa para as indústrias e a análise de rotina de laboratórios, uma vez que também permitiu determinar a potência do antimicrobiano frente ao micro-organismo de teste.

A escolha do método também contribuiu com a química verde e preservação do meio ambiente, por ser uma técnica mais rápida, a qual pode diminuir consideravelmente a utilização de materiais e custos nos processos rotineiros das análises além de permitir a identificação e quantificação de fármacos.

Desta forma, os resultados indicaram a confiabilidade do método para a determinação e quantificação da cefadroxila monoidratada 500 mg cápsulas.

Este método validado foi publicado em periódico de circulação internacional: MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Rapid stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of cefadroxil monohydrate capsules. *Analytical Methods*, v. 10, p. 660 – 666, 2018. (DOI: 10.1039/c7ay02596c).

6.2.5. Análise comparativa entre os métodos validados

6.2.5.1. Análise comparativa entre os métodos físico-químicos

Os resultados obtidos na determinação dos teores da cefadroxila monoidratada cápsulas encontram-se na Tabela 35 e a análise estatística destes valores encontram-se na Tabela 36.

Tabela 35. Valores obtidos na determinação do teor de cefadroxila monoidratada cápsulas utilizando os métodos propostos.

Parâmetros	**Métodos**		
	Espectrofotometria na região do infravermelho	**Cromatografia líquida de alta eficiência**	**Espectrofotometria na região do visível**
	99,94	100,59	98,22
	104,85	98,97	102,44
	103,09	100,59	100,33
Média (%)	102,63	100,05	100,33
DPR* (%)	2,42	0,93	2,10

DPR: desvio padrão relativo

Tabela 36. Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento da cefadroxila monoidratada pelos métodos propostos.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	Valor-P	F tabelado
Entre grupos	2	11,99228	5,996144	1,56	0,28*	5,14
Dentro dos grupos	6	23,02986	3,838311			
Total	8	35,02215				

* Significativo para $p < 0,05$.

Através dos dados obtidos pela análise estatística de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 36, observou-se que os teores da cefadroxila monoidratada não apresentaram diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$, pois o valor de F calculado (1,56) foi inferior ao valor de F tabelado (5,14).

Apesar dessa análise estatística ter apresentado resultados semelhantes para as técnicas de CLAE e espectrofotométricas (infravermelho e visível), é importante ressaltar que há diferenças entre os métodos analisados quando se trata de algumas vantagens e desvantagens.

O método de espectrofotometria na região do infravermelho por exemplo, apresenta como vantagens: a não utilização de solventes orgânicos, quantidade mínima de resíduos, valor acessível do material utilizado para a confecção das pastilhas, fazendo a técnica apresentar custos baixos e também rapidez nas análises. Porém, como desvantagens a técnica apresenta: controle rigoroso do ambiente com relação à temperatura e à umidade, sendo estes fatores muito relevantes para a interferência das análises e exige muita precisão nas pesagens, podendo a quantificação apresentar maior tempo da análise quando comparado com outras técnicas que requerem a utilização de soluções.

O método por CLAE apresenta, da mesma forma, algumas vantagens como: adequada seletividade quando necessita determinar produtos de degradação ou impurezas de uma amostra; colunas podem ser reutilizadas para várias análises diferentes e a técnica pode também apresentar alta precisão e exatidão dos resultados obtidos, além de mostrar-se rápida. Como desvantagem a técnica apresenta: alto custo do equipamento, alto custo de solventes orgânicos com grandes volumes da utilização dos mesmos; apesar das colunas poderem ser reutilizadas, o custo delas são altos e a manutenção técnica também.

Ainda que esta técnica apresente algumas desvantagens quando se trata de custos elevados e risco de causar danos ao ambiente devido à utilização de solventes orgânicos tóxicos e geração de resíduos, esta técnica é amplamente utilizada nas indústrias farmacêuticas.

As vantagens e desvantagens para o método miniaturizado por espectrofotometria na região do visível também podem influenciar na escolha da técnica, como vantagens esta técnica apresenta: a velocidade no processamento das análises, minimização de contaminações e geração de resíduos, menor consumo de amostras e reagentes e consequentemente menor gasto de energia e custo nos processos. Como desvantagem esta técnica apresenta: controle rigoroso no preparo de reagentes complexantes, temperatura e tempo de preparo da amostra específico e controlado, preparação do reagente minutos antes da análise, manutenção da compra das placas de 96 poços, sendo estes, fatores importantes que interferem nas análises, podendo a quantificação apresentar maiores complicações nas análises quando comparado com outras técnicas que não requerem a utilização de reações químicas por exemplo.

Devido este entendimento, validar novos métodos analíticos sustentáveis foi extremamente importante para a conscientização sobre a diminuição dos impactos ambientais, devido à baixa utilização de solventes orgânicos menos tóxicos ou ausência total desses solventes, os quais trazem resultados confiáveis e seguros, além de serem alternativas viáveis à implantação nas indústrias farmacêuticas.

6.2.5.2. Análise comparativa entre métodos microbiológico e físico-químico

Os resultados obtidos na determinação dos teores da cefadroxila monoidratada cápsulas e a análise estatística desses valores encontram-se na Tabela 37.

Tabela 37. Valores obtidos na determinação do teor de cefadroxila monoidratada cápsulas utilizando os métodos propostos e análise estatística.

Parâmetros	**Métodos**		**Análise estatística**
	Ensaio microbiológico turbidimétrico	**Cromatografia líquida de alta eficiência**	**Teste-F** **Teste-*t***
	99,28	100,59	Teste F: duas amostras para variâncias F_{cal} 32,64 > F_{tab} 19 P_{valor} 0,029 < 0,05 Teste *t*: duas amostras presumindo variâncias diferentes t_{cal} 1,47 < t_{tab} 4,30 P_{valor} 0,27 > 0,05
	99,06	98,97	
	99,38	100,59	
Média (%)	99,24	100,05	
DPR* (%)	0,16	0,93	

DPR: desvio padrão relativo

Os resultados obtidos se mostraram satisfatórios, apresentando a porcentagem dos teores da cefadroxila monoidratada determinada pelo ensaio turbidimétrico de 99,24% e pelo método CLAE 100,05% e análise estatística indicando que *t* calculado (1,47) foi inferior a *t* tabelado (4,30), e os valores não foram estatisticamente significativos para um nível de significância de 5%, sendo o valor-*p* (0,27) superior a 0,05. Assim, a análise comparativa provou que os métodos são equivalentes e adequados para a quantificação da cefadroxila monoidratada cápsulas.

O método CLAE é uma técnica amplamente utilizada nas análises de controle de qualidade de rotina das empresas farmacêuticas. Apresenta grande contribuição para a análise de medicamentos, uma vez que também permite monitorar sínteses de medicamentos, isolar produtos, determinar produtos de degradação e impurezas, detectar e quantificar fármacos, bem como acompanhar a produção de lotes (RAMBLA-ALEGRE et al., 2011). Esta técnica apresenta vantagens e desvantagens já citadas no item 6.2.5.1, e quando comparada com o método microbiológico, pode apresentar maior seletividade, rapidez e boa resolução, porém este método, apesar de sua alta aplicabilidade na indústria farmacêutica, não determina a potência do fármaco frente aos micro-organismos testados, o que prova a grande importância de serem utilizados concomitantemente nos processos de análise industriais.

O ensaio turbidimétrico mostrou ser uma técnica ambientalmente amigável, pois utilizou-se apenas água em suas análises e não utilizou equipamentos de custos elevados, apresentou menor tempo de análise, o que consequentemente diminuiu o custo de energia quando comparada com os outros métodos microbiológicos como testes de difusão em ágar, que são utilizados para análise de cefadroxila monoidratada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; TÓTOLI & SALGADO, 2013; USP 37, 2018).

A farmacopeia americana enfatiza o uso de guias de validações de métodos microbiológicos alternativos para as indústrias, a fim de promover a segurança e a qualidade dos antimicrobianos. É muito importante realizar este método em paralelo aos métodos físico-químicos para garantir resultados em relação à sua eficácia terapêutica (KOGAWA et al., 2012; CURBETE & SALGADO, 2016; USP 37, 2018).

6.3. Triagem para modelo de estudo de polimorfos de cefadroxila

6.3.1. Obtenção das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada da cefadroxila

A cefadroxila é encontrada sob três principais formas: Monoidratada, hemi-hidratada e anidra (FARMACOPEIA ARGENTINA, 2003; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2007; IP, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JP, 2011; BP, 2012; EP, 2013; USP 37, 2018). Dentre as três formas existentes, a forma monoidratada é a comercializada pela indústria farmacêutica (BPR, 2016; BRASIL, 2019f).

Para desenvolver o estudo de polimorfismo, a forma anidra é fundamental, uma vez que a partir dela outras formas são obtidas (LIMA & SILVEIRA, 2011; PRADO & ROCHA, 2015). Portanto, a forma anidra foi obtida a partir da forma monoidratada para iniciar os métodos de obtenção dos polimorfos.

A cefadroxila monoidratada (CFD-M) possui peso molecular de (381,4 g/mol). Para que a forma anidra seja encontrada é necessário que a molécula da CFD-M perca sua molécula de água (18 g/mol), valor referente a ± 4,72% de umidade total, consequentemente para a forma hemi-hidratada ocorre o mesmo, porém com perda inferior de umidade de ± 2,36%. As Figuras 33 e 34 e as Tabelas 38 e 39 apresentam os resultados referentes à obtenção das formas anidras e hemi-hidratada, respectivamente, de acordo com os métodos descritos no item 5.3.1. É importante observar que por aproximadamente 10 minutos finais ao tempo esperado, a massa se manteve constante.

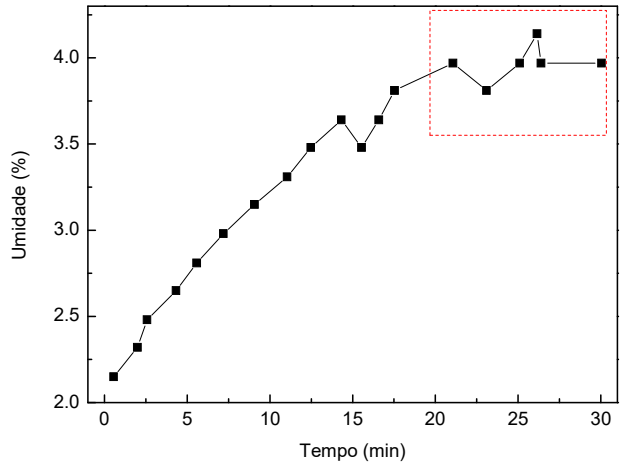


Figura 33. Representação gráfica da obtenção da forma anidra da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 110°C por 30 min.

Tabela 38. Umidade percentual na obtenção da forma anidra da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 110°C por 30 min.

Tempo (min)	Umidade (%)
0:56	2,15
2:00	2,32
2:59	2,48
4:34	2,65
5:58	2,81
7:20	2,98
9:07	3,15
11:05	3,31
12:48	3,48
14:32	3,64
15:54	3,48
16:58	3,64
17:53	3,81
21:06	3,97
23:10	3,81
25:10	3,97
26:14	4,14
26:39	3,97
30:05	3,97

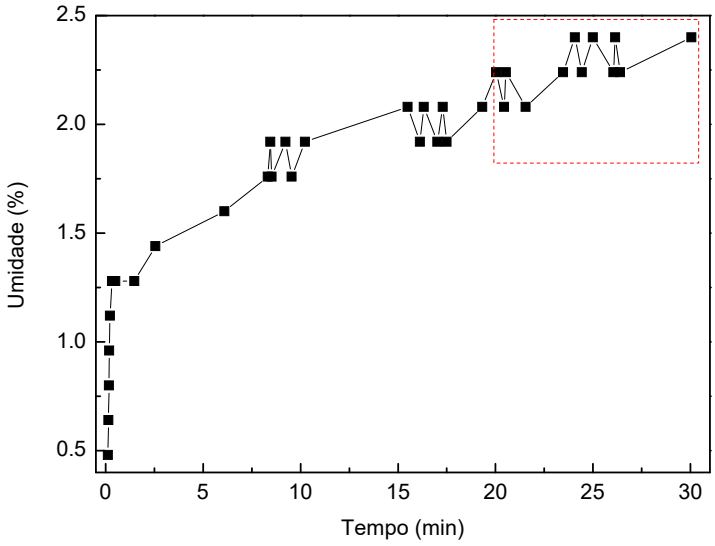


Figura 34. Representação gráfica da obtenção da forma hemi-hidratada da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 70°C por 30 min.

Tabela 39. Umidade percentual na obtenção da forma hemi-hidratada da cefadroxila através do equipamento de analisador de umidade com temperatura constante de 70°C por 30 min.

Tempo (min)	Umidade (%)
0:12	0,48
0:14	0,64
0:17	0,80
0:19	0,96
0:23	1,12
0:33	1,28
0:50	1,28
1:47	1,28
2:56	1,44
6:10	1,60
8:32	1,76
8:45	1,92
8:52	1,76
9:23	1,92
9:54	1,76
10:23	1,92
15:49	2,08
16:12	1,92
16:32	2,08
17:02	1,92
17:30	2,08
17:50	1,92
19:32	2,08
20:03	2,24
20:44	2,40
20:53	2,24
21:55	2,40
23:47	2,24
24:07	2,40
24:43	2,24
25:00	2,40
26:05	2,24
26:14	2,40
26:39	2,24
30:05	2,40

Após a realização desta etapa, análises comparativas foram realizadas para comprovação da obtenção das formas anidra e hemi-hidratada através das técnicas de caracterização de sólidos.

As técnicas de caracterização utilizadas para análise das diferentes formas de cefadroxila conhecidas na área farmacêutica foram: espectrofotometria na região do

infravermelho médio e próximo, determinação do ponto de fusão, análise térmica por TGA/DTG e DSC, microscopia óptica e ensaio de dissolução.

6.3.1.1. Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho médio

A Figura 35 e a Tabela 40 apresentam os espectros de absorção e as bandas características encontradas, respectivamente, na região do infravermelho médio das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada da cefadroxila.

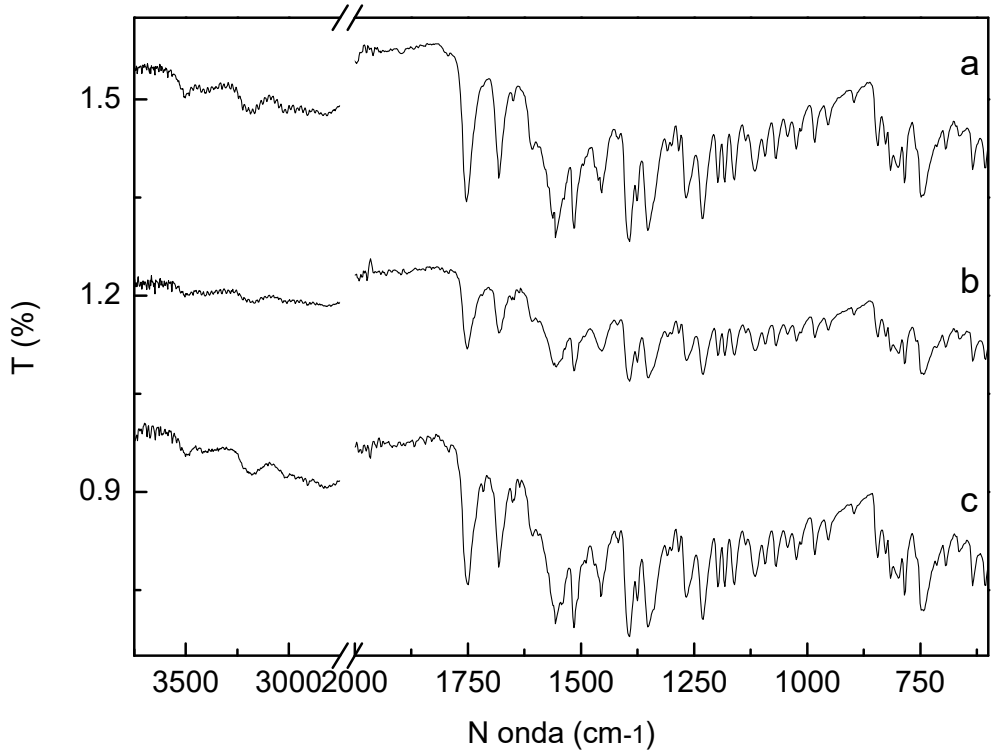


Figura 35. Espectros de absorção na região do infravermelho médio das formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila.

Tabela 40. Bandas de absorção apresentadas para todas as formas de CFD por espectrofotometria na região do infravermelho médio.

Frequências visualizadas (cm^{-1}) para todas as formas de CFD	Faixa de frequências de referência (cm^{-1}) [1]	Grupamentos Responsáveis
3496	3500-3300	Estiramento N-H
3022	3050-3010	Estiramento C_{sp2}-H
1757	1760-1665 [2]	Estiramento C=O
1556	1640-1560	Dobramento N-H
1516	1600-1450 [3]	Estiramento C=C (aromáticos)
1394	1400	Estiramento COO^-
1376	1375	Dobramento C_{sp3}-H
1354	1350-1000	Estiramento C-N
1269	1320-1210	Estiramento C-O
1232	1440-1220	Dobramento C-O-H

1 PAVIA et al., 2010; 2 Valores de referência para grupamentos carbonílicos; 3 Podem aparecer até 4 bandas dentro desta faixa

De acordo com os espectros de absorção na região do infravermelho médio foi possível observar que não houve diferença entre a cefadroxila anidra, hemi-hidratada e monoidratada, apresentando bandas idênticas às características para todas as formas.

6.3.1.2. Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por espectrofotometria na região do infravermelho próximo

A Figura 36 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho próximo das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada da cefadroxila, assim como a Tabela 41 apresenta os dados encontrados para todas as formas de acordo com as funções orgânicas presentes na molécula do fármaco.

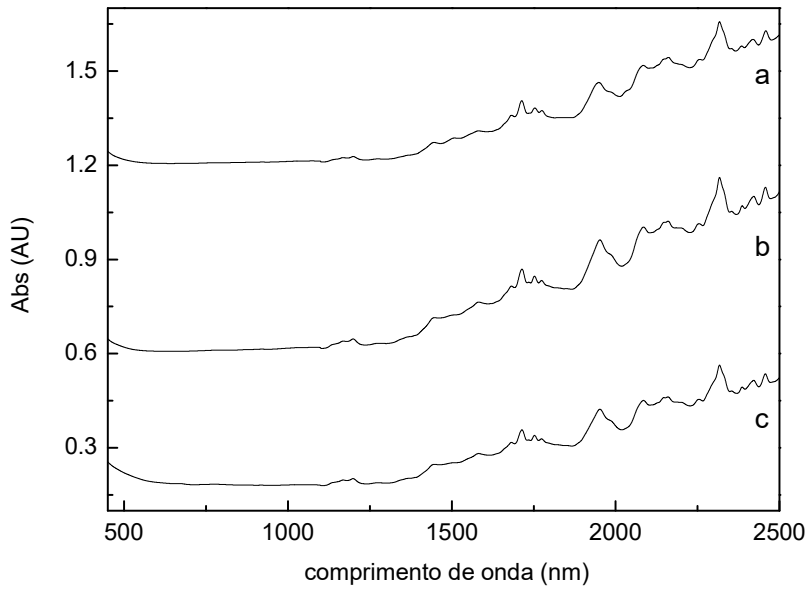


Figura 36. Espectros de absorção na região do infravermelho próximo das formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila.

Tabela 41: Principais sinais e diferenças apresentadas para todas as formas de CFD por espectrofotometria na região do infravermelho próximo.

Funções orgânicas	Região espectral (nm)	CFD monoidratada	CFD hemi-hidratada	CFD anidra
Combinações CH/CC	2500-2300	Pico quíntuplo em ~2459, 2419, 2384, 2353, 2319 nm	Pico quíntuplo em ~2455, 2420, 2384, 2350, 2317 nm	Pico quíntuplo em ~2461, 2422, 2387, 2356, 2320 nm
Combinações NH/OH	2300-2200	Pico simples em ~2252 nm	Pico simples em ~2257 nm	Pico simples em ~2260 nm
Combinações NH_2	2200-2100	Pico duplo em ~2163, 2145 nm	Pico duplo em ~2160, 2144 nm	Pico duplo em ~2164, 2145 nm
1° overtone CO	2100-2000	Pico simples em ~2088 nm	Pico simples em ~2085 nm	Pico simples em ~2088 nm
2° overtone C=O	2000-1900	Pico simples em ~1951 nm	Pico simples em ~1952 nm	Pico simples em ~1951 nm
1° overtone CH	1800-1700	Pico quádruplo em ~1772, 1750, 1736, 1713 nm	Pico quádruplo em ~1771, 1754, 1735, 1716 nm	Pico quádruplo em ~1779, 1757, 1734, 1716 nm
1° overtone ArCHO	1700-1600	Pico simples em ~1686 nm	Pico simples em ~1680 nm	Pico simples em ~1686 nm
1° overtone NH	1600-1500	Pico simples em ~1583 nm	Pico simples em ~1582 nm	Pico simples em ~1582 nm
1° overtone OH	1500-1400	Pico duplo em ~1500, 1442 nm	Pico duplo em ~1499, 1440 nm	Pico duplo em ~1503, 1443 nm
2° overtone CH	1200-1100	Pico duplo em ~1200, 1169 nm	Pico duplo em ~1196, 1169 nm	Pico duplo em ~1204, 1168 nm

De acordo com os espectros de absorção na região do infravermelho próximo e com os dados analisados das principais diferenças de sinais transmitidos entre as formas obtidas de cefadroxila foi possível observar que para todas as formas não houve diferença significativa nas bandas características da molécula e mesmo os sinais apresentando pequenas diferenças nas regiões espectrais compreendidas em 2300-2200 e 1700-1600, principalmente, os picos mantiveram-se de acordo com as funções orgânicas presentes na molécula do fármaco.

6.3.1.3. Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por determinação do ponto de fusão

A Figura 37 apresenta uma imagem contendo amostra de CFD-M SQR no fusiômetro óptico e a visualização da mudança de cor da amostra (fusão) quando o termômetro marcou 197°C.

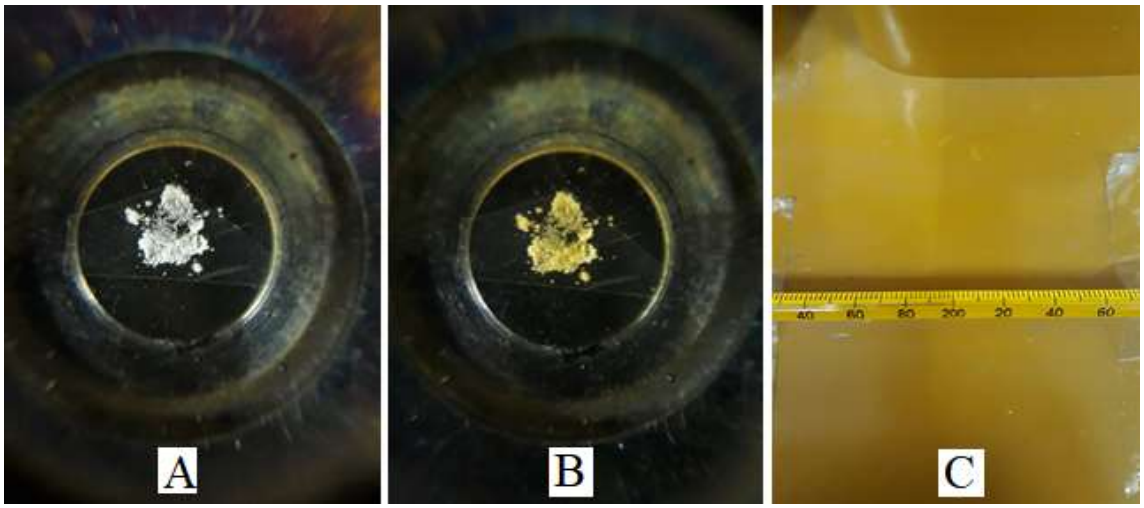


Figura 37. (A) Amostra contendo cefadroxila monoidratada SQR em 25°C, (B) amostra contendo cefadroxila monoidratada SQR em 197°C e (C) visualização do termômetro no momento em que a amostra foi fundida.

De acordo com os resultados, o ponto de fusão (PF) para todas as formas da cefadroxila foi de 197°C, não apresentando diferença entre elas.

6.3.1.4. Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por análises térmicas de TGA/DTG e DSC

Os resultados por TGA/DTG e DSC das formas monoidratada, hemi-hidratada e anidra da cefadroxila não apresentaram eventos exotérmicos e/ou endotérmicos significativos entre as amostras. Porém, as diferenças mínimas nos resultados encontrados mostraram que há diferença entre as formas obtidas. A Figura 38 apresenta a representação gráfica da análise térmica por TGA/DTG e a Figura 39 apresenta a representação gráfica da análise térmica por DSC das três formas estudadas.

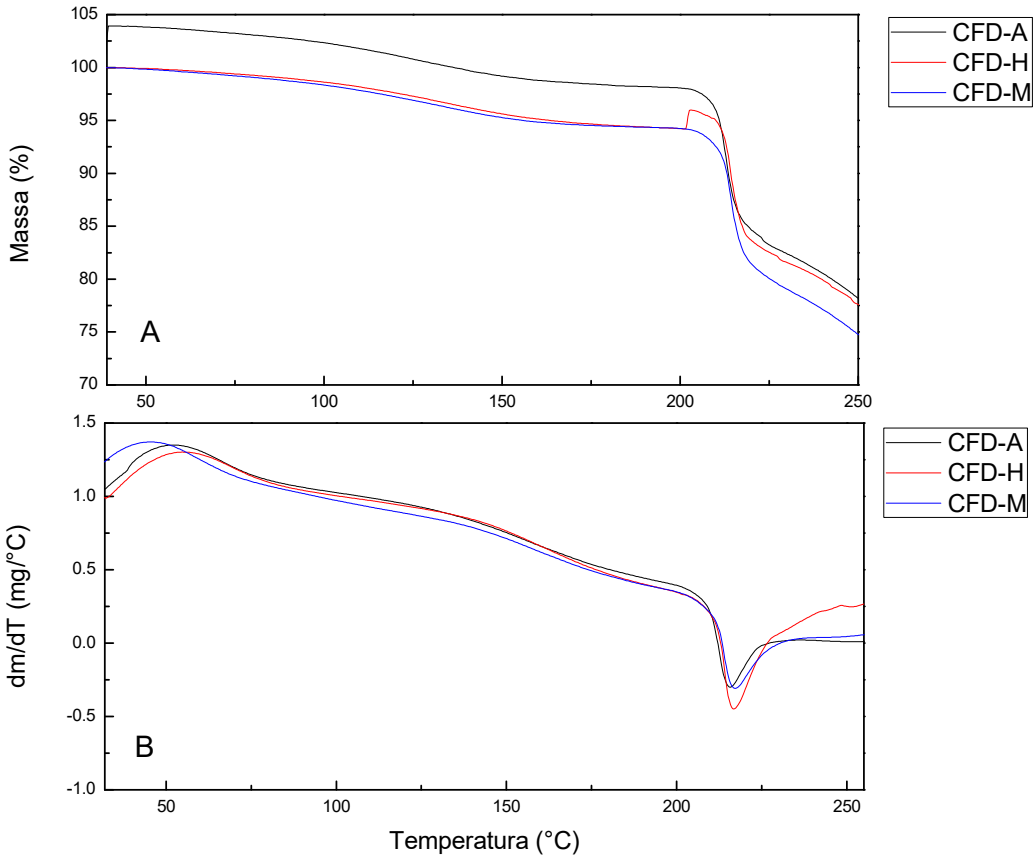


Figura 38. Representação gráfica das curvas TGA (A) e DTG (B) para as formas monoidratada, hemi-hidratada e anidra da cefadroxila em atmosfera inerte de nitrogênio.

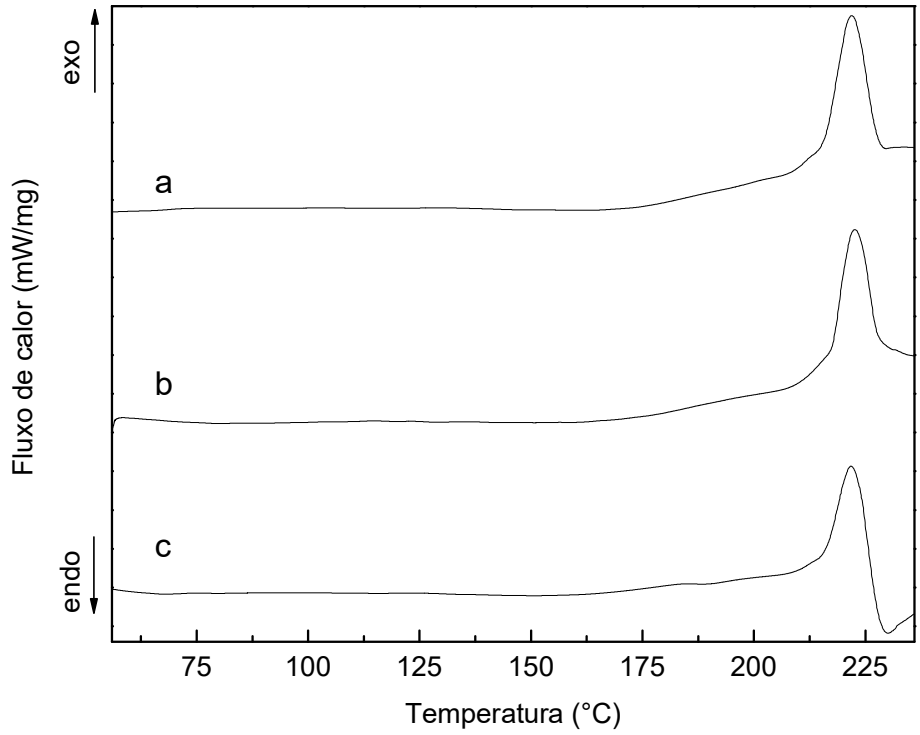


Figura 39. Representação gráfica das curvas de aquecimento DSC para as formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila.

A análise térmica de TGA/DTG apresentou diferenças entre as três formas obtidas, uma vez que a forma anidra apresentou uma quantidade baixa (1,92%) de umidade adsorvida, o que diferiu da forma monoidratada que apresentou perda de massa referente à eliminação de moléculas de água 5,64% e a forma hemi-hidratada apresentou-se intermediária no que se refere à quantidade de água eliminada pela cefadroxila monoidratada e a cefadroxila anidra.

As curvas de DSC para as formas obtidas de cefadroxila apresentaram resultados semelhantes. Para todas as formas não houve evidências significativas aos eventos endotérmicos. Os eventos exotérmicos mais evidentes se apresentaram muito próximos para todas as formas, principalmente na faixa de temperatura de ~221,5°C, correspondente à decomposição da substância. O ponto de fusão das formas não foram possíveis de serem observados, uma vez que o evento indicativo de decomposição foi próximo ao ponto de fusão do fármaco.

6.3.1.5. Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por microscopia óptica

As formas monoidratada, hemi-hidratada e anidra da cefadroxila foram observadas por microscopia óptica digital (Figura 40). Todas as formas apresentaram-se iguais e em formatos cúbicos.

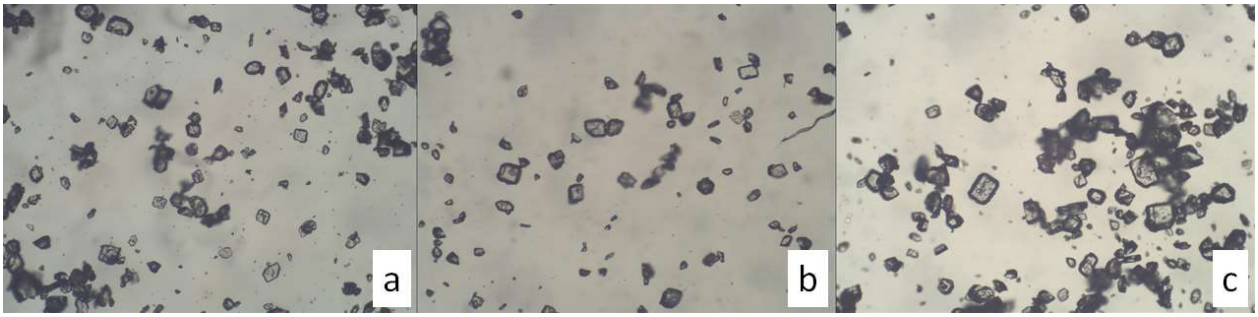


Figura 40. Cristais visualizados por microscopia óptica para as formas monoidratada (a), hemi-hidratada (b) e anidra (c) da cefadroxila com aumento total de 100x.

6.3.1.6. Caracterização das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada por teste de dissolução intrínseca

Considerando a alta solubilidade da CFD e recomendações das farmacopeias brasileira e americana (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 37, 2018), foram utilizados 400 mL de água como meio de dissolução do teste. As demais condições experimentais encontram-se descritas no item 5.3.4.5.

Anteriormente ao teste de dissolução, realizou-se uma curva analítica obtida com soluções padrão de cefadroxila monoidratada SQR, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL para determinar as absorbâncias de estudo em relação ao comprimento de onda definido em 260 nm. A Tabela 42 e Figura 41 apresentam os valores determinados nesta etapa.

Tabela 42. Valores das absorbâncias determinadas na curva analítica pela técnica espectrofotométrica na região do UV em 260 nm.

CFD-M SQR (µg/mL)	λ 260 nm
5	0,125
10	0,238
15	0,359
20	0,474
25	0,593
30	0,706
35	0,816
40	0,933
45	1,072
50	1,175
60	1,409
70	1,645
80	1,862
90	2,090
100	2,309

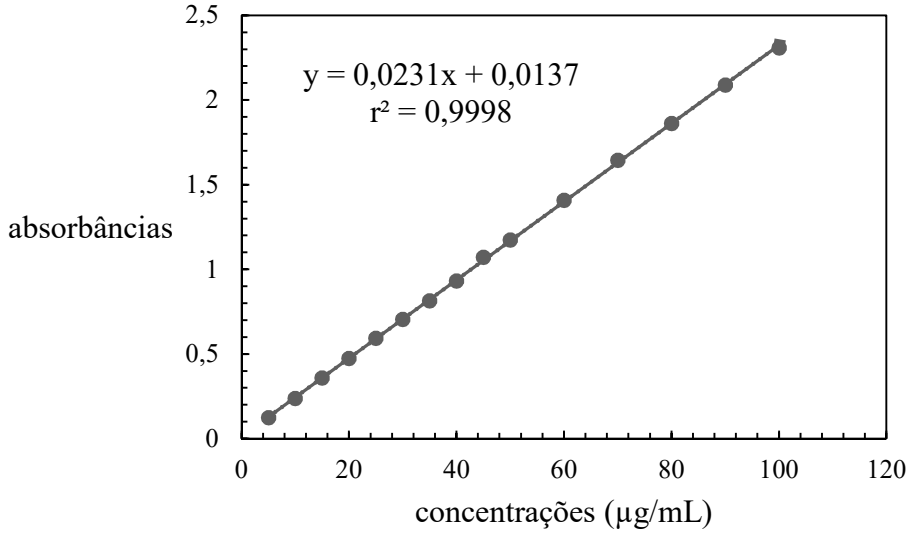


Figura 41: Curva analítica de soluções de cefadroxila monoidratada SQR, em concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL, obtida pela técnica espectrofotométrica na região do UV a 260 nm.

De acordo com a curva de calibração, os dados apresentaram-se lineares em toda faixa de trabalho utilizada no ensaio, e portanto delimitou-se para estudo as concentrações entre 5 e 35 µg/mL, as quais correspondiam às absorbâncias que variaram entre 0,1 e 0,8.

Os dados foram analisados para caracterizar as formas existentes de cefadroxila e ao mesmo tempo determinar como a relação da presença de água nas moléculas influenciariam nas taxas de dissolução, tempo a tempo. O teste foi realizado em triplicata para as três formas de cefadroxila. A Tabela 43 e Figura 42 mostram os resultados desta análise.

Tabela 43. Valores referentes aos perfis de dissolução das amostras de cefadroxila anidra, hemi-hidratada e monoidratada.

	Tempo (min)	**A**	**B**	**C**	**D**
CFD-A	5	0,201	8,10	81,08	61,42
	10	0,263	10,77	107,77	81,64
	20	0,358	14,89	148,90	112,80
	30	0,448	18,81	188,15	142,54
	40	0,559	23,59	235,91	178,72
	50	0,629	26,63	266,36	201,79
	60	0,667	28,28	282,81	214,25
CFD-H	5	0,574	24,26	242,69	183,86
	10	0,633	26,79	267,95	202,99
	20	0,694	29,43	294,35	222,99
	30	0,731	31,06	310,66	235,35
	40	0,768	32,65	326,53	247,37
	50	0,795	33,82	338,22	256,23
	60	0,806	34,29	342,98	259,83
CFD-M	5	0,381	15,90	159,08	120,52
	10	0,421	17,61	176,15	133,44
	20	0,466	19,56	195,65	148,22
	30	0,510	21,46	214,66	162,62
	40	0,550	23,23	232,30	175,99
	50	0,589	24,90	249,04	188,67
	60	0,620	26,24	262,46	198,83

A. Valor médio das absorbâncias encontradas em 260 nm; B. Valores médios das concentrações teóricas, calculadas através da equação da reta conct=[(abs-b)/a], referentes às absorbâncias encontradas em 260 nm (A); C. Valores médios das concentrações teóricas referentes às absorbâncias encontradas em 260 nm (B) multiplicadas por 10 referentes às diluições das amostras (1:10); D. Concentrações de cefadroxila absorvidas calculadas pela equação c=[conc/(π x r2)].

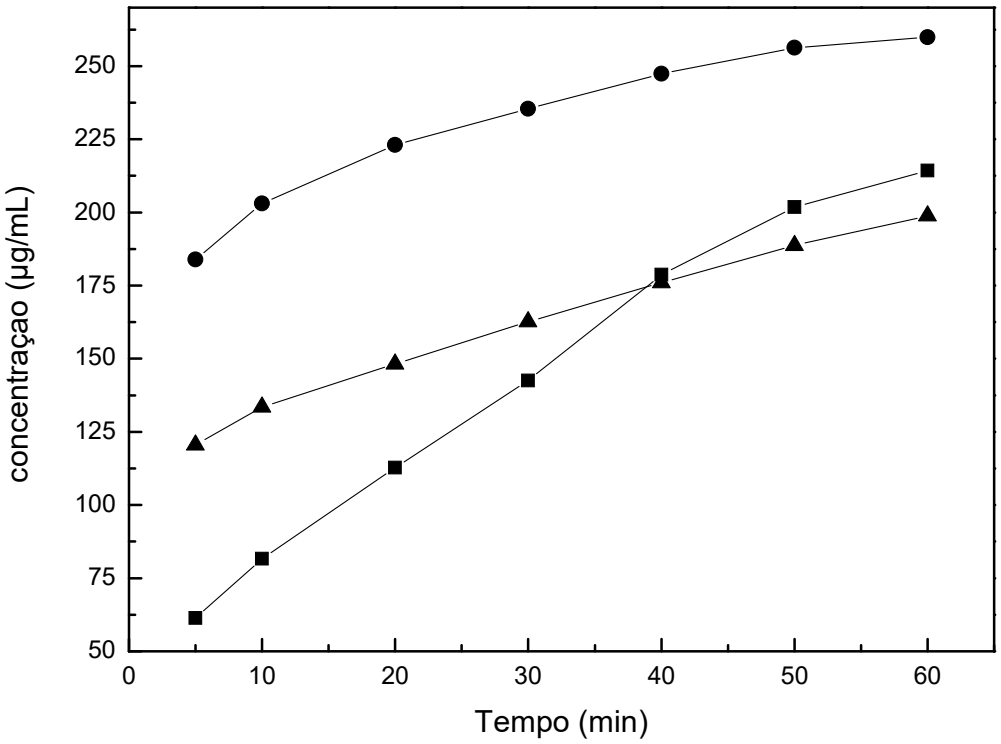


Figura 42. Perfil de dissolução para as amostras CFD-A (■), CFD-H (●) e CFD-M (▲), utilizando água purificada como meio de dissolução (37 ± 0,5°C), aparato II e velocidade de agitação de 100 rpm analisado em 260 nm.

No ensaio de dissolução intrínseca os resultados mostraram que a velocidade de dissolução das formas anidra e monoidratada apresentaram praticamente os mesmos tempos determinados entre 5 e 60 minutos, porém, mostrou a forma hemi-hidratada com velocidade de dissolução superior às demais, e estes valores corroboram com um estudo reportado na literatura que apresentou a solubilidade da forma hemi-hidratada da cefadroxila maior que as demais formas (FDA, 2018).

6.3.2. Ensaio de solubilidade

Antes de determinar qual o método que seria utilizado na triagem de modelos de obtenção de polimorfos da cefadroxila, realizou-se o teste de solubilidade do fármaco frente a diferentes solventes. Estabelecer este teste inicial é imprescindível aos estudos de polimorfismo de fármacos, uma vez que as distintas polaridades entre eles, irão interferir diretamente nos processos de solubilidade e interação entre as moléculas do soluto ao

solvente (BRITTAIN, 2009; MARTINS et al., 2013). O método descrito para a determinação da solubilidade se encontra no item 5.3.2.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), "partes" significa quando 1 g de qualquer sólido é submetido à dissolução no número de mililitros de qualquer solvente estabelecido no número de partes, sob temperatura de 25°C. As solubilidades aproximadas neste estudo apresentam os termos descritivos, que estão descritos na Tabela 44.

Tabela 44. Termos descritos para designar a solubilidade dos compostos.

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	menos de 1 parte
Facilmente solúvel	de 1 a 10 partes
Solúvel	de 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	de 30 a 100 partes
Pouco solúvel	de 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	de 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010.

Os resultados obtidos no teste de solubilidade da cefadroxila em diferentes solventes estão na Tabela 45, de acordo com os critérios preconizados na Tabela 44.

Tabela 45. Solubilidade da cefadroxila monoidratada SQR em diferentes solventes a 25°C.

Solventes	Termo descritivo
Acetato de etila	Praticamente insolúvel
Acetona	Praticamente insolúvel
Acetonitrila	Praticamente insolúvel
Água	Pouco solúvel
Etanol	Muito pouco solúvel
Hexano	Praticamente insolúvel
Isopropanol	Muito pouco solúvel
Metanol	Ligeiramente solúvel

O ensaio de solubilidade permitiu caracterizar a cefadroxila qualitativamente através de sua polaridade, além de determinar qual o melhor sistema solvente para o desenvolvimento de ensaios para a obtenção de polimorfos da cefadroxila. Os resultados encontraram-se dentro das especificações farmacopeicas de solubilidade descritas para o fármaco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JP, 2011; USP 37, 2018).

A cefadroxila possui uma área de superfície polar topológica (TPSA) (PUBCHEM, 2019) e os resultados indicaram e confirmam que a capacidade deste fármaco se dissolver em solventes polares (água, metanol e etanol) é mais fácil que em solventes apolares. Portanto, toda a metodologia estabelecida para obtenção de polimorfos da cefadroxila (Figura 10) foi baseada na solubilidade do fármaco em água e metanol.

6.3.3. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila

6.3.3.1. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por espectrofotometria na região do infravermelho médio

Após a realização do teste de solubilidade, obtiveram diferentes formas de cefadroxila através dos métodos descritos no item 5.3.3. Após a realização desses métodos escolheu-se, em primeira instância, a técnica de espectrofotometria na região do infravermelho médio, por ser uma técnica de escolha complementar na identificação de polimorfos e por utilizar pouca quantidade de amostra.

Observou-se que as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11 e 14 foram consideradas iguais por apresentarem as mesmas bandas características no espectro, porém foram diferentes da CFD-A. A Figura 43 apresenta os espectros de todas as amostras observadas na faixa de 400 a 1800 cm^{-1}.

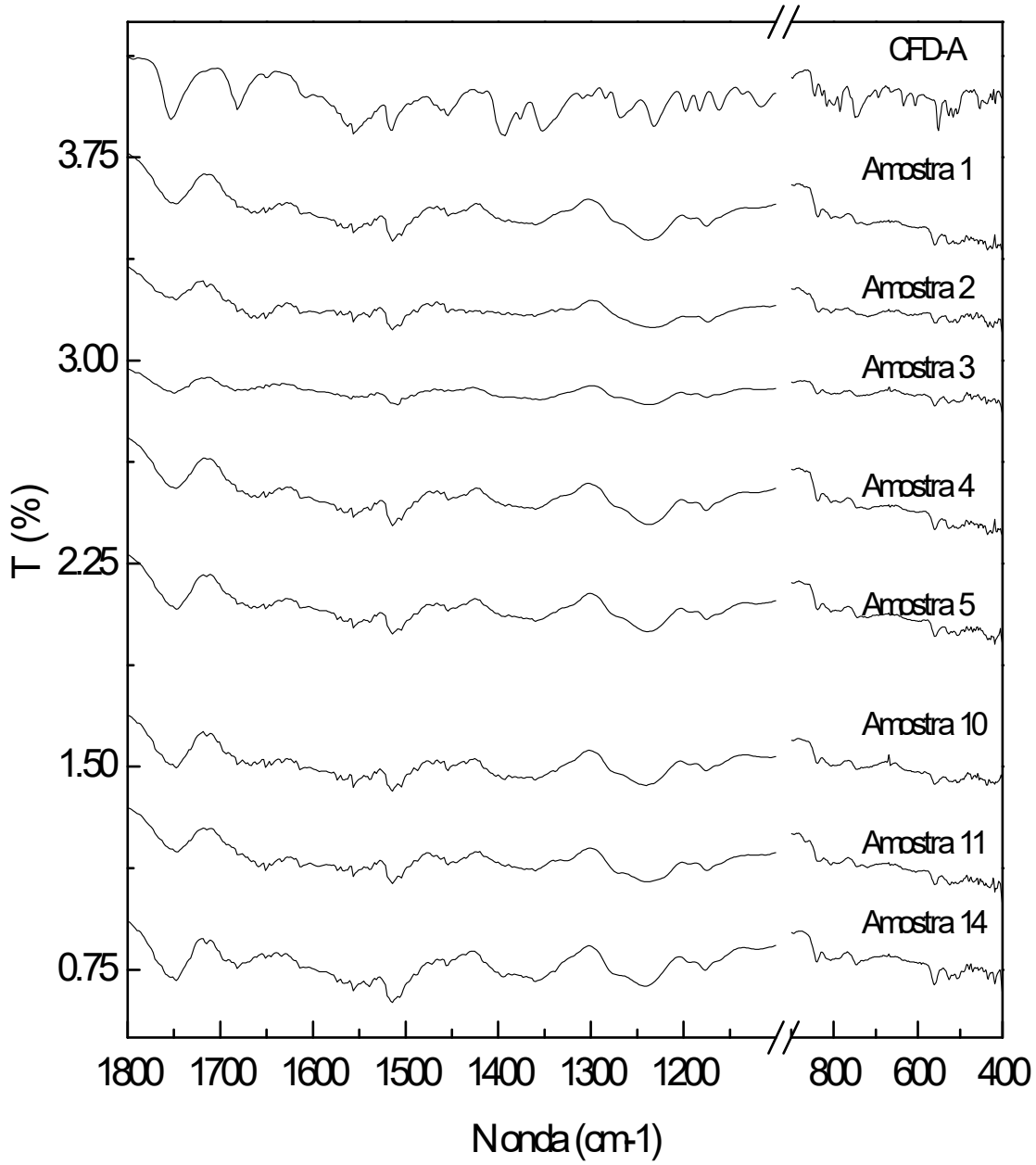


Figura 43. Espectros de região de infravermelho médio das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 14 e CFD-A numa faixa de 400-1800 cm^{-1}.

As amostras 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram-se iguais entre si e diferentes da cefadroxila anidra. Além dos picos referentes às bandas características da molécula terem sido formados em menor intensidade, algumas bandas que foram visualizadas na substância anidra na região espectral entre 1700-1600, 1400-1300, 1200-1100 cm^{-1}, principalmente, que correspondem aos grupamentos de estiramentos de C=O e COO^- e dobramento C-O-H, respectivamente, não foram visualizadas da mesma forma para estas amostras.

Outro fator também observado, foi que para as amostras 10, 11 e 14, os espectros também foram iguais aos das amostras 1, 2, 3, 4 e 5, porém o método de obtenção utilizou o aumento de temperatura na secagem das amostras 10, 11 e 14 e apesar de terem sido diferentes em questão de tempo e temperatura de secagem, foram todos solubilizados em metanol, o que pode ter influenciado neste resultado.

A análise seguiu para as demais amostras 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17 e 18, em que as amostras 15, 16, 17 e 18 apresentaram espectros iguais entre si, porém diferentes dos visualizados na Figura 43 e diferente também da forma anidra (Figura 44). É importante destacar que a amostra 1 foi utilizada como base para comparação entre os demais espectros.

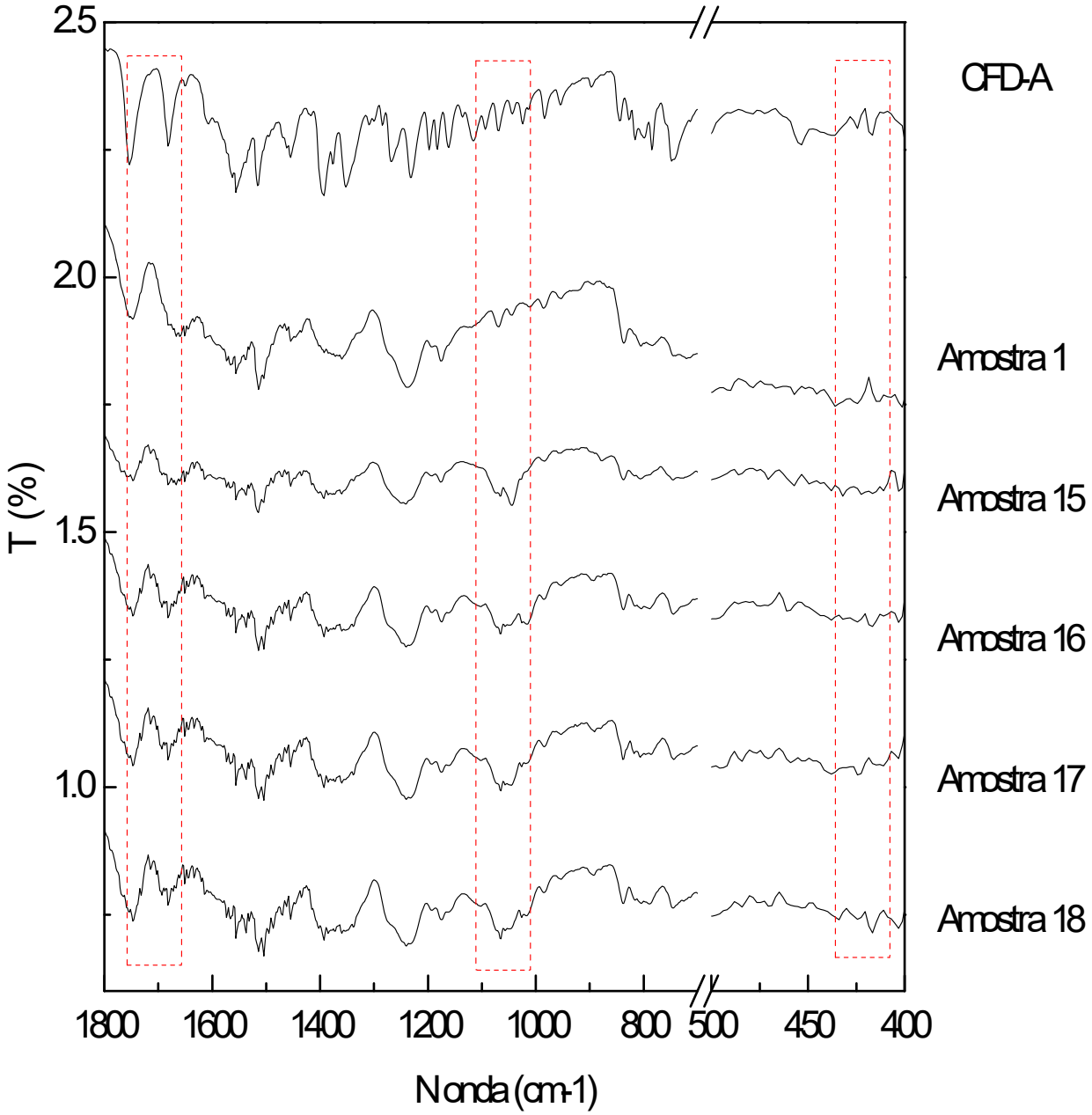


Figura 44. Espectros de região de infravermelho médio das amostras 1, 15, 16, 17, 18 e CFD-A na faixa de 400-1800 cm^{-1}.

As amostras 15, 16, 17 e 18, obtidas pelo mesmo método na triagem determinado (secagem completa em evaporador rotatório), apresentaram-se iguais entre si e diferentes da cefadroxila anidra. As principais diferenças se deram entre as regiões espectrais compreendidas entre 1800-1600, 1100-1000 cm^{-1}, principalmente, correspondentes aos grupamentos de estiramentos de C=O e C-N, respectivamente.

A análise seguiu da mesma forma para as demais amostras. Os resultados dos espectros mostraram que as amostras 8, 9, 12 e 13 foram diferentes de todas as amostras

analisadas anteriormente, pois apresentara distintos picos visualizados no espectro, além de serem também diferentes da CFD-A. A amostra 7 apresentou-se diferente de todas as amostras acima analisadas, porém, foi igual à CFD-A, sendo este resultado esperado já que a CFD-A foi solubilizada apenas em água, porém as bandas se apresentaram em menor intensidade. A Figura 45 apresenta os espectros dessas amostras observadas na faixa de 400 a 1800 cm^{-1}, tomou-se como base a amostra 1 e amostra 15 para comparação dos espectros.

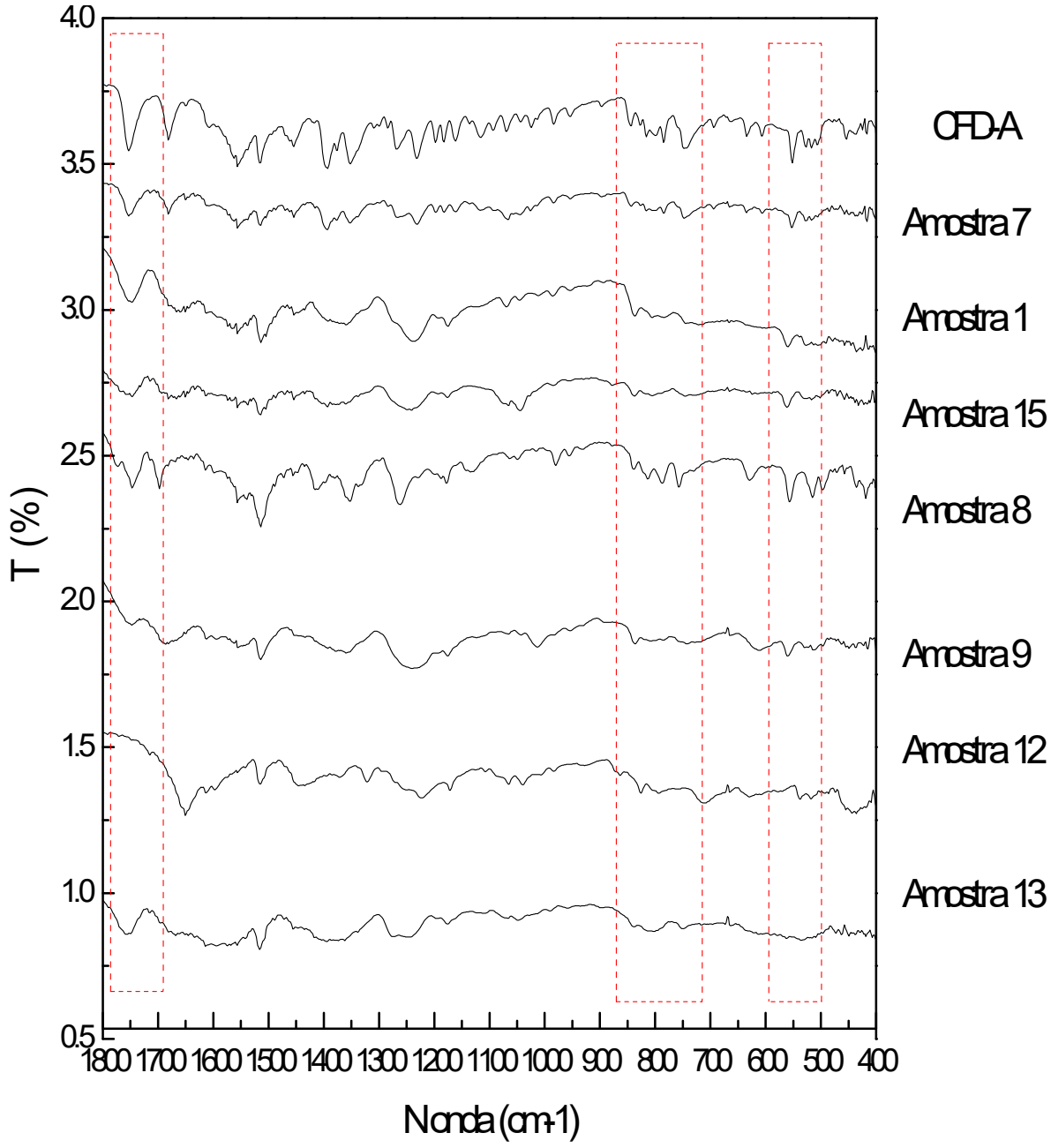


Figura 45. Espectros de região de infravermelho médio das amostras 1, 7, 8, 9, 12, 13, 15 e CFD-A na faixa de 400-1800 cm^{-1}.

As amostras 8, 9, 12 e 13 apresentaram diferenças ocorridas principalmente nas regiões espectrais compreendidas entre 1800-1600, 900-700 e 600-500 cm^{-1}, correspondentes aos grupamentos de estiramentos de C=O e esqueleto aromático (900-690 cm^{-1}), respectivamente.

A amostra 6 não foi analisada, pois formou uma estrutura tecnicamente semelhante ao "caramelo" e aderente à parede do béquer, além da quantidade de produto formado ter sido muito inferior às demais amostras e insuficiente para analisar por espectrofotometria na região do infravermelho médio.

É importante destacar que embora os espectros tenham se mostrado diferentes da substância anidra, a molécula do fármaco ainda se encontra presente nas amostras obtidas, uma vez que as bandas referentes aos picos característicos da molécula da cefadroxila se mantiveram nas regiões principais, porém em menor intensidade e em muitas vezes apresentando-se em menor quantidade, onde para a substância anidra a intensidade do sinal se dava como um pico triplo e em outras formas como pico simples ou duplos.

Como finalização da caracterização pela técnica de espectrofotometria na região do infravermelho médio das amostras obtidas a partir da cefadroxila anidra, determinou-se que a amostra 1 representaria as amostras 2, 3, 4, 5, 10, 11 e 14 e a amostra 15 representaria as amostras 16, 17 e 18, encaminhando para as seguintes técnicas somente as amostras que foram consideradas diferentes, sendo elas as amostras 1, 7, 8, 9, 12, 13 e 15.

6.3.3.2. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por análise térmica (DSC)

As amostras 1, 7, 8, 9, 12, 13 e 15 foram analisadas pela técnica de DSC. Todas as amostras apresentaram eventos significativos notáveis e distintos entre si, confirmando diferenças entre as formas obtidas e entre a cefadroxila. A Figura 46 apresenta a representação gráfica das análises térmicas sobrepostas das formas obtidas com a forma anidra.

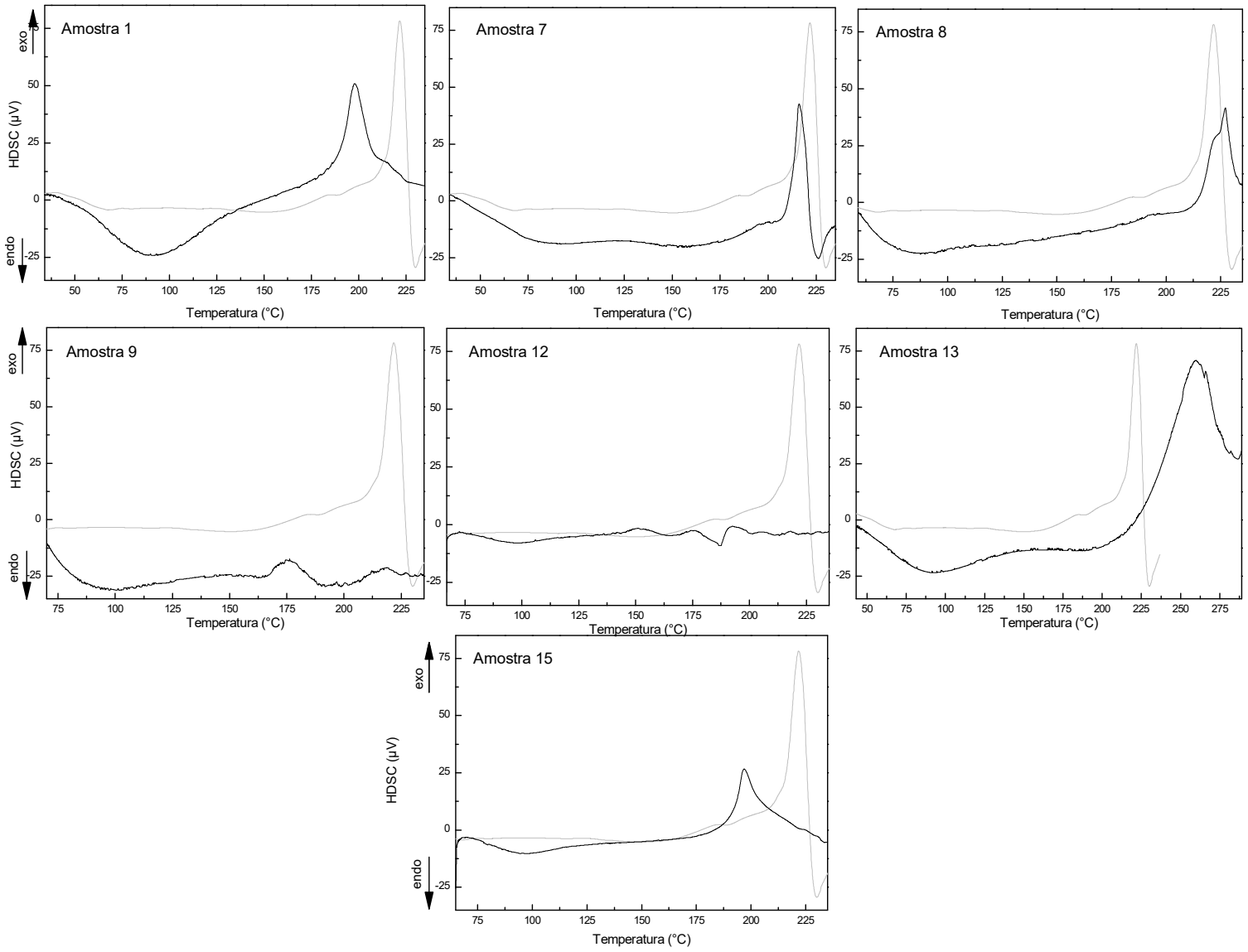


Figura 46. Curvas de DSC das amostra 1, 7, 8, 9, 12, 13 e 15 (preto), sobrepostas com a curva de DSC da CFD-A (cinza).

A análise de DSC indicou diferenças entre todas as amostras e a cefadroxila na forma anidra, as quais apresentaram eventos endotérmicos que foram mais evidentes nas amostras 1, 8, 13 e 15. Estes eventos podem estar relacionados com a perda de solvente ocorrida na molécula quando a amostra foi aquecida.

A amostra 7, correspondente à forma hidratada, apresentou maior evidência no evento endotérmico quando comparado com a forma anidra, enquanto que as amostras 9 e 12 quando comparadas com as demais formas não apresentaram eventos exotérmicos

que correspondam à decomposição como as demais, podendo indicar que essas substâncias obtidas já poderiam estar degradadas.

Os pontos de fusão das amostras não apresentaram eventos endotérmicos característicos assim como na caracterização de DSC das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada, porém, todas as amostras indicaram que são termicamente menos estáveis e diferentes da cefadroxila anidra e monoidratada.

6.3.3.3. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão (PF) para todas as formas polimórficas se mostraram diferentes e inferiores ao ponto de fusão da forma anidra (197°C). O ponto de fusão foi em: 174°C para a amostra 1, 168°C para a amostra 7, 166°C para amostra 8, 140°C para amostra 9, 165°C para amostra 12, 178°C para a amostra 13 e 172°C para amostra 15.

6.3.3.4. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por microscopia óptica

Todas as formas se apresentaram diferentes da CFD-A e diferentes entre si quando observadas por microscopia óptica digital. Na Figura 47 é possível analisar nitidamente a diferença entre elas.

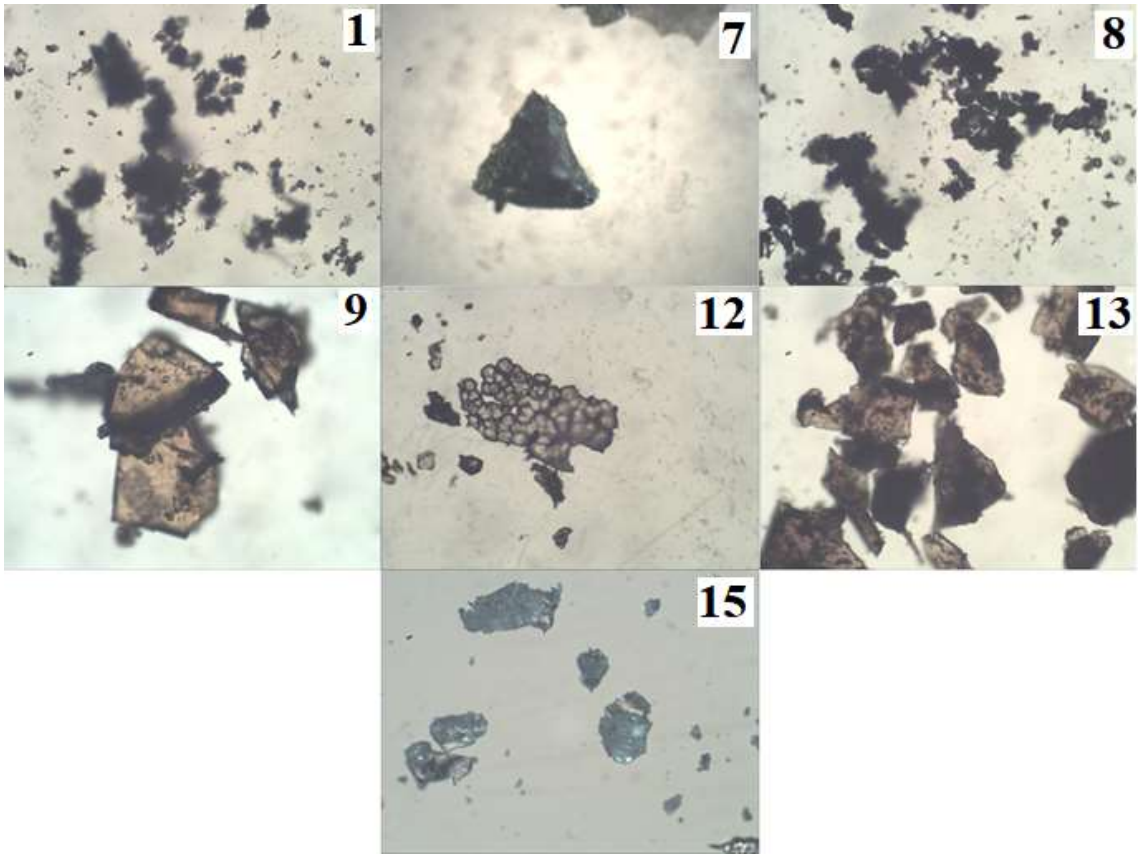


Figura 47. Cristais obtidos por microscopia óptica para as amostras 1, 7, 8, 9, 12, 13 e 15 com aumento total de 100x.

Nesta análise, os resultados confirmaram da mesma forma que as demais técnicas, a diferença entre as amostras obtidas quando comparadas entre si e com relação à substância anidra. A forma anidra apresenta-se microscopicamente em formato cúbico e as amostras 1, 8 e 15 não apresentaram formas definidas, o que pode corresponder como sendo formas amorfas.

O material obtido das amostras 9 e 13 não se apresentaram em forma de "pó" como as demais amostras, mas mostraram com aspecto vítreo. Esta similaridade também foi visualizada na análise microscópica, que poderia indicar como sendo formas solvatadas.

A amostra 7, correspondente à forma hidratada, apresentou formatos cúbicos irregulares e com coloração também alterada, de branca para verde, o que poderia indicar algum aspecto de degradação.

Posteriormente, as amostras foram conduzidas para as técnicas de espectrofotometria na região do infravermelho próximo e dissolução intrínseca. Como

estas técnicas exigem quantidades maiores de amostras e devido duas amostras terem se apresentado diferentemente das demais formas, tanto em aspectos físicos (organoléptico e microscópico), quanto em estabilidade química, como pode ser visto na técnica de DSC, as amostras 9 e 13 foram descartadas dos testes seguintes.

6.3.3.5. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por espectrofotometria na região do infravermelho próximo

A Figura 48 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho próximo das amostras 1, 7, 8, 13 e 15 obtidas a partir da cefadroxila anidra, assim como a Tabela 46 apresenta os dados encontrados para ambas as amostras de acordo com as funções orgânicas presentes na molécula do fármaco.

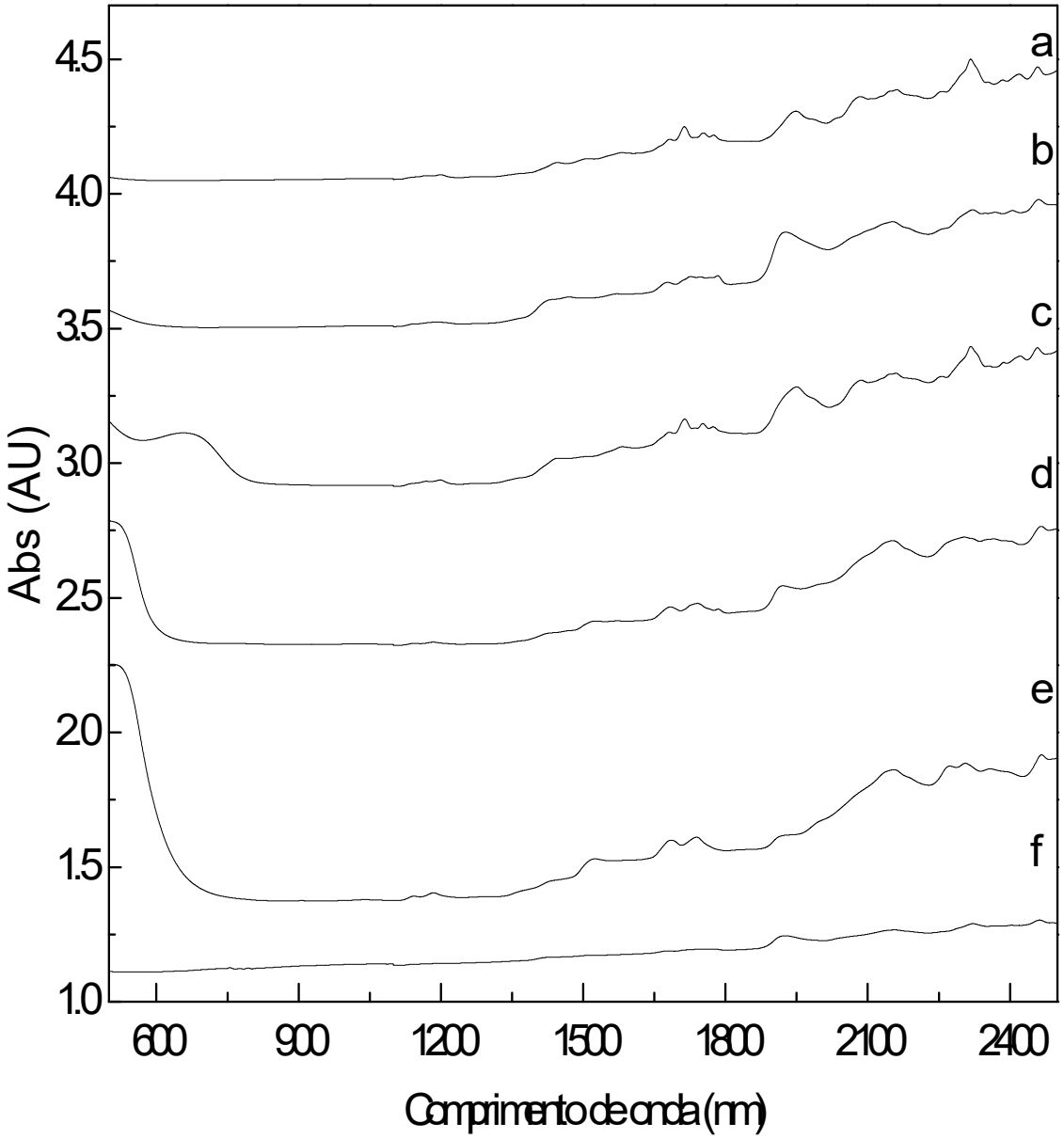


Figura 48. Espectros de absorção na região do infravermelho próximo das amostras 1 (b), 7 (c), 8 (d), 13 (e) e 15 (f) obtidas a partir da cefadroxila anidra (a).

Tabela 46. Principais sinais e diferenças apresentadas para as amostras 1, 7, 8, 13 e 15 obtidas a partir da CFD-A por espectrofotometria na região do infravermelho próximo.

Funções orgânicas	Região espectral (nm)	CFD-A	Amostra 1	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 13	Amostra 15
Combinações CH/CC	2500-2300	Pico quíntuplo em ~2461, 2422, 2387, 2356, 2320 nm	Pico quádruplo em ~2458, 2409, 2372, 2350, 2326 nm	Pico quíntuplo em ~2462, 2422, 2391, 2357, 2320 nm	Pico quíntuplo em ~2468, 2407, 2370, 2347, 2303 nm	Pico quádruplo em ~2400, 2470, 2359, 2309 nm	Pico quádruplo em ~2477, 2400, 2382, 2339 nm
Combinações NH/OH	2300-2200	Pico simples em ~2260 nm	Pico simples em ~2255 nm	Pico simples em ~2257 nm	Pico simples em ~2264 nm	Pico simples em ~2276 nm	Pico simples em ~2269 nm
Combinações NH_2	2200-2100	Pico duplo em ~2164, 2145 nm	Pico duplo em ~2189, 2157 nm	Pico duplo em ~2164, 2143 nm	Pico duplo em ~2156, 2133 nm	Pico duplo com mal resolução em ~2156, 2135 nm	Pico simples em ~2163 nm
1° overtone CO	2100-2000	Pico simples em ~2088 nm	Pico simples em ~2065 nm	Pico simples em ~2088 nm	Pico simples em ~2008 nm	-	-
2° overtone C=O	2000-1900	Pico simples em ~1951 nm	Pico simples em ~1927 nm	Pico simples em ~1953 nm	Pico simples em ~1919 nm	Pico duplo em ~1996, 1921 nm	Pico simples em ~1931 nm
1° overtone CH	1800-1700	Pico quádruplo em ~1779, 1757, 1734, 1716 nm	Pico quádruplo em ~1726, 1747, 1766, 1787 nm	Pico quádruplo em ~1774, 1751, 1736, 1717 nm	Pico quádruplo em ~1726, 1743, 1768, 1785 nm	Pico simples em ~1740 nm	Pico triplo em ~1782, 1758, 1711 nm
1° overtone Ar	1700-1600	Pico simples em ~1686 nm	Pico simples em ~1677 nm	Pico simples em ~1685 nm	Pico simples em ~1686 nm	Pico simples em ~1687 nm	Pico simples em ~1680 nm
1° overtone NH	1600-1500	Pico simples em ~1582 nm	Pico simples em ~1569 nm	Pico simples em ~1586 nm	Pico simples em ~1521 nm	Pico simples em ~1522 nm	Pico simples em ~1503 nm
1° overtone OH	1500-1400	Pico duplo em ~1503, 1443 nm	Pico duplo em ~1467, 1426 nm	Pico duplo em ~1501, 1442 nm	Pico duplo com mal resolução em ~1471, 1423 nm	Pico simples com mal resolução em ~1426 nm	Pico simples com mal resolução em ~1433 nm
2° overtone CH	1200-1100	Pico duplo em ~1204, 1168 nm	Pico duplo com mal resolução em ~1139, 1192 nm	Pico duplo em ~1202, 1166 nm	Pico duplo em ~1185, 1143 nm	Pico duplo em ~1187, 1142 nm	Pico duplo em ~1100, 1008 nm
3° overtone CH	900-700	-	-	-	-	-	Pico triplo em ~796, 779, 758 nm

A técnica de espectrofotometria na região do infravermelho próximo apresentou diferenças entre as amostras obtidas e a forma anidra da cefadroxila, com exceção das amostras 7 e 8, que apresentaram picos muito próximos aos picos da forma comercial.

As amostras 1, 13 e 15 apresentaram quatro picos na região espectral compreendidos entre 2500-2300 nm, que corresponde às combinações de CH/CC, diferentemente da forma anidra e amostras 7 e 8 que possuem cinco picos nesta região.

Alterações foram mais significativas para as amostras 13 e 15, as quais se mantiveram, em partes, semelhantes à forma anidra. Houve alteração da quantidade de picos da amostra 13 nas regiões espectrais compreendidas entre 2000-1700 e 1500-1400 nm, as quais são referentes aos primeiros overtones de CH e OH e segundo overtone de C=O, respectivamente, além da ausência de um pico na região espectral compreendida entre 2100-2000 nm referente ao primeiro overtone de CO.

Com relação à amostra 15, observou-se a presença de apenas um pico na região espectral compreendida entre 2300-2200 nm, correspondente a combinações NH_2 e ausência do pico da região espectral compreendida entre 2100-2000 nm, a qual corresponde ao primeiro overtone de CO, assim como ocorrido com a amostra 13. Na região espectral entre 1500-1400 nm, que corresponde primeiro overtone de OH houve má resolução do pico e na região entre 900-700 nm, referente a um terceiro overtone de CH, houve a presença de três picos, os quais não haviam aparecido nas amostras anteriores.

6.3.3.6. Caracterização das polimórficas da cefadroxila pelo teste de dissolução intrínseca

A dissolução intrínseca foi realizada também como ferramenta para caracterização das formas obtidas a partir da cefadroxila anidra. Até o momento, foi possível observar que as amostras são diferentes formas polimórficas da cefadroxila, devido terem apresentado propriedades físico-químicas diferentes das substâncias anidra e monoidratada. Assim, o teste de dissolução foi aplicado, a fim de complementar a caracterização, além de testar se a velocidade de dissolução das formas permitem obter a mesma extensão e absorção da forma comercializada.

Apesar das formas anidra e monoidratada terem apresentado resultados próximos neste ensaio, utilizou-se para comparação das amostras 1, 7, 8, 13 e 15 os resultados obtidos da forma monoidratada devido este estudo estar relacionado também a interpretações sobre os processos de biodisponibilidade da substância ativa no organismo e a forma monoidratada é a comercialmente utilizada.

Desta forma, a Tabela 47 e a Figura 49 mostram os modelos resultantes e a análise de relevância das amostras obtidas a partir da cefadroxila anidra, tendo sido o ensaio realizado em triplicata para todas as amostras obtidas.

Tabela 47. Valores referentes aos perfis de dissolução das amostras 1, 7, 8, 13 e 15 obtidas a partir da cefadroxila anidra.

	Tempo (min)	A	B	C	D
CFD-M	5	0,381	15,90	159,08	120,52
	10	0,421	17,61	176,15	133,44
	20	0,466	19,56	195,65	148,22
	30	0,510	21,46	214,66	162,62
	40	0,550	23,23	232,30	175,99
	50	0,589	24,90	249,04	188,67
	60	0,620	26,24	262,46	198,83
Amostra 1	5	0,157	6,22	62,25	47,15
	10	0,255	10,44	104,45	79,13
	20	0,395	16,50	165,06	125,04
	30	0,573	24,21	242,12	183,42
	40	0,657	27,84	278,48	210,97
	50	0,671	28,45	284,54	215,56
	60	0,667	28,28	282,81	214,25
Amostra 7	5	0,108	4,08	40,82	30,92
	10	0,169	6,72	67,22	50,93
	20	0,287	11,83	118,31	89,63
	30	0,387	16,16	161,60	122,42
	40	0,468	19,66	196,66	148,99
	50	0,533	22,48	224,80	170,30
	60	0,612	25,90	259,00	196,21
Amostra 8	5	0,080	2,89	28,91	21,90
	10	0,108	4,10	41,03	31,09
	20	0,160	6,33	63,33	47,97
	30	0,204	8,23	82,38	62,40
	40	0,244	9,96	99,69	75,52
	50	0,273	11,24	112,46	85,20
	60	0,307	12,71	127,18	96,35

continua na próxima página

Tabela 47 (continuação). Valores referentes aos perfis de dissolução das amostras 1, 7, 8, 13 e 15 obtidas a partir da cefadroxila anidra.

Amostra 13	5	0,038	1,05	10,51	7,96
	10	0,084	3,04	30,43	23,05
	20	0,123	4,73	47,31	35,84
	30	0,140	5,48	54,89	41,58
	40	0,135	5,27	52,72	39,94
	50	0,185	7,41	74,15	56,17
	60	0,160	6,35	63,54	48,14
Amostra 15	5	0,328	15,94	159,43	120,78
	10	0,575	24,32	243,20	184,24
	20	0,646	27,37	273,72	207,36
	30	0,689	29,23	292,33	221,46
	40	0,719	30,53	305,32	231,30
	50	0,728	30,94	309,43	234,42
	60	0,733	31,16	311,60	236,06

A. Valor médio das absorbâncias encontradas em 260 nm; B. Valores médios das concentrações teóricas, calculadas através da equação da reta conct=[(abs-b)/a], referentes às absorbâncias encontradas em 260 nm (A); C. Valores médios das concentrações teóricas referentes às absorbâncias encontradas em 260 nm (B) multiplicadas por 10 referentes às diluições das amostras (1:10); D. Concentrações de cefadroxila absorvidas calculadas pela equação c=[conc/(π x r2)].

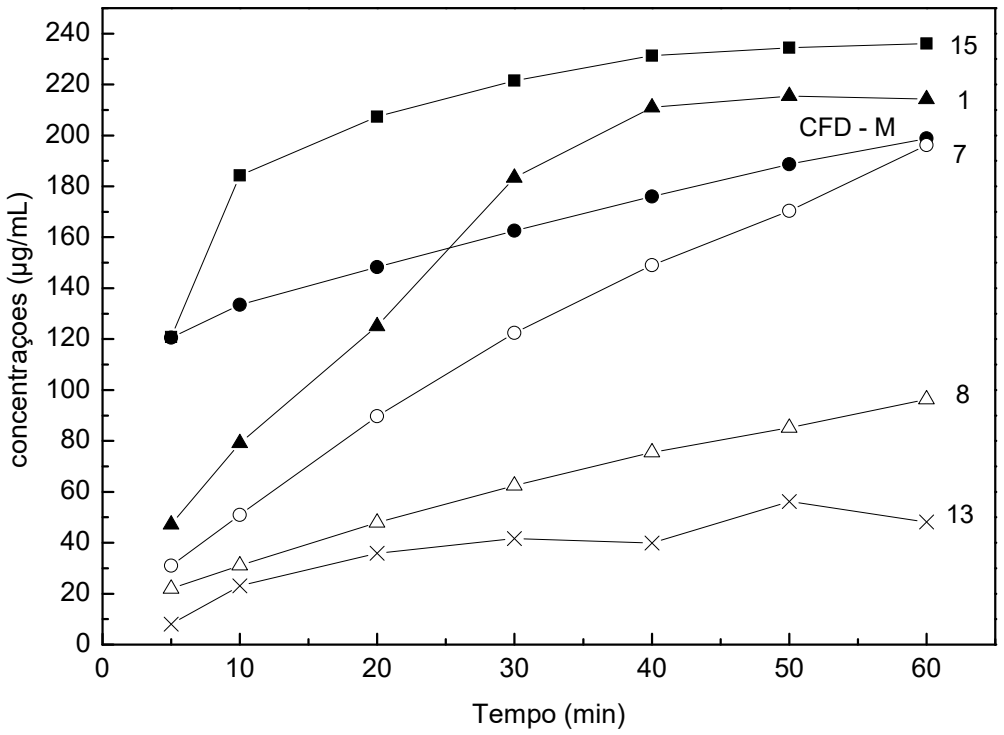


Figura 49. Perfil de dissolução das amostras de CFD-M (●) e amostras 1 (▲), 7 (○), 8 (∆), 13 (X) e 15 (■) obtidas a partir da cefadroxila anidra utilizando água como meio de dissolução (37 ± 0,5°C), aparato II, velocidade de agitação de 100 rpm em 260 nm.

De acordo com os resultados obtidos no perfil de dissolução, todas as amostras se apresentaram diferentes entre si e diferentes da forma comercial monoidratada. As amostras 1 e 15 apresentaram alta velocidade de dissolução quando comparadas com a

forma comercializada, o que pode indicar serem substâncias amorfas, pois na maioria dos casos estas substâncias possuem de 100 a 1000 vezes maior solubilidade que as formas cristalinas (LEUNER & DRESSMAN, 2000; WILSON et al., 2018).

A amostra 7 apresentou perfil de dissolução inferior à CFD-M durante a maioria do tempo do processo, porém em tempo final de 60 minutos apresentou a velocidade praticamente igual à forma monoidratada. As formas 13 e 8 apresentaram maior diferença na velocidade de dissolução, estando ambas as formas com valores médios muito baixo quando comparadas com a forma monoidratada, o que pode indicar baixa biodisponibilidade (DURÁN et al., 2010).

6.3.3.7. Caracterização das formas polimórficas da cefadroxila por difração de raios X

A última análise empregada no processo de caracterização das amostras obtidas a partir da cefadroxila anidra foi a técnica de difração de raios X. A amostra 13 não foi analisada por difração de raios X, pois de acordo com os resultados obtidos na dissolução, esta substância não exibe interesse farmacológico devido à baixa velocidade de dissolução, além de ter sido uma forma obtida com alta utilização de solvente orgânico, se mostrando mais uma vez não ser viável pelo aspecto econômico, ambiental e biológico.

Os difratogramas referentes à cefadroxila anidra e amostras 1, 8 e 15 estão expostos nas Figuras 50, 51, 52 e 53 respectivamente.

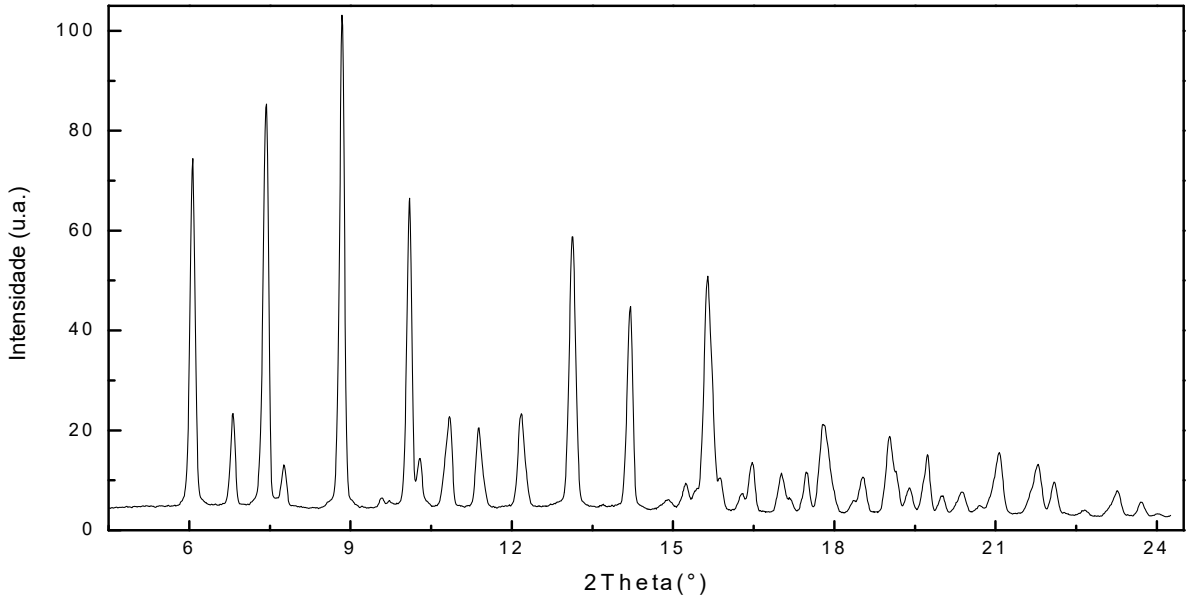


Figura 50. Difratograma da cefadroxila anidra.

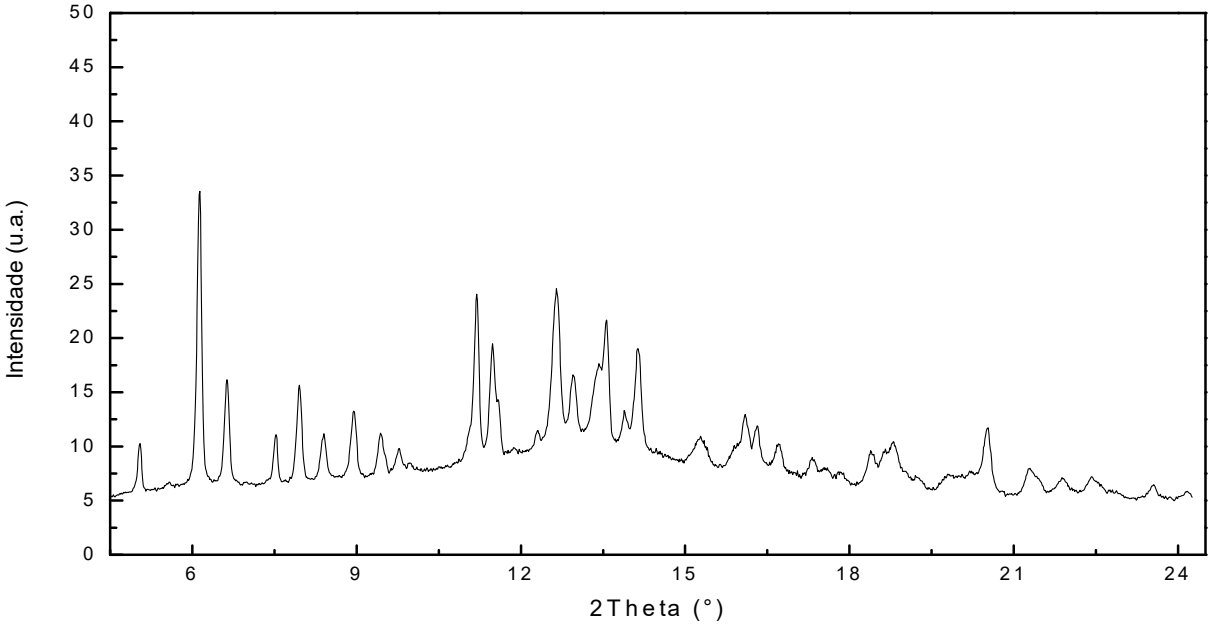


Figura 51. Difratograma da amostra 1 obtida a partir da cefadroxila anidra.

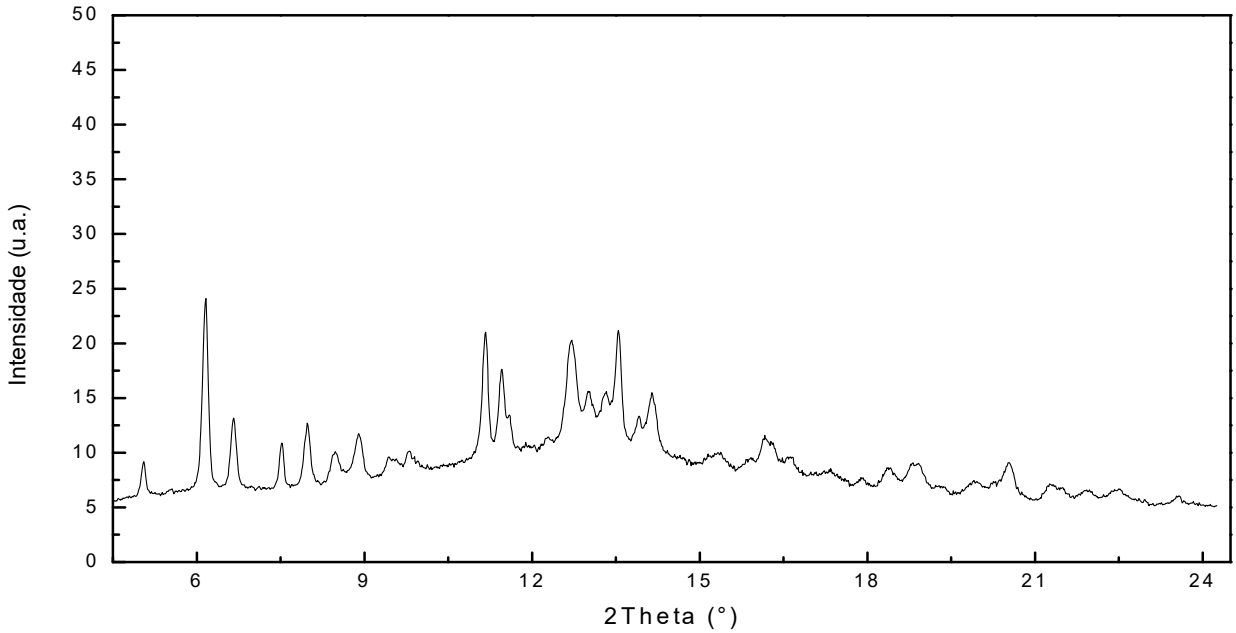


Figura 52. Difratograma da amostra 8 obtida a partir da cefadroxila anidra.

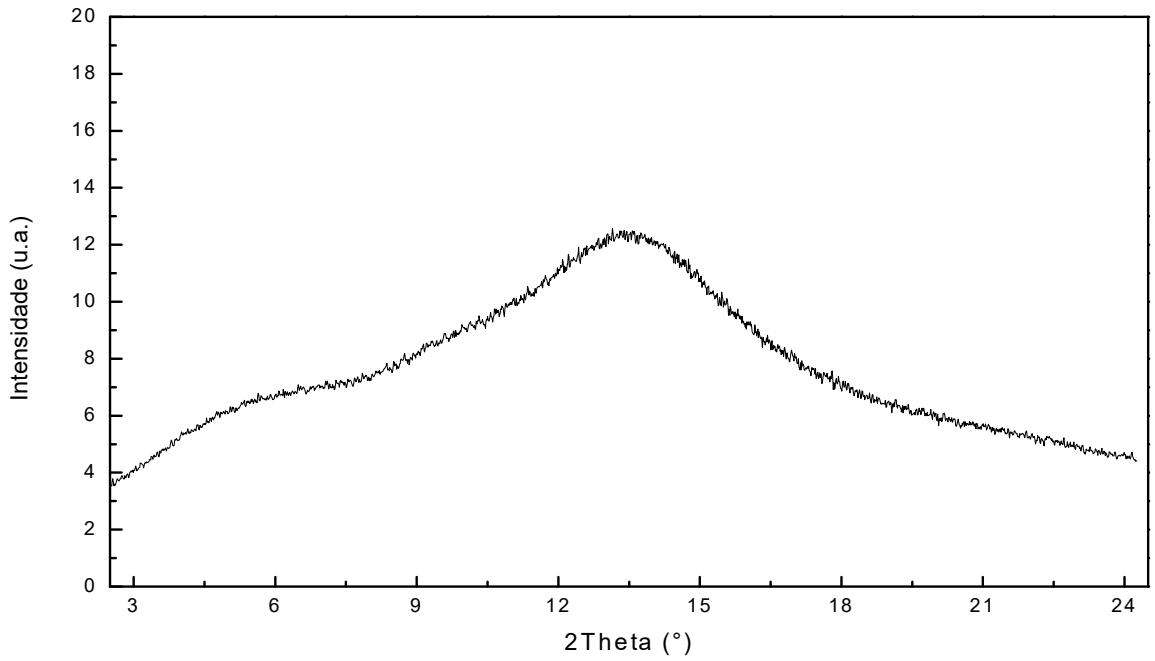


Figura 53. Difratograma da amostra 15 obtida a partir da cefadroxila anidra.

De acordo com os difratogramas, foi possível visualizar que as amostras 1, 8 e 15, obtidas a partir da cefadroxila anidra, apresentaram-se diferentes entre si e diferentes da cefadroxila anidra, o que corrobora com os resultados obtidos pelas outras técnicas.

O difratograma da amostra 15 apresentou como uma substância amorfa, sendo também diferente das demais formas. Este resultado vai ao encontro do teste de dissolução intrínseca, onde a amostra 15 apresentou a maior velocidade de dissolução quando comparada às demais amostras.

As amostras 1 e 8 mostraram ser muito semelhantes, porém apresentaram diferenças nos picos entre os ângulos de 16-18 θ, o que confirma não serem a mesma forma. Esta diferença pode ser vista na Figura 54.

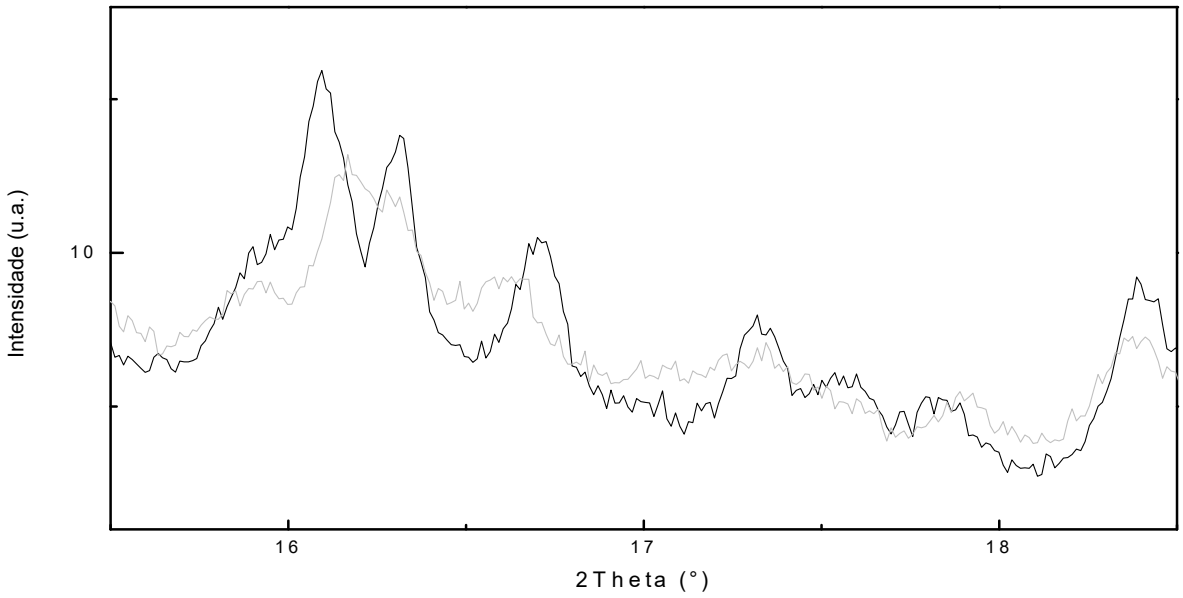


Figura 54. Difratogramas sobrepostos das amostras 1 (preto) e 8 (cinza) obtidas a partir da cefadroxila anidra.

Na amostra 1 é possível visualizar a presença de dois picos presentes nos ângulos próximos de 16,5 θ, os quais não são visualizados na amostra 8. A semelhança entre estes difratogramas pode ter sido provinda do método de obtenção das amostras, em que a cefadroxila anidra foi totalmente solubilizada em metanol para ambas as amostras e seca em temperaturas de 25°C e de 60°C para as amostras 1 e 8, respectivamente.

6.3.3.8. Análise conclusiva sobre a triagem para modelo de estudo de polimorfos

O estudo de polimorfismo da cefadroxila estabeleceu um modelo de triagem rápido, o qual permitiu selecionar as amostras que se apresentaram diferentes entre si e diferentes da substância anidra em um momento inicial. Esta aplicação não elimina o fato das amostras que foram desconsideradas nas análises iniciais da triagem não serem

diferentes também das formas polimórficas encontradas, porém, como o estudo se baseou num período curto de tempo, foi importante seguir um modelo que considerasse apenas as formas que se mostraram diferentes em uma fase inicial da pesquisa, permitindo ao mesmo tempo executar todas as técnicas de caracterização de sólidos.

Assim, das dezoito diferentes amostras obtidas através dos métodos seguidos na triagem, foram selecionadas quatro formas diferentes, nomeadas como Forma I para amostra 1, Forma II, para amostra 8; Hidrato para amostra 7 e Amorfa para amostra 15. A forma amorfa se destaca entre as outras, pois apresenta maior velocidade de dissolução que a forma comercial. Tal característica é importante do ponto de vista farmacológico, uma vez que formas com alta velocidade de dissolução possuem maior biodisponibilidade.

Além disso, todas as formas obtidas foram termicamente menos estáveis que a cefadroxila anidra e monoidratada. Apesar deste estudo ter sido direcionado para a cefadroxila, é importante enfatizar que este modelo de triagem de estudos que envolvem os métodos de obtenção de polimorfos, bem como sua completa caracterização, em um curto período de tempo, pode ser inserido na área industrial de pesquisa e desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos, quando se pretende descobrir novos polimorfos para os fármacos, além do fato de poder trazer novas alternativas de pesquisas que relacionam a cefadroxila.

6.3.4. Aplicação das formas polimórficas da cefadroxila no ensaio microbiológico por turbidimetria

As formas obtidas e caracterizadas no estudo foram aplicadas ao ensaio microbiológico turbidimétrico validado descrito no item 5.2.4, deste trabalho, a fim de observar se as amostras poderiam apresentar atividade bacteriana, bem como qual seria o comportamento desta atividade quanto à sua potência farmacológica frente ao micro-organismo teste quando comparada à forma comercializada monoidratada.

As potências verificadas das formas obtidas a partir da cefadroxila anidra estão expressas na Tabela 48, juntamente com a potência verificada da cefadroxila monoidratada cápsulas contra *Staphylococcus aureus*.

Tabela 48. Porcentagens determinadas para a cefadroxila monoidratada cápsulas e formas obtidas a partir da cefadroxila anidra.

Amostras	Potência antimicrobiana	Perda da potência em relação à CFD-M cápsulas
cefadroxila monoidratada cápsulas	100,31 %	0 %
Forma I	67,01 %	33,20 %
Hidrato	84,39 %	15,87 %
Forma II	57,73 %	42,45 %
Amorfo	86,09 %	14,18 %

Os resultados indicaram que todas as formas tiveram atividade bacteriana, porém indicaram também que a atividade foi inferior à atividade antimicrobiana do produto acabado na sua forma monoidratada. As amostras hidratada e amorfa apresentaram atividade antimicrobiana muito próximas mesmo tendo sido obtidas por métodos bastante distintos.

A forma hidratada foi obtida através da solubilização completa do fármaco em água e seca sob repouso em temperatura de 25°C (em béquer sem tampa), e a forma amorfa foi obtida pela solubilização completa do fármaco em metanol e etanol (50:50 v/v) e seca em rotaevaporador em temperatura de 50°C.

A potência perdida para as amostras hidratada e amorfa pode ser justificada pelo fato da secagem da forma hidratada ter sido realizada em meio ambiente e sem proteção contra a luz. Devido ao frasco não estar lacrado, a amostra também pode ter apresentado impurezas desconhecidas que comprometeram a estabilidade da amostra. Quanto à forma amorfa, a presença de solventes pode ter prejudicado a atividade do fármaco, afetando também sua estabilidade.

As formas I e II mostraram a potência diminuída em relação às formas hidratada e amorfa. Os métodos de obtenção destas duas formas foram realizados somente em metanol, uma com secagem em temperatura de 25°C e outra em secagem em estufa à 60°C. Este resultado indica que a presença de solvente, a alta temperatura e a secagem do fármaco em luz podem comprometer a estabilidade do fármaco.

Alguns estudos encontrados na literatura (CIELECKA-PIONTEK et al., 2011; ROCA et al., 2011; SALOIS et al., 2015; ZALEWSKI et al., 2015) relatam que os β-lactâmicos são fármacos que apresentam perda de estabilidade química em presença de altas temperaturas, condições extremas de pH e presença de solventes. Este fato permite

constatar que a ocorrência da perda da atividade antimicrobiana pode ter ocorrido através da presença desses interferentes nos processos de obtenção das formas.

Embora os valores tenham sido inferiores, é importante destacar que apesar de identificarmos estes fatores como sendo responsáveis pela perda da atividade, eles não foram estudados separadamente, podendo ser uma alternativa de trabalhos futuros que possam ser desenvolvidos para melhoria da atividade frente ao micro-organismo testado e frente a outros micro-organismos.

7. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos e validados quatro novos métodos para a identificação e quantificação da cefadroxila monoidratada em cápsulas, por espectrofotometria na região do infravermelho médio, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do visível e ensaio microbiológico por turbidimetria. Todos os métodos apresentaram contribuição à química verde por apresentarem tempo de análise reduzido, utilização mínima ou zero de solventes orgânicos com mínima geração de resíduos, além de apresentarem ótima sensibilidade e precisão.

Estatisticamente, os métodos desenvolvidos apresentaram resultados semelhantes, relacionando ao mesmo tempo que podem ser intercambiáveis para as análises do controle de qualidade para a determinação de cefadroxila.

No estudo de polimorfismo, a triagem para o processo de caracterização de compostos sólidos mostrou ser rápida e ao mesmo tempo permitiu caracterizar além das formas anidra, hemi-hidratada e monoidratada de cefadroxila outras quatro formas obtidas no estudo, sendo que a considerada amorfa apresentou atividade antimicrobiana contra o micro-organismo testado e alta velocidade de dissolução.

8. REFERÊNCIAS

AHFS. Drug information. Bethesda: ASHP, 2014.

ALI, S. M.; ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Spectroscopic methods for analysis of cephalosporins in pharmaceutical formulations. *World Journal Analytical Chemistry,* v. 3, p. 21-32, 2015.

ALY, F. A.; WALASH, M. I.; BELAL, F. Spectrophotometric determination of cefadroxil and metyrosine in dosage forms. *Analytical Letters*, v. 27, n. 14, p. 2677-2687, 1994.

AMBARWATI, W.; SETIAWATY, V.; WIBOWO, A. Antibiotics used for upper respiratory tract infection: a case study at a primary health center, Bogor Indonesia. *Global Medical & Health Communication*, v. 6, n. 3, p. 226-232, 2018.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*, New York: Oxford University Press, 2000.

ANDRASI, M.; BUGLYO, P.; ZEKANY, L.; GASPAR, A. A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 1040–1047, 2007.

ANJUM, A.; SHETTY, S. K. A.; AHMED, M.; SRIDHAR, B. K.; VIJAYA, K. M. L. Development and validation of RP-HPLC method for the quantitative estimation of cefadroxil monohydrate in bulk and pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Chemical Sciences*, v. 10, n. 1, p. 150-158, 2012.

ANTONIO, S. G. *Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos*. [Tese]. Repositório Institucional UNESP –Araraquara-SP, 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis.* 17th. ed. Gaithesburg: AOAC, v. 1, 2002.

ARAUJO, G. L. B.; PITALUGA, J. R. A.; ANTONIO, S. G.; SANTOS, C. O. P.; MATOS, J. R. Polimorfismo na produção de medicamentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2012.

ARAÚJO, S.; SILVA, I.; TACÃO, M.; ALVES, A.; HENRIQUES, I. Resistência bacteriana a antibióticos em vegetais e águas de irrigação: um problema de saúde pública. *CAPTAR Ciência e Ambiente Para Todos*, v. 6, n. 1, p. 1-3, 2016.

ARBIOL, J.; RUIZ, A.; CIRERA, A.; PEIRO, F.; CORNET, A.; MORANTE, J. R.; CASANOVE, M. J. High resolution electron microscopy analysis of Pt-nanoparticles embedded on crystalline TiO_2. *Microscopy of Semiconducting Materials*, p. 69-72, 2018.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, M.; GUARDIA, M. Green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 1380, p. 497-511, 2008.

ASBEL, L. E.; LEVISON M. E. Cephalosporins, carbapenems and monobactams. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 14, n. 2, p. 435-447, 2000.

BABU, N.J.; NANGIA, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Crystal Growth & Design*, v. 11, p. 2662-2679, 2011.

BAUMHARDT NETO, R.; CANEVALORO Jr., S. V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004.

BELENGUER, A. M.; LAMPRONTI, G. I.; CRUZ-CABEZA, A. J.; HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. Solvation and surface effects on polymorph stabilities at the nanoscale. *Chemical Science*, v. 7, n. 11, p. 6617-6627, 2016.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BERNSTEIN, J.; DAVEY, R. J.; HENCK, J. O. Concomitant polymorphs. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, n. 23, p. 3440-3461, 1999.

BISOYI, H. K.; LI, Q. Light-driven liquid crystalline materials: from photo-induced phase transitions and property modulations to applications. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 24, p. 15089-15166, 2016.

BLANDIZZI, C.; VISCOMI, G. C.; SCARPIGNATO, C. Impact of crystal polymorphism on the systemic bioavailability of rifaximin, an antibiotic acting locally in the gastrointestinal tract, in healthy volunteers. *Drug Design, Development and Therapy,* v. 9, p. 1-11, 2015.

BONFILIO, R.; PIRES, S. A.; FERREIRA, L. M. B.; ALMEIDA, A. E.; DORIGUETTO, A. C.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. A discriminating dissolution method for glimepiride polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, n. 2, p. 794-804, 2012.

BONFILIO, R.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review. *Word Scientific and Engineering Academy and Society*, v. 7, n. 4, p. 316-338, 2010.

BOUZARD, D.; WEBER, F. A.; STEMER, J. Cefadroxil Monohydrate. United States Patent N. 4,504,657. 1985.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 2012.

BPR. GUIA DE REMÉDIOS. 13. ed. São Paulo: Escala, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Antimicrobianos – Bases Teóricas e uso Clínico.* Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos.htm>. Acesso em: 6 mar. 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Antimicrobianos – Bases Teóricas e uso Clínico.* Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/carbapenens.htm>. Acesso em: 6 mar. 2019b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Antimicrobianos – Bases Teóricas e uso Clínico.* Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/monobactans.htm>. Acesso em: 6 mar. 2019c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Antimicrobianos – Bases Teóricas e uso Clínico.* Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cefalosporinas.htm>. Acesso em: 7 mar. 2019d.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Lista de medicamentos de referência.* Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/4412457/Lista+A+15-02-2019.pdf/48624668-bcce-42a0-a1c3-ebf1570360ae.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2019e.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Lista de medicamentos genéricos*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/352400/1.1+Gen%C3%A9ricos+registrados+-+por+nome+do+gen%C3%A9rico+31-03-2017.pdf/9e4ce425-7915-4cc1-b870-05ee305c1a8f>. Acesso em: 7 mar. 2019f.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica n° 2 de 2017. *Registro de medicamentos novos, genéricos e similares contendo solvatos e cocristais como insumo farmacêutico ativo.* Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349757/NOTA+T%C3%89CNICA+02+2017+-+Registro+de+medicamentos+novos%2C+gen%C3%A9ricos+e+similares+contendo+solvatos+e+cocristais+como+insumo+farmac%C3%AAutico+ativo/0dcff85e-5ce9-4639-b312-3d36d5425237>. Acesso em: 30 nov. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. *Guia para validação de métodos analíticos e dá outras providências.* Diário Oficial da União. Brasília, 25 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 73, de 7 de abril de 2016. *Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 de abril de 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. *Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 de abril de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 57, de 17 de novembro de 2009. *Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de novembro de 2009.

BRITTAIN, H. G. Cocrystal systems of pharmaceutical interest: 2010. *Crystal Growth & Design,* v. 12, p. 1046-1054, 2012.

BRITTAIN, H. G. *Polymorphism in pharmaceutical solids*. 2.ed. New York: Informa Healthcare, 2009.

BRITTAIN, H. G. Fluorescence studies of the dehydration of cefadroxil monohydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 10, p. 2757-2764, 2007.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E.W. *Handbook of near-infrared analysis*. 3.ed. Boca Raton: CRC, 2008.

CANEVAROLO, S.V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2003.

CASS, Q. B.; DEGANI, L. G. *Development of methods by HPLC: fundamentals, strategy and validation*. São Carlos: EDUFSCar, 2002.

CHAVES, A. S. *Física*. 4. ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2001.

CHEN, X.; YE, N. A graphene oxide surface–molecularly imprinted polymer as a dispersive solid-phase extraction adsorbent for the determination of cefadroxil in water samples. *RSC Advances*, v. 7, p. 34077-34085, 2017.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis pharmaceutical polymorphs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 5, n. 4, p. 618-644, 2011.

CIELECKA-PIONTEK, J.; MICHALSKA, K.; ZALEWSKI, P.; JELINSKA, A. Recent advances in stability studies of carbapenems. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 7, n. 4, p. 213-227, 2011.

CLIMENI, B. S. O.; DELLALIBERA, F. L.; MONTEIRO, M. V.; BAZAN, C. T. Cefalosporinas: Sua origem, uso e função em animais de grande e pequeno porte. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 12, p. 1-8, 2009.

CONSORTTI, L. P.; SALGADO, H. R. N. A critical review of analytical methods for quantification of cefotaxime. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 47, n. 4, p. 359-371, 2017.

CORRÊA, J. C. R.; PERISSINATO, A. G.; SERRA, C. H. R.; TREVISAN, M. G.; SALGADO, H. R. N. Polymorphic stability of darunavir and its formulation. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*, v. 123, n. 3, p. 2185-2190, 2016.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. A platform for designing quantitative infrared spectrophotometric method for drugs and pharmaceuticals analysis: a rediscover for an ecological and safer technique in the routine quality control laboratories. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3, n.6, p.2056-2059, 2014.

CROSBY, P. B. *Qualidade é investimento*. 7. ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 1999.

CRUZ-CABEZA, A. J.; REUTZEL-EDENS, S. M.; BERNSTEIN, J. Facts and fictions about polymorphism. *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 23, p. 8619-8635, 2015.

CUFFINI, S. L.; PITALUGA, J. R. A; TOMBARI, D. Polimorfismo em fármacos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CURBETE, M. M.; SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay for quantification of fusidic acid in a dermatological cream. *Talanta*, v. 153, p. 51-56, 2016.

DAVIS, K. M.; MIURA, K.; SUGIMOTO, N.; HIRAO, K. Writing waveguides in glass with a femtosecond laser. *Optics Letters*, v. 21, n. 21, p. 1729-1731, 1996.

DEF. DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. 44. ed. São Paulo: Epuc, 2016.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M. C. W. *Farmacologia integrada*. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

DENGALE, S. J.; GROHGANZ, H.; RADES, T.; LÖBMANN, K. Recent advances in co-amorphous drug formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 100, p. 116-125, 2016.

DERAYEA, S. M.; AHMED, H. M.; ABDELMAGEED, O. H.; HAREDY, A. M. New valid spectrofluorimetric method for determination of selected cephalosporins in different pharmaceutical formulations using safranin as fluorophore. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 153, p. 655-660, 2016.

DEVALIYA, R.; JAIN, U. K. Noval estimation of cefadroxil in tablet dosage forms by RP-HPLC. *Oriental Journal of Chemistry*, v. 25, n. 4, p.1053-1058, 2009.

DEWI, A. A. S. W. K.; PUSPITASARI, A. W. Evaluation of antibiotics utilization in acute respiratory infections patients based on ATC/DDD method at puskesmas pasar minggu 2016. *Advanced Science Letters*, v. 24, p. 6570-6572, 2018.

DEY, S.; KALYANI, K.; SAMYUKTHA, B.; SAHOO, S. K.; MOHAPATRA, S.; MURTHY, P. N.; KUMAR, D. Development and validation of a UV-Vis spectrophotometric method for the estimation and degradation monitoring of cefadroxil in bulk and pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Chemistry Research*, v.1, n. 1, p. 29-34, 2010.

DHOKA, M.; CHOPADE, S. Method development & comparative statistical evaluation of HPLC & HPTLC method for simultaneous estimation of cefadroxil monohydrate & ambroxol hydrochloride. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n. 2, p. 203-212, 2012.

DRUG BANK. Drug & Drug Target Database. *Cefadroxil*. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01140>. Acesso em: 7 nov. 2018.

DURÁN, N.; DURÁN, M.; TASIC, L.; MARCATO, P. D. Tecnologia de nanocristais em fármacos. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 151-159, 2010.

EL-GINDY, A.; EL-WALILY, A. F. M.; BEDAIR, M. F. First-derivative spectrophotometric and LC determination of cefuroxime and cefadroxil in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, p. 341-352, 2000.

EL-SHABOURY, S. R.; SALEH, G. A.; MOHAMED, F. A.; RAGEH, A. H. Analysis of cephalosporin antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* v. 45, p. 1- 19, 2007.

EL WALILY, A. F. M.; GAZY, A. A. K.; BELAL, S. F.; KHAMIS, E. F. Selective spectrofluorimetric determination of phenolic β-lactam antibiotics through the formation of their coumarin derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 20, n. 4, p. 643-653, 1999.

ESHRA, A. G.; HASSAN, E. M.; EL-WALITY, A. F. M. HPLC method of analysis of cefadroxil and its apllication in bioavailability studies. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 18, p.331-335, 1993.

ESPINO, M.; FERNÁNDEZ, M. A.; GOMEZ, F. J. V.; SILVA, M. F. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 76, p. 126-136, 2016.

EP. EUROPEAN Pharmacopoeia. 8th. ed. Council of Europe, 2013. v.2.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1089-1093, 2011.

FARMACOPEIA argentina. 7. ed. Farmacopea Nacional Argentina, 2003.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FARMACOPEIA portuguesa. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2007.

FAUDONE, S.N. *Estudio de las Propriedades del Estado Sólido de Fármacos Poco Solubles y su Impacto em la equivalencia in vitro*. [Tesis de Maestria]. Universidad Nacional de Córdoba, 2009.

FDA. Food and Drug Administration. *Draft Guidance on Cefadroxil; Cefadroxil Hemihydrate.* Sep. 2010. Disponível em:< https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM227415.pdf> Acesso em: 31 out. 2018.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: *Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals*. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research, 2016.

FDA. Food and Drug Administration. *Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemitry, Manufacturing, and Controls Information*. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research, 2007.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: *Analytical Procedures and Methods Validation.* Rockville: Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, 2000.

FDA. Food and Drug Administration. *Validation of Chromatographic Methods.* Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FEIGENBAUM, A.V. *Controle da qualidade total: gestão e sistemas*. São Paulo: Makron Books, 1994. v. 1.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO C. β-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 7-17, 2013.

FIOL, F. S. D.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

FITZER, E.; KOCHLING, K. H.; BOEHM, H. P.; MARSH, H. Recommended terminology for the description of carbon as a solid (IUPAC recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, p. 473–506, 2009.

GARCIA, P. C.; CRUZ, S. V.; MIRÓN, C. E. *Fundamentos de síntesis de fármacos.* Barcelona, España: Universitat Barcelona, 2005.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78-84, 2013.

GÁSPÁR, A.; ANDRÁSI, M.; KARDOS, S. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins. *Journal of Chromatography B*, v. 775, p. 239–246, 2002.

GHADI, R.; GHUGE, A.; GHUMRE, S.; WAGHMARE, N.; KADAM, V. J. Co-crystals: emerging approach in pharmaceutical design. *American Journal of Pharmaceutical Research*, v. 4, n. 7, p. 3881-3893, 2014.

GONG, L.; CHASE, D. B.; NODA, I.; LIU, J.; MARTIN, D. C.; NI, C.; RABOLT, J. F. Discovery of β-form crystal structure in electrospun poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] (PHBHx) nanofibers: from fiber mats to single fibers. *Macromolecules*, v. 48, n. 17, p. 6197-6205, 2015.

GONNADE, R. G.; SANGTANI, E. Polymorphs and cocrystals: A comparative analysis. *Journal of the Indian Institute of Science*, v. 97, n. 2, p. 193-226, 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAQANI, M.; ROGHANI-MAMAQANI, H.; SALAMI-KALAJAHI, M. Synthesis of dual-sensitive nanocrystalline cellulose-grafted block copolymers of N-isopropylacrylamide and acrylic acid by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Cellulose*, v. 24, n. 5, p. 2241-2254, 2017.

HALLEM, R. M.; SALEM, M. Y.; FATAHALLAH, F. A.; ABDELFATTAH, L. E. Quality in the pharmaceutical industry - A literature review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, p. 463-469, 2013.

HANCU, G.; SASEBEŞI, A.; RUSU, A.; KELEMEN, H.; CIURBA, A. Study of the electrophoretic behavior of cephalosporins by capillary zone electrophoresis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 5, n. 2, p. 223-229, 2015.

HANCU, G.; KELEMEN, H.; RUSU, A.; GYÉRESI, Á. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of cephalosporins. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 78, n. 9, p. 1413-1423, 2013.

HANSEN, D.; MOWEN, M.M. *Gestão de custos: contabilidade e controle*. 3. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2001.

HENDRIX, C.; ZHU, Y.; WIJSEN, C. ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Comparative study of liquid chromatographic methods for the determination of cefadroxil. *Journal of Chromatography*, v. 634, p. 257-261, 1993a.

HENDRIX, C.; WIJSEN, C.; YUN, L.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Column liquid chromatography of cefadroxil on poly (styrene-divinylbenzene). *Journal of Chromatography*, v. 628, p. 49-58, 1993b.

HENRIQUE, M. A.; NETO, W. P. F.; SILVÉRIO, H. A.; MARTINS, D. F.; GURGEL, L. V. A.; SILVA B., PASQUINI, D. Kinetic study of the thermal decomposition of cellulose nanocrystals with different polymorphs, cellulose I and II, extracted from different sources and using different types of acids. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 128-140, 2015.

HEWITT, W. *Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach*. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2004.

HILFIKERI, R. *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim: Wiley-Vch, 2006.

HOEFEL, H. H. K.; LAUTERT, L. Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: Responsabilidade da enfermagem. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 8, n. 3, p. 441-449, 2006.

ICH. International Conference on Harmonization. *Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances (including Decision Trees).* Disponível em: < https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf> Acesso em: 26 dez. 2018.

ICH. International Conference on Harmonization. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. Geneva, 2005.

ICH. International Conference on Harmonization. *Quality Guidelines. Specifications for new drug substances and products Q6A.* Geneva, 1999.

INMETRO. *Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.* Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Consulta Pública de Novembro de 2012. *Diretrizes de Exame de Pedidos de Patente na Área de Biotecnologia*. Disponível em: <file:///C:/Users/byade/Downloads/diretriz_biotecnologia_consulta_publica_30_11_12_original_0%20(1).pdf>. Acesso em: 06 dez. 2018.

INTERFARMA. Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. *Dados do setor – Mercado farmacêutico mundial*. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2018/dados_do_setor#mercado_farmaceutico_mundial >. Acesso em: 06 dez. 2018.

IONASHIRO, M. *Giolito Fundamentos de Termogravimetria a Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial*. São Paulo: Vésper, 2014.

ISO. International Standard Organization. Disponível em: http://www.iso.org/iso/home/about.htm. Acesso em: 30 dez. 2018.

IP. INDIAN Pharmacopeia. 5th. ed. Indian Pharmacopoeia Commission, 2007.

JACOB, W.; MöLLER, W. On the structure of thin hydrocarbon films. *Applied Physics Letters,* v. 63, n. 13, p. 1771-1773, 1993.

JAIN, M. S.; BAVASKAR, S. R.; BARHATE, S. D.; FEGADE, J. D. Simultaneous uv spectrophotometric methods for estimation of cefadroxil and probencid in tablet dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research,* v. 4, n. 1, p. 18-21, 2014.

JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. *Vogel: Quantitative chemical analysis.* 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Technical and Scientific Books, 1992.

JIM, H. E.; KIM, B.; KIM, Y. C.; CHO, K. H.; MAENG, H. J. Determination of cefadroxil in rat plasma and urine using LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic and urinary excretion studies. *Journal of Chromatography*, v. 948, p. 103-110, 2014.

JONES, R. N.; VARNAM, D. J. Antimicrobial activity of broad-spectrum agents tested against Gram-negative bacilli resistant to ceftazidime: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (North America, 2001). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 44, p. 379-382, 2002.

JP. JAPANESE Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011.

JURAN, J. M.; GRYNA, F. M. *Controle da qualidade:* conceitos, políticas e filosofia da qualidade. 4. ed. São Paulo: Makron, Mc Graw Hill, 1991.

KAMINSKI, J. J.; BODOR, N. Determination of penicillins and cephalosporins using 3-bromo-4, 4-dimethyl-2-oxazolidinone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 3, n. 2-3, p. 151-156, 1979.

KANO, E. N.; SERRA, C. H. R.; KOONO, E. E. M.; FAKUDA, K.; PORTA, V. An efficient HPLC-UV method for the quantitative determination of cefadroxil in human plasma and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 35, n. 13, p. 1871-1881, 2012.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KLUG, H.; LEROY, A. *X-Ray Diffraction Procedures*. New-York: John Wiley & Sons, 1974.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. *Physical Chemistry,* v. 3, n. 1, p. 1-6, 2013.

KOGAWA, A. C.; TOMITA, L. K.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of doxycycline

hyclate in tablets. *International Journal of Microbiology Research*, v. 4, p. 316-321, 2012.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

LA ROCA, M.F.; SOARES Sobrinho, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM Neto, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, p. 177-180, 2007.

LEHTO, V. P.; LAINE, E. Assessment of physical stability of different forms of cefadroxil at high humidities. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 163, p. 49-62, 1998.

LENZI, E. *Química Geral Experimental.* Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2004.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 47-60, 2000.

LI, L.; SALAMOŃCZYK, M.; SHADPOUR, S.; ZHU, C.; JÁKLI, A.; HEGMANN, T. An unusual type of polymorphism in a liquid crystal. *Nature Communications*, v. *9*, n. 1, p. 714, 2018.

LI, Y.; VANDERGHINSTE, D.; PECANAC, D.; SCHEPDAEL, A. V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of cefadroxil by micellar electrokinetic capillary chromatography: Development and validation. *Electrophoresis,* v. 19, p. 2890-2894, 1998.

LIAO, C. H.; SHENG, W. H.; WANG, J. T.; SUN, H. Y.; WANG, H. K.; HSUEH, P. R.; CHEN, Y. C.; CHANG, S. C. In vitro activities of 16 antimicrobial agents against clinical isolates of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in two regional hospitals in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 39, n. 1, p. 59-66, 2006.

LICHTENFELS, E.; LUCAS, M. L.; WEBSTER, R.; D'AZEVEDO, P. A. Profilaxia antimicrobiana em cirurgia vascular periférica: cefalosporina ainda é o padrão-ouro? *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 6, n. 4, p. 378-387, 2007.

LIMA, D. M. M.; SILVEIRA, C. C. F. O patenteamento de polimorfos na indústria farmacêutica e o acesso a medicamentos. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, v. 21, n. 4, p.1515-1536, 2011.

LINDGREN, K. Determination of cefadroxil in serum by high-performance liquid chromatography with cephradine as internal standard. *Journal of Chromatography*, v. 413, p. 347-350, 1987.

LIU, H.; YU, A.; LIU, F.; SHI, Y.; HAN, L.; CHEN, Y. Chiral separation of cefadroxil by capillary electrochromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1376–1379, 2006.

MACHADO, A. A. S. C. Da gênese ao ensino da Química Verde. *Química Nova*, v. 34, n. 3, p. 535-543, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock.* 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAO, C.; PINAL, R.; MORRIS, K. R. A quantitative model to evaluate solubility relationship of polymorphs from their thermal properties. *Pharmaceutical Research*, v. 22, n. 7, p. 1149-1157, 2005.

MARCO, B. A.; RECHELO, B. S.; TÓTOLI, E. G.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 27, p. 1-8, 2019.

MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Characteristics, properties and analytical methods of cefadroxil: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 47, n. 2, p. 93-98, 2017.

MARCO, B. A.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of an innovative method for the determination of cefadroxil monohydrate in capsules. *Physical Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 67-74, 2016.

MARCOLONGO, R. *Dissolução de Medicamentos: Fundamentos, Aplicações, Aspectos regulatórios e Perspectivas na Área Farmacêutica* [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo/USP; 2003.

MARÍN, R. Z.; REGATEIRO, A. A.; GUNDIÁN, J.; MANRESA, R.; SÁNCHEZ, J.; SIRGADO, M. Cefalosporinas. *ACTA Medica*, v. 8, n. 1, p. 40-47, 1998.

MARSILI, L. Solvate of Cefadroxil. United States Patent N. 4,962,195. 1990.

MARSILI, L. Substantially anhydrous crystalline cefadroxil and method for producing it. European Patent Specification N. 0295333B1. 1987.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, v. 36, n. 8, 1248-1255, 2013.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G.; DEMING, S. N.; MICHOOTTE, Y.; KAUFMAN, L. *Chemometrics: a textbook*. New York: Elsevier, 1986.

MCATEER, J. A.; HLLTKE, M. F.; SIIBER, B. M.; FAULKNER, R. D. Liquid chromatographic determination of five orally active cephalosporins - cefixime, cefaclor, cefadroxil, cephalexin, and cephradine in human serum. *Clinical Chemistry*, v. 33, n. 10, p.1788-1790, 1987.

MELLA, S. M.; ZEMELMAN, C. M.; BELLO, H. T.; DOMINGUEZ, M. Y.; GONZALEZ, G. R.; ZEMELMAN, Z. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista Chilena de Infectologia*, v. 18, n. 1, p. 7-19, 2001.

MISHRA, M. K.; DESIRAJU, G. R.; RAMAMURTY, U.; BOND, A. D. Studying microstructure in molecular crystals with nanoindentation: Intergrowth polymorphism in felodipine. *Angewandte Chemie*, v. 126, n. 48, p. 13318-13321, 2014.

MOHARA, M.; AIKO, K.; SHIMURA, K.; ONO, T. Quantitative analysis and inspection for pharmaceutical polymorphism with injection-seeded terahertz parametric generation technique. In: 2018 43rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz). IEEE, 2018.

MOHITE, P. B.; KHANAGE, S. G.; MALWADE, G. B. Development and evaluation of cefadroxyl monohydrate solid dispersion via solvent evaporation method: Investigating drug polymer miscibility with advanced characterization. *Analytical Chemistry Letters*, v. 7, n. 1, p. 109-119, 2017.

MOHITE, P. B.; KHANAGE, S. G.; PANDHARE, R. B. Preparation and characterization of cefadroxil monohydrate solid dispersion by using hydrophilic carrier gaur gum. *Journal of Science and Technology*, v. 4, p. 992-1002, 2016.

MORENO, A. H.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. *Physical Chemistry*, v.2, n.1, p.6-11, 2012.

MRESTANI, Y.; NEUBERTA, R.; MUNKB, A.; WIESEB, M. Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 803, p. 273–278, 1998.

MRESTANI, Y.; NEUBERTA, R. H. H.; HÄRTL, A.; WOHLRAB, J. Determination of cephalosporins in urine and bile by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 349, p. 207-213, 1997.

NAGARAJAN, J. S. K.; VIMAL, C. S.; GEORGE, R.; DUBALA, A. Simultaneous pharmacokinetic assessment of cefadroxil and clavulanic acid in human plasma by LC–MS and its application to bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical Analysis,* v.3, n. 4, p. 285-291, 2013.

NAKANO, R.; HARA, M.; ISHIGURO, H.; YAO, Y.; OCHIAI, T.; NAKATA, K.; MURAKAMI, T.; KAJIOKA, J.; KAYANO, S.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A.; KUBOTA, Y. Broad spectrum microbicidal activity of photocatalysis by TiO_2. *Catalysts*, v. 3, p. 310-323, 2013.

NAKANO, V.; NISHIYAMA, S. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. *Beta-lactamases: Sua importância na resistência bacteriana.* Departamento de Microbiologia- Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&catid=13%3Atemas-de-interesse&id=47%3Abeta-lactamases-sua-importancia-na-resistencia-bacteriana&lang=br>. Acesso em: 21 dez. 2018.

NARANG, A. S.; BODDU, S. H. S. *Excipient applications in formulation design and drug delivery*. Switzerland: Springer, 2015.

NAVEED, S.; ASHRAF, Z.; MUKHTAR, T. Assay of different brands of cefadroxil by using spectrophotometric method. *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences,* Indore, v. 3, n. 4, p. 12-14, 2014.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, p. 689-696, 2008.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistence in *Enterobacteriaceae*: here is the storm. *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, n. 5, p. 263-272, 2012.

NOVARETTI, M. C. Z.; AQUINO, S.; PISCOPO, M. R. Controle de vendas de antibióticos no brasil: análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. *Revista Acadêmica São Marcos*, v. 4, n. 2, p. 25-39, 2014.

NYGREN, O.; LINDAHL, R. Development of a method for screening spill and leakage of antibiotics on surfaces based on wipe sampling and HPLC-MS/MS analysis. *Journal of ASTM International,* v. 8, n. 6, p. 1-20, 2011.

OLIVEIRA, F. C.; SOUZA, A. T. P. C.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C.; RUBIM, J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 218-225, 2004.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

PARKKALI, S.; LEHTO, V. P.; LAINE, E. Applying image analysis in the observation of recrystallization of amorphous cefadroxil. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 5, n. 3, p. 433-438, 2000.

PATEL, N. J.; JOSHI, S. H. Analytical method development and validation for simultaneous estimation of cefadroxil and clavulanic acid in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, v. 3, n. 2, p. 264-278, 2014.

PATEL, S. A.; PATEL, N. J. Visible spectrophotometric method for estimation of cefadroxil in tablet dosage form. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 2, n. 9, p. 73-76, 2011.

PATEL, C.; PATEL, K.; SEM, D. J.; BADMANABAN, R.; PARIKH, A. Development and validation of spectrophotometric methods for the estimation of cefadroxil in tablet dosage forms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 2, n. 2, p. 163-167, 2010.

PATRICK, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 5th. ed. New York: Oxford University Press, 2010.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. *Introdução à espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEDROSO, T. M.; SALGADO, H. R. N. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium pharmaceutical dosage form by high performance liquid chromatography to be applied for quality control in pharmaceutical industry. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences,* v. 50, n. 1, p. 213-223, 2014.

PGIFARMA. *Mercado farmacêutico: Visão geral*. Noticia Home GD. Disponível em: <https://www.pgifarma.com.br/mercado-farmaceutico-visao-geral/>Acesso em: 6 dez. 2018.

PRADIP, D.; SANTOSH, J.; SUMIT, G.; LAXMI, J. Development and validation of uv spectrophotometric estimation of cefadroxil in bulk and tablet dosage form using area under curve method. *Indu American Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n. 2, p. 581-586, 2015.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado sólido na indústria farmacêutica: Uma breve revisão. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 2080-2112, 2015.

PROGENERICOS. Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos. *Genéricos em números – Mercado brasileiro*. Disponível em:http://www.progenericos.org.br/. Acesso em: 6 dez. 2018.

PROHENS, R.; PUIGJANER, C. Polimorfismo en la industria farmacéutica. *Él Farmacéutico*, n. 373, Universitat de Barcelona, 2007.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. *Cefadroxil*. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cefadroxil#section=Top>. Acesso em: 9 jan. 2019.

RAHIM, N.; NAQVI, S. B. S.; ALAM, M.; IQBAL, E.; BIBI, R. Validated high performance liquid chromatography method for analysis of cefadroxil monohydrate in human plasma. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* v. 13, n. 6, p. 975-979, 2014.

RAHIM, N.; NAQVI, S. B. S.; SHAKEEL, S.; IFFAT, W.; MUHAMMAD, N. Determination of cefadroxil in tablet/capsule formulations by a validated reverse phase high performance liquid chromatographic method. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 28, n. 4, p.1345-1349, 2015.

RAMBLA-ALEGRE, M.; MARTÍ-CENTELLES, R.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection. *Journal Chromatography A*, v. 1218, n. 30, p. 4972-4981, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Rang & Dale: Farmacologia*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAO, K. G.; SHANKAR, B. U.; PHANINDRA, B.; NAIK, M. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of cefadroxil monohydrate in bulk and its tablet dosage form. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research,* v. 4, n. 1, p. 71-74, 2014.

RAW, A. S.; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBRE JR, F. O.; YU, L. X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Advanced Drug Deliveries Amsterdam*, v. 56, n. 3, p. 397-414, 2004.

REILLY, A. M.; TKATCHENKO, A. Role of dispersion interactions in the polymorphism and entropic stabilization of the aspirin crystal. *Physical Review Letters*, v. 113, n. 5, p. 055701, 2014.

ROCA, M.; VILLEGAS, L.; KORTABITARTE, M. L.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Effect of heat treatments on stability of β-lactams in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 3, p. 1155-1164, 2011.

ROCHA, A. B.; KUMINEK, G.; MACHADO, T. C.; ROSA, J.; RAUBER, G. S.; BORBA, P. A.; CARDOSO, S. G. Cocristais: Uma estratégia promissora na área farmacêutica. *Química Nova*, v. 39, n. 9, p. 1112-1125, 2016.

ROCHA, F. R.; TEIXEIRA, L. S. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

ROSA, M. F.; VILHENA, R. O. Dissolução intrínseca: conceito e aplicações na indústria farmacêutica. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 9, n. 1, p. 49-61, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.; QUINN, M. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SALEH, G. A.; EL-SHABORURY, S. R.; MOHAMED, F. A.; RAGEH, A. H. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins using oxidized quercetin reagent. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 73, p. 946-954, 2009.

SALOIS, A.; PEREZ, I.; PALMA, E.; GOOLISH, E.; GRIKO, Y. Evaluation of the chemical integrity of beta-lactam antibiotics by iodine-based sssay. *Journal of Biosciences and Medicines*, v. 3, n. 11, p. 91-99, 2015.

SAMANIDOU, V. F.; HAPESHI, E. A.; PAPADOYANNIS, I. N. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids. *Journal of Chromatography*, v. 788, p. 147-158, 2003.

SAMANIDOU, V. F.; IOANNOU, A. S.; PAPADOYANNIS, I. N. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction—a comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. *Journal of Chromatography*, v. 809, p. 175-182, 2004.

SANTOS, O. M. M.; REIS, M. E. D.; JACON, J. T.; LINO, M. E. S.; SIMÕES, J. S.; DORIGUETTO, A. C. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 1, p. 1-24, 2014.

SCHMIDT, A. H.; STEINER, M. S. UPLC-MS/MS in support of cleaning validation studies - cephalosporin antibiotics production facility. *Git Laboratory Journal*, v. 19, 2012.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, p. 80-88, 2007.

SETHURAMAN, S.; RADHAKRISHNAN, K.; VENKATESWARLU, V.; SRAVANI, M.; RAMATHULASI, G.; BHANUTEJA, S. Estimation and degradation monitoring of cefadroxil in pharmaceutical dosage form by using UV-spectroscopy. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n. 1, p. 27-33, 2014.

SHANTIER, S. W.; GADKARIEM, E. A.; IBRAHIM, K. E.; EL-OBEID, A. Spectrophotometric determination of cefadroxil in bulk and dosage form using sodium hydroxide. *E-Journal of Chemistry*, v. 8, n. 3, p. 1314-1322, 2010.

SHARIF, S. I.; KHAN, U; ASHFAQ, M.; IQBAL, M. S.; AHMAD, S. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of potassium clavulanate and cefadroxil in synthetically prepared tablets. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 65, p. 1053-1058, 2010.

SINGHAL, D.; CURALOTO, W. Drug polymorphism and dosage from desing: a pratical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 3, p. 335-347, 2004.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. São Paulo: Bookman, 2001.

SILVA, L. M.; GAIÃO, C. K. T.; MELO, D. F.; SILVA, W. C.; OLIVEIRA, D. G.; WANDERLEY, D. M. S.; LIMA, R. S. C. Estudo de polimorfos e co-cristais no desenvolvimento de medicamentos: Uma revisão bibliográfica. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 13, n. 4, p. 67-73, 2018.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Stability assessment models for pharmaceuticals and medicines to pharmaceutical industries. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 30, n.2, p. 129-135, 2009.

SILVA, P. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SMITH, R. R.; SHAH, U. V.; PARAMBIL, J. V.; BURNETT, D. J.; THIELMANN, F.; HENG, J. Y. The effect of polymorphism on surface energetics of D-mannitol polymorphs. *The AAPS Journal*, v. 19, n. 1, p. 103-109, 2017.

SOLANGI, A. R.; MEMON, S. Q.; KHUHAWAR, M. Y.; BHANGER, M. I. Quantitative analysis of eight cephalosporin antibiotics in pharmaceutical products and urine. *ACTA Chromatographica*, v. 19, p. 81-96, 2007.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. *Organic Chemistry*. New York: Wiley, 2013.

SNIPPE, N.; MERBEL, N. C.; RUITER, F. P. M.; STCIJGER, O. M.; LIGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. Automated column liquid chromatographic determination of amoxicillin and cefadroxil in bovine serum and muscle tissue using on-line dialysis for sample preparation. *Journal of Chromatography*, v. 662, p. 61-70, 1994.

SNIDER, D. A.; ADDICKS, W.; OWENS, W. Polymorphism in generic drug product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 3, p. 391-395, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 3rd. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SPONG, B. R.; PRICEB, C. P.; JAYASANKARA, A.; MATZGERB, A. J.; HORNEDOA, N. R. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 56, p. 2041-274, 2004.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 27, p. 116-129, 2009.

TANJUNG, H. R.; NASUTION, E. S. The development of top 200 prescribed drugs in community pharmacies at medan city as a learning tools. *Development*, v. 10, n. 4, p. 174-176, 2017.

THAKURIA, R.; TAKUR, T. S. *Crystal polymorphism in pharmaceutical science*. 9th. ed. Texas: Elsevier, 2017.

THONGPOON, C.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S.; WHEATLEY, R. A.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of cefadroxil using potassium permanganate and formaldehyde system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, n. 2, p. 277-282, 2006.

TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. *Journal AOAC International*, v. 98, p. 1276-1285, 2015.

TÓTOLI, E. G; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution. *Analytical Methods*, v. 5, p. 5923-5928, 2013.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Physical Chemistry,* v. 2, n. 6, p. 103-108, 2012.

VIEIRA, D. C. M.; RICARTE, P. C.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of the quantitative analysis of cefuroxime sodium in powder for injection by infrared spectroscopy. *Advances in Analytical Chemistry*, v. 6, n. 2, p. 80-87, 2012.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 3-26, 2001.

VIRGEN, C. A.; BELUM, V. R.; KAMBOJ, M.; GOLDFARB, S. B.; BLINDER, V. S.; GUCALP, A.; LACOUTURE, M. E. The microbial flora of taxane therapy–associated nail disease in cancer patients, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 78, p.607-609, 2018.

WANG, H.; ZHOU, J. MS15-P22 The biclinic crystal system–a hidden system in crystallography. *Foundations of Crystallography*, v. 72, n. 271, 2016.

WANG, X.; WU, S.; DONG, W.; GONG, J. In situ monitoring of the solvent-mediated transformation of cefadroxil DMF solvate into monohydrate. *Organic Process Research & Development*, v. 17, n. 9, p. 1110-1116, 2013.

WENDLANDT, W.W. *Thermal Analysis*. New York: Wiley, 2003.

WILDNER, L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, B. S.; SENNA, S. G.; SILVA, R. M.; BAZZO, M. L. Micobactérias: Epidemiologia e diagnóstico. *Revista de Patologia Tropical*, v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.

WILLIAMS, J. D. β-lactamases and β-lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 12, p. 3-7, 1999.

WILSON, B. A.; SALYERS, A. A.; WHITT, D. D.; WINKLER, M. E. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. 3rd. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM), 2011.

WILSON, V.; LOU, X.; OSTERLING, D. J.; STOLARIK, D. F.; JENKINS, G.; GAO, W.; TAYLOR, L. S. Relationship between amorphous solid dispersion in vivo absorption and in vitro dissolution: phase behavior during dissolution, speciation, and membrane mass transport. *Journal of Controlled Release*, v. 292, p. 172-182, 2018.

WHO. World Health Organization. *Quality Assurance of Pharmaceuticals:* A compendium of guidelines and related materials. v. 2, Good Manufacturing Practices and Inspection. 2nd. ed. Geneva, 2007.

USP 37. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 37th. ed. Rockville: United States Convention, 2018.

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

YU, L. X.; LIONBERGER, R. A.; RAW, A. S.; D'COSTA, R.; WU, H.; HUSSAIN, A. S. Apllications of process analytical technology to crystallization processes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 3, p. 349-369, 2004a.

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIN, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, p. 221–227, 2004b.

ZALEWSKI, P.; SKIBIŃSKI, R.; TALACZYŃSKA, A.; PACZKOWSKA, M.; GARBACKI, P.; CIELECKA-PIONTEK, J. Stability studies of cefoselis sulfate in the solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 114, p. 222-226, 2015.

ZAYED, M. A.; ABDALLAH, S. M. Synthesis, characterization and electronic spectra of cefadroxil complexes of d-block elements. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 60, n. 10, p. 2215-2224, 2004.

ZEITLER, K.; SALVAS, B.; STEVENS, V.; BROWN, J. Aztreonam lysine for inhalation: New formulation of an old antibiotic. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 69, p. 107-115, 2012.

ZHANG, Q. G.; NI, K. Y.; LIN, Y. S.; WU, Z. J.; GUO, W. B. Studies on the simultaneous measurement of several cephalosporins by RP-HPLC (I). *Chinese Journal of Chromatography*, v. 17, n.6, p.518-521, 1999.

ZHOU, Y.; CHU, W.; LEI, M.; LI, J.; DU, W.; ZHAO, C. Application of a continuous intrinsic dissolution-permeation system for relative bioavailability estimation of polymorphic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 473, p. 250-258, 2014.

ZHOU, Y.; WANG, J.; XIAO, Y.; WANG, T.; HUANG, X. The effects of polymorphism on physicochemical properties and pharmacodynamics of solid drugs. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 21, p. 2375-2382, 2018.