

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

Avaliação da estabilidade pós-reconstituição de antibióticos carbapenêmicos:  
Desenvolvimento analítico, determinação de produtos de degradação e  
avaliação da toxicidade *in vitro*

FÁBIO DE SOUZA BARBOSA

PORTO ALEGRE, 2020



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

Avaliação da estabilidade pós-reconstituição de antibióticos carbapenêmicos:  
Desenvolvimento analítico, determinação de produtos de degradação e  
avaliação da toxicidade *in vitro*

Tese apresentada por **Fábio de Souza  
Barbosa** para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Porto Alegre, 2020

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.11.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Jacqueline Arguello da Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Nathalie Ribeiro Wingert

Universidade Federal da Bahia

Profa. Dr. Renata Vidor Contri

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Barbosa, Fábio de Souza

Avaliação da estabilidade pós-reconstituição de antibióticos carbapenêmicos: Desenvolvimento analítico, determinação de produtos de degradação e avaliação da toxicidade in vitro / Fábio de Souza Barbosa. -- 2020.

210 f.

Orientador: Andreas Sebastian Loureiro Mendez.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Estabilidade pós-reconstituição . 2. Antibióticos carbapenêmicos. 3. Desenvolvimento analítico . 4. Produtos de degradação . I. Mendez, Andreas Sebastian Loureiro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, meu pai Júlio Cesar, minha mãe Flávia Regina e a minha irmã Luciane pelo apoio durante toda minha trajetória acadêmica.

À Ana Paula Martini pelo apoio e companheirismo durante estes quatro anos.

Ao Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez pela amizade, orientação e incentivo em mais essa etapa da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, e aos técnicos e alunos da Central Analítica-UFCSPA onde fui muito bem recebido.

A todos os professores do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar-UFRGS), Cássia Garcia, Elfrides Schapoval, Martin Steppe, Nadia Volpato e Tércio Oppe.

Aos colegas do LCQFar pela convivência e amizade durante estes anos. Em especial ao Leonardo Pezzi pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. À técnica do laboratório Mariana Meurer e à farmacêutica Caroline Venturi. E às colegas Caren Gobetti, Joanna Manoel, Julia Sorrentino, Juliana Emanuelli, Manoelly Rocha, Nathalie Wingert. E aos demais colegas do LCQFar.

Ao Prof. Dr. Marcelo Arbo e ao Laboratório de toxicologia LATOX-UFRGS pela contribuição nos ensaios de citotoxicidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS.

À CAPES pelo apoio financeiro.





## RESUMO

Os derivados carbapenêmicos são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dotados de maior espectro de ação, atividade e resistência a enzimas  $\beta$ -lactamases, sendo importantes à terapêutica atual no tratamento de diversos tipos de infecções hospitalares. A reconhecida instabilidade química desta classe, em especial quando em solução, leva à necessidade de estudos analíticos aplicados à avaliação da sua estabilidade, com foco em impurezas e produtos de degradação. O presente trabalho objetiva a avaliação da estabilidade pós-reconstituição dos antibióticos imipenem, meropenem e doripenem, em condições de uso clínico, contemplando o monitoramento e a identificação dos produtos de degradação formados. Para a avaliação da estabilidade pós-reconstituição, amostras comerciais destes fármacos foram preparadas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e em solução de glicose 5%, ambos fluidos para infusão, na concentração indicada para uso (5 mg/mL), e armazenadas à temperatura ambiente e sob refrigeração por até 24 e 72 horas, respectivamente. Para o imipenem, as análises quantitativas foram realizadas por CLAE-DAD através de método previamente validado, e os produtos de degradação formados durante o período de armazenamento foram monitorados e identificados por ESI-Q-TOF. Quando armazenado à temperatura ambiente, o imipenem apresentou maior tendência de degradação nas amostras preparadas em solução de glicose 5 %, sendo observado decaimento de aproximadamente 7 % de seu teor inicial, em 4 horas. Para as amostras preparadas em soro fisiológico e armazenadas sob refrigeração, o fármaco manteve o teor acima de 90 % durante 12 horas. Foram detectados e identificados três produtos de degradação:  $m/z$  318,  $m/z$  599 e  $m/z$  658. Os mesmos provém da suscetibilidade química do anel  $\beta$ -lactâmico, de reação de dimerização, e da interação entre o fármaco e a cilastatina. Para o estudo com o meropenem, foi proposto um método de quantificação por ESI-Q-TOF, através da infusão direta das amostras. Os resultados de estabilidade demonstraram que o uso prolongado de infusões não é recomendado. O fármaco apresentou degradação de aproximadamente 10 % de seu teor inicial após 4 horas à temperatura ambiente, quando diluído em glicose 5%. Em soro fisiológico após 4 horas, o decaimento foi de 4 % de seu teor inicial. As

análises por ESI-Q-TOF demonstram a formação de dois produtos de degradação: um de  $m/z$  402, referente à hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, formado em ambas as condições, e outro de  $m/z$  564, formado apenas em solução glicosada, e possivelmente fruto da interação do fármaco com a glicose. Para o estudo com o doripenem, um método por LC-ESI-QTOF foi validado. O doripenem apresentou um perfil de degradação semelhante em ambas às condições testadas, sendo que, após 4 horas à temperatura ambiente, os teores residuais de doripenem foram de 96,74 % e 96,48 %, para as amostras reconstituídas em solução fisiológica e glicose 5 %, respectivamente. O método por LC-ESI-QTOF foi capaz de separar e detectar três produtos de degradação, um formado pela clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico, e dois pela dimerização do fármaco. A citotoxicidade das amostras degradadas de imipenem e meropenem foi avaliada através de ensaios de viabilidade celular, que demonstraram uma leve toxicidade das amostras, que já podem ser observadas após 4 horas de armazenamento a temperatura ambiente. No geral, os resultados obtidos neste trabalho ressaltam os cuidados a serem tomados durante o manuseio e a administração destes fármacos no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: imipenem, meropenem, doripenem, estabilidade pós-reconstituição, LC-MS/MS, produtos de degradação, citotoxicidade.

## ABSTRACT

### **Evaluation of stability after reconstitution of carbapenemic antibiotics: Analytical development, determination of degradation products and *in vitro* toxicity assessment**

Carbapenems are  $\beta$ -lactam antibiotics with broad-spectrum, activity and resistance to hydrolysis by  $\beta$ -lactamase enzymes, being essential for the treatment of several types of hospital infections. The recognized chemical instability of this class, especially when in solution, increases the need for analytical studies applied to the assessment of their stability, such as determination of the impurities profile and degradation products. The present study aims to evaluate the stability of imipenem, meropenem and doripenem after reconstitution, under conditions of clinical use, including the monitoring and identification of the degradation products formed. For evaluation of stability after reconstitution, commercial samples of these drugs were prepared in physiological saline solution (NaCl 0.9%) and in 5% glucose solution, both infusion fluids, in the recommended concentration for use (5 mg/mL), and stored at room temperature and under refrigeration. For imipenem, quantitative analyzes were performed by HPLC-DAD using a previously validated method, and the degradation products formed during the storage period were monitored and identified by ESI-Q-TOF. When stored at room temperature, the imipenem showed a higher degradation tendency in the samples prepared in 5% glucose solution, with decay of approximately 7% of its initial content in 4 hours. For samples prepared in saline and stored under refrigeration, the drug maintained the content above 90% for 12 hours. Based on  $m/z$  values of  $[M+H]^+$  ions and MS/MS data, three degradation products were identified:  $m/z$  318 (DP-1),  $m/z$  599 (DP-2) and  $m/z$  658 (DP-3). They are formed from hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring, dimerization reaction and interaction between the drug and cilastatin. For the study with meropenem, a quantification method was proposed by ESI-Q-TOF, through the direct infusion of the samples. The results have demonstrated that the prolonged use of infusions is not recommended. The drug degraded approximately 10% of its initial content after 4 hours at room temperature, when diluted in 5% glucose. In saline solution, after 4 hours the decay was 4% of its initial content. Analyzes by ESI-Q-TOF demonstrated the formation of two degradation products, one of  $m/z$  402, related to the hydrolysis

of the  $\beta$ -lactam ring, formed under both conditions, and another of  $m/z$  564, formed only in glycoside solution, and possibly resulting from interaction of the drug with glucose. For the study with doripenem, an LC-ESI-QTOF method was validated. Doripenem showed a similar degradation profile in both conditions tested, in a way that, after 4 hours at room temperature the residual content of doripenem were 96.74% and 96.48%, for reconstituted samples in saline and 5% glucose, respectively. The LC-ESI-QTOF method was able to separate and detect three degradation products, one formed by the cleavage of the  $\beta$ -lactam ring, and two by the dimerization of the drug. The cytotoxicity of the degraded samples of imipenem and meropenem was evaluated through cell viability tests, which demonstrated a slight toxicity of the samples, which can already be observed after 4 hours of storage. In general, the results obtained in this work emphasize the precautions to be taken during the handling and administration of these drugs in the hospital environment.

Keywords: imipenem, meropenem, doripenem, stability after reconstitution, LC-MS/MS, degradation products, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura molecular da penicilina (A), cefalosporina (B) e carbapenema (C). .....	39
Figura 3.2. Principais características estruturais das carbapenemas.....	40
Figura 3.3. Estrutura química das carbapenemas imipenem, meropenem e doripenem. ....	41
Figura 3.4. Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2015b).....	48
Figura 3.5. Representação gráfica dos diferentes perfis de degradação dependentes de pH (YOSHIOKA e STELLA, 2000).....	58
Figura 3.6. (A) Estabilidade do imipenem em soluções aquosas em diferentes valores de pH (MÉNDEZ et al., 1991); (B) Estabilidade do doripenem em soluções aquosas em diferentes valores de pH (CIELECKA-PIONTEK et al., 2011b).....	59
Figura 3.7. Principais produtos de degradação do imipenem, formados em solução fracamente ácidas (SMITH et al., 1990).....	60
Figura 3.8. Rota de degradação do imipenem em solução alcalina (SMITH et al., 1990). ....	60
Figura 3.9. Produtos de degradação do meropenem: (A) produto da degradação alcalina; (B) produto da degradação térmica (MENDEZ et al., 2008). ....	61
Figura 3.10. Rota de degradação térmica do meropenem (MENDEZ et al., 2008). ....	61
Figura 3.11. Proposta de mecanismo de polimerização para o meropenem (CAI e RU, 2005).....	62
Figura 3.12. Estruturas químicas propostas para os produtos de degradação obtidos após estresse térmico em amostras reconstituídas do doripenem (BARBOSA et al., 2017).....	63

Figura 3.13 Produto de degradação formado pela dimerização do doripenem (PSATHAS et al., 2008). .....	64
Figure 4.1. Chemical structure of imipenem.....	74
Figure 4.2. Representative chromatograms obtained from analysis of imipenem:cilastatin commercial sample. Detection at 300 nm (A); imipenem:cilastatin sample detected at 254 nm (B); imipenem reference standard detected at 300 nm (C); UV spectrum for imipenem and cilastatin obtained from DAD detector (D). All solutions were worked at 30 µg mL <sup>-1</sup> .....	81
Figure 4.3. Chromatograms obtained from HPLC-DAD analysis of imipenem sample after forced degradation. (A) alkaline hydrolysis (NaOH 0.01 mol L <sup>-1</sup> ; 5 min); (B) Acid hydrolysis (HCl 0.1 mol L <sup>-1</sup> ; 10 min); (C) Neutral hydrolysis (H <sub>2</sub> O; 6 hours, 35 °C); (D) Oxidative degradation (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%; 20 min); (E) Photolytic degradation (UV-C light; 5 h); (F) Humidity (75 % HR; 40 °C, 12 h); (G) Thermal degradation (60 °C; 10 days).....	82
Figure 4.4. Chromatograms obtained from HPLC-DAD analysis of imipenem after storage under clinical conditions. (A) Sample prepared on glucose 5 %, 24 hours; (B) Sample prepared on NaCl 0.9%, 24 hours; (C) Baseline of the gradient method, without sample.....	87
Figure 4.5. ESI-MS/MS spectra of [M+H] <sup>+</sup> ions from imipenem degraded samples: DP-1 at 10 eV (A); DP-2 at 30 eV (B).....	88
Figure 4.6. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated DP-1, identified from MS analysis of imipenem degraded samples.....	89
Figure 4.7. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated DP-2, identified from MS analysis of imipenem degraded samples.....	90
Figure 4.8. ESI-MS/MS spectra of [M+H] <sup>+</sup> ions from imipenem degraded samples: DP-3 at 10 eV (A); 20 eV (B); 30 eV (C). .....	91
Figure 4.9. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated DP-3, identified from MS analysis of imipenem degraded samples.....	92
Figure 5.1. Chemical structure of imipenem.....	104
Figure 5.2. Illustrative image of a plate with concentration inoculum 2%, containing three concentrations of imipenem standard (P) and commercial	

sample (powder for injection) (A): A1 and P1 for 0.5 µg/mL; A2 and P2 for 1.0 µg/mL; A3 and P3 for 2.0 µg/mL. Growth on antibiotic media number 11. ....	110
Figure 5.3. Standard curve correlating diameter of inhibition zone (mm) versus logarithmic of drug concentration (µg/mL), obtained from microbiological assay developed to quantitation of imipenem in powder for injection. ....	111
Figure 6.1. Chemical structure of meropenem. ....	126
Figure 6.2. Line spectra of meropenem obtained from analysis by ESI-Q-TOF: (A) sample prepared with physiological saline solution (NaCl 0.9%); (B) sample prepared with glucose 5%. ....	135
Figure 6.3. Proposition of degradation routes for meropenem when submitted to different stress conditions. R = N,N-dimethylpyrrolidinyl-2-carboxamide.....	136
Figure 6.4. (A) ESI-MS spectrum of [M+H] <sup>+</sup> referred to hydrolytic degradation of meropenem in neutral medium; (B) ESI-MS/MS spectrum of [M+H] <sup>+</sup> from degradation product <i>m/z</i> 402, CID at 15 eV. ....	137
Figure 6.5. Proposed chemical structure and fragmentation for degradation product DP-1 ( <i>m/z</i> 402), identified from MS/MS analysis of meropenem degraded samples, submitted to hydrolytic conditions. ....	137
Figure 6.6. (A) ESI-MS spectrum of [M+H] <sup>+</sup> from oxidative degradation of meropenem; (B) ESI-MS/MS spectrum of [M+H] <sup>+</sup> from degradation product <i>m/z</i> 390, CID at 10 eV.....	138
Figure 6.8. Line spectrum [M+H] <sup>+</sup> of meropenem after submission to high humidity conditions.....	139
Figure 6.9. Line spectrum [M+H] <sup>+</sup> of meropenem diluted on 0.9% NaCl for injection, stored during 24 hours at room temperature. Analysis done by direct infusion ESI-Q-TOF.....	142
Figure 6.10. Line spectrum [M+H] <sup>+</sup> of meropenem diluted on 5 % glucose for injection, stored during 24 hours at room temperature. Analysis done by direct infusion ESI-Q-TOF.....	143
Figure 6.11. Proposed chemical structure and decomposition route referred to degradation product <i>m/z</i> 564 detected on the samples reconstituted with	

glucose 5%. Identification performed through results from direct infusion ESI-Q-TOF .....	143
Figure 6.12. ESI-MS/MS spectra $[M+H]^+$ obtained from the signal of degradation product of meropenem ( $m/z$ 564). (A) CID at 5 eV; (B) CID at 15 eV.....	144
Figure 6.13. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated degradation product $m/z$ 564, identified from MS/MS analysis of meropenem degraded samples.....	145
Figure 7.1. Chemical structure of doripenem.....	156
Figure 7.2. Total ion Chromatograms obtained from LC-ESI-QTOF analysis of doripenem sample after forced degradation. (A) neutral hydrolysis (H <sub>2</sub> O; 8 h, 40°C) (B) acid hydrolysis (HCl 0.1 mol L <sup>-1</sup> ; 35 min); (C) Alkaline hydrolysis (NaOH 0.05 mol L <sup>-1</sup> ; 10 min); (D) oxidative degradation (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%; 40 min); (E) photolytic degradation (UV-C light; 1day); (F) humidity (75% HR; 40°C, 12 h); and (G) thermal degradation (70°C; 6 days). .....	164
Figure 7.3. Proposition of degradation products obtained from degradation of doripenem when submitted to different stress conditions.....	165
Figure 7.4. ESI-QTOF spectrum of $[M+H]^+$ ions of doripenem degradation products. (A) DP-439 at 5 eV; (B) DP-437 at 10 eV; (C) DP-427 at 10 eV; (D) DP-411 at 10 eV.....	168
Figure 7.5. Total ion chromatograms obtained from LC-ESI-QTOF analysis of doripenem after reconstitution and stored for 24 hours at room temperature. (a) Sample reconstituted in 0.9% sodium chloride (b) Sample reconstituted in 5% glucose.....	170
Figura 8.1. Ensaios de viabilidade celular por de redução de MTT e incorporação de vermelho neutro para amostras degradadas de imipenem. (A) Amostras preparadas em solução de glicose 5 %. (B) Amostras preparadas em solução fisiológica. Concentração de imipenem no tempo zero = 75 µg/mL. (n = 3; * = p < 0,05; ** = p < 0,01).....	182
Figura 8.2. Ensaios de viabilidade celular por de redução de MTT e incorporação de vermelho neutro para amostras degradadas de meropenem. (A) Amostras preparadas em solução de glicose 5 %. (B) Amostras preparadas	



em solução fisiológica. Concentração de meropenem no tempo zero = 150  $\mu\text{g/mL}$ . ( $n = 3$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ). As amostras marcadas com “#” apresentaram diferença significativa em relação ao T0 (# =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ ). ..... 184



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Parâmetros farmacocinéticos para as carbepenamas imipenem, meropenem e doripenem (adaptado de MARTÍNEZ et al., 2010). .....	41
Tabela 3.2. Limites de qualificação para presença de produtos de degradação (adaptado de Brasil 2015a). .....	51
Tabela 3.3. Estudos de estabilidade físico-química em conjunto com a toxicidade de impurezas e produtos de degradação. ....	53
Tabela 3.4. Parâmetros cinéticos obtidos na degradação térmica do imipenem, meropenem e doripenem, de acordo com dados da literatura. ....	57
Tabela 3.5. Tempos de armazenamento dos antibióticos carbapenêmicos após reconstituição em fluido de infusão, conforme orientações contidas nas suas bulas. (JANSSEN PHARMACEUTICALS, 2009; MERCK, 2013; ASTRAZENECA, 2015; BIOCHIMICO, 2015). ....	65
Table 4.1. Factors and levels studied in the robustness test applied to development of quantitative HPLC-DAD for imipenem.....	78
Table 4.2. Plackett–Burman design to determine the robustness of the analytical HPLC-DAD method for imipenem quantitation. ....	79
Table 4.3. Analytical results obtained from linearity, precision and accuracy of the RP-HPLC method validated for determination of imipenem in drug product. ....	84
Table 4.4. Results of effects and <i>t</i> calculated for each factor during robustness testing of HPLC-DAD method for quantitation of imipenem in commercial sample.....	85
Table 4.5. Analytical results of residual drug concentration obtained from stability of imipenem in infusion solutions stored at room temperature and under refrigeration. ....	86
Table 4.6. High resolution mass spectrometry (HRMS) data from product ions of protonated imipenem degradation products. ....	93
Table 5.1. Analysis of variance (ANOVA) from quantitative results of linearity (third day) obtained during validation of a microbiological assay for imipenem in powder for injection. ....	112

Table 5.2. Results obtained from intermediate precision (inter-day) and repeatability (intra-day), worked during validation of a microbiological assay for quantitation of imipenem in drug formulation. Data expressed as potency (%) and RSD.....	113
Table 5.3. Mean values (%) of recovery test obtained from microbiological assay applied to quantitation of imipenem in powder for injection.....	114
Table 6.1. Analytical conditions used during the development of quantitative method for meropenem by ESI-Q-TOF. ....	129
Table 6.2. Analytical results obtained from linearity, precision and accuracy assayed during validation of ESI-Q-TOF method for quantitative determination of meropenem in infusion fluids.....	134
Table 6.3. Results obtained from the study of degradation products generated during forced degradation of meropenem. Analyses done by ESI-Q-TOF. ....	140
Table 6.4. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of meropenem in infusion solutions at 50 mg/mL, stored at room temperature. Analyses done by ESI-Q-TOF.....	140
Table 6.5. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of meropenem in infusion solutions at 5 mg/mL, stored at room temperature.....	141
Table 6.6. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of meropenem in infusion solutions at 5 mg/mL, stored under refrigeration. ....	142
Table 7.1. Source and tuning settings for LC-ESI-QTOF analysis. ....	159
Table 7.2. Stress conditions for degradation of doripenem during stability study and development of LC-ESI-QTOF method. ....	160
Table 7.3. Main products and degradation pathways generated by <i>in silico</i> prediction in the Zeneth software. ....	163
Table 7.4. QTOF mass data of protonated degradations products of doripenem .....	167

Table 7.5. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of doripenem after reconstitution at 5 mg mL <sup>-1</sup> , stored at room temperature and under refrigeration.....	169
Tabela 8.1. Teor residual das amostras de imipenem armazenadas a temperatura ambiente.....	181
Tabela 8.2. Teor residual das amostras de meropenem armazenadas a temperatura ambiente.....	183



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	31
2. OBJETIVOS .....	35
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	35
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	39
3.1. Carbapenemas .....	39
3.1.1. Farmacocinética e mecanismo de ação .....	41
3.1.2. Indicações clínicas e posologia .....	42
3.1.3. Características físico-químicas.....	43
3.1.3.1. Imipenem.....	43
3.1.3.2. Meropenem .....	43
3.1.3.3. Doripenem.....	44
3.2. Estudos de estabilidade .....	44
3.2.1. Impurezas e produtos de degradação .....	46
3.2.1.1. Determinação analítica de impurezas .....	48
3.2.1.2. Caracterização de impurezas e produtos de degradação .....	49
3.3. Toxicidade de impurezas e produtos de degradação .....	50
3.4. Estabilidade de carbapenemas .....	55
3.4.1 Cinética de degradação.....	56
3.4.2. Produtos de degradação .....	59
3.4.3. Estabilidade em fluidos de infusão .....	63
4. Capítulo I: Estabilidade pós-reconstituição do antibiótico imipenem, em condições de uso clínico: desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE, e monitoramento e identificação de produtos de degradação por ESI-Q-TOF. ....	69
4.1. Introdução .....	69

4.2. Artigo científico: Stability and degradation products of imipenem applying high-resolution mass spectrometry: An analytical study focused on solutions for infusion.....	71
4.2.1. Abstract .....	72
4.2.2. Introduction.....	74
4.2.3. Materials and methods .....	75
4.2.3.1. Chemicals and reagents.....	75
4.2.3.2. Instrumentation and analytical conditions.....	76
4.2.3.3. Standard and sample preparation .....	76
4.2.3.4. Stability-indicating method by RP-HPLC .....	76
4.2.3.5. Stability in clinical use.....	79
4.2.3.6. High-Resolution Mass Spectrometer Analysis.....	80
4.2.4. Results and discussion.....	80
4.2.4.1. Stability-indicating method by RP-HPLC .....	80
4.2.4.1.1. Specificity and forced degradation.....	81
4.2.4.1.2. Linearity, Precision and Accuracy.....	83
4.2.4.1.3. Robustness .....	85
4.2.4.2. Stability in clinical use and Degradation products by ESI-MS/MS .....	85
4.2.5. Conclusions.....	93
4.2.6. References .....	94
5. Capítulo II: Desenvolvimento de método microbiológico para quantificação do antibiótico imipenem em forma farmacêutica. ....	99
5.1. Introdução .....	99
5.2. Artigo científico: Microbiological assay for quantitative determination of imipenem in powder for injection.....	101
5.2.2. Introduction.....	104
5.2.3. Material and Methods.....	106
5.2.3.1. Chemicals.....	106



5.2.3.2. Microbiological assay .....	106
5.2.3.2.1. Microorganism and inoculum.....	106
5.2.3.2.2. Standard and sample solutions .....	106
5.2.3.2.3. Cylinder-plate assay .....	107
5.2.3.3. Preliminary assays .....	107
5.2.3.4. Method validation .....	108
5.2.3.4.1. Linearity and Precision (repeatability and intermediate precision)..	108
5.2.3.4.2. Accuracy.....	108
5.2.4. Results and Discussion .....	108
5.2.4.1. Methodology optimization.....	108
5.2.4.2. Method validation .....	110
5.2.5. Conclusions.....	114
5.2.6. References .....	115
6. Capítulo III: Desenvolvimento e validação de método analítico por ESI-Q-TOF através de infusão direta, e determinação da estabilidade pós-reconstituição do antibiótico meropenem. ....	121
6.1. Introdução .....	121
6.2. Artigo científico: Stability in clinical use and stress testing of meropenem antibiotic by direct infusion ESI-Q-TOF: Quantitative method and identification of degradation products.....	123
6.2.1. Abstract .....	125
6.2.2. Introduction.....	126
6.2.3. Materials and methods .....	127
6.2.3.1. Chemicals and reagents.....	127
6.2.3.2. Instrumentation.....	128
6.2.3.3. Standard and sample preparation .....	129
6.2.3.4. Validation of quantitative method by ESI-MS/MS .....	130
6.2.3.4.1. Linearity.....	130

6.2.3.4.2. Precision.....	130
6.2.3.4.3. Accuracy.....	130
6.2.3.4.4. Specificity and Stress testing.....	131
6.2.3.5. Stability after meropenem reconstitution .....	132
6.2.4. Results and Discussion .....	132
6.2.4.1. Quantitative method by ESI-MS/MS.....	132
6.2.4.1.1. Linearity, precision and accuracy .....	133
6.2.4.1.2. Specificity and stress testing .....	134
6.2.4.2. Stability after reconstitution .....	140
6.2.5. Conclusions.....	145
6.2.6. References .....	146
7. Capítulo IV: Desenvolvimento e validação de método por LC-ESI-QTOF para determinação da estabilidade pós-reconstituição do antibiótico doripenem...	151
7.1. Introdução .....	151
7.2. Artigo Científico: Stability of doripenem antibiotic by LC-ESI-QTOF and in silico of degradation pathways .....	153
7.2.1. Abstract .....	153
7.2.2. Introduction.....	156
7.2.3. Materials and methods .....	157
7.2.3.1. Chemicals and reagents.....	157
7.2.3.2. Quantitative method validation .....	158
7.2.3.3. Instrumentation and analytical conditions.....	158
7.2.3.4. Specificity and stress testing .....	158
7.2.3.5. Stability after reconstitution .....	160
7.2.4. Results and discussion.....	160
7.2.4.1. Quantitative method validation .....	160
7.2.4.1.1. Linearity, precision and accuracy .....	161
7.2.4.2. Stress testing and in silico prediction of degradation products .....	161

7.2.4.3. Stability after reconstitution .....	169
7.5. Conclusion.....	170
7.6. References .....	171
8. Capítulo V: Avaliação preliminar da citotoxicidade <i>in vitro</i> de amostras de meropenem e imipenem após reconstituição .....	175
8.1. Introdução .....	177
8.2. Materiais e métodos .....	178
8.2.1. Amostras de trabalho .....	178
8.2.2. Preparo das amostras .....	178
8.2.3. Linhagem celular .....	178
8.2.4. Ensaio de viabilidade celular .....	178
8.2.4.1. Ensaio de MTT .....	179
8.2.4.2. Ensaio de vermelho neutro.....	180
8.3. Resultados e discussão.....	180
8.4. Conclusão .....	184
9. DISCUSSÃO GERAL .....	187
10. CONCLUSÕES .....	195
11. REFERÊNCIAS.....	199



## LISTA DE ABREVIATÓES

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ATD – Administração total diária

AUC – Área sobre a curva

BP – British Pharmacopoeia

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

$C_{max}$  – Concentração plasmática máxima

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DHP-1 – Deidropeptidase I

ESI-Q-TOF – espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização por electrospray e analisadores de massas do tipo quadruplo e tempo de voo

ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

k – Constante de velocidade de reação

LIT – Linear Ion Trap

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

PBPs – Penicillin-binding proteins

PVC - polyvinyl chloride

QSAR - Quantitative structure activity relationship

$T > CIM$  – Tempo sobre concentração inibitória mínima

$T_{1/2}$  – Tempo de meia vida

TOF – Time of Flight

USP – United States Pharmacopoeia

Vd – Volume de distribuição









## 1. INTRODUÇÃO

As carbapenemas são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dotados de maior espectro de ação e resistência a enzimas  $\beta$ -lactamases, características que as tornam fundamentais na clínica hospitalar. Devido a sua elevada potência e amplo espectro de ação, as carbapenemas são indicadas para o tratamento de infecções nosocomiais de moderadas a graves, principalmente provocadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. O primeiro derivado carbapenêmico a ser introduzido na clínica foi o imipenem, aprovado para uso em 1985, inserindo-se como uma alternativa eficaz e segura para antibioticoterapia no âmbito hospitalar. A partir do imipenem, outras carbapenemas ganharam espaço no mercado, como o meropenem em 1996 e o doripenem em 2007 (BIRNBAUM et al., 1985; MARTÍNEZ et al., 2010).

Com o objetivo de otimizar sua eficácia clínica, estes antibióticos são administrados em bolsas de infusão, sendo que, dependendo do local e da natureza da infecção a ser tratada, o tempo de infusão pode variar de 30 minutos a 4 horas. Alguns artigos publicados na literatura científica relatam uma instabilidade destes fármacos quando em solução, principalmente devido à hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e tendência à formação de produtos diméricos (SMITH et al., 1990; CAI e RU, 2005; MENDEZ et al., 2008). Em estudo conduzido por Keel e colaboradores (2011), o imipenem e o meropenem, quando submetidos à temperatura de 35 °C, apresentaram um decaimento superior a 10 % de seu teor inicial nos tempos de 4 e 8 horas, respectivamente. Esta instabilidade em solução, associada a longos períodos de infusão, redobram os cuidados a serem tomados durante a reconstituição, diluição e infusão destes fármacos no ambiente hospitalar.

De acordo com Singh e colaboradores (2012) nas últimas décadas houve uma mudança radical na definição de qualidade de produtos farmacêuticos, onde o foco definitivamente passou da “pureza” para “impurezas” e “produtos de degradação” em fármacos e medicamentos. Segundo os autores, essa mudança se dá principalmente após a inserção da série de diretrizes Q3 do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for*

*Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), que dispõe sobre o controle destas substâncias.

A presença indesejada destas substâncias em produtos farmacêuticos, mesmo que em pequenas quantidades, pode influenciar na qualidade e segurança dos mesmos. Neste sentido, diferentes farmacopeias, tais como a *British Pharmacopoeia* (BP) e a *United States Pharmacopoeia* (USP), estão incorporando limites para os níveis permitidos de impurezas (ROY, 2002). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº 53, de 4 dezembro de 2015, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos (BRASIL, 2015).

Considerando a estabilidade em solução dos antibióticos carbapenêmicos e a crescente preocupação das agências regulatórias quanto à presença de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade dos antibióticos imipenem, meropenem e doripenem, principalmente em estudos pós-reconstituição e diluição dos mesmos, simulando condições de uso clínico, com o foco na identificação dos produtos de degradação formados. Também, tem foco na avaliação da segurança biológica de amostras degradadas através da aplicação de ensaios de toxicidade *in vitro*.

---

## 2. OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Constituem objetivos deste trabalho a avaliação da estabilidade dos antibióticos carbapenêmicos imipenem, meropenem e doripenem, pós-reconstituição, em condições de uso clínico, focando no monitoramento e na identificação dos produtos de degradação formados, bem como na avaliação da toxicidade *in vitro* destes compostos.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) para quantificação do imipenem em forma farmacêutica;
- ✓ Desenvolver método microbiológico para determinação da potência do antibiótico imipenem, através de ensaio microbiológico por difusão em ágar-cilindros em placas;
- ✓ Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade para análise do meropenem por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray, através de infusão direta;
- ✓ Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequencial para análise do doripenem;
- ✓ Estabelecer dados quantitativos de estabilidade dos antibióticos (imipenem, meropenem e doripenem) em condições de uso clínico, e monitorar a formação de produtos de degradação, propondo a estrutura química dos mesmos através da análise por espectrometria de massas de alta resolução;
- ✓ Avaliar a toxicidade *in vitro* das amostras submetidas à degradação pós-reconstituição.



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---





### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Carbapenemas

A descoberta da tienamicina, um antibiótico natural extraído a partir de cepas de *Streptomyces cattleya* em 1979, deu origem a uma nova e importante classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as carbapenemas. Com destacada importância clínica, as carbapenemas são estruturalmente semelhantes às cefalosporinas e penicilinas (Figura 3.1), das quais diferem por apresentar a substituição de um átomo de enxofre por um carbono na posição C1, e uma insaturação entre os carbonos C2 e C3 no anel de cinco membros (MOELLERING et al., 1989; KNAPP et al., 2001; MARTINEZ et al., 2010).

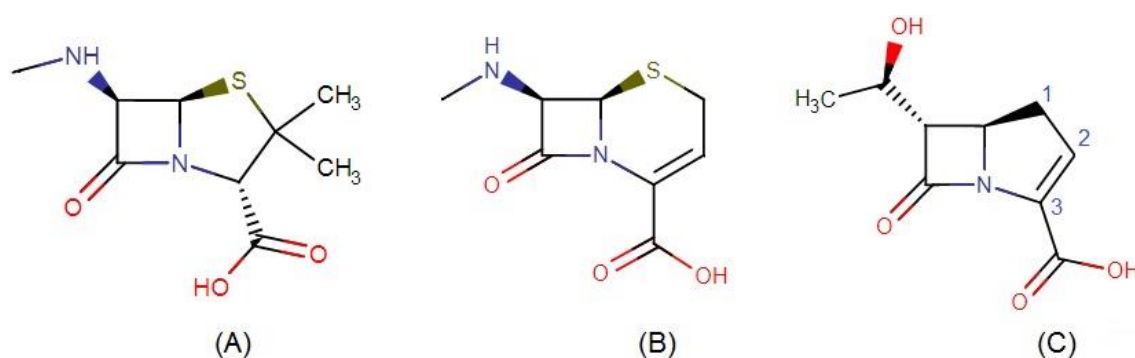


Figura 3.1. Estrutura molecular da penicilina (A), cefalosporina (B) e carbapenema (C).

A estrutura básica das carbapenemas é formada por um anel azabiciclo, obtido através da condensação de um anel  $\beta$ -lactâmico com um anel pirrolidínico de cinco membros. Este possui a substituição de um átomo de enxofre por um carbono na posição C1, e uma insaturação entre os carbonos C2 e C3. Este carbono (posição C1) desempenha papel importante para a atividade e espectro de ação das carbapenemas. Os diferentes derivados carbapenêmicos disponíveis no mercado são obtidos através de substituições químicas nas posições C1 e C2 do anel de cinco membros. O imipenem é o único derivado carbapenêmico no qual os hidrogênios da posição C1 não apresentam substituintes, o que o leva a apresentar alta sensibilidade à hidrólise pela enzima renal deidropeptidase I (DHP-I). Já o meropenem e o doripenem (denominados  $\beta$ -metil-carbapenemas), apresentam um grupamento metil ligado na posição C1, conferindo estabilidade frente à DHP-I. Na posição

C2, uma cadeia tioacídica de característica básica diferencia as carbapenemas quanto à farmacocinética, espectro de ação e atividade antimicrobiana (BIRNBAUM et al., 1985; MOELLERING et al., 1989; MARTÍNEZ et al., 2010).

Outra consideração importante a respeito da estrutura química das carbapenemas, é que diferentemente das penicilinas e cefalosporinas que apresentam uma cadeia acilamino ligada ao anel  $\beta$ -lactâmico, as carbapenemas apresentam um radical *trans*-hidroxietil (ligado ao C6). Esta cadeia é estendida sob o plano do anel  $\beta$ -lactâmico, que lhe confere maior resistência à hidrólise por enzimas  $\beta$ -lacmases, pois desloca a água, que é necessária para ação hidrolítica destas enzimas. A conformação *trans* dos hidrogênios ligados aos carbonos C5-C6, contribuem para atividade antimicrobiana e resistência à hidrólise, e demonstram como a estereoquímica do anel  $\beta$ -lactâmico é determinante para a sua atividade (KNAPP et al., 2001; MARTÍNES et al., 2010; EI-GAMAL et al., 2017). As características estruturais citadas acima estão apresentadas na Figura 3.2, e as estruturas químicas do imipenem, meropenem e doripenem estão apresentadas na Figura 3.3.

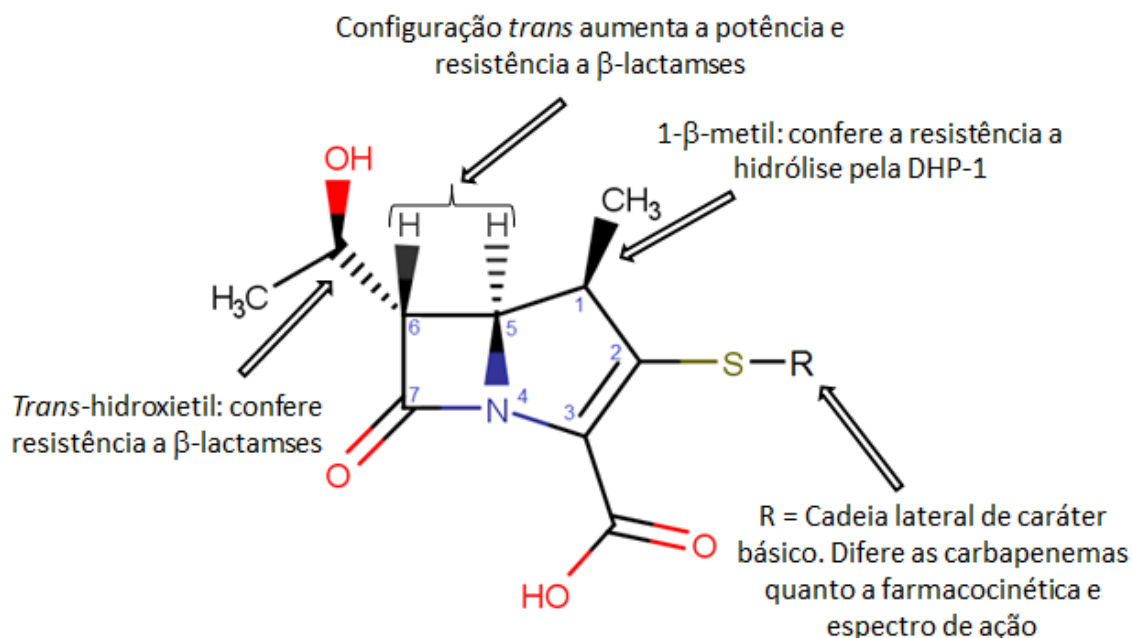


Figura 3.2. Principais características estruturais das carbapenemas.

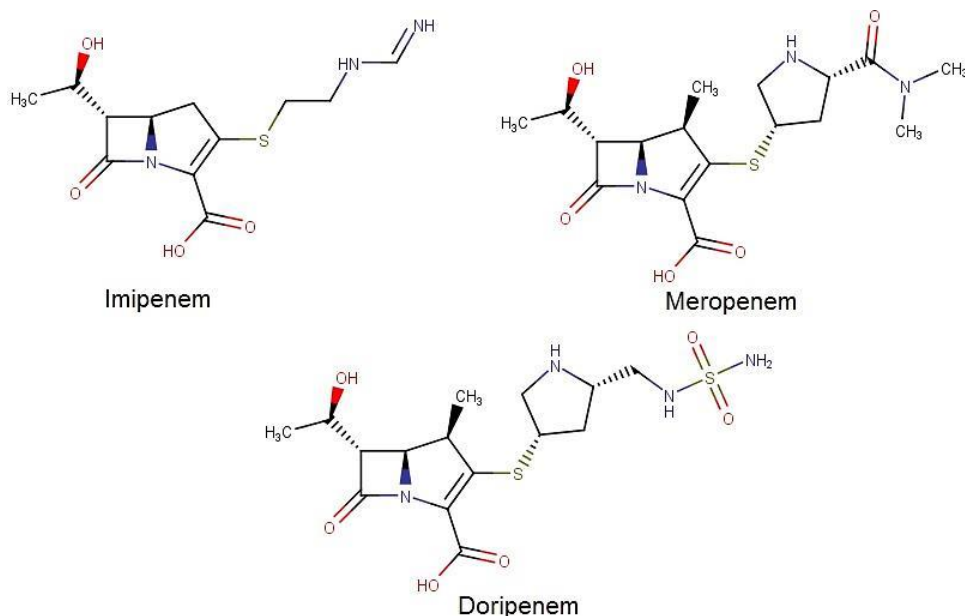


Figura 3.3. Estrutura química das carbapenemas imipenem, meropenem e doripenem.

### 3.1.1. Farmacocinética e mecanismo de ação

Os derivados carbapenemicos citados acima são comercializados na forma de pó para solução injetável. As propriedades farmacocinéticas do imipenem e meropenem são semelhantes quando administrados por via intravenosa (i.v) e intramuscular (i.m). Estas propriedades estão detalhadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Parâmetros farmacocinéticos para as carbapenemas imipenem, meropenem e doripenem (adaptado de MARTÍNEZ et al., 2010).

	Imipenem	Meropenem	Doripenem
Dose i.v (g)	1	1	0,5
C <sub>max</sub> (mg/L)	69,9	61,6	23
t <sub>1/2</sub> (h)	1,11	0,98	1
Vd (l)	14,4	12,5	16,8
AUC (mg/h/l)	92,5	90,8	36
Ligação a proteínas (%)	20	2	9
Recuperação urinária (%)	74	75	71

C<sub>max</sub>: Concentração plasmática máxima; t<sub>1/2</sub>: Tempo de meia vida plasmática; Vd: Volume de distribuição; AUC: Área sob a curva.

Quanto à distribuição, as carbapenemas apresentam penetração adequada na maior parte dos fluidos e tecidos corporais (líquido peritoneal, bile, urina, líquido sinovial, tecidos dérmicos, ossos, escarro, etc.) (NICOLAU, 2008). Assim como outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as carbapenemas apresentam atividade dependente do tempo. Devido a isto, um parâmetro importante para eficácia clínica destes fármacos é o tempo sobre a concentração inibitória mínima ( $T > CIM$ ), ou seja, o tempo, em porcentagem, do intervalo de dose em que a concentração do fármaco excede a CIM do microrganismo alvo. De acordo com Nicolau (2008), devido a sua elevada potência bactericida, efeito pós-antibiótico e alta afinidade pelas *penicillin-binding proteins* (PBPs), as carbapenemas requerem um  $T > CIM$  menor que outros  $\beta$ -lactâmicos. Onde um  $T > CIM$  de 20% é suficiente para obter um efeito bacteriostático (30% em penicilinas e 40% em cefalosporinas), e um  $T > CIM$  de 30 a 40 % é adequado para garantir seu efeito bactericida máximo (50% em penicilinas e 60 - 70% em cefalosporinas).

O mecanismo de ação das carbapenemas baseia-se na inibição da biossíntese de peptídeoglicano, componente fundamental que confere estabilidade e rigidez a parede celular bacteriana. Estes fármacos ligam-se ao resíduo serina das transpeptidases, denominadas *PBPs*, que estão localizadas na face externa da membrana citoplasmática. Um fator importante para a atividade destes fármacos é a capacidade dos mesmos de atravessar a parede celular bacteriana para ter acesso às PBPs. Este acesso ocorre de maneira mais simples em bactérias Gram-positivas devido à ausência da membrana externa. Já em bactérias Gram-negativas estes fármacos necessitam de porinas específicas localizadas na membrana externa das mesmas (MATTHEWS et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010).

### **3.1.2. Indicações clínicas e posologia**

Todas as carbapenemas são semelhantes quanto ao espectro de ação, porém podem apresentar diferenças significativas frente a patógenos específicos. Estas diferenças determinam a indicação clínica de cada carbapenema. O doripenem por exemplo apresenta maior atividade intrínseca frente à enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido. As

carbapenemas são indicadas principalmente para o tratamento de infecções mistas no trato urinário, infecções intra-abdominais, pielonefrites, e em pneumonias associadas ou não ao uso de ventilação mecânica. A dose diária destas carbapenemas pode chegar a até 4 g por dia dependendo da gravidade da infecção a ser tratada (MARTÍNEZ et al., 2010; EI-GAMAL et al., 2017).

### **3.1.3. Características físico-químicas**

#### *3.1.3.1. Imipenem*

O antibiótico imipenem apresenta-se como a primeira carbapenema a ser aprovada para uso clínico. Quimicamente, é um derivado N-forminidoil da tienamicia (BIRNBAUM et al., 1985). É comercializado na forma de pó para solução injetável em frascos contendo 500 mg do fármaco. Devido a sua suscetibilidade à hidrólise pela DHP-I, este fármaco é comercializado em associação com a cilastatina sódica, um inibidor reversível da ação desta enzima. No Brasil, o imipenem é comercializado por diferentes laboratórios, como Merck (Tienam<sup>®</sup>), Química Haller (Penexil<sup>®</sup>) e Antibióticos do Brasil Ltda. (ABL) (medicamento genérico).

As seguintes características físico-químicas são descritas para o imipenem (USP 37, 2014):

- ✓ Aparência: Pó cristalino branco a amarelado;
- ✓ Nome químico: Ácido (5R,6S)-3-[[2-(formimidoylamino)ethyl]thio]-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxílico;
- ✓ Fórmula Molecular: C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S;
- ✓ Massa molecular: 299,347 g/mol

#### *3.1.3.2. Meropenem*

Aprovado pelo FDA em 1996, o meropenem é comercializado na forma de pó para solução injetável em frascos contendo 500 e 1000 mg de meropenem (MARTÍNEZ et al., 2010). É comercializado no Brasil por diferentes laboratórios, como a AstraZeneca (Meronem<sup>®</sup>), BioChimico (Mepenox<sup>®</sup>), Eurofarma (medicamento genérico) e ABL (medicamento genérico).

As seguintes características físico-químicas são descritas para o meropenem (FB 6, 2019).

- ✓ Aparência: pó cristalino branco ou amarelo pálido;
- ✓ Nome químico: Ácido (4R,5S,6S)-3-[[[(3S,5S)-5-[(dimetilamino)carbonil]-3-pirrolidinil]tio]-6-[(1R)-1-hidroxi-etil]-4-metil-7-oxo-1-azabicyclo [3.2.0]hept-2-eno-2-carboxílico];
- ✓ Fórmula Molecular:  $C_{17}H_{25}N_3O_5S$ ;
- ✓ Massa Molecular: 437,51 g/mol (meropenem tri-hidratado).

### 3.1.3.3. Doripenem

O doripenem foi aprovado pelo FDA em 2007, sendo comercializado na forma de pó para solução injetável em frascos contendo 500 e 1000 mg de doripenem (Doribax<sup>®</sup>). No Brasil, o doripenem foi registrado na ANVISA pela Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. com nome de Doriprex, porém seu registro consta como vencido.

As seguintes características físico-químicas são descritas para o doripenem (Janssen Pharmaceuticals, 2009):

- ✓ Aparência: pó branco ligeiramente amarelado;
- ✓ Nome químico: Ácido (4R,5S,6S)-3-[[[(3S,5S)-5-[[[aminosulfonyl]amino]methyl]-3-pyrrolidinyl]thio]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxílico];
- ✓ Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{24}N_4O_6S_2$ ;
- ✓ Massa molecular: 438,52 g/mol (doripenem mono-hidratado);
- ✓ pKa:  $pK_{a1}$  2,8 e  $pK_{a2}$  7,9 (em solução aquosa).

## 3.2. Estudos de estabilidade

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade do mesmo de manter suas características químicas, físicas, microbiológicas e farmacológicas, dentro de limites especificados, durante todo seu período de vida útil. Esta estabilidade depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de fatores relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes, forma

farmacêutica, processo de fabricação ou tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2019). Desta forma, a estabilidade de formulações farmacêuticas é sempre um aspecto importante a ser estudado, uma vez que a segurança destas formulações está intimamente relacionada à sua estabilidade, onde pequenas alterações podem comprometer o efeito farmacológico e, em alguns casos, levar a efeitos adversos.

Os estudos de estabilidade correspondem a um conjunto de testes projetados para obter informações acerca da estabilidade de um produto farmacêutico, tanto para fins de registro e determinação de prazo de validade, como para determinação da estabilidade intrínseca do fármaco (BRASIL, 2019a). De acordo com ICH, o objetivo de um estudo de estabilidade é fornecer evidências de como a qualidade de um medicamento varia com o tempo, sob a influência de uma série de fatores, a fim de determinar um período para vida útil do medicamento, sob condições recomendadas de armazenamento (ICH, 2003). Comumente, os estudos de estabilidade são divididos em três categorias: os testes de estresse ou degradação forçada, o estudo acelerado e o estudo de longa duração, que diferem nas condições de armazenamento, frequência e principalmente objetivo do teste.

Os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, descritos na RDC n° 318/2019 (BRASIL, 2019a) apresentam como principal finalidade a determinação do prazo de validade de um medicamento, e nesta resolução são definidas as condições para o armazenamento, como temperatura e umidade, e a frequência com que os testes devem ser realizados.

Já os testes de degradação forçada são realizados para elucidar características de estabilidade intrínseca do fármaco. Estes são conduzidos em condições mais severas que as utilizadas no estudo acelerado. A RDC n° 53/2015 preconiza que o estudo de degradação forçada seja realizado submetendo as amostras às seguintes condições: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica, e exposição a íons metálicos. Consta também que o estudo deve promover degradação suficiente a fim de permitir avaliação da formação de produtos de degradação. Os resultados dos ensaios devem servir de suporte para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos indicativos de estabilidade,

e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento (BRASIL, 2015a).

Além dos estudos de estabilidade citados anteriormente, recentemente a ANVISA, através da RDC nº 318/2019, também regulamenta a realização de mais dois tipos de estudos:

→ *Estudo de Estabilidade em Uso para medicamentos*: estudo aplicado a medicamentos acondicionados em embalagens multidose. Este estudo deve comprovar estabilidade, no mínimo, pelo período previsto para a permanência do medicamento em sua embalagem primária, após abertura. Este estudo adicional deve ser realizado para determinar o prazo de validade do produto após aberto;

→ *Estudo de Estabilidade Pós-Reconstituição ou diluição para medicamentos*: estudo aplicado para medicamentos que demandem reconstituição ou diluição antes do uso. Deve ser realizado estudo adicional para determinar o prazo de validade do produto acabado, nas condições de uso que estão estipuladas na bula. No relatório deste estudo deve conter o resultado de uma análise inicial, que corresponda ao produto imediatamente após a reconstituição, e o resultado final, que corresponda ao produto reconstituído e diluído pelo tempo máximo recomendado.

### **3.2.1. Impurezas e produtos de degradação**

Quanto à preocupação com impurezas e produtos de degradação, o ICH, em seu guia *Impurities in new drug substances Q3A(R2)*, estabelece limites para a presença de impurezas em medicamentos. Neste guia as impurezas são classificadas em três grupos (ICH, 2006a):

→ *Impurezas orgânicas*: Estas impurezas podem surgir durante o processo de fabricação ou armazenamento, e incluem produtos de degradação, intermediários de síntese, reagentes ou catalizadores;

→ *Impurezas inorgânicas*: Estas podem ser decorrentes do processo de fabricação, normalmente incluem: metais pesados ou residuais, sais inorgânicos, e outros materiais (exemplo: materiais de filtragem ou carvão);

→ *Solventes residuais*: Estes solventes são líquidos orgânicos ou inorgânicos, utilizados como veículos na síntese dos fármacos. Para



determinação de solventes residuais, o ICH apresenta guia específico em seu portfólio, o guia Q3C(R7) (ICH, 2018).

No Brasil, a ANVISA, por meio da RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015, estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Define produtos de degradação como “impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento” (BRASIL, 2015a).

Juntamente com a RDC nº 53/2015, a ANVISA publicou o “Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos” (BRASIL, 2015b). O perfil de degradação pode ser definido como o conjunto de produtos de degradação observados em um medicamento quando exposto a uma determinada condição.

O perfil de degradação de maior interesse sanitário é aquele formado no estudo de estabilidade de longa duração, que é que definido como perfil de degradação “real”, e a estes produtos são aplicados os limites estabelecidos na RDC nº 53/2015. Como o perfil de degradação depende das condições em que o fármaco é exposto, o perfil de estabilidade forçada não será igual ao obtido no estudo de longa duração.

Na prática, percebe-se geralmente que a degradação forçada leva à formação de um número maior de produtos de degradação, em relação ao estudo de longa duração. Portanto o perfil obtido no estudo de degradação forçada trata-se de um perfil de degradação “potencial”. Cabe ressaltar que o perfil de degradação potencial pode ser diferente do perfil real, tanto qualitativamente como quantitativamente (Brasil, 2015b). Mas do ponto de vista qualitativo, o perfil real deve estar contido no perfil potencial. A relação entre os perfis de degradação esta ilustrada na Figura 3.4.



Figura 3.4. Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2015b).

Com a finalidade de atender às especificações impostas pela RDC nº 53/2015 e pelo guia nº 4/2015, a determinação do perfil potencial de degradação tem como principal objetivo a sua utilização no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Em resumo, a premissa básica consiste em utilizar a degradação forçada para determinar o perfil de degradação potencial, desenvolver um método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar todos potenciais produtos de degradação, e utilizar este método para determinar o perfil de real, nas amostras oriundas da estabilidade de longa duração.

#### 3.2.1.1. Determinação analítica de impurezas

Conforme mencionado anteriormente, uma série de diretrizes nacionais e internacionais são impostas com o objetivo de avaliar a estabilidade de produtos farmacêuticos, e controlar os níveis de impurezas presentes nos mesmos. Os desafios analíticos enfrentados na determinação de impurezas e produtos de degradação muitas vezes são decorrentes das baixas concentrações nas quais estes analitos estão presentes nas amostras, e também por apresentarem estrutura química semelhante à do fármaco, o que dificulta a separação. Portanto, a principal consideração a respeito do método

analítico a ser escolhido é se ele possui sensibilidade e especificidade adequada para esta finalidade (GÖRÖG, 2018).

Cabe também ressaltar que a escolha do método analítico depende da natureza da própria impureza, e se o objetivo do método é analisar impurezas conhecidas e com padrões comerciais disponíveis no mercado, ou analisar impurezas desconhecidas, principalmente os produtos de degradação. Em trabalho de revisão desenvolvido por Jain e Basniwal (2013), os autores citam mais de cento e noventa artigos publicados entre 2008 e 2012, que utilizam a técnica de CLAE-DAD para ambos os casos, porém, quando trata-se de impurezas desconhecidas, nota-se a utilização de técnicas hífenadas, principalmente a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (JAIN e BASNIWAL, 2013; HOLM e ELDER, 2016; GÖRÖG, 2018).

### *3.2.1.2. Caracterização de impurezas e produtos de degradação*

No exercício do controle de impurezas e produtos de degradação desconhecidos, a identificação e a caracterização são dois passos fundamentais, e em casos onde os mesmos apresentam-se acima de limites toleráveis pelos órgãos reguladores, estes passos são obrigatórios. A caracterização pode ser realizada através de uma abordagem convencional, com o isolamento dos produtos por diferentes técnicas cromatográficas, seguido de métodos espectrais de caracterização, porém esta abordagem pode ser muito trabalhosa e demorada. Um conceito mais moderno é a utilização de técnicas hífenadas como estratégia para otimizar o processo de caracterização.

O termo “técnica hífenada” refere-se ao acoplamento de duas ou mais técnicas analíticas, que tem como objetivo gerar uma ferramenta analítica mais eficiente que as técnicas convencionais. Para o acoplamento, estas técnicas analíticas devem ser ortogonais, ou seja, elas devem medir propriedades físico-químicas distintas nos analitos. Um exemplo bem sucedido de técnicas hífenadas é o acoplamento de técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência com técnicas espectrométricas, como a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear, capazes de gerar informações adicionais a respeito da estrutura química dos analitos (LEVSEN et al., 2000; THOMASI et al., 2017)

Segundo Narayanam e colaboradores (2014), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é hoje uma ferramenta essencial para a caracterização de impurezas e produtos de degradação. Uma estratégia sistemática de várias etapas envolve a utilização de espectrômetros de alta resolução e experimentos de múltiplos estágios de fragmentação. Em trabalho publicado por Mehta e colaboradores (2010), os autores propõem uma estratégia para a caracterização de pequenas quantidades de produtos de degradação, utilizando como base a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A valsartana é utilizada como fármaco modelo para o estudo. Experimentalmente, os autores sugerem a caracterização em três etapas: 1) iniciando as análises com experimentos multi-estágio de fragmentação ( $MS^n$ ) para compreender as vias de fragmentação do fármaco e produtos. 2) Junto aos experimentos de  $MS^n$ , os autores utilizam equipamento de alta resolução, para a determinação da massa exata dos produtos de degradação e de seus fragmentos. 3) E por último, a determinação do número de hidrogênios lábeis, por experimentos de troca de hidrogênio/deutério. Para o estudo de  $MS^n$  é utilizado um analisador de massas do tipo *Linear Ion Trap* (LIT), e os experimentos de alta resolução foram realizados utilizando analisador de massas do tipo *Time of Flight* (TOF). Considerando todos os resultados obtidos nos experimentos citados acima, os autores atribuem ao produto de degradação sua estrutura química, e justificam esta estrutura através de um mecanismo de formação.

Embora o vasto conjunto de dados estruturais que podem ser gerados pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, algumas vezes os resultados obtidos podem ser inconclusivos, deixando dúvidas no momento da caracterização. Nestes casos, a ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser utilizada com ferramenta definitiva no momento de atribuir a estrutura química de um produto de degradação (GONNELLA, 2013).

### **3.3. Toxicidade de impurezas e produtos de degradação**

Além da preocupação com a quantidade e a identidade química das impurezas presentes em medicamentos, a segurança biológica dos mesmos também é objeto de estudo, e é regulamentada por uma série de diretrizes em

órgãos nacionais e internacionais de vigilância sanitária. A ANVISA através da RDC nº 53/2015, estabelece os limites, ou seja, valores acima dos quais as impurezas devem ser qualificadas quanto a sua segurança biológica. Estes limites são expressos como percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como administração total diária (ATD), e estão apresentados na Tabela 3.2. Outros documentos de referência para a qualificação destas substâncias são as guias do ICH nominadas Q3B(R2) que trata de impurezas em medicamentos, e Q3A(R2) que trata de impurezas em insumos farmacêuticos ativos (ICH, 2006a; ICH, 2006b; Brasil, 2015a).

Tabela 3.2. Limites de qualificação para presença de produtos de degradação em medicamentos (adaptado de Brasil 2015a).

	Dose máxima diária	Limite
Limite de qualificação	< 10 mg	1,0 % ou 50 µg ATD, o que for menor.
	10 mg - 100 mg	0,5 % ou 200 µg ATD, o que for menor.
	> 100 mg – 2 g	0,3 % ou 3 mg ATD, o que for menor.
	> 2 g	0,15 %

Para impurezas ou produtos de degradação presentes acima dos limites especificados, há três alternativas para que esta substância seja considerada qualificada (Brasil, 2015a):

→ Quando a impureza em questão for um metabólito significativo encontrado em estudos conduzidos em animais ou em humanos;

→ Quando o limite proposto estiver devidamente justificado em literatura científica ou em compêndios oficiais;

→ Quando forem apresentados dados de mutagenicidade e toxicidade geral (segurança biológica) através de estudos adequados ou literatura científica.

Quanto aos testes a serem realizados, não existe, até o momento, um guia específico da ANVISA para a condução de estudos de qualificação de

impurezas. A necessidade dos estudos deve ser avaliada caso a caso, considerando vários fatores, incluindo a população de pacientes, a condição clínica a ser tratada, a dose diária, a via de administração e o tempo de exposição ao produto. Assim, não é possível estabelecer um padrão de estudos que devem ser conduzidos.

Os testes para a qualificação de impurezas devem seguir guias presentes em órgãos regulatórios, como os guias M7(R1) e M3(R2) do ICH, que tratam da avaliação de impurezas mutagênicas e de estudos de segurança não clínicos, respectivamente. Também podem ser utilizados guias presentes na *Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* (ICH, 2009; BRASIL, 2019b; ICH, 2017). De acordo com a ANVISA, para medicamentos já presentes no mercado, com perfil de segurança conhecido, alternativas à avaliação de toxicidade geral podem ser consideradas, visando minimizar o uso de animais em estudos desnecessários. Neste caso, a abordagem utilizada pode ser escolhida pela empresa considerando-se o “princípio dos 3 R’s” (*reduce, refine, replace*) sempre que possível, desde que seja viável fornecer dados de segurança cientificamente robustos e justificáveis (BRASIL, 2019b).

Outra alternativa na avaliação toxicidade são os estudos *in silico*. De acordo com o guia M7(R1) do ICH, a mutagenicidade de uma impureza pode ser determinada utilizando métodos de (Q)SAR “*Quantitative structure activity relationship*”. Para isso devem ser utilizado dois métodos complementares: um método baseado em regras (*expert rule-based*) e outro baseado em estatística. Se em ambos os métodos de (Q)SAR a impureza apresentar a ausência de alertas estruturais, torna-se suficiente concluir que a impureza não possui potencial mutagênico.

Referente a produtos de degradação, na literatura científica encontram-se diversos trabalhos nos quais a estabilidade físico-química é apresentada em conjunto com estudos de toxicidade. Alguns exemplos estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Estudos de estabilidade físico-química em conjunto com a toxicidade de impurezas e produtos de degradação, em fármacos e medicamentos.

Título do estudo	Autores
Photodegradation kinetics of Iodenafil carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and <i>in vitro</i> cytotoxicity.	CODEVILLA et al., 2013
Characterization of forced degradation products of ketorolac tromethamine using LC-ESI/Q/TOF/MS/MS and <i>in silico</i> toxicity prediction.	KALARIYA et al., 2014
<i>In vitro</i> toxicity assessment of rivaroxaban degradation products and kinetic evaluation to decay process	WINGERT et al., 2018
Identification, isolation and characterization of dolutegravir forced degradation products and their cytotoxicity potential	SAIDA et al., 2019
LC-ESI-QTOF-MS analysis utilizing gas-phase fragmentation reactions subjected to ESI-MS-CID and ESI CID-MS/MS conditions to study the degradation behaviour of sorafenib tosylate: NMR and <i>in vitro</i> cytotoxicity and apoptosis detection studies of hydrolytic degradation products.	JOHNSIRANI et al., 2020

Trabalhos referentes à toxicidade de carbapenemas também são encontrados. A citotoxicidade de amostras degradadas de meropenem foi estudada por Mendez e colaboradores (2008) através de ensaio de viabilidade celular, utilizando células mononucleares humanas. O trabalho foi realizado com três tipos de amostras; uma amostra degradada em solução aquosa de 50 mg/mL e estocada à 45 °C por 36 horas; outra amostra degradada em sua forma sólida, expondo o fármaco em pó à temperatura de 90 °C por 90 dias; e outra amostra resultante da degradação alcalina do fármaco, utilizando NaOH 0,1 Mol/L e tempo de degradação de 10 minutos. As células foram incubadas com as amostras nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL, e a viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de incubação. Após 24 horas, não

foi observada citotoxicidade das amostras degradadas em relação ao fármaco não degradado. Em contraste, a amostra sólida degradada e a amostra degradada em solução alcalina na concentração de 1,0 mg/mL, após 48 h de incubação, apresentam efeitos citotóxicos com redução da viabilidade celular em 41,17 e 16,12%, respectivamente.

A toxicidade intrínseca das carbapenemas também é avaliada por outros autores. Birbaum e colaboradores (1985) relatam o potencial nefrotóxico do imipenem. O estudo demonstra que altas doses de imipenem, quando administradas a certos animais de laboratório como uma dose única diária ou como doses múltiplas diárias por até seis meses, são capazes de induzir danos renais. A necrose do túbulo contorcido proximal é observada em macacos e coelhos. Para macacos, doses únicas de 180 mg/kg induziram a necrose em uma fração dos animais tratados. Segundo os autores, o estudo com macacos não demonstrou evidências de toxicidade cumulativa quando doses sucessivas foram separadas em um intervalo de 24 horas, porém, para coelhos, foi observado que uma dose de 150 mg/kg administrado em três doses (50 mg/kg) com intervalo de seis horas, induziu leve necrose tubular, equivalente ao observado com uma dose única de 120 mg/kg, mas distintamente menor que o induzido por uma dose única de 150 mg/kg. O estudo também relata o efeito nefroprotetor da cilastatina (inibidor da DHP-1), quando administrada juntamente com o imipenem, sendo que a administração conjunta dos fármacos eliminou os efeitos nefrotóxicos do imipenem em doses aplicáveis.

Um mecanismo de nefrotoxicidade é apresentado por Tune e colaboradores (1972) para o antibiótico cefaloridina, cujo efeito é causado pela secreção renal incompleta do fármaco. Neste caso, o mesmo é transportado ativamente na superfície contra-luminal do epitélio tubular, porém, é incapaz de sair pela superfície luminal do epitélio, acumulando-se intracelularmente e levando à morte celular. No caso do imipenem, o seu metabolito majoritário, formado pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico através da ação da DHP-1 seria o principal responsável por esse acúmulo e consequente toxicidade. Essa hipótese é fortalecida pela redução da toxicidade renal do imipenem quando administrado em conjunto com um inibidor da DHP-1 (cilastatina). Porém, estudos posteriores demonstraram que a nefroproteção não está relacionada



ao bloqueio metabólico, mas em vez disso, a competição em uma etapa anterior entre o imipenem e a cilastatina com o transportador tubular, através de uma via saturável de entrada, presumivelmente na superfície contra-luminal do túbulo.

Nouda e colaboradores (1995) avaliaram a toxicidade renal do meropenem, primeira 1- $\beta$ -metil carbapenema resistente à hidrólise pela DHP-1, que não é administrado em conjunto com a cilastatina. No estudo realizado com coelhos, análises bioquímicas e histopatológicas não demonstraram nefrotoxicidade do meropenem nas doses de 300 mg/kg. Os autores relatam que a diferença de nefrotoxicidade do meropenem em relação ao imipenem, está na menor basicidade da cadeia lateral ligada ao carbono C-2 (meropenem: pKa 7,2; imipenem: pKa 9,9). Em experimentos posteriores, os autores sintetizaram estruturas análogas ao meropenem com diferenças na basicidade da cadeia lateral C-2, e também com a ausência do grupo 1- $\beta$ -metil. Nos resultados encontrados, a ausência do grupo 1- $\beta$ -metil não foi capaz de induzir nefrotoxicidade, enquanto que o aumento da basicidade da cadeia lateral apresentou papel importante no aumento da toxicidade destes análogos.

### **3.4. Estabilidade de carbapenemas**

A literatura científica relata diversos trabalhos acerca da estabilidade dos derivados carbapenêmicos (SWANSON et al., 1986; SMITH et al., 1990; MÉNDEZ et al., 1991; TAKEUCHI et al., 1995; CAI e RU, 2005; MENDEZ et al., 2006; CIELECKA-PIONTEK et al., 2011; BARBOSA et al., 2017). Estes trabalhos abordam diferentes aspectos desta temática, que auxiliam na melhor compreensão do comportamento e dos mecanismos envolvidos na degradação destes fármacos. Os principais temas abordados por estes trabalhos, referentes à estabilidade química das carbapenemas, são:

→ Cinética de degradação térmica, com determinação da ordem de reação e da constante de velocidade de reação (k);

→ Influência de fatores capazes de alterar a velocidade de degradação e a formação de produtos de degradação. Estes fatores envolvem principalmente o pH, concentração das amostras, agentes oxidantes e efeito de tampões;

→ Avaliação da estabilidade pós-reconstituição, utilizando fluidos para infusão.

### 3.4.1 Cinética de degradação

Quanto aos trabalhos envolvendo a cinética de degradação, principalmente térmica, para as três carbapenemas em estudo (imipenem, meropenem, doripenem), são majoritariamente relatadas reações de primeira ordem, nas quais a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. Para o imipenem, Swanson e colaboradores (1986) estudaram os parâmetros cinéticos para o fármaco diluído em solução salina e em soro humano, em diferentes temperaturas. O resumo dos resultados obtidos por Swanson e colaboradores (1986) está apresentado na Tabela 3.4. Nos resultados observa-se uma maior estabilidade das amostras diluídas em soro humano, e, segundo os autores, os valores de energia de ativação encontrados, em torno de 17 kcal/mol, são característicos para reações de hidrólise.

A cinética de degradação térmica do meropenem é estudada por Mendez e colaboradores (2006). Neste trabalho, as amostras de meropenem são submetidas ao estresse térmico na forma sólida e na amostra reconstituída em solução fisiológica à 10 mg/mL. As amostras reconstituídas foram armazenadas nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C, e as amostras em estado sólido nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C. Os resultados obtidos demonstram que, para as amostras reconstituídas, o tempo necessário para um decaimento de 10 % de seu teor inicial ( $t_{90}$ ) é de 4,7 horas quando armazenada a 25 °C, e de 3,0 horas quando armazenada a 35 °C, valores que ressaltam os cuidados a serem tomados durante o preparo das soluções e a administração desse medicamento. Já em estudo cinético realizado por Barbosa e colaboradores (2017), amostras reconstituídas de doripenem foram submetidas às temperaturas de 25, 35 e 45 °C. Em comparação com os resultados publicados para o meropenem nestas temperaturas, é observada uma maior estabilidade do doripenem, obtendo-se valores de  $t_{90}$ , calculados nas temperaturas de 25 e 35 °C, de 20,2 e 8,0 horas, respectivamente. Um resumo destes resultados está também descrito na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Parâmetros cinéticos obtidos na degradação térmica do imipenem, meropenem e doripenem, de acordo com dados da literatura.

Amostras	Temperatura (°C)	k	t <sub>1/2</sub>	Autores
Imipenem				
Solução fisiológica <sup>a</sup>	2	0,016 h <sup>-1</sup>	44,42 h	SWANSON et al., 1986
	25	0,112 h <sup>-1</sup>	6,21 h	
	37	0,339 h <sup>-1</sup>	2,05 h	
	50	0,802 h <sup>-1</sup>	0,86 h	
Soro humano <sup>b</sup>	20	0,012 h <sup>-1</sup>	58,72 h	
	37	0,065 h <sup>-1</sup>	10,73 h	
Meropenem				
Amostra reconstituída <sup>c</sup>	25	0,022 h <sup>-1</sup>	31,24 h	MENDEZ et al., 2006
	35	0,035 h <sup>-1</sup>	19,64 h	
	45	0,046 h <sup>-1</sup>	15,11 h	
Amostra em estado sólido	70	0,0011 dia <sup>-1</sup>	630 dias	
	80	0,0020 dia <sup>-1</sup>	340 dias	
	90	0,0137 dia <sup>-1</sup>	51 dias	
Doripenem				
Amostra reconstituída <sup>d</sup>	25	0,005 h <sup>-1</sup>	133,59 h	BARBOSA et al., 2017
	35	0,013 h <sup>-1</sup>	53,06 h	
	45	0,025 h <sup>-1</sup>	27,17 h	

<sup>a</sup> Amostra na concentração de 2,5 mg/mL; <sup>b</sup> Amostra na concentração de 100,0 µg/mL; amostra na concentração de 10,0 mg/mL; <sup>d</sup> Amostra na concentração de 4,5 mg/mL.

Além da temperatura, o pH é um fator que exerce influência direta sobre a estabilidade das carbapenemas. A influência do pH sobre a velocidade de degradação destes fármacos pode ser explicada pelo efeito catalítico dos íons hidrônio ou hidróxido sob determinadas reações. No geral, observa-se uma maior instabilidade em pH alcalino, devido ao ataque nucleofílico da base à carbonila do anel β-lactâmico.

Quando uma reação dependente da atividade de íons hidrônio ou hidróxido ocorre em pH constante, geralmente observa-se uma cinética de pseudo-primeira-ordem. Estas reações podem ser descritas pela seguinte equação (YOSHIOKA e STELLA, 2000):

$$k_{obs} = k_{H^+} a_{H^+} + k_{H_2O} + k_{OH^-} a_{OH^-}$$

Onde  $k_{obs}$  é a soma das constantes de degradação específicas para cada via de degradação (ácida ou alcalina), e  $a_{H^+}$  e  $a_{OH^-}$  correspondem à atividade dos íons hidrônio e hidróxido, respectivamente. Quando o primeiro e segundo termo da equação exercerem maior efeito sobre a velocidade de degradação, é observado um perfil de degradação apresentado na Figura 3.5(a). Se o segundo e o terceiro termo forem predominantes, o perfil de degradação correspondente será alterado, como ilustrado na Figura 3.5(b). Se todos os termos forem determinantes, o perfil de degradação observado terá o formato de “U” (Figura 3.5(c)), e se apenas o primeiro e terceiro termo forem determinantes o perfil de degradação apresentará um formato de “V” (Figura 3.5(d)). A representação gráfica dos perfis de degradação citados acima são obtidos através da plotagem do logaritmo de  $k_{obs}$  em função do pH.

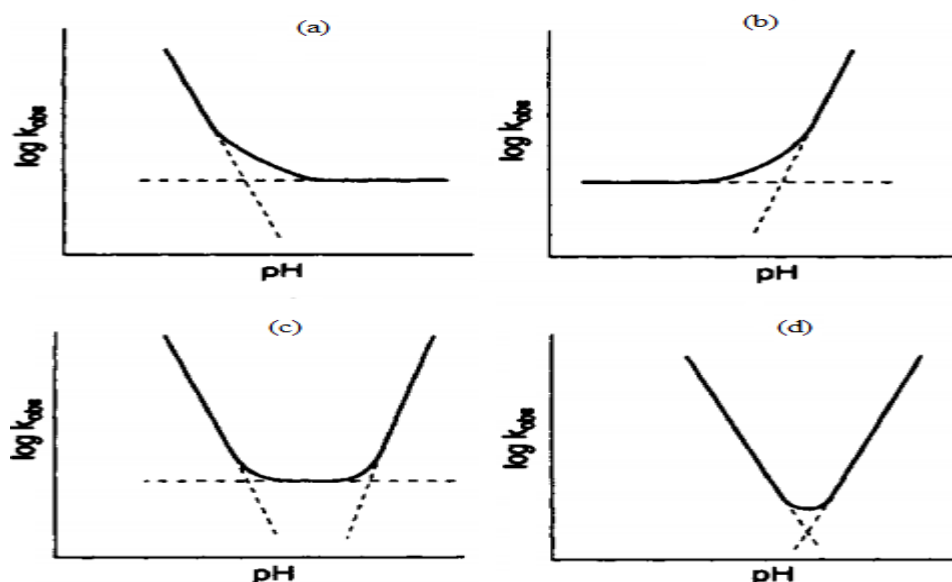


Figura 3.5. Representação gráfica dos diferentes perfis de degradação dependentes de pH (YOSHIOKA e STELLA, 2000).

Na estabilidade das carbapenemas, o pH é considerado um fator influente na decomposição do fármaco. Observa-se que tanto soluções ácidas quanto alcalinas desempenham papel determinante na degradação destes fármacos, que se apresentam mais estáveis em valores de pH próximos à neutralidade, entre 6 e 7 (MÉNDEZ et al., 1991; TAKEUCHI et al., 1995; CIELECKA-PIONTEK et al., 2011a). Um resumo dos resultados obtidos por Méndez e colaboradores (1991) para o imipenem, e por Cielecka-Piontek e colaboradores (2011b) para o doripenem, estão apresentados na Figura 3.6. Nestas representações gráficas, o ponto de inflexão das curvas demonstra os valores de pH em que os fármacos são mais estáveis.

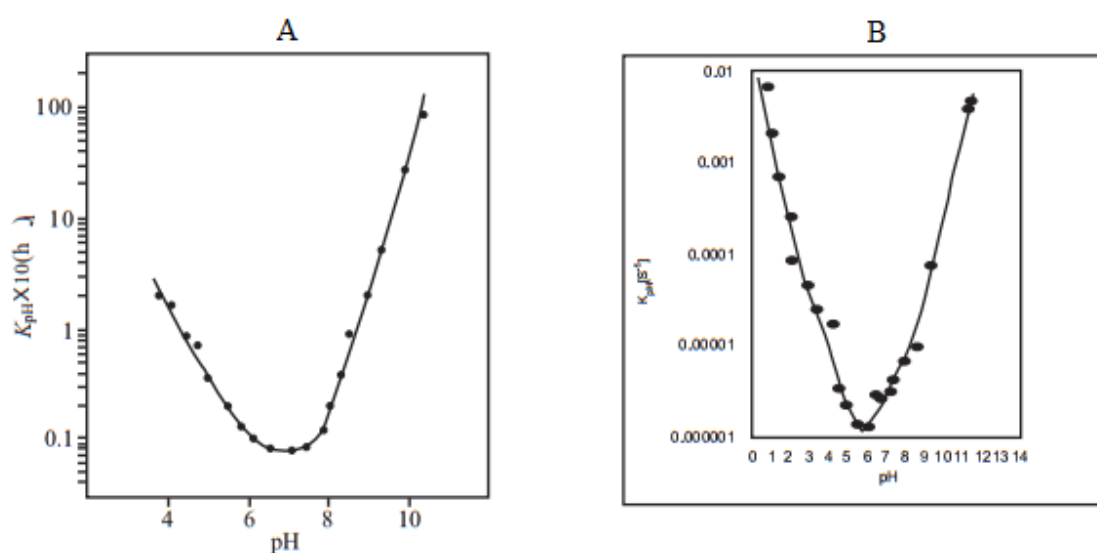


Figura 3.6. (A) Estabilidade do imipenem em soluções aquosas em diferentes valores de pH (MÉNDEZ et al., 1991); (B) Estabilidade do doripenem em soluções aquosas em diferentes valores de pH (CIELECKA-PIONTEK et al., 2011b).

### 3.4.2. Produtos de degradação

Smith e colaboradores (1990) demonstraram que não apenas a velocidade de degradação é afetada pelo pH, e propõe diferentes vias de degradação para o imipenem. Segundo estes autores, em pH ácido ocorrem principalmente reações de dimerização, partindo da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, seguido de reações intermoleculares. Os dois principais produtos de degradação formados estão apresentados na Figura 3.7.

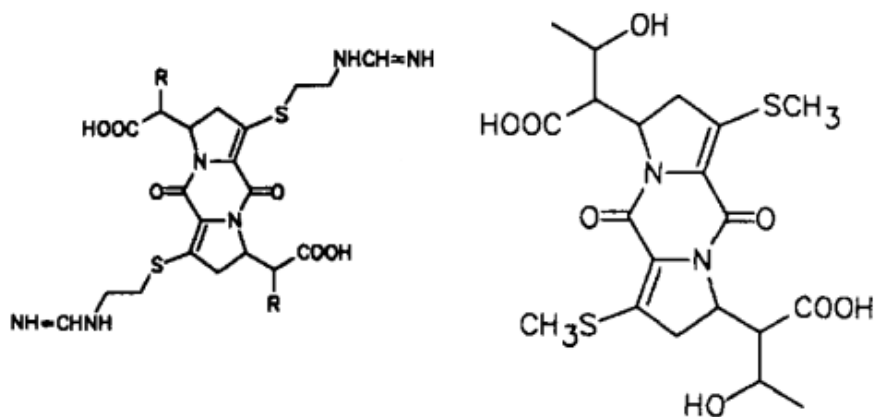


Figura 3.7. Principais produtos de degradação do imipenem, formados em solução fracamente ácidas (SMITH et al., 1990).

Em soluções alcalinas, em pH de 9,5, observou-se a hidrólise do grupamento forminidoil presente em sua cadeia lateral. Também observou-se um produto de degradação resultante da reação intermolecular entre o grupo amino da cadeia lateral e anel  $\beta$ -lactâmico. A rota de degradação proposta e os produtos de degradação formados estão apresentados na Figura 3.8.

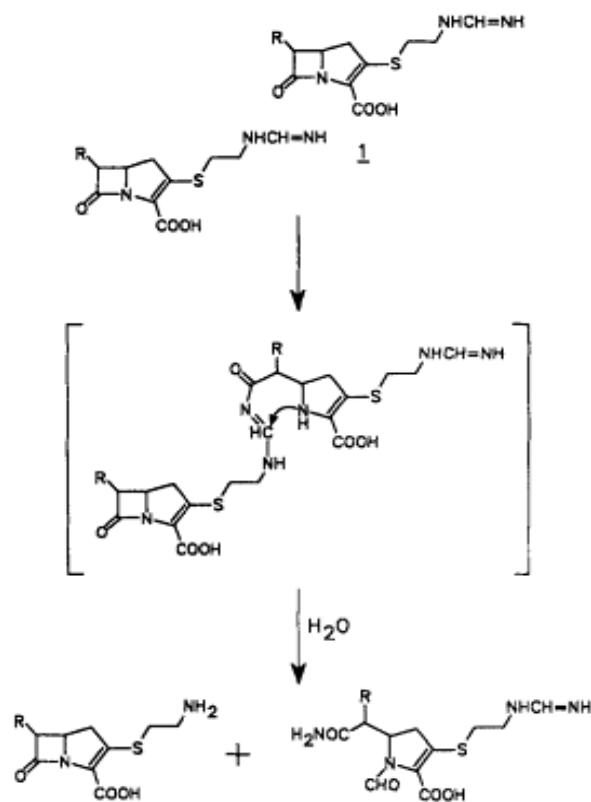


Figura 3.8. Rota de degradação do imipenem em solução alcalina (SMITH et al., 1990).

Alguns produtos de degradação do meropenem também são propostos na literatura científica. Mendez e colaboradores (2008), através de análises por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, propõem a estrutura química de dois produtos de degradação do fármaco, um formado em meio alcalino, e outro formado em amostras submetidas a estresse térmico (Figura 3.9). O produto formado em meio alcalino trata-se do fármaco com o anel  $\beta$ -lactâmico hidrolisado. Já o produto formado por estresse térmico é resultante de várias reações químicas, com a perda da cadeia lateral e modificações no anel  $\beta$ -lactâmico, formando um derivado pirrólico. A rota de degradação térmica está apresentada na Figura 3.10.

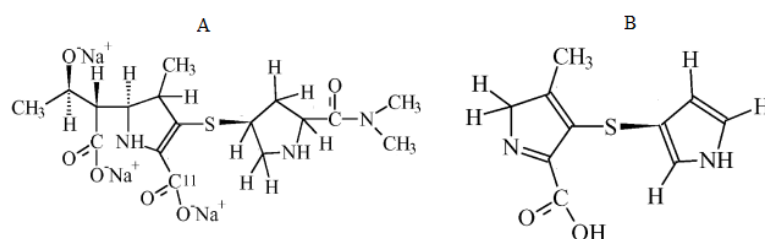


Figura 3.9. Produtos de degradação do meropenem: (A) produto da degradação alcalina; (B) produto da degradação térmica (MENDEZ et al., 2008).

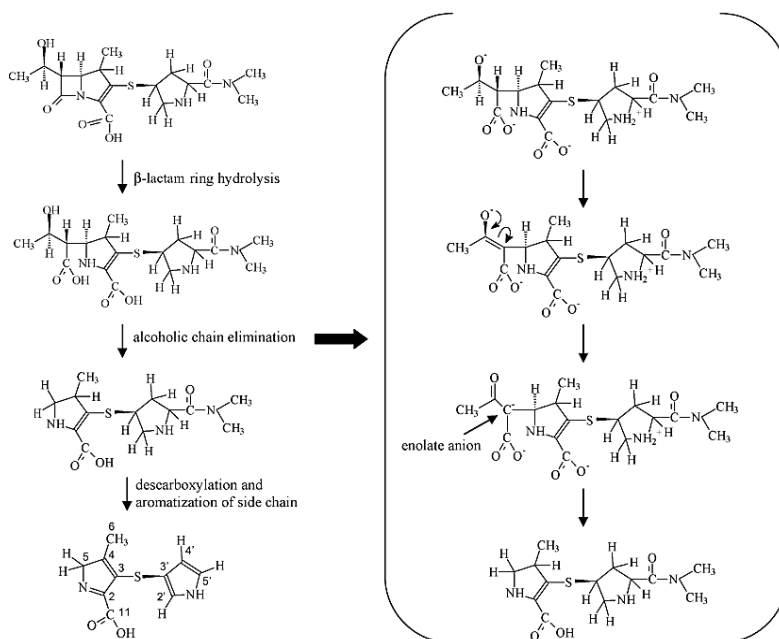


Figura 3.10. Rota de degradação térmica do meropenem (MENDEZ et al., 2008).

Também em estudo com o meropenem, Cai e Ru (2005) avaliam o comportamento de polimerização do fármaco submetendo-o a condições de elevada umidade (>75 %). Os produtos de polimerização do meropenem são separados por cromatografia de gel de filtração e identificados por espectrometria de massas. Em mecanismo semelhante ao descrito para o imipenem por Smith e colaboradores (1990), os autores Cai e Ru (2005) propõem que o mecanismo de polimerização do meropenem tem início com a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, seguido da reação intermolecular envolvendo o ácido carboxílico resultante desta hidrólise com a amina cíclica presente em sua cadeia lateral. O possível mecanismo de polimerização proposto por Cai e Ru (2005) está apresentado na Figura 3.11.

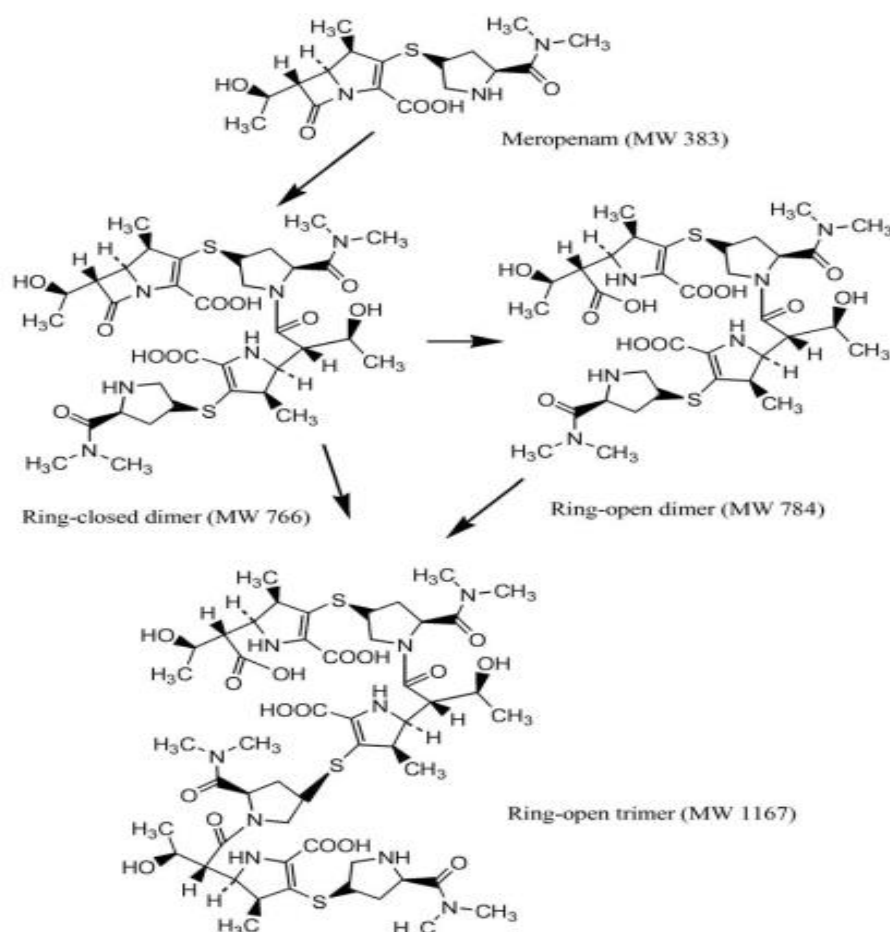


Figura 3.11. Proposta de mecanismo de polimerização para o meropenem (CAI e RU, 2005).

Este comportamento de dimerização também é observado para o doripenem. Em trabalho publicado por Barbosa e colaboradores (2017),



amostras de doripenem, reconstituídas à concentração de 4,5 mg/mL e armazenadas a 45 °C, apresentaram produtos de degradação oriundos de um processo de dimerização. Nestas condições também foi possível observar um produto de degradação resultante da clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico. Estes produtos estão apresentados na Figura 3.12. Na figura observamos o produto formado pela clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico, e outros três produtos oriundos de um processo de dimerização.

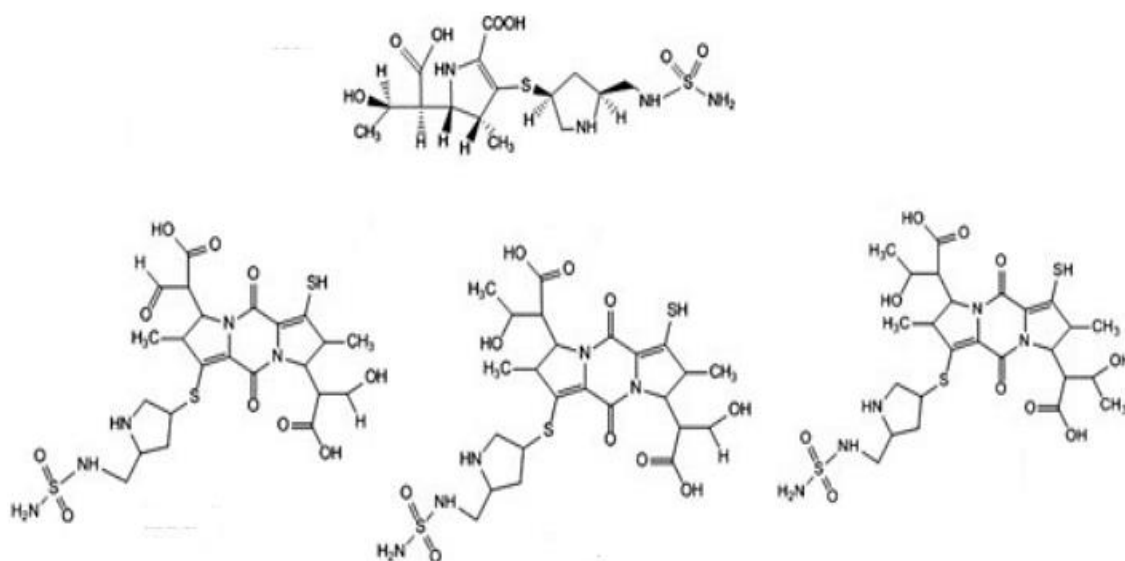


Figura 3.12. Estruturas químicas propostas para os produtos de degradação obtidos após estresse térmico em amostras reconstituídas do doripenem (BARBOSA et al., 2017).

### 3.4.3. Estabilidade em fluidos de infusão

A estabilidade do doripenem pós-reconstituição, e em condições de uso clínico, é amplamente estudada por Psathas e colaboradores (2008). Neste trabalho, as amostras comerciais de doripenem foram armazenadas por 12 meses à temperatura ambiente (estabilidade de longa duração), e após este período de armazenamento, foram reconstituídos à 50 mg/mL e diluídos à concentração de 5 mg/mL, utilizando solução fisiológica ou solução de glicose 5 %. Para ambos os diluentes utilizados, foram testados três dispositivos diferentes de infusão: bolsas de PVC (polyvinyl chloride), polietileno e PVC com vial adaptador. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e sob refrigeração, e foram avaliados o teor residual de doripenem, tamanho de

partícula, pH e substâncias relacionadas ao doripenem. Entre as substâncias relacionadas, a única citada é o produto dimérico do doripenem apresentado na Figura 3.13.

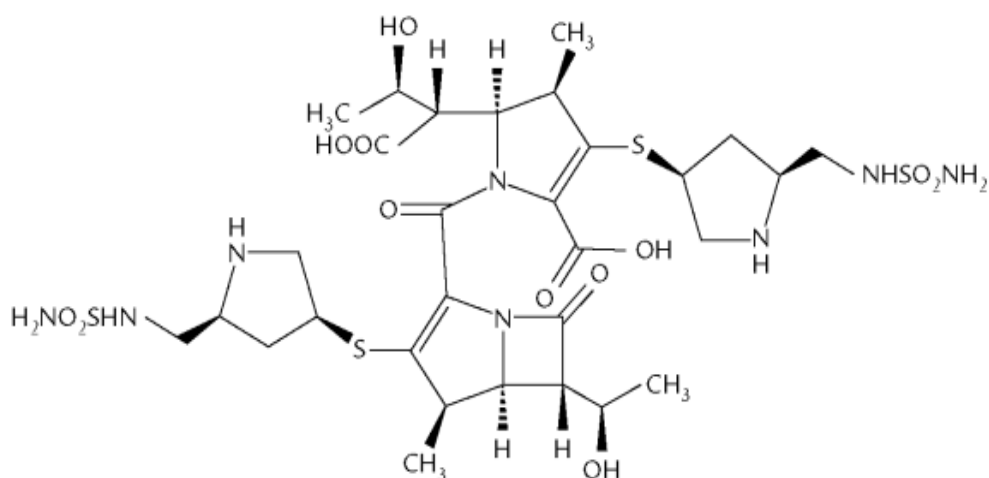


Figura 3.13 Produto de degradação formado pela dimerização do doripenem (PSATHAS et al., 2008).

As amostras reconstituídas na concentração de 50 mg/mL mantiveram seu teor inalterado por um período de até 60 minutos, e para as amostras diluídas, observou-se uma maior estabilidade das soluções preparadas em solução fisiológica em comparação com as amostras diluídas em solução glicosada.

Na Tabela 3.5 estão apresentados os tempos máximos de armazenamento após a reconstituição de cada um dos fármacos em estudo, de acordo com as orientações contidas nas bulas dos respectivos medicamentos.

Tabela 3.5. Tempos de armazenamento dos antibióticos carbapenêmicos após reconstituição em fluido de infusão, conforme orientações contidas nas suas bulas (JANSSEN PHARMACEUTICALS, 2009; MERCK, 2013; BIOCHIMICO, 2015; ASTRAZENECA, 2015).

<b>Fármaco</b>	<b>Fluido de infusão</b>	<b>Temp. Ambiente</b>	<b>4 °C</b>
Imipenem	Cloreto de sódio 0,9%	4 horas	24 horas
	Solução Glicosada 5%	4 horas	24 horas
Meropenem	Cloreto de sódio 0,9%	10 horas	48 horas
	Solução Glicosada 5%	3 horas	18 horas
Doripenem	Cloreto de sódio 0,9%	12 horas	72 horas
	Solução Glicosada 5%	4 horas	24 horas

Mesmo com número elevado de artigos científicos envolvendo a estabilidade de carbapenemas, nota-se a ausência de estudos com o foco nos produtos de degradação pós-reconstituição, que podem ser formados durante o período que compreende o preparo dos fármacos (reconstituição e diluição em diferentes fluidos para infusão) até sua administração a partir bolsas de infusão. Cientes de que a degradação de um produto farmacêutico acarreta em sérias consequências, comprometendo sua eficácia e segurança, o estudo do perfil de degradação pós-reconstituição constitui um aspecto de suma importância, que cada vez mais ganha à atenção das autoridades e agências regulatórias.



---

**4. Capítulo I: Estabilidade pós-reconstituição do antibiótico imipenem, em condições de uso clínico: desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE, e monitoramento e identificação de produtos de degradação por ESI-Q-TOF.**

---



#### **4. Capítulo I: Estabilidade pós-reconstituição do antibiótico imipenem, em condições de uso clínico: desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE, e monitoramento e identificação de produtos de degradação por ESI-Q-TOF.**

##### **4.1. Introdução**

O imipenem foi o primeiro antibiótico carbapenêmico a ser aprovado para terapia clínica em seres humanos, em 1985. Por apresentar amplo espectro de ação, proporciona tratamento seguro e eficaz em casos de infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BIRNBAUM et al., 1985; MARTÍNEZ et al., 2010). Métodos para a determinação quantitativa do imipenem são reportados em trabalhos científicos, com destaque para os métodos cromatográficos para determinação do fármaco em matéria prima (SMITH et al., 1990; MÉNDEZ et al., 1991; ABDEL-MOETY et al., 2010). Para a quantificação do fármaco em sua forma farmacêutica, com a presença da cilastatina, Forsyth e Ip (1994) desenvolveram um método por espectrofotometria ultravioleta, utilizando método matemático de derivação dos espectros (primeira derivada). Também para quantificação do fármaco, em forma farmacêutica, a Farmacopeia Americana (USP 37, 2014) descreve uma metodologia por CLAE, utilizando como fase móvel uma solução de 1-heptanosulfonato de sódio (0,2%) preparada em tampão fosfato de potássio pH 6,8; coluna C-18 (4,6 mm x 30 cm); forno de coluna a 50 °C; e vazão à 2 mL/min.

Para estudos focados na estabilidade físico-química do imipenem, Smith e colaboradores (1990) determinaram a cinética de degradação do fármaco em soluções aquosas, em ampla faixa de pH (4,0 a 9,5), e realizaram a identificação e a proposição de rotas de degradação. Os autores sugerem que em pH fracamente ácido ocorre um processo de oligomerização, iniciado pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico. No caso de soluções fracamente alcalinas, as principais reações envolvem a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e do grupo formínidoil presente em sua cadeia lateral. Swanson e colaboradores (1986)

estudaram os parâmetros cinéticos da degradação do fármaco, quando o mesmo é reconstituído em solução salina e em soro. Em ambas as condições o fármaco apresenta uma cinética de degradação de primeira ordem, com energia de ativação de 17 kcal/mol, valor característico para reações de hidrólise.

Sabendo que a eficácia e a segurança de um produto farmacêutico está intimamente relacionada à sua estabilidade, e considerando a ausência de trabalhos com o foco em produtos de degradação formados durante a utilização clínica desde medicamento, o presente trabalho tem como objetivo estudar a estabilidade do imipenem em condições que mimetizem sua utilização clínica. Para as análises quantitativas, é proposto um método indicativo de estabilidade por CLAE, como uma alternativa ao método farmacopeico. Propõe-se o uso da técnica por espectrometria de massas de alta resolução, para monitorar a formação de produtos de degradação e propor suas respectivas estruturas químicas.



---

**4.2. Artigo científico: Stability and degradation products of imipenem applying high-resolution mass spectrometry: An analytical study focused on solutions for infusion.**

**Biomedical Chromatography. v. 33, Issue 4, p. e4471. 2019**

---



#### 4.2.1. Abstract

Carbapenems show recognized instability in aqueous solutions, therefore some care must be taken from its handling and preparation to its use in the hospital environment. Here, the stability and degradation products of imipenem were investigated from conditions that simulate its clinical use. For this, a simple stability-indicating method by HPLC-DAD was validated with focus on quantitation of drug concentration remaining from infusion solutions (sodium chloride 0.9% and glucose 5%). The degradation products formed were identified by high-resolution mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS/MS), being detected the ions  $[M + H]^+$  at  $m/z$  318 (DP-1),  $m/z$  599 (DP-2) and  $m/z$  658 (DP-3). The most probable elemental compositions were obtained with a high degree of confidence, where the error between the masses observed and calculated was 1.25 ppm for DP-1, -0.33 ppm for DP-2 and 1.82 ppm for DP-3. DP-1 degradation product is resulted from cleavage of  $\beta$ -lactam ring; DP-2 corresponds to the drug dimer; and DP-3 is generated from interaction between imipenem and cilastatin. The proposed method provides a safe and reliable alternative for the quantitation of imipenem, and the stability data obtained by ESI-Q-TOF have helped to better understanding about drug behavior under conditions of clinical use.

**Keywords:** Imipenem, Stability, Degradation Products, Stability-indicating method, High-Resolution Mass Spectrometry.

#### 4.2.2. Introduction

Imipenem (Figure 4.1) is the first carbapenem antibiotic to be approved for clinical therapy in humans, in 1985. It is a broad-spectrum antibiotic, which provides safe and effective treatment of infections caused by Gram-negative and Gram-positive bacteria (Martínez et al., 2010; Moellering et al., 1989). Due to its instability against renal enzyme dehydropeptidase I (DHP-I), it is marketed in combination (1:1) with an inhibitor of this enzyme, the cilastatin (Martínez et al., 2010; Moellering et al., 1989). Chemically, imipenem is (5R,6S)-3-[[2-(formimidoylamino) ethyl]thio]-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2 carboxylic acid, with molecular formula  $C_{12}H_{17}N_3O_4S$  and molecular weight 299.35; the drug is marketed as a white to slightly yellowish off-white crystalline powder for reconstitution and injection in aqueous solution (USP, 2014).

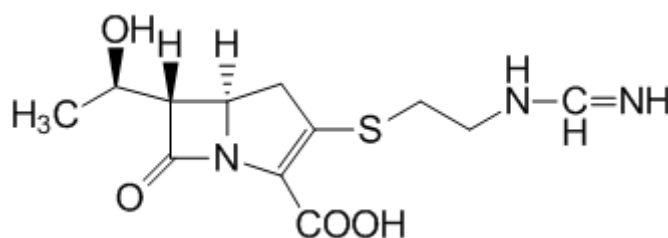


Figure 4.1. Chemical structure of imipenem

Studies focused on stability of imipenem are described in the literature. In a paper published by Smith and collaborators (1990), the drug stability in aqueous solutions is evaluated in a broad pH range, being identified three degradation products through nuclear magnetic resonance, among these products, two are generated from imipenem dimers; the authors also presented the chemical routes of degradation. Mendez et al. (1991) studied the catalytic effect of different buffers on degradation of imipenem in aqueous solutions, estimating the activation energy at different pH values, through the Arrhenius equation. With focus on chemical kinetics, Swanson et al. (1986) studied the drug degradation kinetics when reconstituted in serum and saline, being verified a chemical behavior following first order reaction. However, modern analytical tools like mass spectrometry are not well explored during investigation of imipenem stability in clinical routine conditions. Moreover, nowadays many

different laboratories are producing imipenem in powder for injection, becoming useful a more scientific exploration about its stability during handling and storage.

Stability studies and degradation products in pharmaceutical formulations are an important aspect to be addressed, since the efficacy and safety of these formulations are intimately related to their stability, where small chemical or physical changes can compromise the pharmacological effect and, in some cases lead to adverse effects. In Brazil, recently the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) established limits for the presence of impurities and degradation products in pharmaceutical products (ANVISA, 2015). This document is in agreement with ICH (International Conference on Harmonisation), which provides specific guidelines for stability (Q1) and impurities (Q3). The limits for impurities are applied for degradation products formed during long-term stability, not being mentioned for extemporaneous preparations like imipenem.

In the present work, imipenem was investigated in order to know the stability in the most common infusion solutions used in clinics. For drug quantitation, a simple stability-indicating HPLC-DAD method was purposed. To study the degradation products in terms of chemical identification, a high resolution mass spectrometry was applied, using ESI-Q-TOF.

#### **4.2.3. Materials and methods**

##### *4.2.3.1. Chemicals and reagents*

Imipenem reference standard (85.5 %) was purchased from Sigma-Aldrich Inc. (Laramie, WY, USA), and the imipenem drug product (imipenem: cilastatin 500 mg) was purchased from Antibióticos do Brasil Ltda (Cosmópolis, SP, Brazil). Acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA); sodium hydroxide and hydrogen peroxide were purchased from Synth (São Paulo, Brazil); monobasic sodium phosphate and hydrochloric acid were purchased from Química Moderna (Barueri, SP, Brazil). Purified water was obtained using a Milli-Q Plus® system (Millipore, Bedford, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

#### *4.2.3.2. Instrumentation and analytical conditions*

The RP-HPLC method was performed on a Prominence<sup>®</sup> Liquid Chromatograph Shimadzu, equipped with a degasser DGU-20A5, LC-20 AC pump, SIL-20 AC autosampler, SPD-M20A PDA detector and CTO-20 AC column oven (Shimadzu, Kyoto, Japan). LC Solution V. 1.24 SP1 system software was used to control the equipment and to calculate data and responses from the LC system.

The chromatographic analysis was performed using ODS-Hypersil Thermo Scientific C-18 column (250 mm × 4.6 mm i.d, 5 µm particle size) (Bellefonte, United States). The column oven was kept at 25 °C and the analyses were performed in a gradient elution mode with the flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. A gradient mobile phase system consisting of solvent A (10 mmol L<sup>-1</sup> monobasic phosphate buffer (pH 6.8):acetonitrile, 99:01 v/v) and solvent B (acetonitrile). Gradient program consisting of 0 - 5 min 0 % solvent B, 5 - 20 min linear gradient up 20 % solvent B. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and sonicated before use. The wavelength of the UV–Vis detector was set to 300 nm and the injection volume was 20 µL.

#### *4.2.3.3. Standard and sample preparation*

A stock solution standard of imipenem was prepared at 100 µg mL<sup>-1</sup>. For it, 10 mg of imipenem standard reference were weighed and dissolved in a 100 mL volumetric flask with purified water. From this solution, different concentrations of analytical solutions were obtained by successive dilutions. For samples solutions, an accurately weighed amount of drug powder equivalent to 10 mg was obtained from a sample pool that had been previously weighed, following the same procedure described above for standard reference.

#### *4.2.3.4. Stability-indicating method by RP-HPLC*

The HPLC-DAD method was validated according to official guidelines, applying the recommended protocols for each validation parameter (ICH, 2005).

The specificity was determined through forced degradation study. The conditions were heat, humidity, oxidation, photolysis and neutral, alkaline and acid hydrolysis. For all stress conditions tested, the study was conducted to obtain a decay of at least 10 % of the initial content of imipenem, maintaining the degradation in the range of 10 to 30 %. Considering the difference on drug susceptibility when exposed to each degradation factor, the decomposition time was different depending each one. Considering that high concentrations favor the formation of dimeric degradation products, the samples were exposed to degradation at the concentration of clinical use at  $5.0 \text{ mg mL}^{-1}$ , and after the degradation period, they were diluted to the concentration of analysis.

#### *Thermal degradation*

Imipenem drug product (imipenem + cilastatin 500 mg) in solid form was exposed to the dry heat of  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in an oven for 10 days. After the degradation time, the sample was prepared in ultrapure water and diluted the concentration of analysis ( $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### *Humidity*

For exposure of the drug to conditions of high humidity, the samples in solid form were packed in open flasks and stored in silica-free glass desiccator, in an oven at  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 12 hours. At the bottom of the desiccator was added 250 mL of a supersaturated solution of NaCl (40%), obtaining the environment in around 75% RH (measured by hygrometer). After the degradation period, the sample was prepared in ultrapure water and diluted the concentration of the analysis.

#### *Neutral, acid and alkaline hydrolysis*

Imipenem samples were reconstituted in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl or  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH at a concentration of  $5.0 \text{ mg mL}^{-1}$  and then diluted to  $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  using ultrapure water. The reaction times were 10 min to acid degradation, and 5 min the alkaline degradation. For neutral hydrolysis, the imipenem sample was reconstituted in ultrapure water at a concentration of  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  and stored at  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 6 hours. After the degradation time, the sample was diluted using ultrapure water the concentration of  $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### *Oxidation*

For oxidation study it was prepared a sample solution at 5.0 mg mL<sup>-1</sup> with a hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%. The reaction time was 20 min, and after the degradation time, the sample was diluted to 30 µg mL<sup>-1</sup> in ultrapure water.

### *Photolysis*

Two milliliters of a solution containing 5.0 mg mL<sup>-1</sup> of imipenem was placed in a closed 1 cm quartz cell, which was exposed to a UVC chamber for 5 h. After the degradation time, the sample was diluted to 30.0 µg mL<sup>-1</sup> in ultrapure water and immediately analyzed.

In addition, the method robustness was studied by applying the Plackett-Burman experimental design, which uses a factorial analysis that allows varying a series of parameters that can interfere in the analysis, in a reduced number of experiments and makes possible to determine the effect of each of the conditions tested in the chromatographic system (Heyden et al., 2001). To perform the robustness test through the Plackett-Burman experimental design, it is necessary to establish the normal parameters of the analysis. And from the normal parameters, small changes are made at a level above and a level below for each factor evaluated. The conditions tested for robustness are described in Table 4.1.

Table 4.1. Factors and levels studied in the robustness test applied to development of quantitative HPLC-DAD for imipenem.

<b>Factor</b>	<b>Level (-)</b>	<b>Nominal</b>	<b>Level (+)</b>
pH	6.6	6.8	7.0
% Initial of acetonitrile	0.8 %	1.0 %	1.2 %
λ Detection	297 nm	300 nm	303 nm
Flow rate	0.9 mL min <sup>-1</sup>	1.0 mL min <sup>-1</sup>	1.1 mL min <sup>-1</sup>
Temperature	20 °C	25 °C	30 °C
Column	Thermo <sup>®</sup>	Thermo <sup>®</sup>	Shimadzu <sup>®</sup>



It was used an experimental design of 11 factors (N = 12). After determination of the number of real factors to be examined, the remaining columns in the design were defined as dummy factors, as shown in Table 4.2. Dummy factor is an imaginary factor for which the change from one level to the other has no physical meaning (Heyden et al., 2001), and the dummy factors were used to calculate the estimated experimental error.

Table 4.2. Plackett–Burman design to determine the robustness of the analytical HPLC-DAD method for imipenem quantitation.

Exp.	pH	Dummy	Detection	Flow	Dummy	Dummy	Dummy	Column	% ACN	Temp.	Dummy
1	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-
2	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+
3	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-
4	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-
5	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-
6	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+
7	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+
8	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+
9	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-
10	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+
11	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+
12	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-

#### 4.2.3.5. Stability in clinical use

The stability of imipenem (imipenem:cilastatin 500 mg) in infusion solutions was assessed under room-temperature conditions (25°C ± 2°C) and under refrigerated conditions (2 - 8°C). The infusion solutions were prepared at concentration of 5.0 mg mL<sup>-1</sup>, using sodium chloride 0.9% and glucose 5%. Aliquots were withdrawn at suitable time intervals in the range of 0 to 24 hours (three samples for each time), diluted to the concentration of 50 µg mL<sup>-1</sup> and analyzed by HPLC method. All solutions were assayed in triplicate.

#### 4.2.3.6. High-Resolution Mass Spectrometer Analysis

The mass spectrometric analysis was performed for imipenem samples stored at 4 and 24 hours, in the conditions described above. The samples were diluted until analytical concentration in formic acid and immediately analyzed on the spectrometer by direct infusion.

The ESI-MS/MS analyses were performed on a micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an ESI interface operating in positive ion mode using a capillary voltage of 4.5 kV. The other optimum values of the ESI-Q-TOF parameters were: drying gas temperature, 200 °C; drying gas flow, 4 L min<sup>-1</sup>, and nebulizing gas pressure 0.4 bar. The detection was made considering a mass range of 20–1000 *m/z* acquired with a spectra rate of 1.00 Hz. Nitrogen was used as drying and nebulizing gas.

The mass spectrometer was calibrated through a solution of sodium formate (10mM) in positive mode, and the mass data were processed using Data Analysis 4.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### 4.2.4. Results and discussion

#### 4.2.4.1. Stability-indicating method by RP-HPLC

The purposed method uses simple analytical conditions, with common mobile phase and programming a gradient elution for short drug retention. In the development of the chromatographic method, the system suitability was evaluated by series of parameters as theoretical plates (N), retention factor (*k'*), peak asymmetry or tailing factor (T) and resolution (R). The Figure 4.2 illustrates the representative chromatograms from analyses of imipenem reference standard and commercial sample. Imipenem was retained at 7.80 minutes, well separated from cilastatin, which is detected in 254 nm.

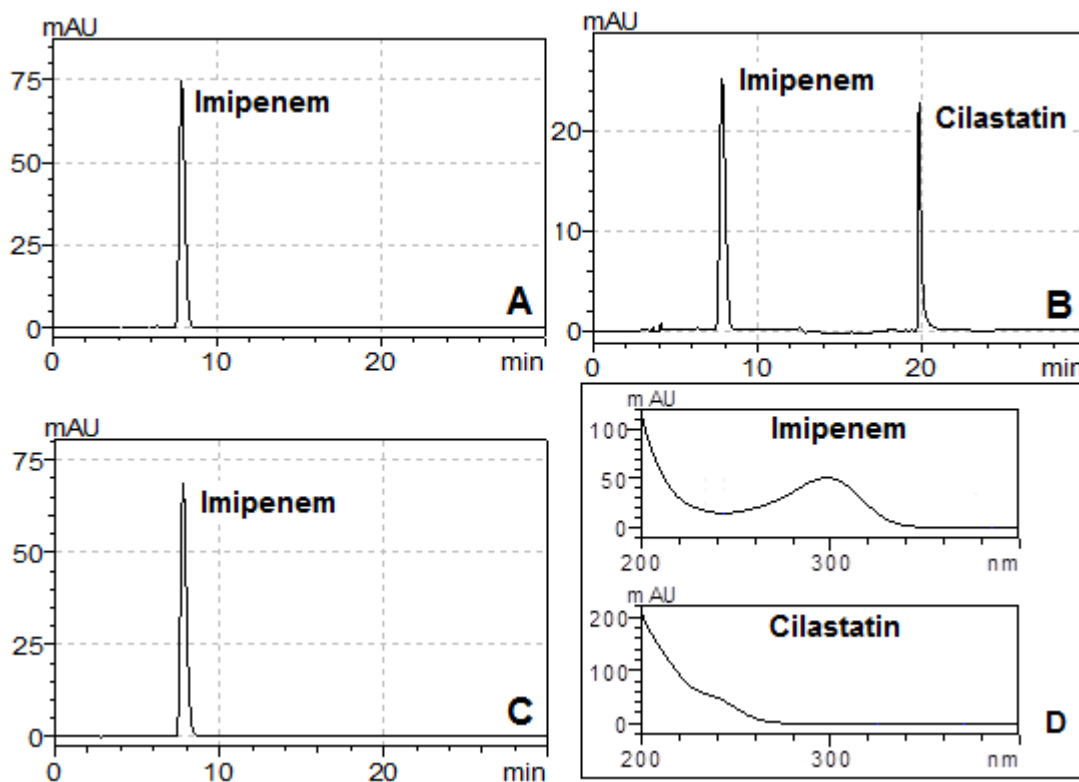


Figure 4.2. Representative chromatograms obtained from analysis of imipenem:cilastatin commercial sample. Detection at 300 nm (A); imipenem:cilastatin sample detected at 254 nm (B); imipenem reference standard detected at 300 nm (C); UV spectrum for imipenem and cilastatin obtained from DAD detector (D). All solutions were worked at  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.2.4.1.1. Specificity and forced degradation

For the specificity, The Figure 4.3 shows illustrative chromatograms referred to degraded samples and eventual degradation products detected in each condition. Analysis of the chromatographic peak purity demonstrated that in all tested conditions there was no co-elution of the products formed by both the degradation of imipenem and the possible degradation of cilastatin, classifying the method as specific for assaying the drug in the pharmaceutical formulation.

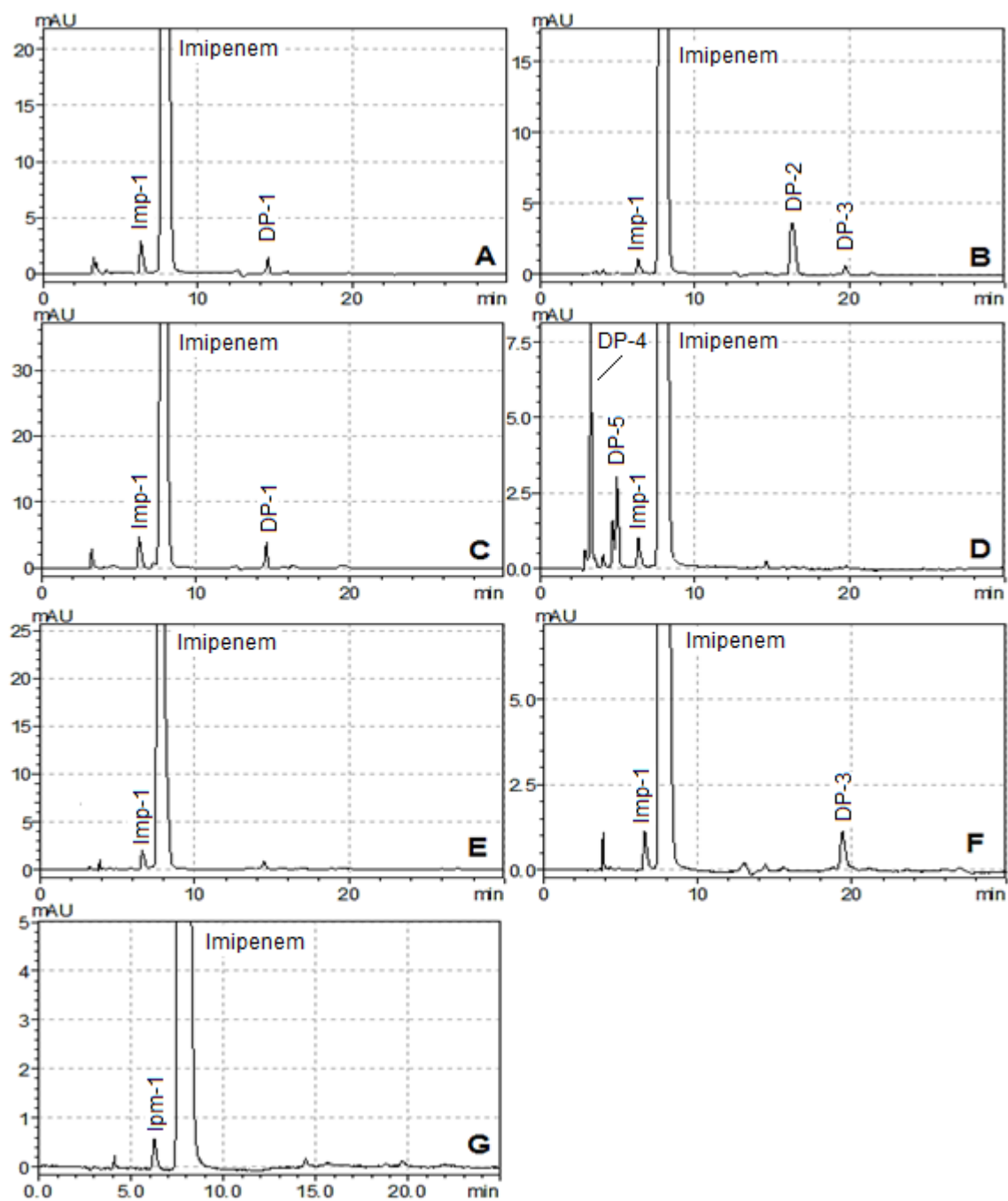


Figure 4.3. Chromatograms obtained from HPLC-DAD analysis of imipenem sample after forced degradation. (A) alkaline hydrolysis (NaOH 0.01 mol L<sup>-1</sup>; 5 min); (B) Acid hydrolysis (HCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>; 10 min); (C) Neutral hydrolysis (H<sub>2</sub>O; 6 hours, 35 °C); (D) Oxidative degradation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%; 20 min); (E) Photolytic degradation (UV-C light; 5 h); (F) Humidity (75 % HR; 40 °C, 12 h); (G) Thermal degradation (60 °C; 10 days).

In all chromatograms, it is possible to observe a peak at 6 min (Figure 4.3), which is also present in the non-degraded samples. This peak is also visualized in the standard chromatograms, being possibly attributed to thienamycin, the main impurity (Imp-1) reported for imipenem.

When exposed to acid and alkaline hydrolysis, the drug showed an extensive degradation even in a short period. Under alkaline conditions, drug decomposition was immediate (approximately 30% of its initial content in 5 min; Figure 4.3A). The same behavior is also reported for other carbapenems such as doripenem and meropenem (Barbosa et al., 2017; Mendez et al., 2008). For the former it was demonstrated a high rate of degradation even at low concentrations of sodium hydroxide whose decomposition resulted in the degradation product characterized as  $\beta$ -lactam ring-opened derivative (Mendez et al., 2003; Mendez et al., 2008). After acid hydrolysis, two degradation products at 16.10 and 19.90 min could be detected (Figure 4.3B). Imipenem also showed rapid degradation in neutral hydrolysis, being observed a residual drug content of 90% after 6 hours (Figure 4.3C). The effect of temperature was assessed by exposing the drug to dry heat (Figure 4.3G) and under conditions of humidity (75%) (Figure 4.3F), with highlights to degradation product at 19.90 min formed under high humidity conditions. In the oxidative condition (hydrogen peroxide 3%), the drug content was reduced approximately 30% in a period of 20 min, leading to the formation of more polar degradation products (Figure 4.3D). When exposed to photolysis, the remaining drug content was 90% after 5 h (Figure 4.3E).

#### 4.2.4.1.2. Linearity, Precision and Accuracy

The results from the development of quantitative method are summarized in Table 4.3. The linearity evaluation through statistical tool by ANOVA showed good performance in the concentration range worked (Table 4.3), in addition, the residual plots demonstrated the absence of outliers, and the Cochran C-test indicated homoscedasticity of residuals variance ( $C_{\text{calculated}} = 0.490 < C_{\text{critical}} = 0.684$ ). The study also took into account the percentage magnitude of the intercept in relation to the concentration of analysis; the intercept presented a value of 0.97%. For the precision and accuracy parameters, the analytical data obtained showed a good reproducibility between analyses, in all validation

parameters investigated (Table 4.3). Spiked amounts were also quantitated with reliability in the linearity range, showing accuracy (mean recovery = 99.46-100.34%).

Table 4.3. Analytical results obtained from linearity, precision and accuracy of the RP-HPLC method validated for determination of imipenem in drug product.

Parameter	Results	
Linearity		
Calibration range	10.0 – 50.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Regression equation	$y = 45590x + 13473$	
Slope $\pm$ standard deviation	45590 $\pm$ 182.05	
Intercept $\pm$ standard deviation	13473 $\pm$ 168.02	
Correlation coefficient (r)	0.9999	
Standard error of regression	0.57 %	
(ANOVA) Linear regression	$(F_{\text{calculated}} = 187808 > F_{\text{critical}} = 4.96; p = 0.05)$	
(ANOVA) Deviation the linearity	$(F_{\text{calculated}} = 3.5 < F_{\text{critical}} = 3.71; p = 0.05)$	
Precision	Amount %	RSD
Day 1 <sup>a</sup>	99.52	0.91
Day 2 <sup>a</sup>	99.95	1.33
Day 3 <sup>a</sup>	99.29	1.11
Inter-Day <sup>b</sup>	99.68	1.10
Accuracy	Mean of recovery (%) <sup>c</sup>	RSD
Spiked amount ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
4.20	100.34	0.89
10.50	99.69	0.71
16.80	99.46	1.19

<sup>a</sup> Six independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup> Mean obtained from precision in different days.

<sup>c</sup> Three replicates for each level.

#### 4.2.4.1.3. Robustness

The robustness, assayed using the experimental Plackett-Burman design, allowed to evaluate the effect from several factors that interferes in the chromatographic analysis (Table 4.4). The proposed stability-indicating method by HPLC-DAD can be considered robust because none of the factors studied had a significant effect on the quantification of imipenem ( $\alpha = 0.05$ ).

Table 4.4. Results of effects and  $t$  calculated for each factor during robustness testing of HPLC-DAD method for quantitation of imipenem in commercial sample.

<b>Factor</b>	<b>Effect</b>	<b><math>t</math> calculated</b>
pH	-0.63	1.27
% Initial of acetonitrile	-0.46	0.93
$\lambda$ Detection	-0.14	0.28
Flow rate	0.94	1.90
Temperature	0.32	0.65
Column	0.12	0.25

$t_{\text{tab}}(0.05; 5) = 2.57.$

#### 4.2.4.2. Stability in clinical use and Degradation products by ESI-MS/MS

In the present study, imipenem showed a tendency for greater degradation in glucose 5 % infusion solutions (Table 4.5), being in accordance to the publication from Bigley et al. (1986). These authors also reported imipenem is more stable in 0.9% sodium chloride injection, like observed in our experiments, and the pH values generally decreased during the study period, which may be due the hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring and formation of a carboxylic acid. This trend has already been described for meropenem and doripenem (Barbosa et al., 2017; Mendez et al., 2008), where there is also a relationship between the increase in the degradation rate and drug concentration (Mcquade et al., 2004; Patel and Cook, 1997; Psathas et al., 2008).

Table 4.5. Analytical results of residual drug concentration obtained from stability of imipenem in infusion solutions stored at room temperature and under refrigeration.

Diluent and temperature	% Initial concentration remaining <sup>a</sup>					
	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
<b>NaCl 0.9 % for injection</b>						
<b>2 – 8 °C</b>	99.78	99.66	99.48	98.40	89.44	84.78
	± 0.68	± 0.10	± 0.89	± 1.37	±1.60	±0.17
<b>25 ± 2 °C</b>	99.78	98.00	95.03	87.63	82.02	80.02
	± 0.68	± 1.44	± 1.23	± 1.25	± 0.98	± 0.68
<b>Gluc. 5 % for injection</b>						
<b>2 – 8 °C</b>	100.19	97.21	94.77	93.06	80.66	78.36
	± 0.77	± 1.31	± 1.93	± 2.28	± 0.40	± 2.80
<b>25 ± 2 °C</b>	100.19	96.45	93.12	85.23	79.66	69.13
	± 0.77	± 1.25	± 1.39	± 1.18	± 0.84	± 2.71

<sup>a</sup> Mean ± S.D. of three triplicate samples.

Figure 4.4 shows representative chromatograms from infusion samples containing the drug. It is possible to observe a similar chromatographic profile with two degradation products highlighted, being one more polar than imipenem with a retention time of 3.00 min, named DP-6, and another product with a retention time near 14.00 min, similar to the retention presented by DP-1 in the stress study (section 4.2.3.1.1). It is also possible to visualize the imp-1 mentioned in the stress study (section 4.2.3.1.1).



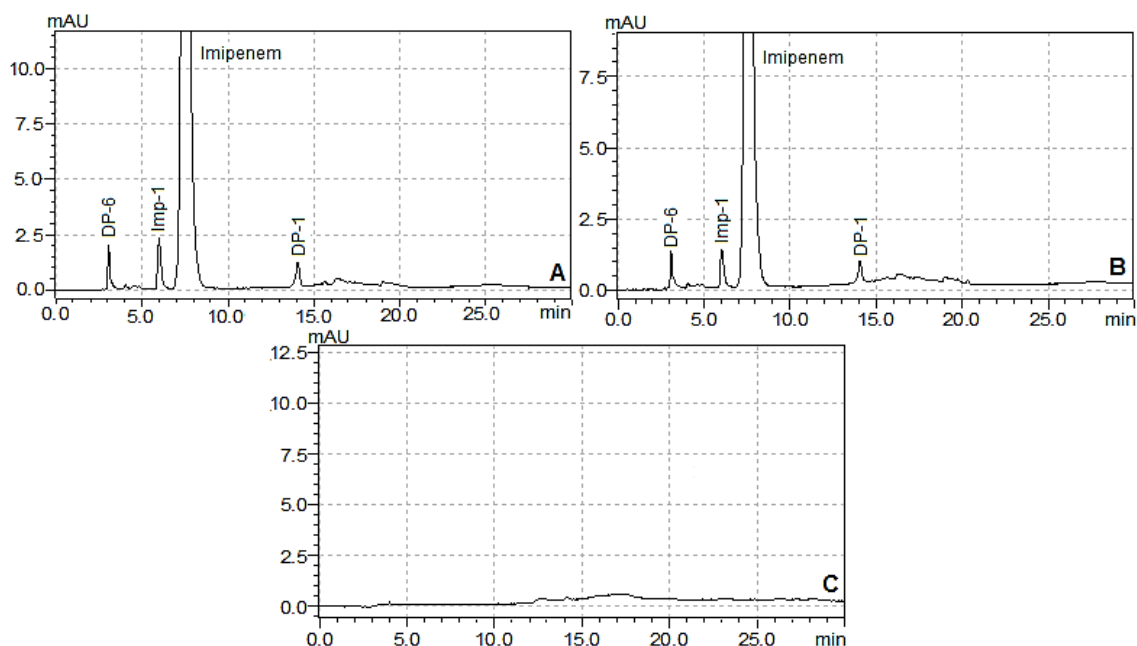


Figure 4.4. Chromatograms obtained from HPLC-DAD analysis of imipenem after storage under clinical conditions. (A) Sample prepared on glucose 5 %, 24 hours; (B) Sample prepared on NaCl 0.9%, 24 hours; (C) Baseline of the gradient method, without sample.

The ESI-MS/MS experiments were performed to characterize the major degradation products formed under storage conditions tested. Although imipenem has a higher drug content decrease when prepared on glucose 5%, the analysis by mass spectrometry showed no structural difference between the degradation products formed as compared to the degradation products formed in sodium chloride 0.9 %.

Based on the  $m/z$  values of their  $[M+H]^+$  ions and the MS/MS data, the most probable structures have been proposed for the degradation products. Among the detected compounds, stand out the degradation products of  $m/z$  318 (DP-1), 599 (DP-2) and 658 (DP-3). The most probable elemental compositions of these degradation products were obtained with a high degree of confidence, where the error between the masses observed and calculated was 1.25 ppm for DP-1, -0.33 ppm for DP-2 and 1.82 ppm for DP-3 (Table 4.6). Among the degradation products found, DP-1 and DP-2 corroborate with some studies already published in the literature (Sun et al., 2009; Smith et al., 1990).

The ESI-MS/MS spectra of DP-1 and DP-2  $[M+H]^+$  ions are shown in Figure 4.5, and the respective chemical structures, as well as the possible fragmentation pathway, are expressed in Figures 4.6 and 4.7. DP-1 degradation product is formed by  $\beta$ -lactam ring hydrolysis, known and already described reaction for carbapenems, and corresponds to the primary metabolite of imipenem (R)-5-((1S,2R)-1-carboxy-2-hydroxypropyl)-3-((2-formimidamido ethyl)thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid. In addition, the fragments  $m/z$  274, 172 and 103 (Figure 4.6) obtained in the MS/MS experiment indicate no changes in the N-formimidoyl group.

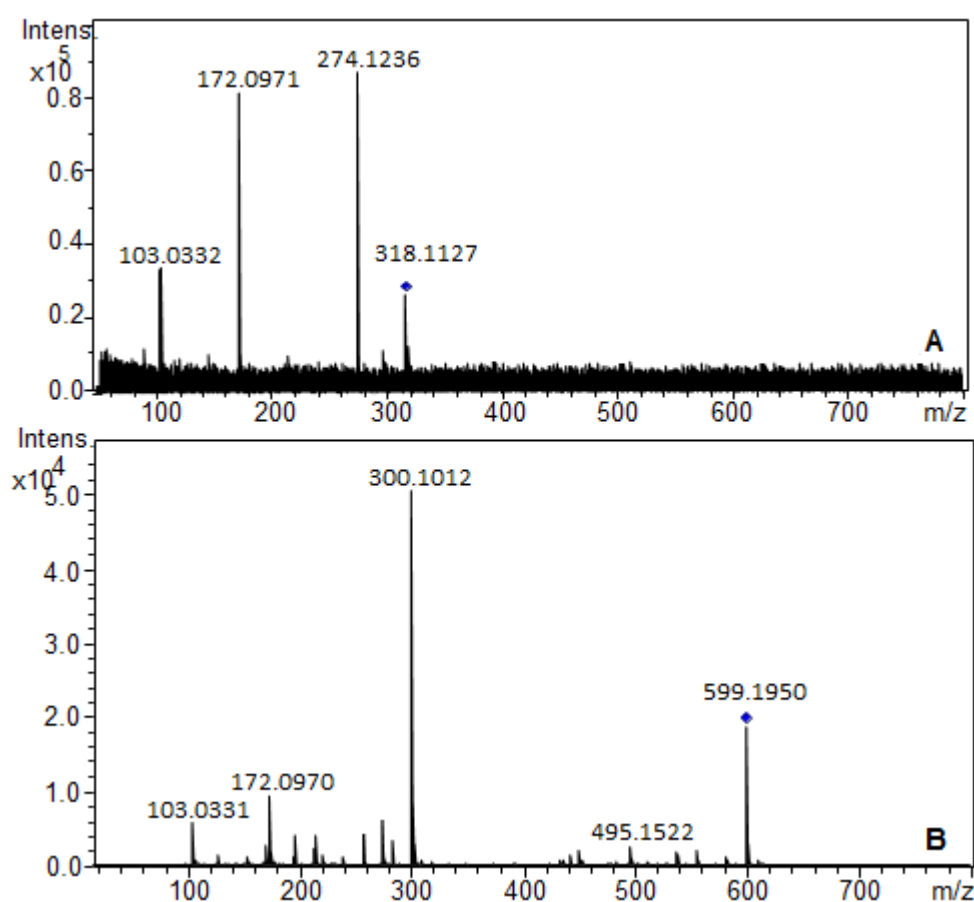


Figure 4.5. ESI-MS/MS spectra of  $[M+H]^+$  ions from imipenem degraded samples: DP-1 at 10 eV (A); DP-2 at 30 eV (B).

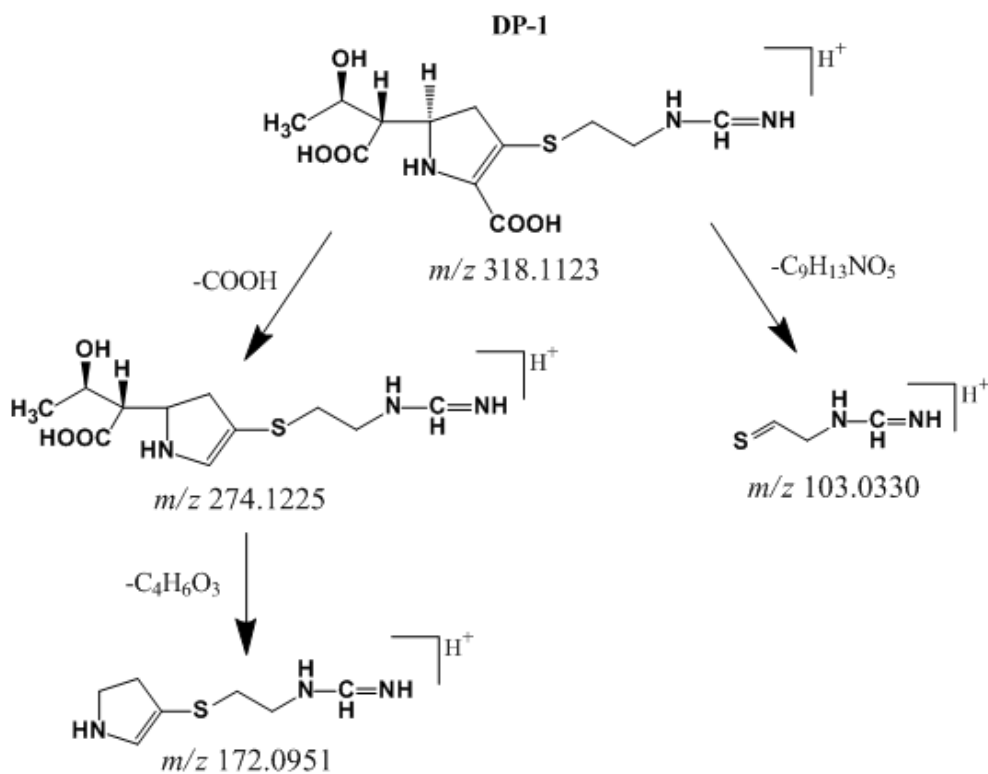


Figure 4.6. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated DP-1, identified from MS analysis of imipenem degraded samples.

The degradation product DP-2 is a drug dimer, chemically named 5-(1-carboxy-2-hydroxypropyl)-3-((2-formimidamidoethyl)thio)-1-(3-((2formimidamido ethyl)thio)-6-(1-hydroxyethyl)-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carbonyl) 4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid. It is obtained primarily by intramolecular reactions, as hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring followed by an intermolecular reaction between the carboxylic acid and the ring nitrogen (Figure 4.7). This formation process is reported by Smith et al. (1990), and this dimerization reaction is well known for carbapenems, which is favored by high concentrations for infusion.

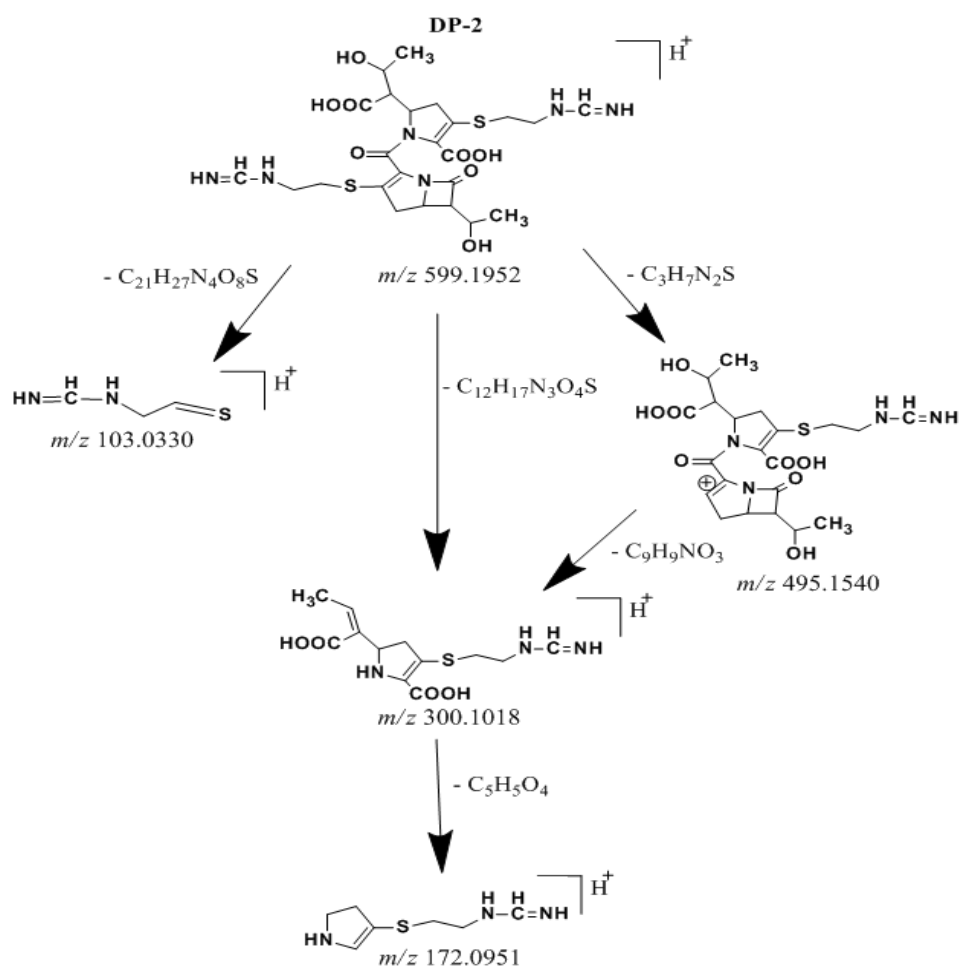


Figure 4.7. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated DP-2, identified from MS analysis of imipenem degraded samples.

For DP-3 degradation product ( $m/z$  658), the  $[M+H]^+$  value and the data obtained from MS/MS experiment (Figure 4.8) indicate this compound comes from the chemical bond between a hydrolyzed imipenem and cilastatin. When a low collision energy (10 eV) is used, the dissociation of precursor ion  $m/z$  658 is observed in two products ions  $m/z$  300 and  $m/z$  359, corresponding to imipenem and cilastatin, respectively. Using collision energy of 20 eV it is observed a product ion  $m/z$  614 (loss of COOH), and at 30 eV it is observed ions originating from imipenem fragmentation. These energy variations were used strategically to generate further insights about the chemical structure of the degradation product. In Figure 4.9, it is shown the proposed chemical structure for DP-3 and its fragments obtained by MS/MS. Due to the different possibilities for connection between the molecules, it is necessary to perform complementary analyzes to confirm the binding site. DP-3 is chemically named

(5R)-1-((Z)-7-((2-amino-2carboxyethyl)thio)-2-(2,2 dimethylcyclo propane carboxamido) hept-2-enoyl)-5((1S,2R)-1-carboxy-2-hydroxypropyl)-3-((2-formimidamidoethyl)thio)-4,5 dihydro -1H-pyrrole-2-carboxylic acid.

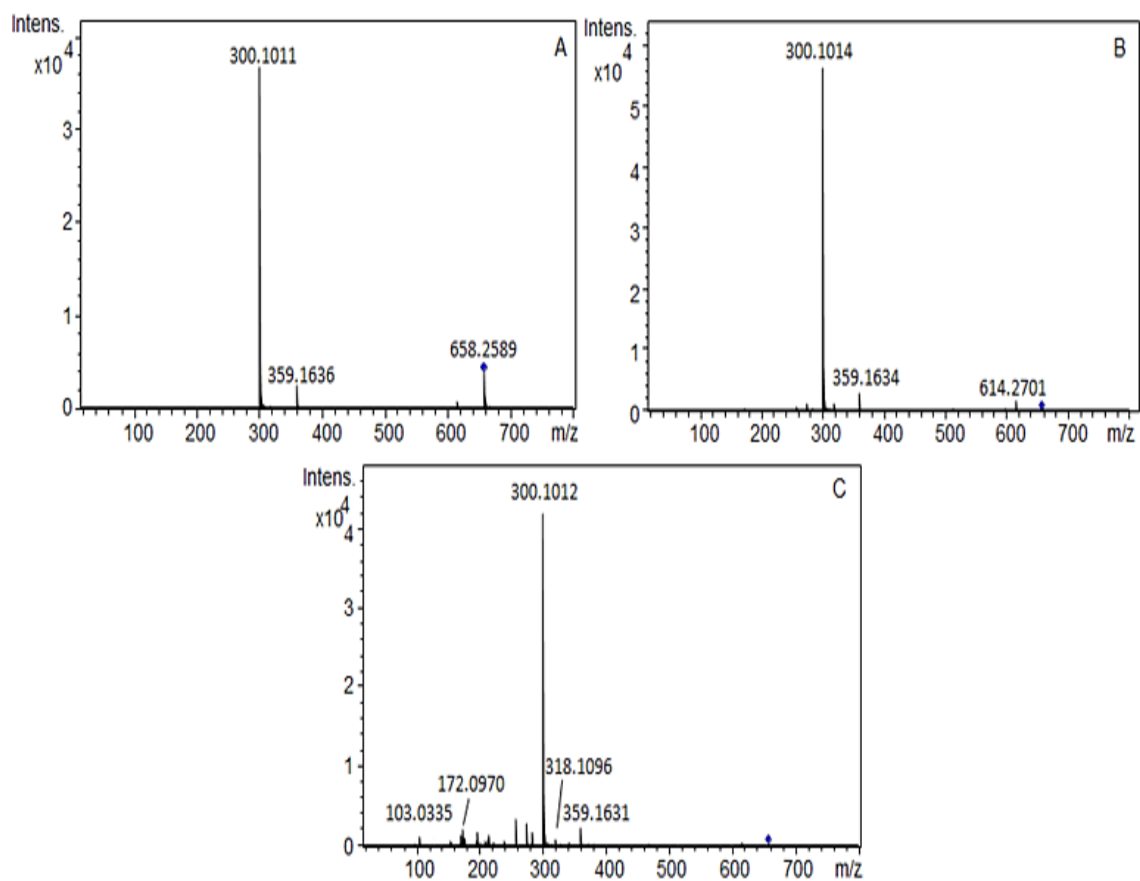


Figure 4.8. ESI-MS/MS spectra of [M+H]<sup>+</sup> ions from imipenem degraded samples: DP-3 at 10 eV (A); 20 eV (B); 30 eV (C).

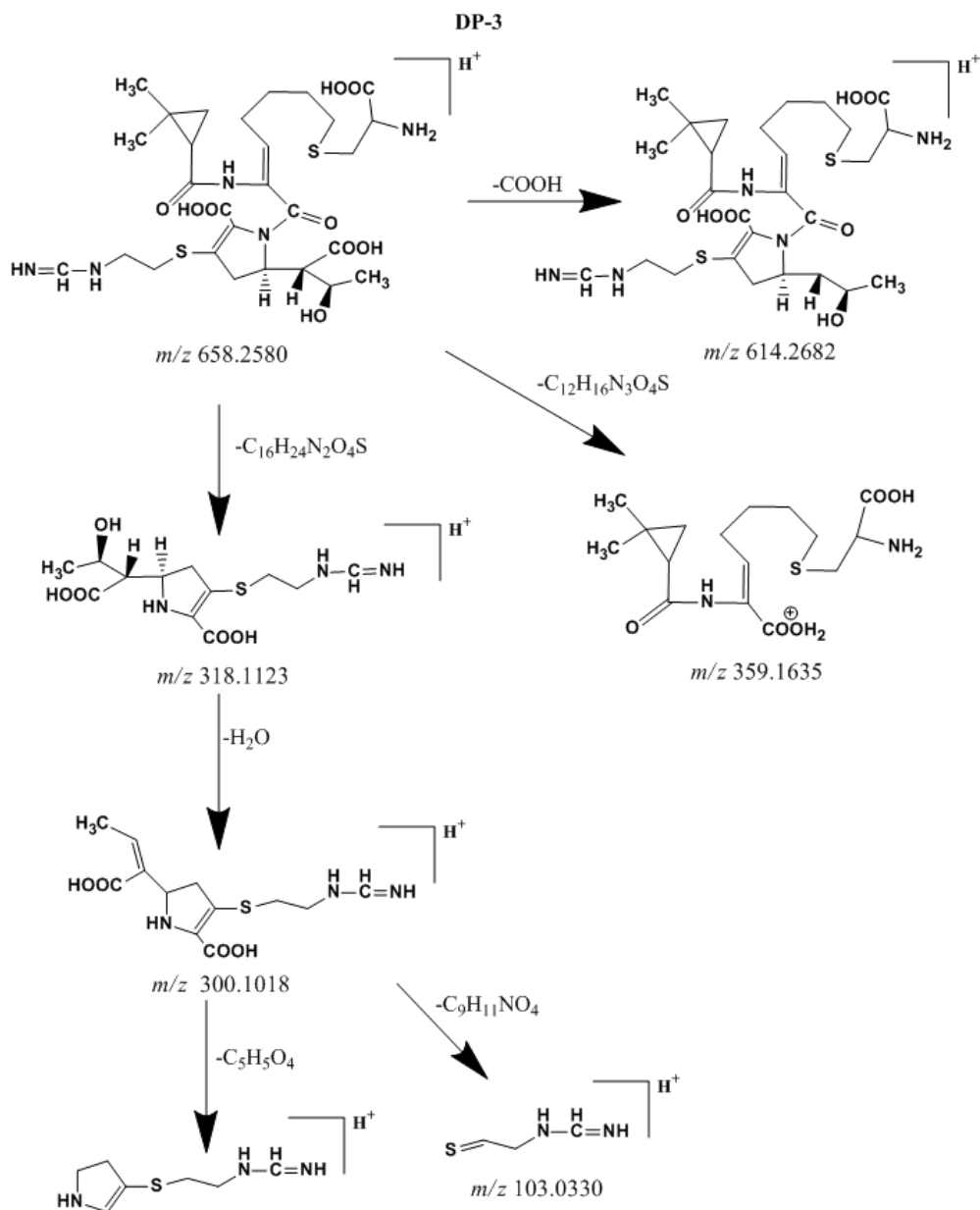


Figure 4.9. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated DP-3, identified from MS analysis of imipenem degraded samples.

Table 4.6. High resolution mass spectrometry (HRMS) data from product ions of protonated imipenem degradation products.

	<b>Molecular Formula [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Observed <i>m/z</i></b>	<b>Calculated <i>m/z</i></b>	<b>Error (ppm)</b>
DP-1	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sup>+</sup>	318.1127	318.1123	1.25
	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sup>+</sup>	274.1236	274.1225	4.04
	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	172.0971	172.0951	11.21
	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	103.0332	103.0330	1.94
DP-2	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	599.1950	599.1952	-0.33
	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S <sup>+</sup>	495.1522	495.1540	-3.63
	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	300.1012	300.1018	-1.99
	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	172.0970	172.0951	11.03
	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	103.0331	103.0330	0.97
DP-3	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	658.2592	658.2580	1.82
	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	614.2698	614.2682	2.60
	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sup>+</sup>	359.1632	359.1635	-0,83
	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S <sup>+</sup>	318.1096	318.1123	-8.48
	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	300.1012	300.1018	-1.99
	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	172.0970	172.0951	11.04
	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	103.0335	103.0330	4.85

#### 4.2.5. Conclusions

The validated HPLC-DAD method was shown to be a reliable and reproducible option for routine analysis of the antibiotic imipenem in drug product. The specificity was proved through forced degradation tests, allowing the unequivocal drug quantitation in stability studies. The evaluation of stability in clinical use conditions showed rapid drug degradation at room temperature, maintaining its content above 90% for only 4 hours. Analyzes by ESI-MS/MS allowed the detection of formed degradation products, with emphasis on three major compounds. The most probable elemental compositions of these degradation products were obtained with a high degree of confidence due to

high mass resolution, and the MS/MS data allowed the proposition of molecular structures.

#### *Acknowledgements*

The authors are grateful to CAPES (Brazil) and CNPq (Brazil) for a research fellowship and for financial support.

#### **4.2.6. References**

Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., Sentochnik, D.E. (1989). The carbapenems: new broad spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 24, 1 – 7.

Martínez, M.J.F., García, M.I.G., Sánchez, E.G., Sánchez. J.E.G. (2010). Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28, 53 – 64.

USP. (2014). *The United States Pharmacopoeia*, 32 ed., Rockville, United States Pharmacopoeial Convention.

Smith, G.B., Dezeny, G.C., Douglas. .A.W (1990). Stability and Kinetics of Degradation of Imipenem in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 79, 732 – 740.

Mendez, R., Alemany, T., Martin-Villacorta. J. (1991). Catalytic Effect of Buffers on Degradation of Imipenem (N-Formimidoylthienamycin) in Aqueous Solution. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 39, 831 – 835.

Swanson, D.J., Deagelis, C., Smith, I.L., Achenthah, J.J. (1986). Degradation kinetics os imipenem in normal saline and in human serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 29, 936 – 937.

ICH. (2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.



Heyden, Y.V., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L. (2001). Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 24, 723 – 753.

Barbosa, F.S., Cassol, J.P., Batista, L.A., Cordeiro, E.W., Santos, M.C., Pohlmann, A.R., Schapoval, E.E.S., Garcia, C.V., Mendez, A.S.L. (2017). Stability of doripenem in reconstituted solution – thermal and oxidative decomposition kinetics and degradation products by LC–MS. *Biomedical Chromatography*, 31, e3940, 1-10.

Mendez, A., Chatagastelles, P., Palm, E., Nardi, N., Schapoval, E. (2008). Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 350, 95 – 102.

Mendez, A.S.L., Steppe, M., Schapoval, E.E.S. (2003). Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 33, 94 – 954.

ANVISA. (2015). Brazilian Health Regulatory Agency. Resolution RDC nº 53, december 4<sup>th</sup>, 2015.

Bigley, F.P., Forsyth, R.J., Henley, M.W. (1986). Compatibility of imipenem-cilastatin sodium with commonly used intravenous solutions. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 43, 2803 – 9.

Patel, P.R., Cook, S.E. (1997). Stability of meropenem in intravenous solutions. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 54, 412 – 21.

Mcquade, M.S., Nostrand, V.V., Shariter, J., Kanike, J.D., Forsyth, R.J. (2004). Stability and compatibility of reconstituted ertapenem with commonly used i.v. infusion and coinfusion solutions. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 61, 38 – 45.

Psathas, P.A., Kuzmission, A., Ikeda, K., Yasuo. S. (2008). Stability of doripenem in vitro in representative infusion solutions and infusion bags. *Clinical Therapeutics*. 30, 2075 – 2087.

Sun, C., Wu, J., Pan, Y. (2009). Characterization of novel hydrolysis products of carbapenems by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 23, 3205 – 3212.

---

**5. Capítulo II: Desenvolvimento de método microbiológico para quantificação do antibiótico imipenem em forma farmacêutica.**

---



## **5. Capítulo II: Desenvolvimento de método microbiológico para quantificação do antibiótico imipenem em forma farmacêutica.**

### **5.1. Introdução**

Os ensaios microbiológicos para a determinação da potência de antibióticos são técnicas oficiais e bem estabelecidas, descritas na Farmacopeia Brasileira, na *British Pharmacopoeia* (BP) e na *United States Pharmacopoeia* (USP). O ensaio microbiológico de antibióticos tem o objetivo de determinar a potência ou atividade de um produto contendo antibiótico comparando a dose que inibe o crescimento de um microrganismo susceptível em relação à dose de uma substância padrão ou preparação biológica de referência do fármaco que produz inibição similar (FB 6, 2019). De acordo com a Farmacopeia Americana (USP 37, 2014), atividade (potência) dos antibióticos pode ser demonstrada sob condições adequadas pelo seu efeito inibitório sobre os microrganismos. Uma redução na atividade antimicrobiana também revelará mudanças sutis não demonstráveis por métodos químicos. Conseqüentemente, os ensaios microbiológicos apresentam-se sempre como uma alternativa válida para a resolução de dúvidas relativas à possível perda de atividade.

Em ambos os compêndios oficiais citados acima, são preconizados dois testes que podem ser utilizados para determinação da potência do antibiótico, o método por turbidimetria e o método por difusão em ágar. O método de difusão em ágar depende da difusão do antibiótico, que é adicionado a um cilindro vertical, através de uma camada de ágar solidificada contendo o microrganismo inoculado, de tal forma que o crescimento do microrganismo seja impedido inteiramente em uma área circular (zona de inibição) ao redor do cilindro no qual foi adicionado o fármaco. Já o método turbidimétrico depende da inibição do crescimento de uma cultura microbiana em uma solução uniforme do antibiótico, em um meio fluido que é favorável ao seu rápido crescimento na ausência do antibiótico (FB 6, 2019; USP 37, 2014).

Para os derivados carbapenêmicos em estudo, estão publicados na literatura métodos microbiológicos para quantificação do meropenem (MENDEZ et al., 2005) e doripenem (FUHR et al., 2013). Para ambos, descreve-se a técnica de difusão em ágar. O método validado por Mendez e colaboradores (2005) utiliza o delineamento de retas paralelas (3 x 3), no qual são adicionados na mesma placa três cilindros contendo a amostra e três cilindros contendo a solução padrão, cada qual com um nível de concentração (baixa, média e alta). Neste trabalho, o microrganismo teste utilizado foi o *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Para o doripenem, Fuhr e colaboradores (2013) também utilizam o delineamento 3 x 3, tendo como microrganismo teste *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Estes métodos microbiológicos se apresentam como alternativas aos métodos químicos usuais, como os métodos cromatográficos, com a vantagem de requerer um menor nível de instrumentação, além de evitar o uso de solventes orgânicos. Com base nisto e devido à ausência de um ensaio microbiológico para determinação do imipenem, este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método microbiológico para determinação o antibiótico imipenem em forma farmacêutica.

---

**5.2. Artigo científico: Microbiological assay for quantitative determination of imipenem in powder for injection.**

**Drug Analytical Research. V. 02, p. 8 – 13, 2018.**

---





### 5.2.1. Abstract

This work describes the development and validation of a microbiological method using the cylinder-plate assay for quantitative determination of imipenem in powder for injection. The aim was to obtain a low-cost and suitable methodology that can be alternative to physicochemical techniques already described, contributing for the quality control of this antibiotic. Firstly, the analytical conditions were optimized, testing the microorganism, inoculum concentration and best range of sample and standard concentrations, in a way that provides the adequate measurement of the inhibition halos. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 was selected as test microorganism, as well as 2.0 % of inoculum concentration. The validation protocol followed the official guidelines, and the parameters evaluated were linearity, precision (intermediate precision and repeatability) and accuracy. All standard curves ranging 0.5-2.0 µg/mL showed r values higher than 0.999, and ANOVA confirmed that there were no deviation from linearity (p-value > 0.05). The method also proved to be precise with RSD (relative standard deviation) values ranging 0.28-0.64 for repeatability and 2.49 for intermediate precision. It was performed three days of experiments, being three assays of eight plates a day. The drug mean content was 101.05%. Accuracy was assessed by recovery test, with standard recovery percentage of 101.70-107.90% (mean recovery = 104.86%), which was considered satisfactory. Therefore, the proposed microbiological method was considered validated and suitable for application in quantitative determination of this drug, being useful for quality control routine.

**Keywords:** imipenem, microbiological assay, quantitative determination, validation, quality control.

### 5.2.2. Introduction

Imipenem (Figure 5.1), or chemically (5R,6S)-3-[2-(aminomethylideneamino) ethylsulfanyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo [3.2.0] hept-2-ene-2-carboxylic acid, is a broad spectrum beta-lactam antibiotic belonging to the subgroup of carbapenems, which are drugs structurally composed of a pentacyclic thiazolidinic ring attached to the nitrogen of the beta-lactam ring by a tetrahedral carbon atom (1). Derived from thienamycin, imipenem is the oldest carbapenems available for clinical use, approved in 1986 in the USA (2). It has activity against most of the Gram-positive and Gram-negative, aerobic and anaerobic bacteria (1), including those beta-lactamase-producing bacterial pathogens. This occurs due the greater stability of pentacyclic ring that is attached to beta-lactam ring against the action of these enzymes (3). However, drug-resistance has been reported in Gram-negative bacteria, for example in some strains of *Pseudomonas aeruginosa* (4).

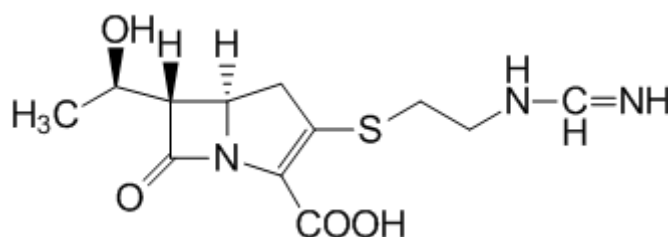


Figure 5.1. Chemical structure of imipenem

Clinically, imipenem is used to treat several polymicrobial infections, such as pneumonia and complicated gastrointestinal tract infections. The recommended dose is 2 g/day in adults with normal renal functions (4). However, imipenem is hydrolyzed by a renal dehydropeptidase (dehydropeptidase I) (3), being inactivated, requiring co-administration of cilastatin, an inhibitor of this enzyme in clinical use. Imipenem and cilastatin are marketed as powder for injection (1:1, w/w) in doses of 250 and 500 mg, since they are not absorbed orally. Most often they are given intravenously by infusion, but in case of treatment of less severe infections, they can be given intramuscularly (in dose of 750 mg) (5).

A review of literature shows many analytical studies applied to imipenem in biological fluids, involving HPLC-DAD (6-8), and spectrophotometric/chemometric technique (9). On the other hand, for pharmaceutical dosage forms, the literature reports derivative spectrophotometric (10,11), and RP-UPLC method for quantitation of imipenem related impurities (12). In fact, antibiotics play an increasingly important role in pharmacotherapy because of their wide use in the clinical practice, so it is extremely important to develop alternative methods that allow their analytical determination in existing pharmaceutical forms (13).

Microbiological assays have been widely used to determine antibiotic drugs along the years (13-15). These methods are recommended by several pharmacopoeias, like the USP and European Pharmacopoeias (16-18). Different techniques are described in microbiological assays that are used for antibiotic drugs to determine antibacterial activity, like paper disk procedures, standard broth microdilution assay, and cylinder-plate assay. The evaluation of the inhibitory effect of the antibiotic on the growth of the test microorganisms makes possible its quantitative determination by means of logarithmic relation between the drug concentration and antimicrobial potency (13).

Therefore, microbiological assays can be an alternative to the physicochemical methods like HPLC, not requiring sophisticated equipment or toxic solvents, and being viable to use even in small laboratories. For carbapenems, two microbiological cylinder-plate assays are described for meropenem and doripenem, both developed to determine the drugs in powder for injections (13,19). For imipenem, this methodology is absent. Thus, the present manuscript reports the development and validation of microbiological assay for quantitation of imipenem in powder for injection, applying the cylinder-plate method.

### **5.2.3. Material and Methods**

#### *5.2.3.1. Chemicals*

Imipenem reference standard (85.5%) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Powder for injection containing 500 mg of imipenem monohydrate and 500 mg of Cilastatin sodium was purchased from ABL Antibiotics (Cosmópolis, SP, Brazil). For microbiological assay, Difco™ Antibiotic Media number 11 obtained from Interlab® (São Paulo, SP, Brazil), and Grove Randall number 1 agar from Merck (Darmstadt, Germany) were used. All solutions were prepared in distilled water and sterilized before each experiment. Analytical grade sodium chloride of the Synth LTDA (São Paulo, SP, Brazil) was used for preparation of inoculum suspension.

#### *5.2.3.2. Microbiological assay*

##### *5.2.3.2.1. Microorganism and inoculum*

*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 was chosen as microorganism test. The strains were cultivated with number 1 agar and kept in freezer. One day before the assay, the microorganism was inoculated with the same agar that was kept at 35° C for 24 hrs. The inoculum suspension was prepared using NaCl 0.9% sterile solution, which was standardized with  $25 \pm 2\%$  of transmittance at 580 nm, using a spectrophotometer Analyser® Model 800 (São Paulo, SP, Brazil). NaCl 0.9% solution was used as blank of absorption. Portions of this inoculum suspension were inoculated into erlenmeyer flasks containing number 11 agar in order to obtain a concentration of 2% inoculum, being kept at  $47 \pm 2^\circ$  C. Then, 6 mL of this inoculum (2%) were applied over the base layer (composed by 20 mL of number 11 agar) in the plates.

##### *5.2.3.2.2. Standard and sample solutions*

Imipenem standard solution was prepared for each experiment. Sterile distilled water was used as solvent for drug solubilization and subsequent dilutions. An amount equivalent to 10 mg of imipenem standard was accurately weighed and transferred to 100 mL volumetric flask. Distilled water was added to make up to volume and give the final concentration of the stock solution. This

stock solution (imipenem 100 µg/mL) was used during the experiment. For sample solution, the same protocol was applied starting from an amount equivalent to 10 mg of imipenem powder for injection. Both stock solutions (100 µg/mL) were used in the subsequent dilutions.

#### *5.2.3.2.3. Cylinder-plate assay*

The 3 x 3 design was performed with 8 plates for assay, following the procedure recommended by official reference (17). The 100 x 20 mm petri dishes were filled with number 11 agar in two separate layers: the base layer and the surface layer. The base layer was composed by 20 mL of number 11 agar and the surface layer was composed by 6 mL of inoculum (2%). Six 8 mm cylinders were distributed over the surface layer in each plate, for subsequent application of the drug solutions.

These cylinders were filled with 200 µL of standard solution or sample solution in three different concentrations of each, and then, the plates were incubated in dry air oven at 37 °C for 18 hours. Inhibition halos were measured using a digital caliper Starret® and the data collected were analyzed for antimicrobial potency calculations, by correlating diameter of inhibition halos and log of drug concentration.

#### *5.2.3.3. Preliminary assays*

Two concentrations were tested for inoculum suspension (1% and 2%) in a preliminary assay with 20 plates, being 10 plates with each concentration of inoculum. At the same preliminary experiment, two ranges of concentrations for standard and sample solutions were tested: 1.0; 2.0 and 4.0 µg/mL and 2.0; 4.0 and 8.0 µg/mL, which was prepared from the stock solutions. In the plates with 1% of inoculum concentration, the two ranges of dilutions for standard and sample solutions were tested (5 plates for each group). The same procedure was done for the plates with 2% inoculum concentration. The results were compared to evaluate the microorganism growth and inhibition halo measurements.

Another preliminary experiment was performed from observation of previous results, using 2% of inoculum concentration and testing three new

concentrations for standard and sample solutions: 0.5; 1.0 and 2.0 µg/mL. Here, the focus was the inhibition halo sizes, which must to be adequate for practical measurement and to avoid possible interferences.

#### *5.2.3.4. Method validation*

##### *5.2.3.4.1. Linearity and Precision (repeatability and intermediate precision)*

To evaluate linearity, three concentrations were prepared from the stock solutions of imipenem standard. The stock solution was diluted in volumetric flasks (10 mL) with sterile distilled water and the final concentrations obtained was 0.5; 1 and 2 µg/mL. Linearity was assessed by constructing nine standard curves in three days of assay, being three curves a day, and each curve considered the results from eight plates. The analysis of linear regression was performing using least squares regression method, and statistical analyses to validate the results were performed using ANOVA. The repeatability (intra-day) was evaluated comparing results of three eight-plate assays, performed in the same day at the same conditions, and the intermediate precision was evaluated comparing results of three different days of experiment, being three assays of eight plates a day. Relative standard deviation (RSD) was calculated.

##### *5.2.3.4.2. Accuracy*

The accuracy was assayed by recovery method. Known quantities of standard solutions were added to sample solutions with nominal concentrations of 0.5; 1 e 2 µg/mL. The amount of standard added corresponds to 10% of these solutions concentrations. Then, the recovery percentages of the standard added were calculated. The results from three eight-plate assays performed in the same day were used in the calculations. Relative standard deviation (RSD) from the analyses was also calculated.

### **5.2.4. Results and Discussion**

#### *5.2.4.1. Methodology optimization*

The success in a method validation is widely dependent of well-established analytical conditions. In particular case of microbiological methodologies, where there is a great source of variations that may interfere on

analysis, is important the optimization of the conditions in order to obtain a reliable and reproductive method. The microbiological assay using the cylinder-plate assay and 3x3 design (three concentrations of standard and sample in the same plate) has been recommended by official references (16), being used for many antibiotics. The principle of this method is the drug diffusion on an agar surface inoculated with a microorganism, producing a inhibition zone of growth that is measured (20-22) and allows to determine the drug potency and to detect small variances in biological activity. Agar diffusion methods have been the methodology chosen for water-soluble antibiotics (23).

For the present study, the culture medium were selected based on similar methodologies described for others similar carbapenems: meropenem and doripenem (13,18). As test microorganism, *Staphylococcus epidermidis* was selected due availability as well as its adequate growth in the culture media selected and reproducibility on measurement of halos. Testing inoculum concentration, the better response was observed by using the higher concentration (2%), whose growth was better in terms of intensity and uniformity.

From this result, another preliminary experiment tested different dilutions for standard and sample using plates with 2% of inoculum concentration. The drug concentrations tested were 1.0; 2.0; 4.0 µg/mL and 2.0; 4.0; 8.0 µg/mL. It is very important for a better and more reliable measure of inhibition halos to have adequate separation between them in the surface layer. For it, it is important to found a range with a good response from geometric progression used in the calculations. The two concentration ranges tested did not provide a good response in terms of reproducibility and inhibition halo sizes, as expected. In this case, it was observed a very large halo sizes. Based on these first preliminary results, we tested another experimental variation focused on concentration range, testing 0.5; 1.0 and 2.0 µg/mL. Now, the result was satisfactory because allowed adequate separation and reproducible measure of inhibition halos, as illustrated (Figure 5.2). So, one additional experiment was performed with the defined analytical conditions to test the reproducibility, showing satisfactory results.

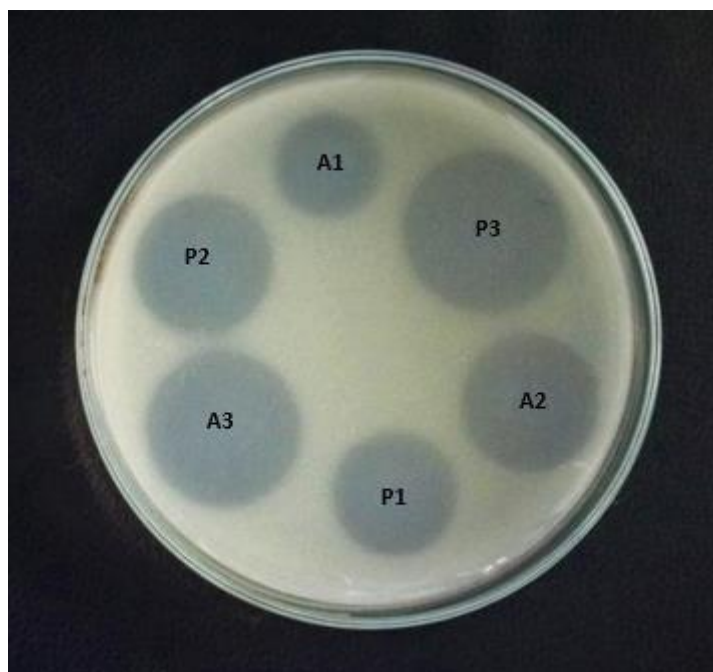


Figure 5.2. Illustrative image of a plate with concentration inoculum 2%, containing three concentrations of imipenem standard (P) and commercial sample (powder for injection) (A): A1 and P1 for 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ; A2 and P2 for 1.0  $\mu\text{g/mL}$ ; A3 and P3 for 2.0  $\mu\text{g/mL}$ . Growth on antibiotic media number 11.

#### 5.2.4.2. Method validation

The validation parameters studied were linearity, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy. All analytical procedures followed the official guidelines: ICH (24) and the Brazilian Health Regulatory Agency (25).

For linearity, it was constructed standard curves that correlates inhibition halo sizes with drug concentration in logarithmic values. For it, it was obtained nine standard curves in three days of analysis, being three curves a day at the same conditions. The standard curves considered each one 8 plates, totalizing 24 plates at the same day. The range of drug concentration assayed was 0.5; 1.0 and 2.0  $\mu\text{g/mL}$ . The means of halo diameters for each drug concentration were 15.20 mm (RSD = 2.87); 19.45 mm (RSD = 1.42) and 23.12 mm (RSD = 2.76), respectively. In agreement to official guidelines, the r value (correlation coefficient) of the standard curves must be close or equal 1.0, in order to demonstrate the best linear relation between the variables. In this work, all curves obtained a r value > 0.99, being considered very satisfactory. A standard



curve obtained in third day of analysis with  $r = 0.9991$  is illustrated on Figure 5.3. The linear regression analysis performed by ANOVA (analysis of variance) was used to prove the linearity performance, and did not shown deviations from parallelism or significant differences from the medium values ( $p$ -value  $> 0.05$ ), as recommended in official guidelines (17,19). The Table 5.1 illustrates the ANOVA applied to results of third day of analysis, considering results from 24 plates (equivalent to three assays with 8 plates).

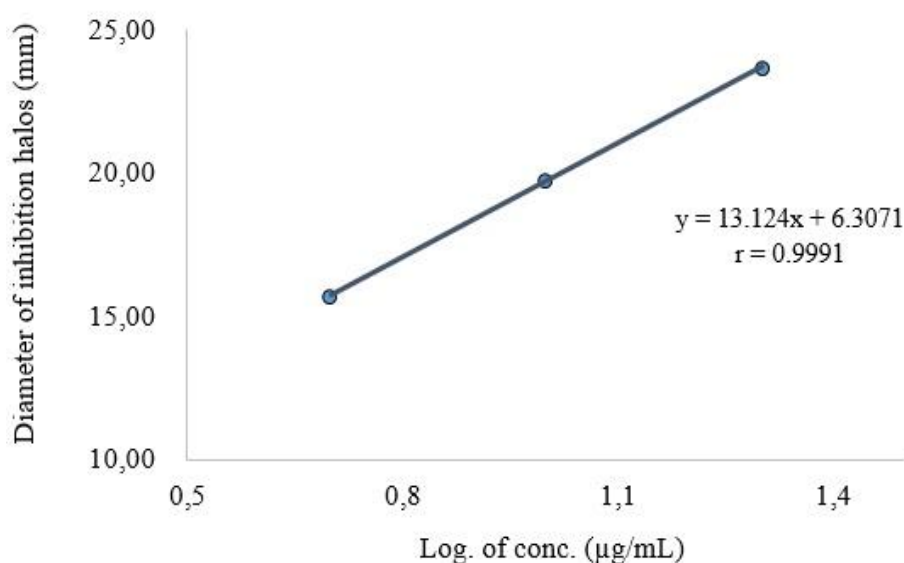


Figure 5.3. Standard curve correlating diameter of inhibition zone (mm) versus logarithmic of drug concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), obtained from microbiological assay developed to quantitation of imipenem in powder for injection.

Table 5.1. Analysis of variance (ANOVA) from quantitative results of linearity (third day) obtained during validation of a microbiological assay for imipenem in powder for injection.

<b>Variation sources</b>	<b>Degrees of freedom</b>	<b>Sums of Squares</b>	<b>Mean Squares</b>	<b>F-calculated</b>	<b>F-value</b>
Preparation	1	0.005	0.005	3.88	4.12
Regression	1	509.60	509.60	395424.10	4.12
Desviation from paralelism	1	0.000	0.000	0.010	4.12
Quadratic	1	0.003	0.003	2.53	4.12
Quadratic difference	1	0.000	0.000	0.013	4.12
Difference between doses	5	509.61	101.92	79086.11	2.48
Difference between plates	7	0.009	0.001	0.951	2.29

According to official codes, the evaluation of precision can be expressed in two levels: repeatability and intermediate precision. As preconized in 3 x 3 design of cylinder plate assay, during precision both commercial sample and reference standard were analyzed in all experiments and then, the imipenem content was calculated. To access repeatability and precision intermediate, results of six assays with 8 plates were considered in three days of analysis (three assays with 8 plates a day) and the calculated RSD were satisfactory in all the cases (RSD = 0.28-0.64). The mean drug content was 101.05% (RSD=2.49) (Table 5.2). As described in imipenem monograph found in US pharmacopeia, the powder for injection has to contain 90-115% of imipenem and cilastatin (16). Microbiological assay is classified as biological assay and generally, have a highly variation of results (26) in comparison with analytical

methods like HPLC. Despite of this, the RSD values obtained in the purposed method were adequate, being below to 5% for all experiments, showing that this microbiological assay is suitable to determine imipenem in drug formulation despite the inherent variation of biological assays.

Table 5.2. Results obtained from intermediate precision (inter-day) and repeatability (intra-day), worked during validation of a microbiological assay for quantitation of imipenem in drug formulation. Data expressed as potency (%) and RSD.

		<b>Repeatability</b>	
	Antimicrobial <sup>a</sup> Potency (%)	Mean Potency (%)	RSD (%)
Day 1	104.16	104.33	0.28
	104.16		
	104.67		
Day 2	98.59	99.45	0.76
	99.81		
	99.96		
Day 3	98.98	99.35	0.64
	98.99		
	100.09		
<b>Intermediate precision</b>		101.05	2.49

<sup>a</sup> Each result is a mean from three assays of eight plates.

For accuracy, recovery testing was performed according to described for other microbiological methods applied to carbapenems (13,19). Here, the recovery percentage was between 101.70 – 105.20% (mean recovery = 104.86%) with RSD= 2.95 (Table 5.3), each result considering three assays with six plates each one. So the recovery percentage obtained was considered satisfactory and the method demonstrated to be accurate for quantitative estimation of imipenem.

Table 5.3. Mean values (%) of recovery test obtained from microbiological assay applied to quantitation of imipenem in powder for injection.

<b>Sample concentration (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Standard added (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Recovered concentration (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Mean of recovery<sup>a</sup> (%)</b>
0.5	0.05	0.051	101.7
1.0	0.10	0.107	107.9
2.0	0.20	0.210	105.2
<b>RDS (%)</b>			<b>2.95</b>

<sup>a</sup> Each result is a mean from three assays of six plates.

### 5.2.5. Conclusions

The commercial samples of imipenem were quantified by the proposed microbiological assay, whose validation was considered satisfactory. Linearity, precision and accuracy were the parameters studied and the results were satisfactory in terms of official limits. So, the cylinder-plate assay method can be an analytical option for imipenem quantitation, in special when the biological potency is useful for a better comprehension about drug quality. This bioassay can be also performed in a complementary view about physicochemical methods like UV spectrophotometry or HPLC.

#### *Conflict of Interest*

The authors declare the absent of any conflict of interest in all the results presented in this paper.

#### *Acknowledgements*

The authors thank to CAPES for financial support and to Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for all structure provided.

### 5.2.6. References

1. Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 2008; 9: 23-27
2. Zhanel GG, Simor AE, Vercaigne L, Mandell L. Imipenem and Meropenem: Comparison of in vitro activity, pharmacokinetics, clinical trials and adverse effects. *Can J Infect Dis.* 1998; 9: 215-228
3. Rodloff AC, Goldstein EJC, Torres A. Two decades of Imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 916-929
4. Hellinger WC, Brewer NS. Carbapenems and Monobactams: Imipenem, Meropenem and Aztreonam. *Mayo Clin Proc.* 1999; 74: 420-435
5. McGregor JA, Christensen FB, French JI. Intramuscular Imipenem/Cilastatin treatment of upper reproductive tract infection in women: efficacy and use characteristics. *Chemotherapy.* 1991; 37: 31-36
6. Legrand T, Chhun S, Rey E, Blanchet B, Zahar JR, Lanternier F, et al. Simultaneous determination of three carbapenems antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B.* 2008; 875: 551-556
7. Dailly E, Bouquié R, Deslandes G, Jolliet P, Floch RL. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinect study. *J Chromatogr B.* 2011; 879: 1137-1142
8. Torres-Fernández R, Navarro MV, López MAB, Mochón MC, Sánchez JCJ. Urea as new stabilizing agent for imipenem determination Electrochemical study and determination of imipenem and its primary metabolite in human urine. *Talanta.* 2008; 77: 241-248
9. El-Kosasy AM, Abdel-Aziz O, Magdy N, El Zahar NM. Spectrophotometric and chemometric methods for determination of imipenem, ciprofloxacin hydrochloride, dexamethasone sodium phosphate, paracetamol and cilastatin sodium in human urine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016; 157: 26-33

10. Parra A, Garcia-Villanova J, Ródenas V, Gómez MD. First- and second-derivate spectrophometric determination of imipenem and cilastatin in injections. *J Pharm Biomed Anal.* 1993; 11: 477-482
11. Tabbouche OS, Soukkariyyeh I. First-order derivate ultraviolet spectrophotometry of imipenem-cilastatin formulations. *J Taibah Univ Sci.* 2014; 9: 178-181
12. Vikram P, Shanmugasundaram P. A highly sensitive stability-indicating UPLC method for the determination of related substamces in imipenem and cilastatin for injection. *Int J Pharma Bio Sci.* 2016; 7: 144-154
13. Mendez ASL, Weisheimer V, Oppe TP, Steppe M, Schapoval EES. Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 37: 649-653
14. Mahmoudi A, Fourar REA, Boukhechem MS, Zarkout S. Microbiological assay for the analysis of certain macrolides in pharmaceutical dosage forms. *Int J Pharm* 2015; 491: 285-291
15. Staub I, Schapoval EES, Bergold AM. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. *Int J Pharm.* 2005; 292: 195-199
16. The United States Pharmacopoeia, 32st ed.; United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2009.
17. Brazilian Pharmacopeia, 5th ed.; Anvisa: Brasília, 2010.
18. European Pharmacopoeia, 8th ed.; Council of Europe: Strasbourg, 2014.
19. Führ F, Paliosa PK, Costa MCN, Garcia CV, Schapoval EES, Steppe M, et al. Bioassay applied to quantitative determination of Doripenem in powder for injection- degradation kinetics and comparison to HPLC and CE methods. *Curr Pharm Anal.* 2013; 9: 244-251
20. Gavin JJ. Analytical microbiology: II The diffusion methods. *Microbiological process reports. Appl Microbiol.* 1956; 5: 25-33

21. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yakobi A, et al. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci.* 1992; 81: 309-312
22. Costa MCN, Barden AT, Andrade JMM, Oppe TP, Schapoval EES. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. *Talanta.* 2014; 119: 367-374
23. Christ AP, Machado MS, Ribas KG, Schwarzbald AV, Silva CB, Adams AIH. A fully validated microbiological assay for daptomycin injection and comparison to HPLC method. *Braz J Pharm Sci.* 2015; 511: 775-783
24. ICH. In: *Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology – Q2 (R1)*, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, 2005.
25. Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA). Resolution: RE n° 166, July 24<sup>th</sup>, 2017.
26. Breier AR, Garcia CV, Oppe TP, Steppe M, Schapoval EES. Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed. Anal.* 2002; 29: 957- 961





---

**6. Capítulo III: Desenvolvimento e validação de método analítico por ESI-Q-TOF através de infusão direta, e determinação da estabilidade pós-reconstituição do antibiótico meropenem.**

---



## **6. Capítulo III: Desenvolvimento e validação de método analítico por ESI-Q-TOF através de infusão direta, e determinação da estabilidade pós-reconstituição do antibiótico meropenem.**

### **6.1. Introdução**

O meropenem é o segundo derivado carbapenêmico a ser aprovado para uso clínico em humanos, em 1996, pelo *FDA*. É um antibiótico de uso parenteral indicado para o tratamento de infecções hospitalares moderadas a graves, incluindo infecções respiratórias, do trato intra-abdominal, do trato urinário, meningite, fibrose cística, entre outros (EDWARDS, 1995; WISEMAN et al., 1995). Quimicamente, o meropenem é um derivado dimetilcarbamoil-pirrolidinilo da tienamicina (MARTÍNES et al., 2010), e é a primeira carbapenema a apresentar o grupamento metil ligado à posição 1 do anel do 5 membros, o que confere resistência à hidrólise pela enzima DHP-1.

A estabilidade do meropenem em soluções intravenosas foi avaliada por Patel e Cook (1997). Neste estudo, soluções de meropenem são preparadas utilizando diversos fluidos para infusão, em concentrações que variaram de 1 à 50 mg/mL, e foram armazenadas em bolsas de PVC. Observou-se maior estabilidade do fármaco em soluções menos concentradas, utilizando como fluidos de infusão água para injetáveis e solução fisiológica (NaCl 0,9 %). Sabendo-se que a estabilidade do meropenem em solução é diretamente afetada pelo aumento da temperatura, Grant e colaboradores (2000) propõem a utilização de dispositivos refrigerados para infusão do meropenem, nos quais o fármaco se mantém estável por até 24 horas. Trabalhos focados na cinética de degradação também são descritos, tanto para o fármaco em estado sólido, quanto em solução (TAKEUCHI, et al., 1995; MENDEZ et al., 2006; CIELECKA-PIONTEK et al., 2008). Quanto a produtos de degradação do meropenem, assim como para outras carbapenemas, destacam-se os produtos formados pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e processos de dimerização (TAKEUCHI et al., 1994; MENDEZ et al., 2008). Além destes, Almarsson e colaboradores (1998) também propõem a formação de adutos de dióxido de carbono, em soluções contendo bicarbonato de sódio.

Para a determinação quantitativa do meropenem, a literatura científica relata diferentes métodos analíticos, em produtos farmacêuticos e em fluidos corporais. Dentre eles, destacam-se métodos cromatográficos com detecção por espectrofotometria ultravioleta (CLAE-UV) (PATEL e COOK, 1997; GRANT et al., 2000; ÖZKAN et al., 2001; MENDEZ et al., 2003; CAI e HU, 2005; CIELECKA-PIONTEK et al., 2008), métodos por espectrofotometria no ultravioleta (MENDEZ et al., 2003; ELRAGEHY et al., 2008) e ensaio microbiológico (MENDEZ et al., 2005). Mesmo com diferentes métodos relatados, o presente trabalho apresenta uma alternativa rápida e eficiente para aplicação em estudos de estabilidade, que, além de dados quantitativos, tem como principal potencial gerar dados que auxiliem na identificação dos produtos de degradação.

---

**6.2. Artigo científico: Stability in clinical use and stress testing of meropenem antibiotic by direct infusion ESI-Q-TOF: Quantitative method and identification of degradation products**

**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.**

**v. 179, p. 112973. 2020**

---



### 6.2.1. Abstract

An ESI-MS/MS method through direct infusion was validated for quantitative analysis of meropenem powder for injection. The validation parameters were established in a rapid analysis of 30 seconds. Drug stability was studied through the submission to stress testing, resulting on four degradation products. Under hydrolytic conditions, in acid, neutral and alkaline media, the major degradation product was formed through the cleavage of the  $\beta$ -lactam ring. Oxidation of the drug using  $H_2O_2$  (3%) showed the formation of two degradation products from a decarboxylation reaction and N-oxide formation. Under high humidity conditions, there was detected a dimer product. The stability of meropenem after reconstitution was studied in conditions that simulate its clinical use. In samples reconstituted and diluted in infusion fluids, an extensive degradation was observed. At room temperature meropenem maintained its content > 90% for up to 4 hours when prepared in 5% glucose and for up to 12 hours when prepared in 0.9% NaCl. Through ESI-MS/MS analyzes it was observed a degradation product formed by  $\beta$ -lactam ring cleavage, detected in all conditions studied. It was also identified a degradation product formed only in 5% glucose, generated by the hydrolysis of  $\beta$ -lactam followed by the attachment of a glucose molecule to the nitrogen of the pyrrolidine ring. In general, all the results obtained in the stability studies contribute to the knowledge about this antibiotic and future candidates of this class.

**Keywords:** Meropenem, Stability, Mass Spectrometry, Direct infusion, Degradation Products.

### 6.2.2. Introduction

Meropenem is the first derivative 1- $\beta$ -methyl carbapenem, approved by the EMEA for clinical use in 1994 [1]. Belonging to the carbapenem class, meropenem is a broad-spectrum antibiotic with wide range of activity; it is indicated for the treatment of moderate to severe nosocomial infections, including respiratory infections, intra-abdominal tract, urinary tract, meningitis, cystic fibrosis, among others [2,3]. Chemically, meropenem (Figure 6.1) is a dimethylcarbamoyl pyrrolidinyl derivative, modified synthetically from thienamycin [1,4].

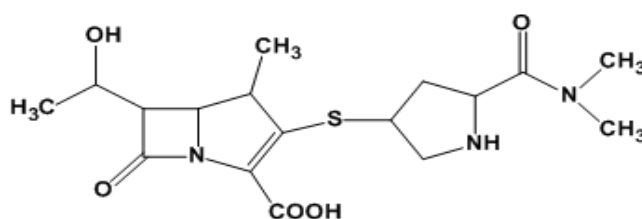


Figure 6.1. Chemical structure of meropenem.

Analytical studies with focus on degradation products and impurities in pharmaceutical products have been extensively published by several groups, since these substances, even in small quantities, can interfere on the drug quality and safety. Knowing that efficacy and safety of drug products are closely related to stability, the drugs must undergo extensive stability testing from their design in preformulation studies until the final product. The International Conference on Harmonisation (ICH) in its Q1A (R2) guideline establishes conditions for stability studies [5]. In parallel, its Q3B (R2) guideline sets thresholds for degradation products in new drug products [6].

The stability of meropenem is studied by several authors. Patel and Cook [7] evaluated the stability in intravenous solutions, where the drug was stable for a longer time in sterile water for injection and in 0.9% sodium chloride solution, when compared to other infusion fluids, such as dextrose 5 and 10% and lactate ringer solution. Grant et al. [8] studied the stability of meropenem in a portable infusion device in a cold pouch. The kinetics of thermal degradation is proposed for the drug in solution and solid state [9,10,11]. Considering the works focused on the identification of degradation products, Mendez et al. [12]



identified thermal and alkaline degradation products of the meropenem, where thermal stress conditions have resulted in various chemical reactions, with modification of the side chain and  $\beta$ -lactam ring, and resulting in a pyrrole derivative. In alkaline medium, meropenem was totally decomposed to the corresponding  $\beta$ -lactam ring-opened derivative. In conditions of high relative humidity (> 75%), Cai and Hu [13] verified the formation of dimers and trimers, and Almarsson et al. [14] proposed the formation of a carbon dioxide adduct in bicarbonate-containing solutions.

Aiming to develop a specific, fast and reproducible method, able to detect and characterize degradation products in small quantities, directly in the degraded matrix (infusion bags), the present work proposes a quantitative method by ESI-Q-TOF direct infusion for application in stability studies. Through this method, the formation of degradation products was monitored in real time using different infusion fluids (0.9% sodium chloride and 5% glucose), simulating its clinical use. The products formed under different stress conditions were also identified in order to determine the forced degradation profile.

### **6.2.3. Materials and methods**

#### *6.2.3.1. Chemicals and reagents*

Meropenem USP reference standard (USP Reference Standards, Rockville, MD) was used during method development. Meropenem drug product (Vial 500 mg) was purchased from Antibióticos do Brasil Ltda (Cosmópolis, SP, Brazil). Doripenem reference standard, used as internal standard, was purchased from AK Scientific Inc. (Mountain View, CA, USA). Acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA); sodium hydroxide and hydrogen peroxide were purchased from Synth (São Paulo, Brazil); monobasic sodium phosphate and hydrochloric acid were purchased from Química Moderna (Barueri, SP, Brazil). Purified water was obtained using a Milli-Q Plus® system (Millipore, Bedford, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

### 6.2.3.2. Instrumentation

The ESI-MS/MS analyses were performed on a micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an ESI interface operating in positive ion mode; all the conditions used in the development of the quantitative method are shown in Table 6.1. The nitrogen was used as drying and nebulizing gas, and the detection was made considering a mass range of 20 – 800  $m/z$  acquired with a spectra rate of 1.00 Hz. The total time of analysis was 30 seconds. The infusion of the samples was performed with the aid of an infusion pump with syringe operating in a flow of 300  $\mu\text{l h}^{-1}$ .

The mass spectrometer was calibrated through a solution of sodium formate (10mM) in positive mode, and the mass data were processed using Data Analysis 4.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Table 6.1. Analytical conditions used during the development of quantitative method for meropenem by ESI-Q-TOF.

Parameter	Setting
<b>Source</b>	
Capillary voltage	4.5 kV
Drying gas temperature	200 °C
Drying gas flow	4 L min <sup>-1</sup>
Nebulizing gas pressure	2.0 bar
<b>Transfer</b>	
Funnel 1 RF	200 vpp
Funnel 2 RF	200 vpp
isCID Energy	0.0 eV
Hexapole RF	100 vpp
<b>Quadrupole</b>	
Ion Energy	5 eV
Low Mass	350 <i>m/z</i>
<b>Collision Cell</b>	
Collision Energy	5 eV
Collision RF	150 vpp
Transfer Time	65.0 μs
Pre Pulse Storage	5.0 μs
<b>Monitored ions for quantitative analysis</b>	
Meropenem [M+H] <sup>+</sup>	<i>m/z</i> 384
Int. standard (doripenem [M+H] <sup>+</sup> )	<i>m/z</i> 421

#### 6.2.3.3. Standard and sample preparation

The method was proposed for quantification of meropenem in infusion fluids simulating the clinical use. The samples were prepared in the concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup> (concentration most used clinically), in solution of 0.9% sodium chloride or 5% glucose solution. Even working with simple matrices, we choose to prepare the stock solutions using these matrices in

order to minimize possible ionization differences caused by adducts sodium formation. Starting from this solution, the second dilution was performed using ultrapure water, and to help positive ionization, the samples were diluted to the analytical concentration with formic acid 0.1% in a ratio of 1:1, being immediately analyzed on the mass spectrometer. All samples were fortified with doripenem standard (internal standard ID) for a final concentration of  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### *6.2.3.4. Validation of quantitative method by ESI-MS/MS*

For the method validation, the following parameters were considered: specificity (for forced degradation), linearity, precision and accuracy. Each parameter was studied individually for the two matrices (infusion fluids) studied.

##### *6.2.3.4.1. Linearity*

The linearity was studied by performing three independent analytical curves. Meropenem reference solutions were prepared, in triplicate, at the concentrations of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Standard plots (concentration versus signal intensity of meropenem/internal standard) were constructed, and linearity was evaluated statistically by linear regression analysis through the least square method and applying ANOVA (analysis of variance).

##### *6.2.3.4.2. Precision*

Precision was determined by repeatability (intraday) and intermediate precision (interday). Repeatability was evaluated by assaying six samples solutions at  $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  during the same day, and the intermediate precision was studied by comparing the assays on three different days. The analyses were done in triplicate and the results were expressed as the relative standard deviation (RSD) of the analytical measurements.

##### *6.2.3.4.3. Accuracy*

Accuracy was determined by the recovery of known amounts of meropenem reference standard added to the matrices. The meropenem standard was added at three levels (low, medium and high), according to the

linearity range. Results were expressed as the percentage of meropenem reference standards recovered from the samples. All solutions were prepared in triplicate and assayed.

#### *6.2.3.4.4. Specificity and Stress testing*

The forced degradation of meropenem was performed focusing the evaluation of intrinsic stability of the drug, studying the degradation products formed and observing possible interferences in the analysis. Placebo solutions were also analyzed. The stress conditions used were hydrolysis in neutral, acid and alkaline media, thermal, humidity and oxidation.

##### *Neutral, acid and alkaline hydrolysis*

Meropenem samples were reconstituted in 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl or 0.01 mol L<sup>-1</sup> NaOH at concentration of 5.0 mg mL<sup>-1</sup> and then diluted to 2.5 µg mL<sup>-1</sup> using ultrapure water. The reaction times were 10 min for acid degradation, and 5 min for alkaline degradation. For neutral hydrolysis, the meropenem sample was reconstituted in ultrapure water at concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup> and stored at 35 °C for 6 hours. After the degradation time, the sample was diluted using ultrapure water reaching the concentration of 2.5 µg mL<sup>-1</sup>.

##### *Humidity*

For exposure of meropenem under conditions of high humidity, the samples in solid form were packed in open flasks and stored in silica-free glass desiccator, in a dry air oven at 40 °C for 12 hours. At the bottom of the desiccator it was added 250 mL of a supersaturated solution of NaCl (40%), obtaining the environment in around 75% RH (measured by hygrometer). After the degradation period, the sample was solubilized with ultrapure water and diluted to the concentration of analysis.

##### *Thermal*

Meropenem drug product in solid form was exposed to dry heat of 60°C in an oven for 10 days. After the degradation time, the sample was solubilized with ultrapure water and diluted to the concentration of analysis (2.5 µg mL<sup>-1</sup>).

## *Oxidation*

For oxidation study it was prepared a sample solution at  $5.0 \text{ mg mL}^{-1}$  with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 3%. The reaction time was 20 min, and after this time, the sample was diluted to  $2.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  in ultrapure water.

### *6.2.3.5. Stability after meropenem reconstitution*

For evaluation of meropenem stability when prepared as a solution for direct infusion (bolus), vials containing 500 mg of meropenem trihydrate were reconstituted with 10 mL of sterile water for injection, until a nominal concentration of  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ . The samples were stored under room temperature ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ ), and aliquots were withdrawn in times of 0, 1, 2, 3 and 4 hours.

For the stability of intravenous solutions prepared in glucose 5%, vials containing 500 mg of meropenem trihydrate were reconstituted with 10 mL of the infusion fluid, reaching a nominal concentration of  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ . The resulting suspension was transferred to a polyvinyl chloride (PVC) infusion bag (Viaflex Mini-Bag, Baxter Hospitalar Ltda, São Paulo, SP, Brazil) containing 5% glucose to achieve a nominal concentration of  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . For samples prepared in 0.9% sodium chloride, vials containing 500 mg of meropenem trihydrate were reconstituted with 10 mL of the infusion fluid, obtaining a nominal concentration of  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ . The resulting suspension was transferred to a polyethylene infusion bags (Equiplex indústria farmacêutica Ltda, Aparecida de Goiânia, GO, Brazil) containing sodium chloride 0.9% to achieve a nominal concentration of  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . For both conditions, aliquots were withdrawn in times of 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours, for the samples stored at room temperature. For samples stored under refrigeration, the time interval studied was 0 to 60 hours.

## **6.2.4. Results and Discussion**

### *6.2.4.1. Quantitative method by ESI-MS/MS*

For quantitative estimation of meropenem, the scientific literature reports different analytical methods applied for pharmaceutical products and biological fluids, among them chromatographic methods with detection by ultraviolet spectrophotometry (HPLC-UV) [7,8,9,11,13,15], ultraviolet spectrophotometry

method [15,16] and microbiological assay [17]. Even having some analytical methods already published, the present work presents a fast and reproducible alternative with mass spectrometry detection for application in stability studies, being able to processing and monitoring simultaneously quantitative data and degradation products.

#### 6.2.4.1.1. Linearity, precision and accuracy

The results obtained for linearity, precision and accuracy parameters are presented in Table 6.2. Standard curves were constructed in the range of 0.5 – 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and the regression equations obtained were  $y = 0.2708x - 0.078$  ( $r = 0.9987$ ) for standard curve prepared in 0.9% NaCl and  $y = 0.318x + 0.016$  ( $r = 0.9995$ ) for the curve in 5% glucose. Statistical analysis by ANOVA confirmed the linear regression ( $F_{\text{calc}} > F_{\text{critical}}$ ,  $p = 0.05$ ) and shows that there is no deviation from linearity ( $F_{\text{calc}} < F_{\text{critical}}$ ,  $p = 0.05$ ) for both curves. For the curve prepared in 0.9% NaCl, the intercept value found was statistically different from zero. Therefore, for routine analysis, it is not recommended to use a single-point calibration, being necessary working with standard curve. For precision parameter, the quantitative values showed repeatability (intra-day assay) with RSD below than 2%, and inter-day assays showed good results, with reproducible data in the 3 days of analysis. About the accuracy of proposed method, spiked amounts were also quantified with reliability in the linearity range, showing good accuracy.

In addition, the results obtained for the precision and accuracy parameters were statistically compared with the results obtained by the chromatographic method using the method developed by Mendez et al (2003). For precision, the  $t$ -student test was applied and showed no significant difference between the obtained amounts ( $n = 6$ ), using samples from the same batch. The calculated  $t$ -values ( $t_{\text{calc}} = 0.65$  and  $t_{\text{calc}} = 0.85$  for samples prepared in 0.9% NaCl and 5% glucose, respectively) were found to be lower than the critical  $t$ -value ( $t_{\text{crit (0.05;5)}} = 2.57$ ). For accuracy, the mean recovery at the three levels tested ( $n = 9$ ) also showed no statistical difference with the recovery obtained in the chromatographic method, for the same samples. The calculated  $t$ -values ( $t_{\text{calc}} =$

1.02 and  $t_{\text{calc}} = 1.14$  for samples prepared in 0.9% NaCl and 5% glucose, respectively) were found to be lower than the critical  $t$ -value ( $t_{\text{crit}}(0.05;8) = 2.30$ ).

Table 6.2. Analytical results obtained from linearity, precision and accuracy assayed during validation of ESI-Q-TOF method for quantitative determination of meropenem in infusion fluids.

Statistical parameter	Samples on 0,9% NaCl		Samples on 5 % Gluc.	
Linearity				
Calibration range	0.5 – 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$		0.5 – 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Regression equation	$y = 0,2708x - 0,078$		$y = 0,318x + 0,016$	
Correlation coefficient (r)	0.9987		0.9995	
Standard error of regression	1.59		1.11	
Precision	Amount %	RSD	Amount %	RSD
Day 1 <sup>a</sup>	99.33	1.99	105.37	1.72
Day 2 <sup>a</sup>	103.28	1.46	101.49	1.64
Day 3 <sup>a</sup>	100.24	1.90	99.71	1.95
Inter-day <sup>b</sup>	101.47	2.42	102.38	3.19
Accuracy	Recovery (%) <sup>c</sup>	RSD	Recovery (%) <sup>c</sup>	RSD
Spiked amount ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				
Low	100.86	1.76	104.49	2.86
Medium	97.64	2.85	101.99	2.69
High	99.44	3.92	100.41	2.89

<sup>a</sup> Six independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup> Mean obtained from precision in different days.

<sup>c</sup> Three replicates for each level.

#### 6.2.4.1.2. Specificity and stress testing

For the method specificity, we evaluated the interference from matrix components and degradation products in the meropenem signal. Due the high resolution and excellent separation power of ions, the method proposed by ESI-Q-TOF enabled a safe and interference-free analysis, even without previous chromatographic separation. Figure 6.2 shows the spectra obtained from the



samples and both matrices studied. For samples prepared in physiological solution (Figure 6.2, spectrum A) meropenem is detected as  $[M+H]^+$  ion of  $m/z$  384 and its sodium adduct  $[M+Na]^+$   $m/z$  406. The same profile is observed for doripenem, with the formation of an  $[M+H]^+$  ion of  $m/z$  421 and its sodium adduct  $[M+Na]^+$   $m/z$  443. In the samples (Figure 6.2, spectrum B) in glucose 5% it is observed, in addition to the ions referring to meropenem and doripenem ( $m/z$  384 and 421 respectively), a signal of  $m/z$  203 referring to the formation of a sodium adduct with glucose.

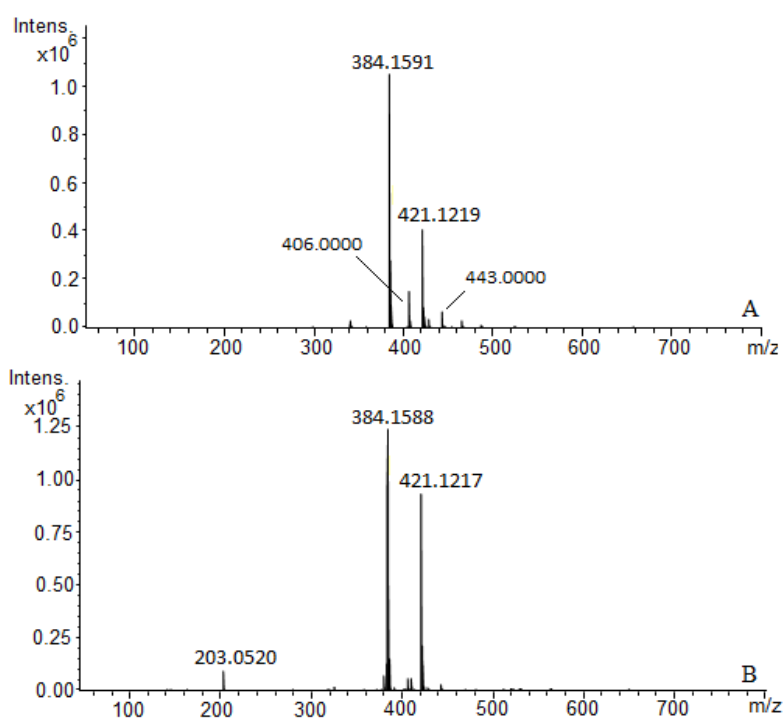


Figure 6.2. Line spectra of meropenem obtained from analysis by ESI-Q-TOF: (A) sample prepared with physiological saline solution (NaCl 0.9%); (B) sample prepared with glucose 5%.

Stability studies can be divided into stress tests, accelerated and long term studies, which differ in the storage conditions, testing frequency and mainly in the purposes from each one. The set of degradation products observed in each of these studies may be called the degradation profile. In the stress testing the drug substance can help to identify the likely degradation products; this can be called the "potential" degradation profile, and it is essential in determining the drug intrinsic stability and also in the development of stability-indicating methods.

As mentioned in the section 6.2, the stability of meropenem have been studied by some authors, which describe the tendency for two decomposition routes:  $\beta$ -lactam ring cleavage and dimerization. In our study, in all samples submitted to hydrolysis (neutral, alkaline and acidic), a major degradation product of  $m/z$  402 (DP-1) was detected, as shown in Figure 6.3. This product is related to hydrolysis of  $\beta$ -lactam ring, a reaction that occurred with higher velocity in alkaline medium, corroborating with works already reported in the literature [10,18].

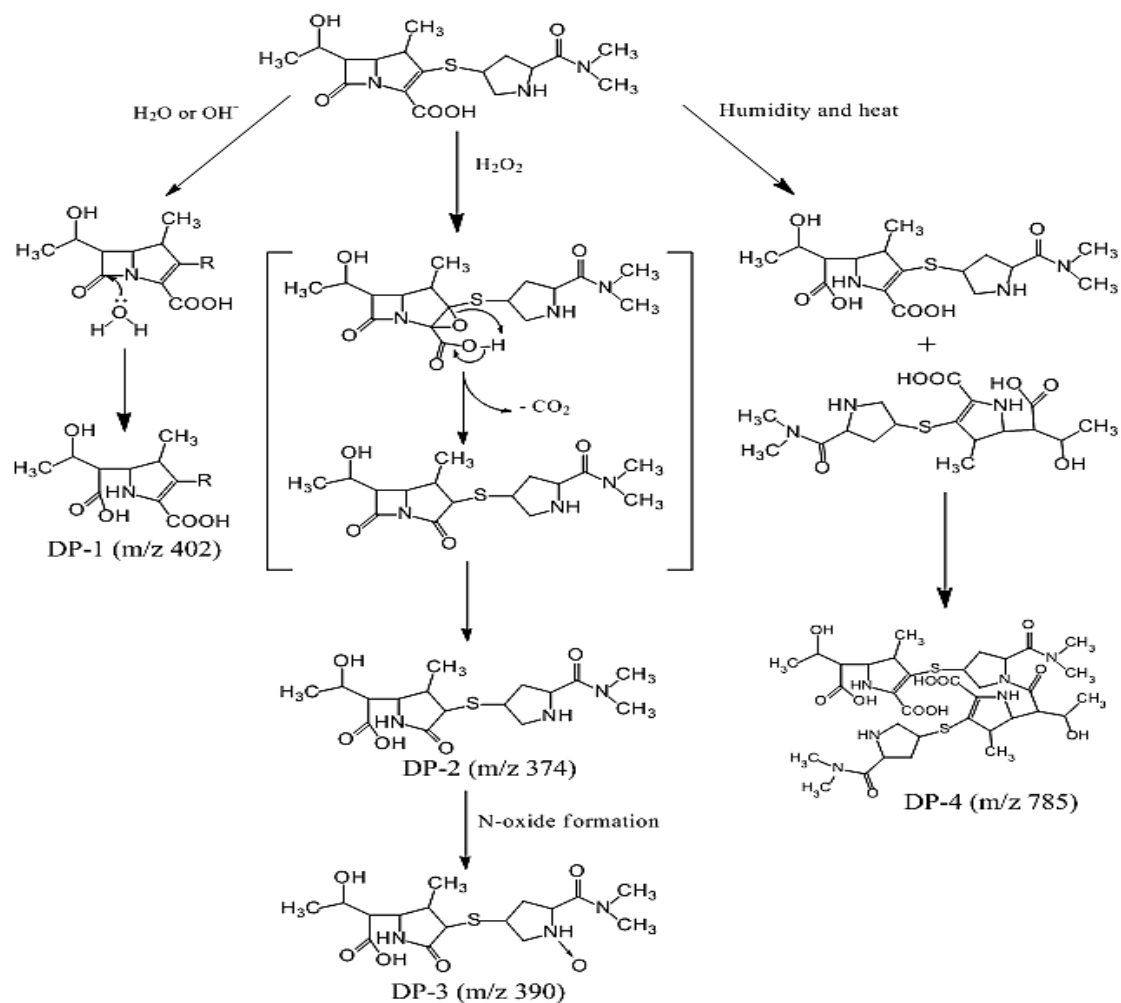


Figure 6.3. Proposition of degradation routes for meropenem when submitted to different stress conditions. R = N,N-dimethylpyrrolidinyl-2-carboxamide.

Submitting DP-1 degradation product to MS/MS analysis, using collision-induced dissociation (CID) and a collision energy of 15 eV, the fragmentation was induced (Figure 6.4). A residual fragment of  $m/z$  358 was detected, being

associated to the loss of  $-\text{COOH}$ . Another two fragments ( $m/z$  175 and 140) were identified as residuals of thioacylic chain. This fragmentation route is shown in Figure 6.5.

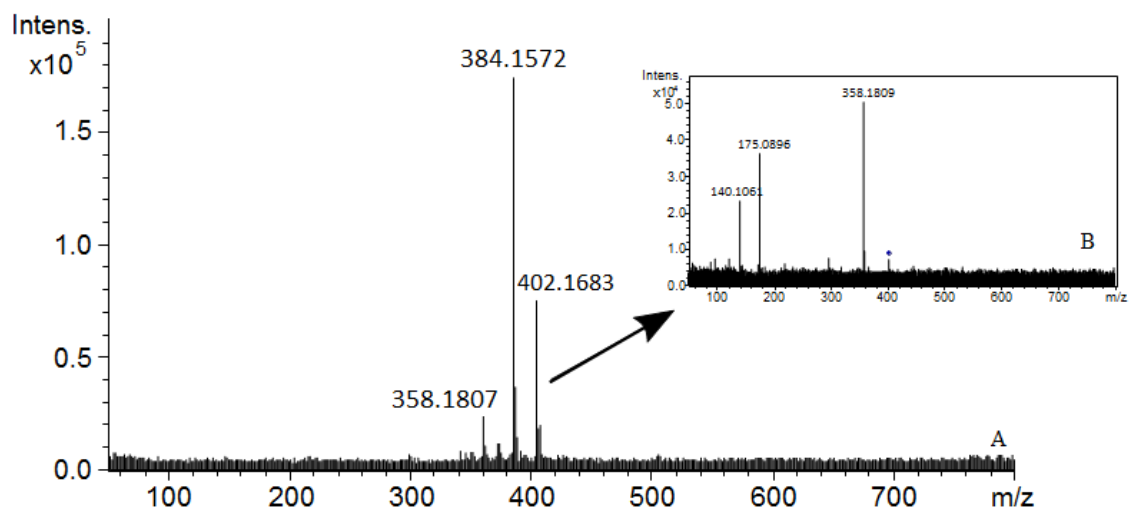


Figure 6.4. (A) ESI-MS spectrum of  $[\text{M}+\text{H}]^+$  referred to hydrolytic degradation of meropenem in neutral medium; (B) ESI-MS/MS spectrum of  $[\text{M}+\text{H}]^+$  from degradation product  $m/z$  402, CID at 15 eV.

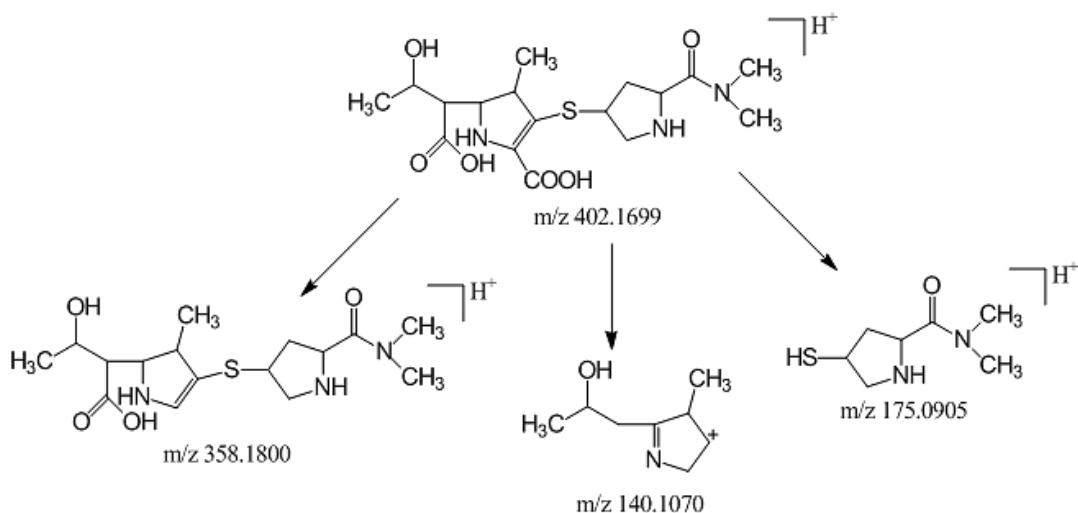


Figure 6.5. Proposed chemical structure and fragmentation for degradation product DP-1 ( $m/z$  402), identified from MS/MS analysis of meropenem degraded samples, submitted to hydrolytic conditions.

In conditions of oxidative degradation, meropenem presented an extensive degradation, with detection of two products: DP-2 at  $m/z$  374 and DP-3 with a more intense signal at  $m/z$  390, as shown in Figure 6.6. The chemical structures

and the decomposition routes involved are illustrated in Figure 6.3. The mechanism involved in the generation of these degradation products present an epoxylation reaction as a main step, leading to an epoxy intermediate positioned between carbons 2 and 3 on the five member ring, followed by loss of CO<sub>2</sub> and β-lactam ring opening (DP-2 product). The DP-3 product, generated in a larger quantity, was identified as an N-oxide derivative from DP-2. Due to the low signal intensity from DP-2, it was not possible to carry out fragmentation experiments. For DP-3, the chemical structure and fragmentation route is illustrated in Figure 6.7.

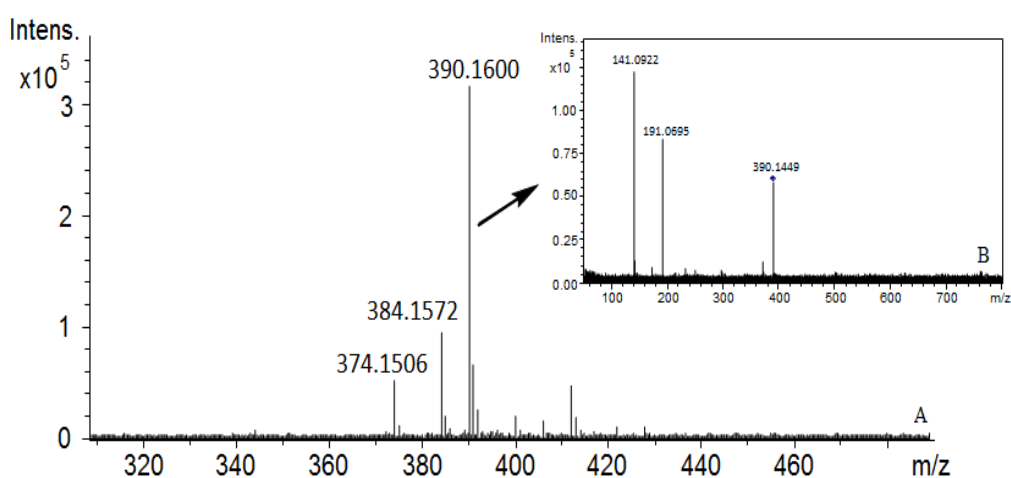


Figure 6.6. (A) ESI-MS spectrum of  $[M+H]^+$  from oxidative degradation of meropenem; (B) ESI-MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  from degradation product  $m/z$  390, CID at 10 eV.

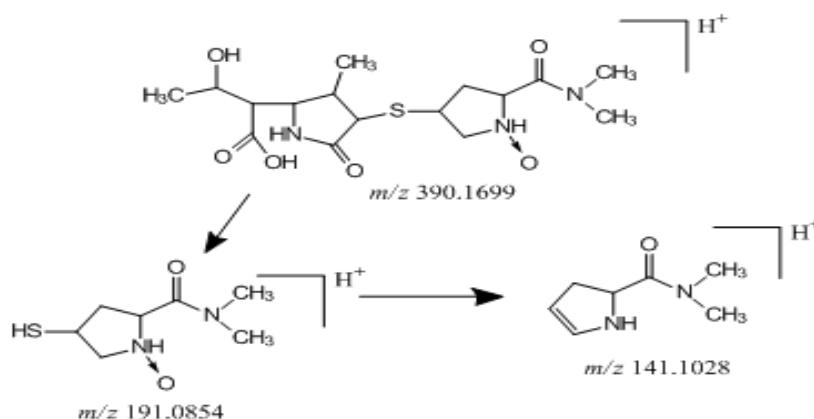


Figure 6.7. Proposed chemical structure and fragmentation for degradation product DP-3 ( $m/z$  390), identified from MS/MS analysis of meropenem degraded samples, submitted to oxidative conditions.

For samples submitted to high humidity conditions, it was also observed the formation of an open ring dimer at  $m/z$  785 (DP-4) (Figure 6.8), which was not possible to perform MS/MS experiments due to the low signal intensity. In that condition, the degradation product with opened beta-lactam ring was also identified ( $m/z$  402). For the dimer, this same degradation product was firstly reported by Cai and Hu [13], being generated by intermolecular interactions between the carboxylic acid formed from  $\beta$ -lactam ring hydrolysis and the nitrogen of the pyrrolidine ring present in the side chain. This chemical structure is shown in Figure 3. For the samples as powder submitted to thermal stress conditions it was not detected degradation products.

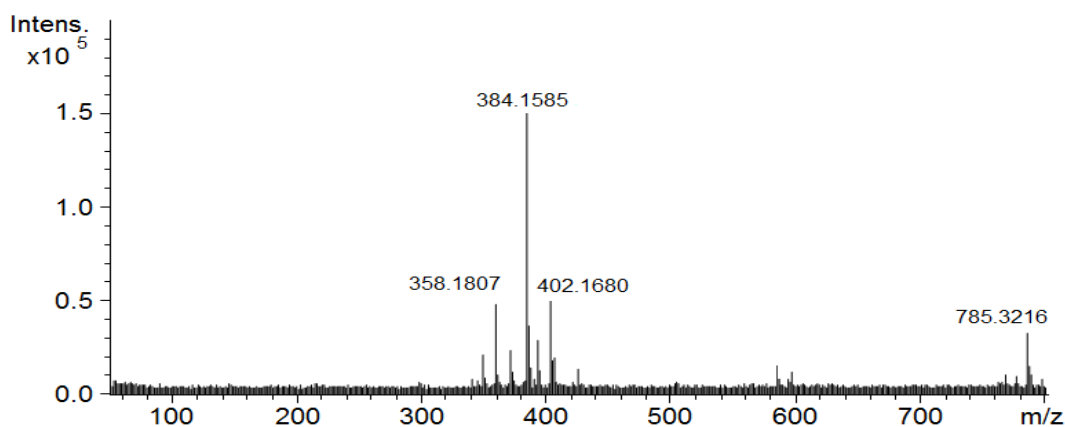


Figure 6.8. Line spectrum  $[M+H]^+$  of meropenem after submission to high humidity conditions.

In general terms, the results obtained from forced degradation of meropenem corroborate with previous studies for hydrolytic and high humidity conditions [10,13,18]. For oxidative degradation, two new degradation products were detected, which were identified through MS/MS data, being proposed their chemical structures and decomposition routes. These results are summarized in Table 6.3.

Table 6.3. Results obtained from the study of degradation products generated during forced degradation of meropenem. Analyses done by ESI-Q-TOF.

	Accurate mass	Molecular formula; extract mass (error in ppm)	Major fragments; molecular formula	Stress condition
DP-1	402.1683	$C_{17}H_{28}N_3O_6S^+$ 402.1699	358.1809; $C_{16}H_{28}N_3O_4S^+$ 175.0896; $C_7H_{15}N_2OS^+$ 140.1061; $C_8H_{14}NO^+$	Hydrolysis (neutral, acid and alkaline media); Humidity.
DP-2	374.1572	$C_{16}H_{28}N_3O_5S^+$ 374.1749	--	Oxidation
DP-3	390.1600	$C_{16}H_{28}N_3O_6S^+$ 390.1699	191.0795 $C_7H_{15}N_2O_2S^+$ 141.1028 $C_7H_{13}N_2O^+$	Oxidation
DP-4	785.3216	$C_{34}H_{53}N_6O_{11}S_2^+$ 785.3213	--	Humidity

#### 6.2.4.2. Stability after reconstitution

The stability after reconstitution of meropenem have been studied in different intravenous solutions of clinical interest. For the stability study, simulating its use in bolus, the samples were prepared in sterile water for injection at a concentration of 50 mg/mL and stored at room temperature for 4 hours. The results were expressed as residual content of meropenem, and are shown in Table 6.4. A reduction of approximately 7% in the drug content is observed after 4 hours.

Table 6.4. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of meropenem in infusion solutions at 50 mg/mL, stored at room temperature. Analyses done by ESI-Q-TOF.

Diluent	% initial concentration remaining <sup>a</sup>				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
<b>water for injection</b>	100,24 ± 1.99	98.84 ± 0.52	98.35 ± 0.56	97.24 ± 0.27	93.80 ± 1.76

<sup>a</sup> Mean ± SD of three triplicate samples

For the samples reconstituted and diluted on infusion fluids at 5 mg/mL, a significant drug degradation was observed when diluted on 5% glucose, where in only 4 hours at room temperature a reduction of approximately 10% of its initial content was observed. In saline solution, also at room temperature, meropenem maintained its content above 90% for up to 12 hours. A similar behavior was observed for samples stored under refrigeration. For this condition, meropenem maintained its content above 90% for up to 24 hours when diluted on saline solution, and for less than 12 hours in samples diluted on 5% glucose. The degradation rates obtained corroborate with the study published by Patel and Cock (1997), which observed a higher degradation when prepared in solutions with glucose. Visually it is possible to notice the color change of meropenem samples prepared in 5% glucose, from colorless to slightly yellowish in 4 hours. The results obtained are expressed in Tables 6.5 and 6.6.

Table 6.5. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of meropenem in infusion solutions at 5 mg/mL, stored at room temperature.

Diluent	% Initial concentration remaining <sup>a</sup>						
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24h
<b>0.9 % NaCl for injection</b>	99.98 ± 1.68	97.55 ± 1.54	96.68 ± 0,20	95.49 ± 0.41	94.23 ± 1.05	92.06 ± 1.16	87.31 ± 0.95
<b>5 % Gluc. for injection</b>	100.17 ± 0.98	94.33 ± 0.96	90.88 ± 1.35	85.20 ± 0.50	79.07 ± 0.72	72.99 ± 0.76	53.54 ± 1.11

<sup>a</sup> Mean ± SD of three triplicate samples

Table 6.6. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of meropenem in infusion solutions at 5 mg/mL, stored under refrigeration.

Diluent	% Initial concentration remaining <sup>a</sup>					
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
<b>0.9 % NaCl for injection</b>	98.52 ± 0.52	95.37 ± 0.58	90.99 ± 4.31	85.27 ± 2.22	83.01 ± 3.52	78.86 ± 7.41
<b>5 % Gluc. for injection</b>	100.53 ± 2.48	87.65 ± 0.41	83.54 ± 1.91	67.61 ± 0.49	64.93 ± 2.38	54.38 ± 2.98

<sup>a</sup> Mean ± SD of three triplicate samples

The degraded samples (reconstituted sample) were analyzed by ESI-QTOF-MS, and the representative mass spectra are presented in the Figures 6.9 and 6.10. Two degradation products were detected, being one of  $m/z$  402, formed in both infusion fluids, and another of  $m/z$  564, formed only in the samples diluted on 5% glucose solution. The product of  $m/z$  402 (Figure 6.5) is generated by the cleavage of the  $\beta$ -lactam ring, which has been already described on literature. For carbapenems, the hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring is common to occur immediately after reconstitution, being already studied for doripenem and imipenem [12,18,19].

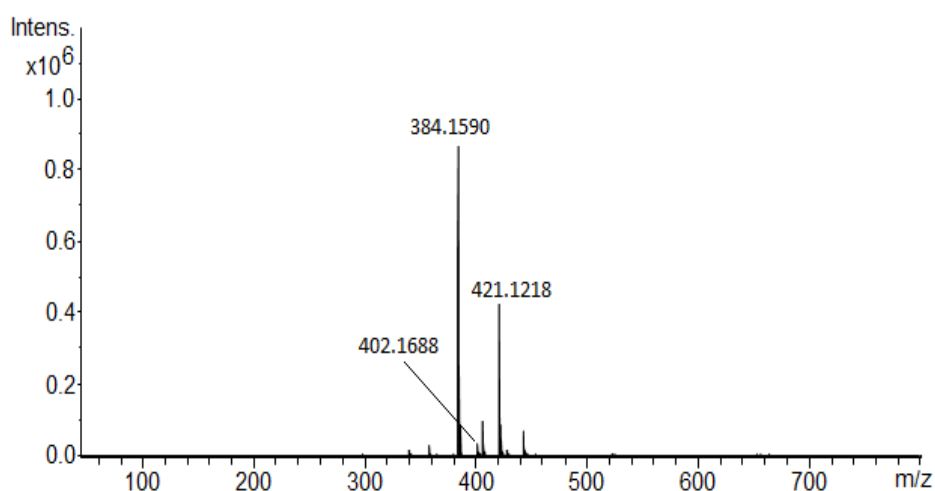


Figure 6.9. Line spectrum  $[M+H]^+$  of meropenem diluted on 0.9% NaCl for injection, stored during 24 hours at room temperature. Analysis done by direct infusion ESI-Q-TOF.



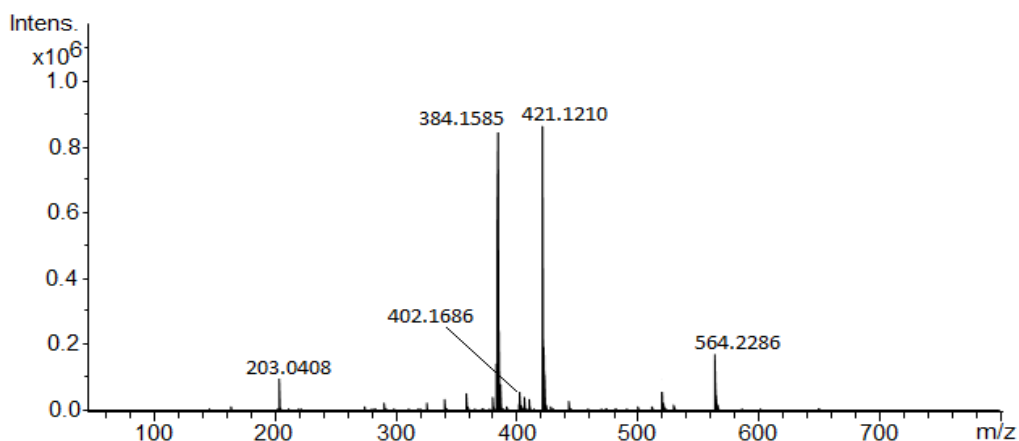


Figure 6.10. Line spectrum  $[M+H]^+$  of meropenem diluted on 5 % glucose for injection, stored during 24 hours at room temperature. Analysis done by direct infusion ESI-Q-TOF.

For degradation product at  $m/z$  564, the chemical structure and reaction mechanism is shown in Figure 6.11. This purpose is based on results from the mass of  $[M+H]^+$  ion and fragments obtained by MS/MS experiments. In summary, its formation is resulted from hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring, followed by the attachment of a glucose molecule to the nitrogen of pyrrolidine ring. A similar mechanism is proposed by Shadbad et al. [20] for acyclovir, with infusion solutions containing glucose.

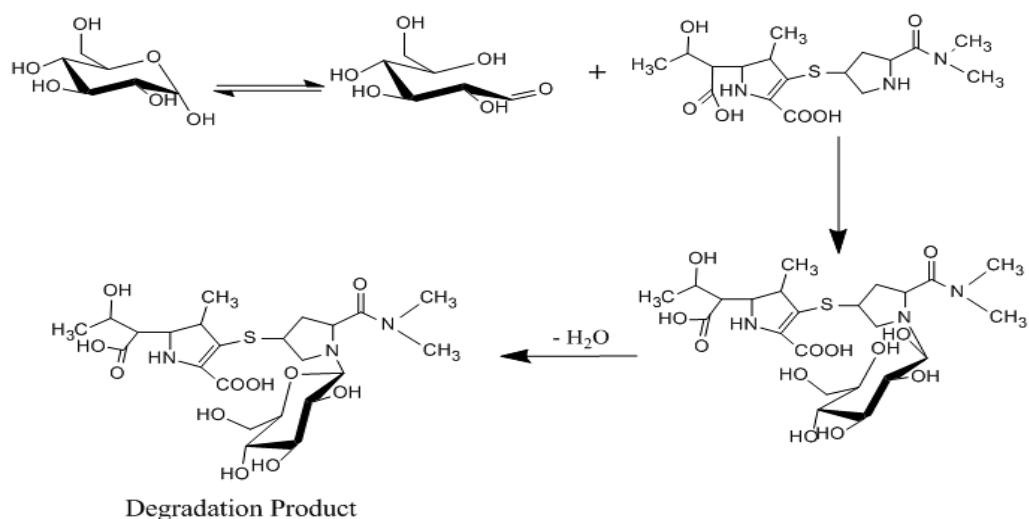


Figure 6.11. Proposed chemical structure and decomposition route referred to degradation product  $m/z$  564 detected on the samples reconstituted with glucose 5%. Identification performed through results from direct infusion ESI-Q-TOF.

The ESI-MS/MS spectra of the degradation product  $m/z$  564 are shown in Figure 6.12. When fragmented with collision energy of 5 eV (Figure 6.12A), a fragment of  $m/z$  520, referring to the loss of  $-\text{COOH}$ , is detected. When collision energy of 15 eV is used, three further fragments of  $m/z$  358, 302 and 175 (Figure 6.12B) are generated. The proposed fragmentation is shown in Figure 6.13.

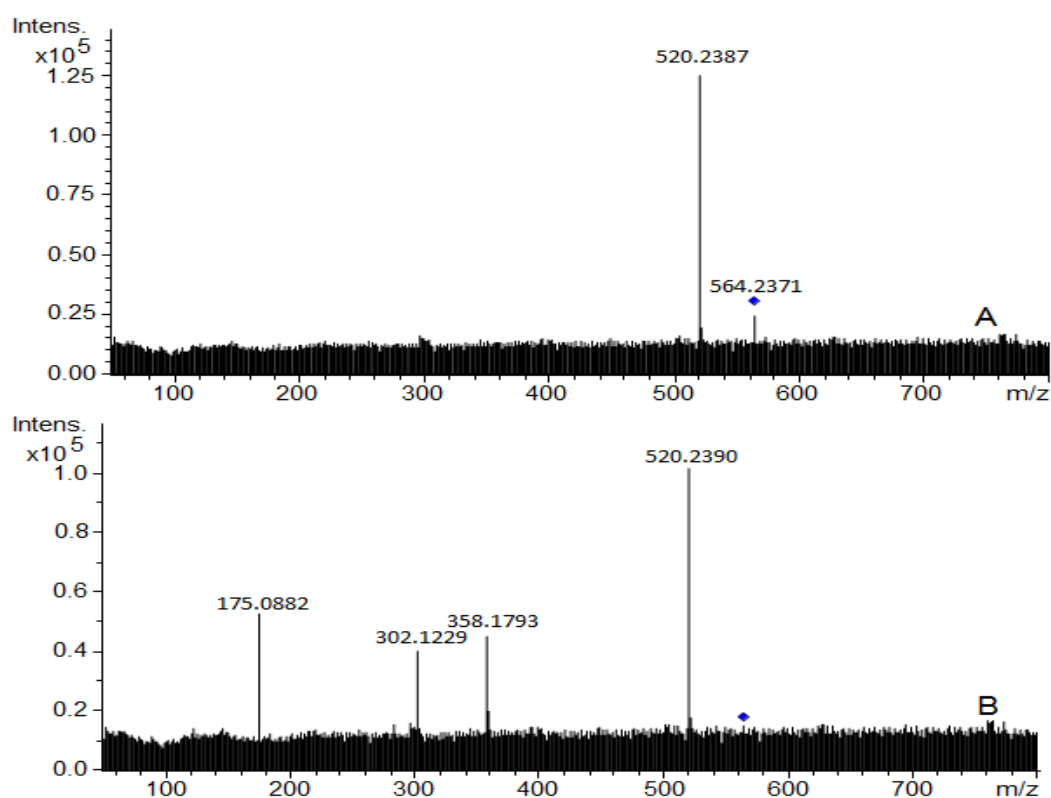


Figure 6.12. ESI-MS/MS spectra  $[\text{M}+\text{H}]^+$  obtained from the signal of degradation product of meropenem ( $m/z$  564). (A) CID at 5 eV; (B) CID at 15 eV.

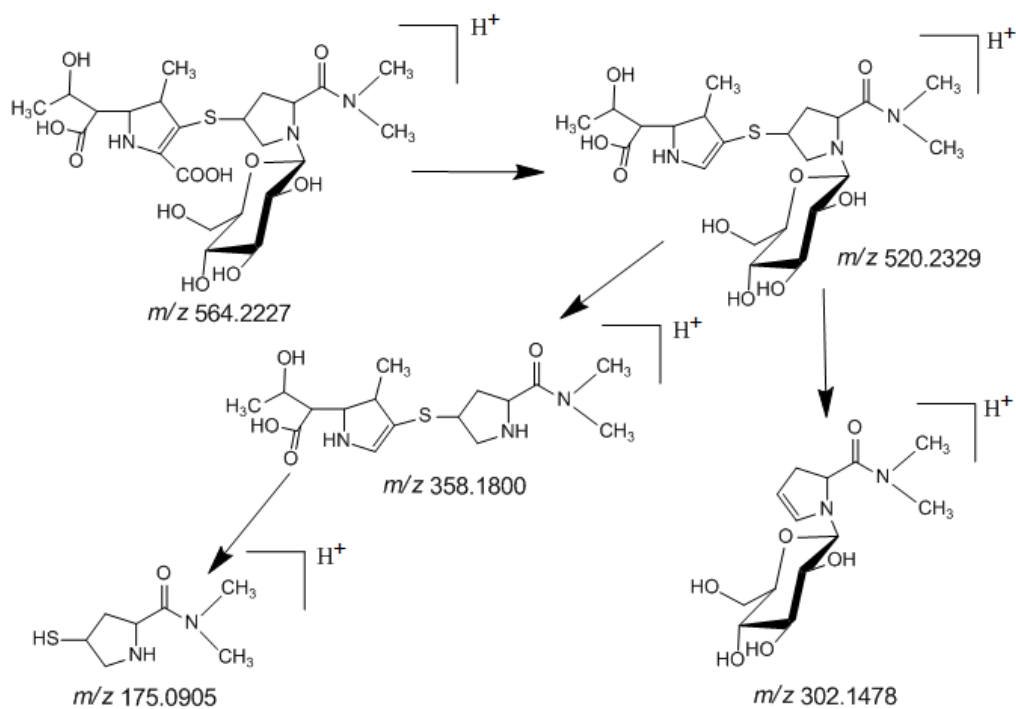


Figure 6.13. Proposed chemical structure and fragmentation route for protonated degradation product  $m/z$  564, identified from MS/MS analysis of meropenem degraded samples.

For a complementary investigation, the pH of the samples stored at room temperature was measured, and all solutions presented values within the limits specified in official monographs, from 7.3 to 8.3.

### 6.2.5. Conclusions

ESI-Q-TOF method by direct infusion was developed and validated for quantitative analysis of meropenem. Four degradation products from stress studies could be detected and characterized simultaneously to the quantitative assay. Conditions of oxidative degradation was responsible for finding two new degradation products, not yet described on literature. For the stability after reconstitution, under conditions that simulate clinical use, meropenem was highly unstable, mainly when diluted on 5% glucose solution. At room temperature, the drug maintained its content > 90% during 12 hours in samples prepared with 0.9% NaCl, and during 4 hours in samples prepared with 5% glucose solution. Through ESI-MS/MS two main degradation products were detected in the reconstituted samples: one generated by cleavage of the  $\beta$ -lactam ring, detected in both clinical conditions, and another resulted from the

interaction between meropenem and glucose, detected only in glycoside solutions. In general, all the results obtained here in the stability studies contribute to the knowledge about this antibiotic and future candidates from this class.

#### **6.2.6. References**

- [1] M.J.F. Martínez, M.G. Garcia, E.G. Sánchez, J.E.G. Sánchez, Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28 (2010) 56 – 64.
- [2] J.R. Edwards, Meropenem: a microbiological overview, *J, Antimicrob. Chemother.* 36 (1995) 1 – 17.
- [3] L.R. Wiseman, A.J. Wagstaff, R.N. Brogden, H.M. Bryson, Meropenem. A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy, *Drug Evaluation.* 50 (1995) 73 – 101.
- [4] M.I. El-Gamal, I. Brahim, N. Hisham, R. Aladdin, H. Mohammed, A. Bahaaeldin, Recent updates of carbapenem antibiotics, *Eur. J. Med. Chem.* 131 (2017) 185 – 195.
- [5] ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS Q1A(R2). 2003.
- [6] ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities in new drug substances Q3A(R2). 2006.
- [7] P.R. Patel, S.E. Cook, Stability of meropenem in intravenous solutions, *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 54 (1997).
- [8] E.M. Grant, M. Zhong, P.G. Ambrose, D.P. Nicolau, C.H. Nightingale, R. Quintiliani, Stability of meropenem in a portable infusion device in a cold pouch, *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 57 (2000) 992 – 5.

- [9] Y. Takeuchi, M. Sunagawa, Y. Isobe, Y. Hamazume, T. Noguchi, Stability of a 1 beta-methylcarbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338) in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.* 43 (1995) 689 – 8692.
- [10] A.S.L. Mendez, J. Dalomo, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1363 – 1366.
- [11] J. Cielecka-Piontek, M. Zajac, A. Jelinska, A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 52 – 57.
- [12] A. Mendez, P. Chagastelles, E. Palma, N. Nardi, E. Schapoval, Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity, *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 95 – 102.
- [13] S. Cai, C. Ru, Chromatographic determination of polymerized impurities in meropenem, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 585 – 589.
- [14] O. Almarsson, M.J. Kaufman, J.D. Stong, Y. Wu, S.M. Mayr, M.A. Petrich, J.M. Williams, Meropenem Exists in Equilibrium with a Carbon Dioxide Adduct in Bicarbonate Solution, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 663.
- [15] A.S.L. Mendez, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 947 – 954.
- [16] N.A. Elragehy, E.M. Abdel-Moety, N.Y. Hassan, M.R. Rezk, Stability-indicating determination of meropenem in presence of its degradation product, *Talanta.* 77 (2008) 28–36
- [17] A.S.L. Mendez, V. Weisheimer, T.P. Oppe, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 649 – 653.
- [18] F.S. Barbosa, J.P.E. Cassol, L.A.C. Batista, E.W. Cordeiro, M.C. Castro, A.R. Pohlmann, E.E.S. Schapoval, C.V. Garcia, A.S.L. Mendez, Stability of doripenem in reconstituted solution – thermal and oxidative decomposition

kinetics and degradation products by LC–MS, *Biomed. Chromatogr.* 31 (2017) e3940.

[19] F.S. Barbosa, L.C. Pezzi, M. Tsao, T.F. Oliveira, S.M.D. Macedo, E.E.S. Schapoval, A.S.L. Mendez, Stability and degradation products of imipenem applying high-resolution mass spectrometry: An analytical study focused on solutions for infusion, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019) e4471.

[20] M.R.S. Shadbad, F. Ghaderi, L. Hatami, F. Monajjemzadeh, Investigation of Possible Maillard Reaction Between Acyclovir and Dextrose upon Dilution Prior to Parenteral Administration. *AAPS PharmSciTech.* 17 (2016).

---

**7. Capítulo IV: Desenvolvimento e validação de método por LC-ESI-QTOF para determinação da estabilidade pós-reconstituição do antibiótico doripenem.**

---





## 7. Capítulo IV: Desenvolvimento e validação de método por LC-ESI-QTOF para determinação da estabilidade pós-reconstituição do antibiótico doripenem.

### 7.1. Introdução

O doripenem é o derivado carbapenêmico parenteral mais recente a entrar no mercado, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2007 para o tratamento de infecções intra-abdominais e no trato urinário. Em seu amplo espectro de ação, o doripenem combina uma atividade similar à do imipenem frente a bactérias Gram-positivas e similar ao meropenem frente a bactérias Gram-negativas, aliado a características de maior resistência à hidrólise por enzimas  $\beta$ -lactamases, o que o coloca no topo da classe das carbapenemas (GOLDSTEIN et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010; EL-GAMAL et al., 2017). Quimicamente, o doripenem apresenta estrutura bastante semelhante ao meropenem, com a adição de um grupamento sulfamoxil-aminoetil em sua cadeia lateral (MARTÍNEZ et al., 2010; EL-GAMAL et al., 2017).

Em trabalho publicado por Sham (2009), a atividade microbiológica do doripenem é testada frente a uma ampla gama de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo notável a maior atividade do doripenem frente a bactérias Gram-negativas multirresistentes como *P. aeruginosa*, no qual a concentração inibitória mínima (CIM<sub>90%</sub>) foi de 2 a 4 vezes menor comparada com a CIM<sub>90%</sub> de outras carbapenemas.

Quanto à determinação analítica do doripenem em forma farmacêutica, diferentes métodos encontram-se descritos na literatura. Destacam-se os métodos por cromatografia líquida de alta e ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos (CIELECKA-PIONTEK et al., 2012; MANTOVANI et al., 2012; REDDY et al., 2014; BARBOSA et al., 2017), e o método espectrofotométrico por UV-derivada (CIELECKA-PIONTEK et al., 2010).

A estabilidade química do doripenem também é relatada em diferentes trabalhos. Barbosa e colaboradores (2017) determinaram a cinética de

degradação do doripenem em amostras reconstituídas em água, na concentração de 4,5 mg/mL em três temperaturas (25, 35 e 45 °C), e também a cinética de decomposição oxidativa. Neste estudo são propostos seis produtos de degradação, três destes oriundos de um processo de dimerização. A estabilidade pós-reconstituição também é avaliada por Psathas e colaboradores (2008), cujos resultados ilustraram que, em solução salina, as amostras mantiveram sua potência durante 12 horas mantidas em temperatura ambiente, e por 72 horas sob refrigeração. Quando reconstituídas em dextrose 5%, os tempos de manutenção de potência foram de 4 horas à temperatura ambiente e 48 horas sob refrigeração. Quanto à estabilidade do fármaco em estado sólido, Cielecka-Pionteck (2012) determinaram parâmetros cinéticos e termodinâmicos do doripenem em diferentes condições de temperaturas e umidade. Quando degradado com baixa umidade relativa do ar, observou-se uma reação cinética de primeira ordem. Em condições de elevada umidade, observou-se um modelo cinético de autocatálise, onde o produto formado atua como um catalisador de sua própria reação.

Devido à instabilidade já relatada do doripenem, principalmente quando em solução, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método por LC-ESI-QTOF para a avaliação da estabilidade química do doripenem pós-reconstituição e sob condições de estresse. Também tem como foco realizar o estudo de degradação *in silico*, como ferramenta auxiliar na identificação dos produtos e das vias de degradação.

---

**7.2. Artigo Científico: Stability study of doripenem antibiotic applying LC-ESI-QTOF method and *in silico* prediction: an analytical investigation focused on degradation products**

Submetido para publicação no periódico European Journal of Pharmaceutical Sciences.

---



### 7.2.1. Abstract

In the present study, the stability of the antibiotic doripenem was evaluated with a focus on identifying the generated degradation products. For this, a method by LC-ESI-QTOF was developed and validated. Also, as an auxiliary tool in the identification of degradation products, Zeneth 7 software was used in the prediction of drug degradation *in silico*. Under stress conditions, six degradation products were detected and based on the literature and MS<sup>2</sup> analyzes, their structures were proposed. Under hydrolytic conditions, in acid, neutral and alkaline media, the major degradation product was formed through the cleavage of the  $\beta$ -lactam ring. In neutral hydrolysis, the formation of two drug dimers was also observed. Oxidation of the drug using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) led to the formation of three degradation products, generated by oxidation of the thioether group and by decarboxylation reaction. The most probable elemental compositions for degradations products were obtained with a high degree of confidence, where the error between the masses observed and calculated was less than 5 ppm. The stability of doripenem after reconstitution was studied in conditions that simulate its clinical use. At room temperature, the drug demonstrated a similar degradation profile when prepared using 0.9% NaCl and 5% glucose for infusion, keeping its content > 90% for at least 8 hours, and the LC-ESI-QTOF analyzes detected the formation of three degradation products. Finally, all the data generated help to understand the degradation behavior of doripenem and its important antibiotic class.

**Keywords:** Doripenem, Stability, Degradation Products, *in silico* prediction, LC-ESI-QTOF.

### 7.2.2. Introduction

Doripenem (Figure 7.1) is a carbapenem derivative approved by the European Medicines Agency (EMA) in 2008, for the treatment of intra-abdominal and urinary tract infections. In its broad spectrum of action, doripenem combines an activity similar to that of imipenem against Gram-positive bacteria and similar to meropenem against Gram-negative bacteria, combining characteristics with greater resistance to hydrolysis by  $\beta$ -lactamase enzymes, which puts it at the top of the carbapenem class (El-Gamal et al., 2017; Goldstein and Citron, 2009; Martínez et al., 2010). Because it is used in prolonged infusions (4 hours) (Cirilo et al., 2009), the stability of this drug in solution is an important aspect to be considered. Extensive degradations can lead to loss of effectiveness and also form degradation products that can compromise the safety of the therapy.

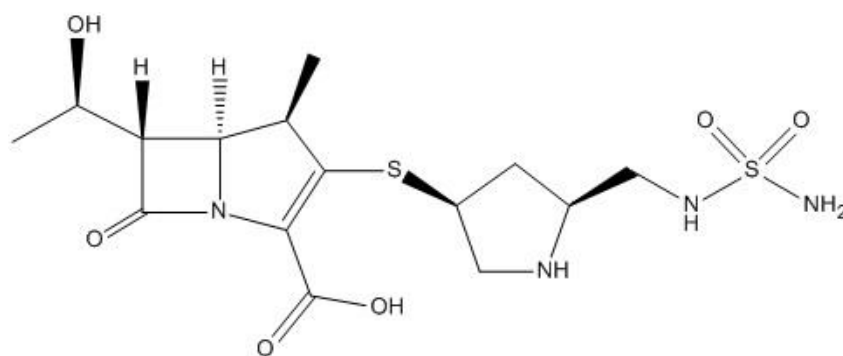


Figure 7.1. Chemical structure of doripenem.

The stability of doripenem in solution has been reported by several studies. Barbosa et al. (2017) determined the thermal degradation kinetics at temperatures of 25, 35 and 45 °C, where it was observed that the increase of 10 °C in the temperature doubled the degradation rate. Cielecka-Piontek and Jelinska (2010) also evaluated the stability of doripenem in solution over a wide pH range, where first-order kinetics was observed, and greater stability in the pH range between 5 and 7. Psathas and collaborators (2008) evaluated the stability of doripenem after constitution (50 mg mL<sup>-1</sup>) and in infusion fluids at a concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup>, using 5% dextrose and 0.9% sodium chloride. Also using infusion fluids, Crandon and collaborators (2010) studied the stability of doripenem in polyvinyl chloride bags and elastomeric pumps.

In the last decades, impurities and degradation products have special attention from regulatory agencies, and there has been a radical change in the concept of 'quality' of pharmaceutical products. The focus has definitely shifted from 'purity' to 'impurities' (IMPs) in drug substances and 'degradation products' (DPs) in finished pharmaceutical products (Singh et al., 2012). However, understanding the degradation of pharmaceutical products is a complex task, and this is due to the intrinsic molecular complexity of many drugs, that can contain several functional groups that can undergo multiple reactions simultaneously or in sequence (Alsante et al., 2013). In this context, *in silico* prediction studies not only assist in the identification and proposition of degradation pathways, but also help to expand the number of hypothetical degradation products that must be taken into account. Also, the researchers can use this prediction tool to gain a broader view of potential degradation products, and help to define stress conditions.

The aim of the present work is the development of an LC-ESI-QTOF method to assess the stability of the doripenem antibiotic, submitted to a stress conditions and also after reconstitution in infusion fluids. This study is focused on the identification of the formed degradation products, the *in silico* prediction of products, and degradation pathways using the Zeneth 7 software (Lhasa Limited, Leeds, UK).

### **7.2.3. Materials and methods**

#### **7.2.3.1. Chemicals and reagents**

Doripenem reference standard (99.40%) was purchased from AK Scientific Inc. (Mountain View, CA, USA). Doribax® 500 mg (doripenem monohydrate) was purchased in the market. Acetonitrile LC-MS grade was obtained from Merck (Darmstadt, Germany); formic acid 98 % Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA); sodium hydroxide and hydrogen peroxide were purchased from Synth (São Paulo, Brazil); hydrochloric acid purchased from Química Moderna (Barueri, SP, Brazil). Purified water was obtained using a Milli-Q Plus® system (Millipore, Bedford, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

#### 7.2.3.2. Quantitative method validation

The quantitative method was validated according to protocols recommended by official guidance, and the parameters evaluated in the validation were specificity (for stress testing); linearity; precision and accuracy (ICH, 2005).

#### 7.2.3.3. Instrumentation and analytical conditions

The analysis were performed in the Prominence® Liquid Chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a degasser DGU-20A XR; LC-20AD XR pumps; SIL-20AD XR autosampler; CTO-20 AC column oven and CBM 20A controller, coupled to mass spectrometer micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an ESI interface. The source and tuning settings used are described in Table 7.1.

For chromatographic analysis, a Zorbax Eclipse Plus C18 column (50 × 2.1 mm i.d, 1.8 µm particle size; USA) was used. The analyses were performed in isocratic elution mode with a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> using a mobile phase consisting of ultrapure water and acetonitrile (95:5 v/v) both fortified with 0.1% formic acid. The column oven was kept at 40°C and 5 µL injection volume. All samples used for validation were prepared and diluted in ultrapure water.

The mass spectrometer was calibrated through a solution of sodium formate (10mM) in positive mode, and the control of LC-ESI-QTOF equipment and mass data were processed using Hystar 3.2 and Data Analysis 4.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

#### 7.2.3.4. Specificity and stress testing

Due to the absence of excipients in the formulation of doripenem, the stress test was performed with the medication. The drug degradation pathways are usually reactions of hydrolysis, oxidation, photolysis and/or acid-base chemistry. In this work, doripenem was subjected to degradation under conditions of hydrolysis in acidic, neutral and alkaline media, oxidation, heat, humidity and photolysis. The test was conducted for degradation between 10 -



30% when compared to non-degraded (ICH, 2003; WHO, 2005). All conditions used are summarized in Table 7.2.

Table 7.1. Source and tuning settings for LC-ESI-QTOF analysis.

Parameter	Setting
<b>Source</b>	
Ion mode	positive
Capillary voltage	4.5 kV
Drying gas temperature	200 °C
Drying gas flow	6 L min <sup>-1</sup>
Nebulizing gas pressure	2.0 bar
<b>Transfer</b>	
Funnel 1 RF	200 vpp
Funnel 2 RF	200 vpp
isCID Energy	0.0 eV
Hexapole RF	100 vpp
<b>Quadrupole</b>	
Ion Energy	10 eV
Low Mass	200 <i>m/z</i>
<b>Collision Cell</b>	
Collision Energy	0 eV
Collision RF	120 vpp
Transfer Time	50.0 μs
Pre Pulse Storage	6.0 μs

All the stressed samples were diluted with mobile phase until concentration of analysis and filtered through 0.22 μm membrane filter before LC-ESI-QTOF analysis.

In parallel to the forced degradation study, the software Zeneth 7 (Lhasa Limited, Leeds, UK) was used to predict the degradation of doripenem. The prediction of degradation products was made considering the following stressors: temperature, pH, water, oxygen, peroxide, initiator radical and light.

Table 7.2. Stress conditions for degradation of doripenem during stability study and development of LC-ESI-QTOF method.

Stress factor	Stressors	Exposure time and temperature
Acid <sup>a</sup>	0.1 mol L <sup>-1</sup> HCl	35 min – room temperature
Alkaline <sup>a</sup>	0.05 mol L <sup>-1</sup> NaOH	10 min – room temperature
Neutral <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O	8 hour – 40 °C
Oxidation <sup>a</sup>	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 min – room temperature
Heat <sup>b</sup>	70 °C	6 days
humidity <sup>b</sup>	75 % RH	12 hours – 40 °C
Photolysis <sup>b</sup>	UV-C radiation	1 day

<sup>a</sup> Solutions were prepared at 1.0 mg mL<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> Solid state

#### 7.2.3.5. Stability after reconstitution

The doripenem samples were weighed and reconstituted at a concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup> (recommended concentration for clinical use), in glass flasks, using 0.9% sodium chloride (Equiplex indústria farmacêutica Ltda, Aparecida de Goiânia, GO, Brazil) or 5% glucose solution (Viaflex Mini-Bag, Baxter Hospitalar Ltda, São Paulo, SP, Brazil). The samples were stored at room temperature for a period of 24 hours under fluorescent light, and refrigerated (between 2 - 8 ° C), for a period of up to 72 hours. Aliquots of these samples were collected at different time intervals. Immediately after collection, the samples were diluted to the concentration of analysis and frozen at -20 °C for further analysis. All samples were prepared in triplicate. The samples stored at room temperature were quantified using the method proposed by LC-ESI-QTOF, and the samples stored in refrigeration were quantified by HPLC-DAD method, using a method developed by Mantovani and collaborators (2012).

### 7.2.4. Results and discussion

#### 7.2.4.1. Quantitative method validation

In the development of the analytical method, different chromatographic systems were tested, seeking a low analysis time and with low consumption of solvents in the mobile phase. The system's suitability was evaluated by series of parameters as plates (N), retention factor (k'), peak asymmetry or tailing

factor (T) and resolution (R), and the best results were obtained using 95% ultrapure water with 0.1% formic acid with a flow of 0.2 mL min<sup>-1</sup>.

#### 7.2.4.1.1. Linearity, precision and accuracy

For the linearity, three standard curves were constructed with six points in the range of 1.0 – 10.0 µg mL<sup>-1</sup>, and the regression equation obtained were  $y = 169886x - 117889$  ( $r = 0.9994$ ). Statistical analysis by ANOVA confirmed the linear regression ( $F_{\text{calc}} 30595 > F_{\text{critical}} 4.75$ ,  $p = 0.05$ ) and shows that there is no deviation from linearity ( $F_{\text{calc}} 3.3 < F_{\text{critical}} 3.49$ ,  $p = 0.05$ ), and the standard regression error was 2.29 %. The significance of the coefficients was also assessed; the slope value was statistically different from zero, as recommended, and the intercept value also found was statistically different from zero. Therefore, for routine analysis, it is not recommended to use a single-point calibration. A standard curve must be considered. The analysis of the regression residues showed random dispersion with the absence of outliers; the residues showed a constant variance and homoscedasticity were confirmed by the Cochran C- test ( $C_{\text{calc}} 0.568 < C_{\text{critical}} 0.616$ ).

The precision parameter was evaluated through repeatability (intra-day assay) and reproducibility (inter-day assay). Repeatability was evaluated through nine determinations, covering the linear range of the analytical method: low (1.0 µg mL<sup>-1</sup>), medium (5.0 µg mL<sup>-1</sup>) and high (10.0 µg mL<sup>-1</sup>), with three replicates at each level. The mean content of doripenem found in repeatability (n=9) was 99.44 % with a RSD of 3.07 %. The reproducibility was studied by comparing the assays on two different days, and the mean content of doripenem found in reproducibility (n=18) was 98.34% with a RSD of 3.31 %. Accuracy was determined by the recovery of known amounts of doripenem reference standard added to samples. The added levels were 20, 40 and 60% of the sample concentration (5.0 µg mL<sup>-1</sup>). The average recovery values were between 95.90 – 99.31 %, with low values of RSD (< 2.0%) during analysis.

#### 7.2.4.2. Stress testing and *in silico* prediction of degradation products

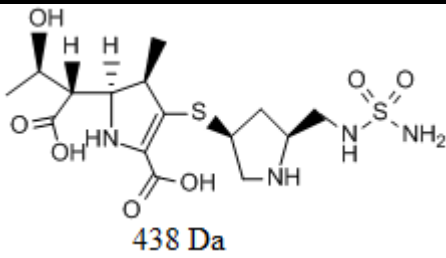
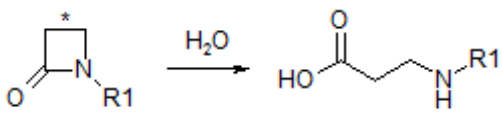
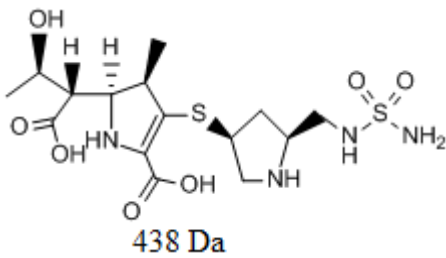
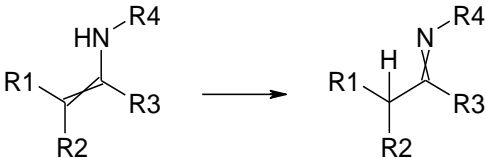
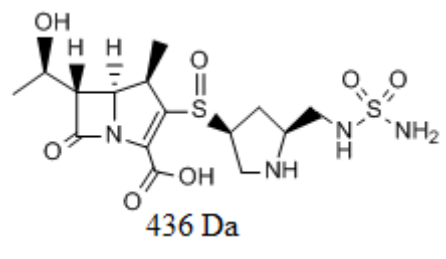
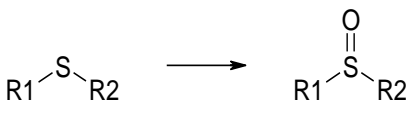
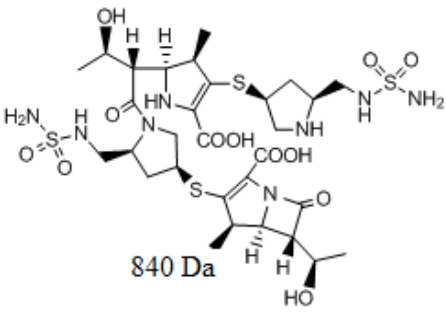
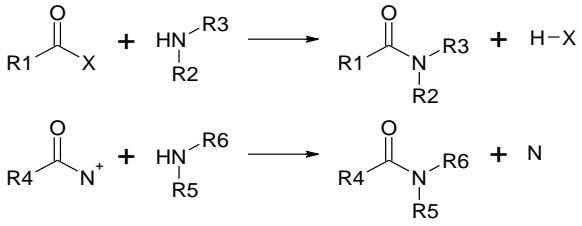
Stress tests are the main tool used to identify degradation products and pathways, development of analytical methods and mainly to predict stability

problems (Baertschi and Reynolds, 2011). For the specificity of the method, the stress tests demonstrated that there is no formation of degradation products capable of compromising the safe quantification of doripenem, which was performed using the extracted ion chromatogram ( $[M+H]^+$  421.1210  $\pm$  0.5).

The *in silico* prediction showed a large number of hypothetical degradation products (> 80) and they were classified according to their probability of formation. Some of the products classified as most likely are shown in Table 3, with emphasis on products formed by the hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring, S-oxidation of thioether to sulfoxide, and N-acetylation.

In the stress test, six degradation products were visualized with protonated mass  $[M+H]^+$  439; 437; 427; 411; and two dimers that showed protonated mass  $[M+2H]^{2+}$  421. Among these six detected degradation products, the  $[M+H]^+$  439, 437 and one dimer products had their structure and degradation path predicted by *in silico* analysis. The total ion chromatograms of the degraded doripenem samples are shown in Figure 7.2.

Table 7.3. Main products and degradation pathways generated by *in silico* prediction in the Zeneth software.

Degradation product	Transformation name	Description
 <p>438 Da</p>	Hydrolysis of beta-lactam	 <p>The bonds marked * may also be aromatic.</p>
 <p>438 Da</p>	Hydrolysis of beta-lactam and Tautomerisation of primary or secondary enamine to imine	 <p>R1-R3 = any atom except *C(=O)R5 R4 = any atom except R6 R5 = carbon or hydrogen R6 = any atom (multiply bonded to a heteroatom; both atoms may have positive charge)</p>
 <p>436 Da</p>	S-Oxidation of thioether to sulphoxide	 <p>R1, R2 = aliphatic carbon (not multiply bonded to another heteroatom) or aromatic carbon</p>
 <p>840 Da</p>	N-Acylation of amine, hydroxylamine or hydrazine	 <p>X = F, Cl, Br, I, R7, O-R8, N-R9, S-R10 R1, R4 = carbon or hydrogen R2, R5 = aliphatic carbon (not multiply bonded and not attached to another heteroatom) or aromatic carbon or hydrogen R3, R6 = aliphatic carbon (not multiply bonded and not attached to another heteroatom) or aromatic carbon or hydrogen or oxygen or nitrogen (not multiply bonded)</p>

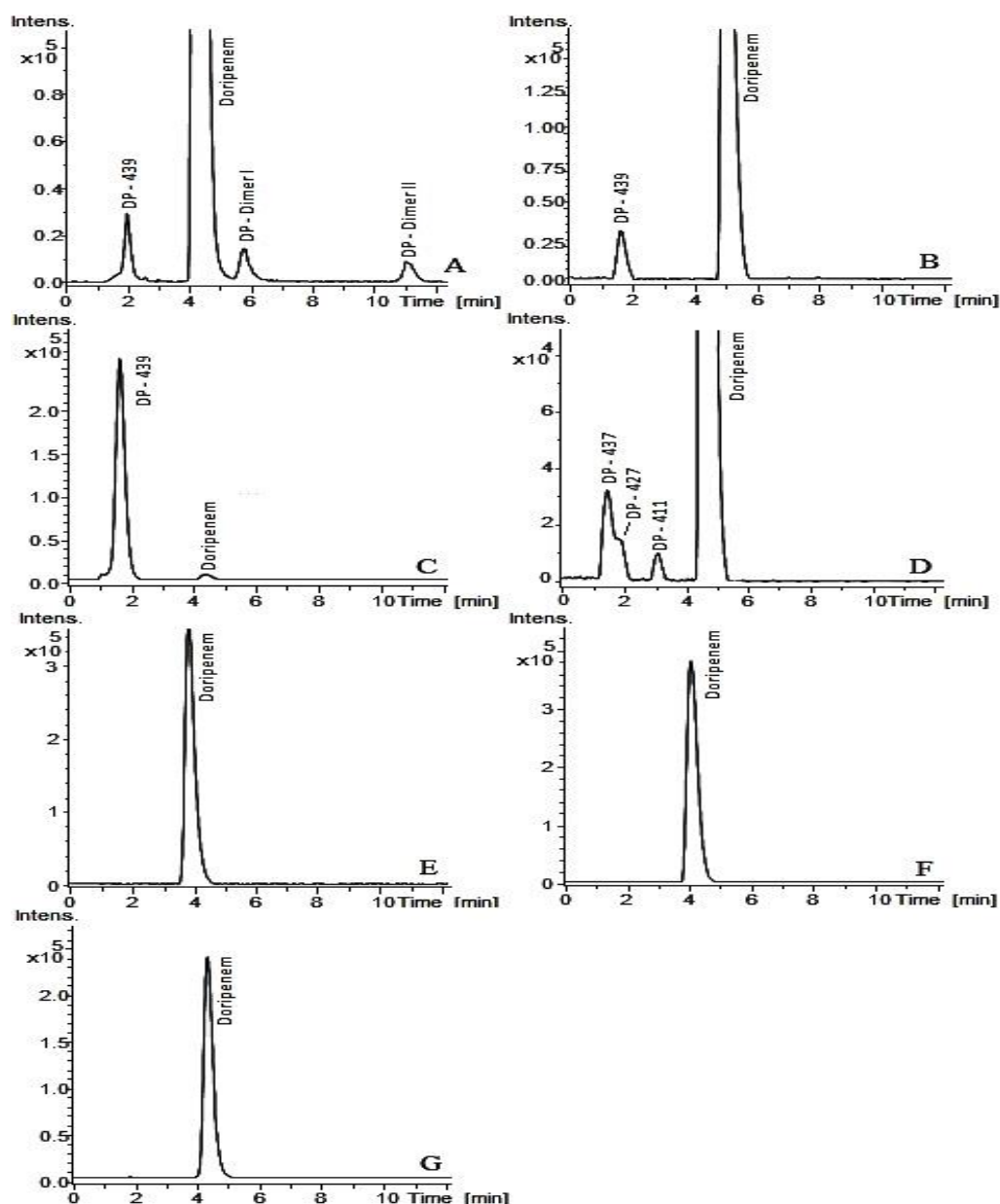


Figure 7.2. Total ion Chromatograms obtained from LC-ESI-QTOF analysis of doripenem sample after forced degradation. (A) neutral hydrolysis (H<sub>2</sub>O; 8 h, 40°C) (B) acid hydrolysis (HCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>; 35 min); (C) Alkaline hydrolysis (NaOH 0.05 mol L<sup>-1</sup>; 10 min); (D) oxidative degradation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%; 40 min); (E) photolytic degradation (UV-C light; 1day); (F) humidity (75% HR; 40°C, 12 h); and (G) thermal degradation (70°C; 6 days).

When submitted to hydrolysis conditions in an acidic, neutral and alkaline media, the main degradation product generated that presented *m/z* 439 (named DP-439) and corresponds to the product generated by the hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring (Figure 7.3), which also is recognized as the main metabolite of the

drug. The hydrolysis reaction of the beta-lactam ring is widely reported for carbapenemic derivatives such as imipenem, meropenem and ertapenem (Barbosa et al., 2019; Jadhav et al., 2020; Mendez et al., 2008). In an alkaline media, the degradation occurs more quickly, where using NaOH 0.05 mol L<sup>-1</sup>, in only 10 minutes, the drug is almost completely degraded. The *in silico* analysis indicated that this degradation product may undergo a tautomerism reaction between the enamine and imine forms (2-pyrroline and 1-pyrroline). Ratcliffe et al. (1989) demonstrated the existence of the two forms in equilibrium for the product of the hydrolysis of the imipenem β-lactam ring. Takeuchi et al. (1993), in NMR assays, also demonstrated that in aqueous solution the product of beta-lactam ring hydrolysis of meropenem is presented as a mixture of the isomers 1-pyrroline and 2-pyrroline, where they coexist in equilibrium.

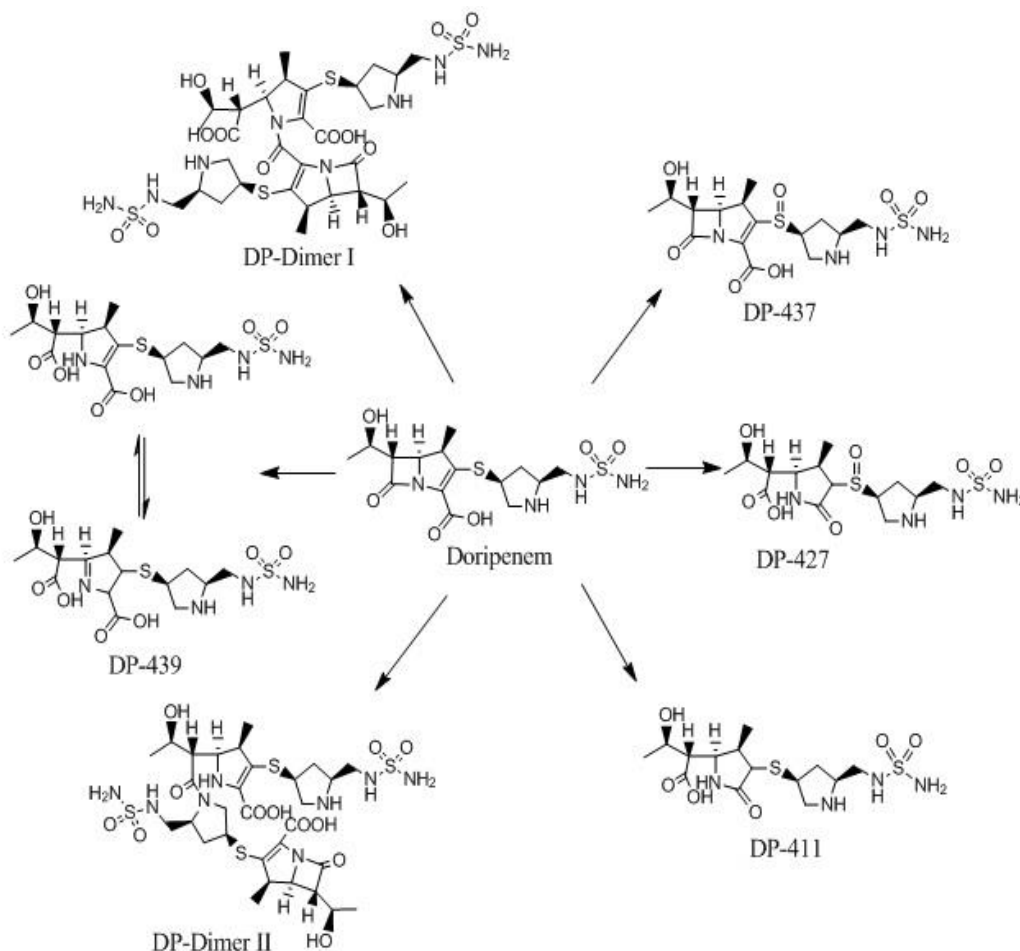


Figure 7.3. Proposition of degradation products obtained from degradation of doripenem when submitted to different stress conditions.

Through collision-induced dissociation (CID), the MS<sup>2</sup> analysis of the degradation product DP-439 was performed (Figure 4). Using a collision energy of 5.0 eV it is possible to visualize the major fragments of *m/z* 395 formed by the loss of –COOH, and the fragments *m/z* 378 and 316, formed by the loss of –COOH followed by the loss of - NH<sub>2</sub>, and sulfone group present in the side chain.

In addition to this degradation product, hydrolysis in neutral medium also generated two other products that were detected with less intensity, both of *m/z* 421. The analysis of the isotopic distribution showed that the difference between the <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes was 0.5 Da, which indicates ionization with two charges, being the actual mass of the products 840 Da, and dealing with two different dimers of doripenem, named in this work as dimers I and II. Dimer I was also the first degradation product detected in the stability study after reconstitution, and based on previous work, its formation probably occurs through an N-acelitation reaction, involving the carboxylic acid of a drug molecule with nitrogen of the beta-lactam ring of another drug molecule. Psathas et al. (2008) studied the stability after reconstitution of doripenem, and reported as the main degradation product a dimer formed through the reaction described above. This same dimerization process is also described by Sanjoz and collaborators (2001) for ertapenem. The proposed chemical structure for dimer II, is based on *in silico* study (Table 3) that indicated with high probability the formation of dimer through N-acetylation, in reaction involving the carbonyl of the β-lactam ring and the pyrrolidinic nitrogen of the side chain. The chemical structure of the proposed dimers is shown in Figure 7.3.

When submitted to oxidation by 3% hydrogen peroxide, three degradation products of [M+H]<sup>+</sup> 437, 427 and 411 were formed. The product DP-437 is formed by the oxidation of the thioether group to sulfoxide, a reaction that occurs easily in the presence of peroxides. The MS<sup>2</sup> analyzes using CID at 10 eV (Figure 4) led to the formation of three major fragments of *m/z* 420 formed by the loss of - NH<sub>2</sub>, *m/z* 358 formed by the loss - SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> and *m/z* 178 formed by the cleavage of the chain side. The oxidation of the thioether group in carbapenems is reported in a study published by El-Kosasy et al. (2020), where complete oxidation of the thioether was observed leading to the formation of a



sulfone in the drugs meropenem and ertapenem. In a study with ertapenem, Jadhav et al. (2020) report the formation of S-oxide and N-oxide. The formation of N-oxide is also reported by Barbosa and collaborators (2020) for the oxidation of meropenem. The degradation products DP-427 and 411 are possibly formed by the oxidation of the thioether group and by the loss of carboxylic acid. This degradation mechanism is proposed by Barbosa and collaborators (2020) for the oxidative degradation of meropenem, which involves the formation of an epoxy intermediate positioned between carbons 2 and 3 of the 5-membered ring followed by the loss of –COOH. A similar reaction was described by Callen and collaborators (1994) in a study of the oxidative degradation of tiagabine, by which the two main degradation products were dihydroxytiagabine and ketotiagabine, likely to take place via a transient epoxide intermediate. The chemical structure proposed for these products and the MS<sup>2</sup> spectra are shown in Figure 7.3 and Figure 7.4.

The most probable elementary compositions of the formed degradation products were obtained with a high degree of confidence, where the error between the observed and calculated masses was less than 5 ppm (Table 4). When submitted to degradation in the solid state, under conditions of heat, humidity and photolysis, it was not possible to visualize the formation of degradation products under the conditions used in the test.

Table 7.4. QTOF mass data of protonated degradations products of doripenem generated from stress testing.

Degradation products	Most probable molecular formula [M+H] <sup>+</sup>	Exact mass of most probable structure	QTOF mass data	Error (ppm)
DP- 439	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	439,1316	439,1320	0.91
DP- 437	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	437,1159	437,1175	3.66
DP- 427	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	427,1316	427,1336	4.68
DP- 411	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	411,1367	411,1370	0.73
DP-Dimer I	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> N <sub>8</sub> O <sub>12</sub> S <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	421.1210	421.1225	3.56
DP-Dimer II	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> N <sub>8</sub> O <sub>12</sub> S <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	421.1210	421.1230	4.75

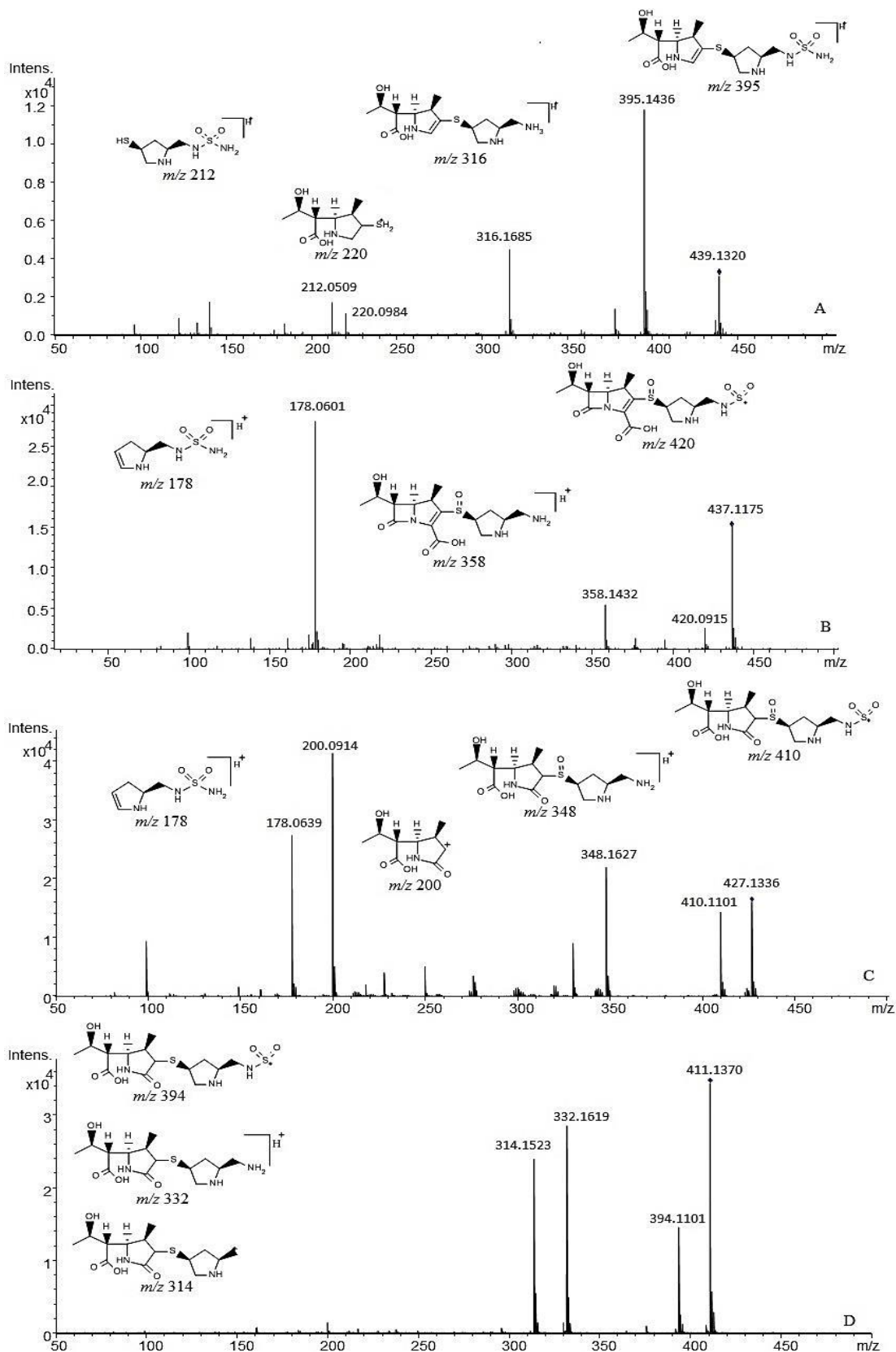


Figure 7.4. ESI-QTOF spectrum of  $[M+H]^+$  ions of doripenem degradation products. (A) DP-439 at 5 eV; (B) DP-437 at 10 eV; (C) DP-427 at 10 eV; (D) DP-411 at 10 eV.

### 7.2.4.3. Stability after reconstitution

In the present study, doripenem showed a similar decomposition profile in both tested diluents. After 4 hours at room temperature, the amounts found were 96.74 % and 96.48 %, for samples reconstituted in 0.9% NaCl and 5% glucose, respectively. For samples stored under refrigeration, the drug remained stable for up to 72 hours. The complete results are shown in Table 7.5, and are in agreement with other works already published in the literature (Crandon et al., 2010; Psathas et al., 2008).

Table 7.5. Analytical results of drug residual concentration obtained from stability of doripenem after reconstitution at 5 mg mL<sup>-1</sup>, stored at room temperature and under refrigeration.

Diluent and temperature	% Initial concentration remaining <sup>a</sup>						
	Room temperature storage					Refrigerated storage	
	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h		
0.9 % NaCl for injection	100.54 ± 0.91	96.74 ± 1.12	94.44 ± 1.20	88.2 ± 3.08	80.97 ± 1.06		
5 % Gluc. for injection	99.48 ± 1.69	96.78 ± 1.07	94.58 ± 1.57	87.17 ± 4.95	81.58 ± 2.52		
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
0.9 % NaCl for injection	102.95 ± 1.92	100.4 ± 2.23	101.01 ± 1.27	101.85 ± 1.22	101.81 ± 1.77	101.39 ± 1.81	98.99 ± 1.56
5 % Gluc. for injection	101.81 ± 1.71	101.49 ± 1.82	101.71 ± 1.72	100.9 ± 1.68	101.58 ± 1.14	99.76 ± 1.93	98.76 ± 2.57

<sup>a</sup> Mean ± SD of three triplicate samples.

LC-ESI-QTOF analyzes detected the formation of three degradation products. In the first analysis times, after 4 hours of storage, it is already possible to observe the formation of DP-Dimer I. After 8 hours of storage, it is already possible to detect the presence of degradation products of DP-439, generated by the hydrolysis of the β-lactam ring, and only after 16 hours of storage it was possible to visualize the DP-Dimer II. Some representative chromatograms are shown in Figure 7.5.

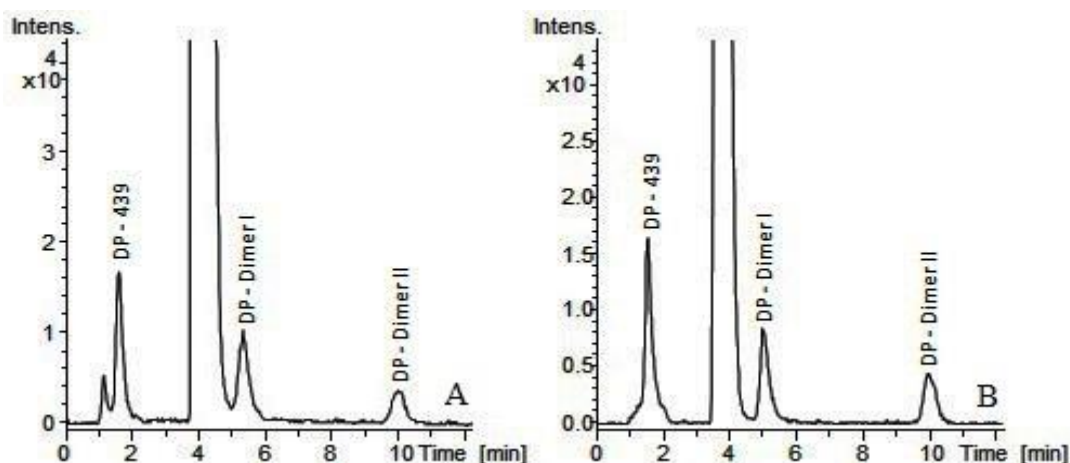


Figure 7.5. Total ion chromatograms obtained from LC-ESI-QTOF analysis of doripenem after reconstitution and stored for 24 hours at room temperature. (a) Sample reconstituted in 0.9% sodium chloride (b) Sample reconstituted in 5% glucose.

## 7.5. Conclusion

This study presents the forced stability and after reconstitution of the antibiotic doripenem. To perform the analyzes, a simple method with low solvent consumption was developed and validated by LC-ESI-QTOF, and the zeneth software was used as a tool for *in silico* prediction of doripenem degradation. In the stress testing, six degradation products were detected, and based on the *in silico* analysis and the exact mass and MS<sup>2</sup> data, their chemical structures were proposed. In stability after reconstitution, doripenem showed a similar degradation profile when diluted in 0.9% NaCl and 5% glucose, and three degradation products were identified, two of these generated by a dimerization process and another formed by hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring. Finally, the method proposed by LC-ESI-QTOF, as well as the prediction of degradation *in silico*, proved to be very useful in the study of the stability of the antibiotic doripenem, and all the data generated help to understand the degradation behavior of this important antibiotic class.

## 7.6. References

Alsante, K.M., Huynh-Ba, K., Baertschi, S.W., Reed, R.A., Landis, M.S., Kleinman, M.H., Foti, C., Rao, V.M., Meers, P., Abend, A., Reynolds, D.W., Joshi, B.K., 2013. Recent trends in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 1: Predicting degradation related impurities and impurity considerations for pharmaceutical dosage forms. *AAPS PharmSciTech.* 15, 198–212. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0047-x>.

Baertschi, S.W., Reynolds, D.W., 2011. Chapter 1 Introduction, in: Baertschi, S.W., Alsante, K.M., Reed, R.A. (Eds), *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation.* Informa Healthcare, London, pp. 2–9. <https://doi.org/10.3109/9781439801802>.

Barbosa, F.S., Cassol, J.P.E., Batista, L.A.C., Cordeiro, E.W., Castro, M.C., Pohlmann, A.R., Schapoval, E.E.S., Garcia, C.V., Mendez, A.S.L., 2017. Stability of doripenem in reconstituted solution – thermal and oxidative decomposition kinetics and degradation products by LC–MS. *Biomed. Chromatogr.* 31, e3940. <https://doi.org/10.1002/bmc.3940>.

Barbosa, F.S., Pezzi, L.C., Tsao, M., Macedo, S.M.D., Oliveira, T.F., Schapoval, E.E.S., Mendez, A.S.L., 2020. Stability in clinical use and stress testing of meropenem antibiotic by direct infusion ESI-Q-TOF: Quantitative method and identification of degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 179, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112973>.

Barbosa, F.S., Pezzi, L.C., Tsao, M., Oliveira, T.F., Macedo, S.M.D., Schapoval, E.E.S.; Mendez, A.S.L., 2019. Stability and degradation products of imipenem applying high-resolution mass spectrometry: An analytical study focused on solutions for infusion. *Biomed. Chromatogr.* 33, e4471. <https://doi.org/10.1002/bmc.4471>.

Callen, G., Chorghade, M.S., Lee, E.C., Nilsen, P.G., Petersen H., Rustum, A., 1994. Identification and synthesis of major oxidative degradation products of tiagabine. *Heterocycles.* 39, 293–303. [https://doi.org/10.3987/COM-94-S\(B\)27](https://doi.org/10.3987/COM-94-S(B)27).

Cielecka-Piontek, J., Jelinska, A., 2010. The UV-derivative spectrophotometry for the determination of doripenem in the presence of its degradation products. *Spectrochim. Acta, Part A*. 77, 554–557. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.06.019>.

Cirillo, I., Vaccaro, N., Turner, K., Solanki, B., Natarajan, J., Redman, R., 2009. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Doripenem After 0.5-, 1-, and 4-Hour Infusions in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 49, 798–806. <https://doi.org/10.1177/0091270009337012>.

Crandon, J.L., Sutherland, C., Nicolau, D.P., 2010. Stability of doripenem in polyvinyl chloride bags and elastomeric pumps. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 67, 1539–44. <https://doi.org/10.2146/ajhp090429>.

El-Gamal, M.I., BRAHIM, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., Bahaaeldin, A., 2017. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* 131, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>.

El-Kosasy, A.M., Abdel-Aziz, O., Youssif, R.M., Salama, N.N., 2020. Feasible oxidative degradates separation with instant quantification of two non-classical  $\beta$ -lactams by derivative UV spectrophotometry and TLC densitometry. *Chem. Pap.* 74, 3557–3567. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01181-7>.

Goldstein, E.J.C., Citron, D.M., 2009. Activity of a novel carbapenem, doripenem, against anaerobic pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.022>.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2003. Stability Testing of new drug substances and products Q1A(R2).

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1).

- Jadhav, R.A., Ahirrao, V.K., Pathan, A.R., Patil, K.R., Rane, V.P., Yeole, R.D., 2020. An Efficient HPLC–MS Method for Impurity Profile of Ertapenem. *Chromatographia*. 83, 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03928-6>.
- Martínez, M.J.F., García, M.G., Sánchez, E.G., Sánchez, J.E.G., 2010. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28, 56–64. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8).
- Mendez, A., Chagastelles, P., Palma, E., Nardi, N., Schapoval, E., 2008. Thermal and alkaline stability of meropenem: degradation products and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 350, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.023>.
- Mantovani, L., Saiyago, C., de Camargo, V.B., Silveira, V., Garcia, C., Schapoval, E., Mendez, A.S.L., 2012. Stability-indicating RP-HPLC Method for Analysis of the Antibiotic Doripenem in Pharmaceutical Formulation Comparison to UV Spectrophotometry and Microbiological Assay. *Acta Chromatogr.* 24, 367–382. <https://doi.org/10.1556/achrom.24.2012.3.3>.
- Psathas, P.A., Kuzmission, A., Ikeda, K., Yasuo, S., 2008. Stability of Doripenem in Vitro in Representative Infusion Solutions and Infusion Bags. *Clin. Ther.* 30, 2075–2087. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.11.013>.
- Ratcliffe, R.W., Wildonger, K.J., Di Michele, L., Douglas, A.W., Hajdu, R., Goegelman, R.T., Springer, J.P., Hirshfield, J., 1989. Studies on the structures of imipenem, dehydropeptidase I-hydrolyzed imipenem, and related analogs. *J. Org. Chem.* 54, 653–660. <https://doi.org/10.1021/jo00264a028>.
- Sajonz, P., Natishan, T.K., Wu, Y., Williams, J.M., Pipik, B., DiMichele, L., Novak, T., Pitzenberger, S., Dubost, D., Almarsson, Ö., 2001. Preparation, isolation, and characterization of dimeric degradation products of the 1 $\beta$ -methyl carbapenem antibiotic, ertapenem. *J. Liq. Chromatogr. Relat.* 24, 2999–3015. <https://doi.org/10.1081/JLC-100107352>
- Singh, S., Handa, T., Narayanam, M., Sahu, A., Junwal, M., Shah, R.P., 2012. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69, 148–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.044>.

Takeuchi, Y., Inoue, T., Sunagawa, M., 1993. Studies on the structures of meropenem (SM-7338) and its primary metabolite. *J. Antibiot.* 46, 827–832.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.827>.

WHO. World Health Organization. 2005. Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. Thirty-ninth report. Appendix 3, 138 – 140.



---

**8. Capítulo V: Avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro* de amostras de meropenem e imipenem após reconstituição.**

---



## **8. Capítulo V: Avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro* de amostras de meropenem e imipenem após reconstituição**

### **8.1. Introdução**

Conforme o já destacado em capítulos anteriores, o estudo de impurezas e produtos de degradação é reconhecido como parte importante no desenvolvimento de novos medicamentos, e está presente em diversas etapas, desde a síntese, o desenvolvimento de formulações, até as condições finais de produção e armazenamento. De acordo com Giordani e colaboradores (2011), a primeira década dos anos 2000 foi marcada por um esforço considerável, realizado tanto por agências reguladoras quanto membros da indústria farmacêutica, para avaliar a toxicidade de impurezas presentes em produtos farmacêuticos.

A toxicidade intrínseca de um medicamento pode causar em um paciente, além de efeitos terapêuticos, efeitos colaterais indesejados, o que torna qualquer terapia uma verdadeira balança entre benefícios e riscos. A aceitabilidade dos riscos associados a esta toxicidade depende de alguns fatores, como o tipo de doença a ser tratada e o tempo de tratamento, que corresponde à duração de exposição ao risco. O grande problema das impurezas presentes no produto farmacêutico é que elas aumentam o risco geral da terapia sem agregar nenhum benefício, e este risco é dependente do número, estrutura química e concentração das mesmas (BOUDER, 2008; GIORDANI et al., 2011).

Devido ao risco associado à presença de impurezas e de produtos de degradação, e o já relatado potencial nefrotóxico das carbapenemas, o presente capítulo tem como objetivo avaliar a citotoxicidade dos antibióticos imipenem e meropenem em amostras degradadas em condições de uso clínico, utilizando ensaios *in vitro* de viabilidade celular, utilizando linhagem celular Vero - rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

## 8.2. Materiais e métodos

### 8.2.1. Amostras de trabalho

Para os experimentos, foram utilizadas amostras comerciais de imipenem (imipenem:cilastatina 500 mg) adquiridas junto a Antibióticos do Brasil Ltda. (Cosmópolis, SP, Brasil), e amostras comerciais de meropenem 500 mg também adquiridas da Antibióticos do Brasil Ltda. (Cosmópolis, SP, Brasil), ambas na forma de pó para solução injetável. Para o preparo das amostras, foram utilizadas bolsas de infusão contendo 100 mL de solução fisiológica (Equiplex indústria farmacêutica Ltda, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), e também bolsas contendo 100 mL de solução de glicose 5 % (Viaflex Mini-Bag, Baxter Hospitalar Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

### 8.2.2. Preparo das amostras

Para o preparo das amostras de meropenem e imipenem, os frascos contendo 500 mg de fármaco foram reconstituídos com 10 mL do fluido de infusão, resultando em uma suspensão de 50 mg/mL. Esta suspensão foi então transferida para a bolsa de infusão contendo glicose 5 % ou solução fisiológica, obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL. As bolsas foram armazenadas à temperatura ambiente, e alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo para a realização dos ensaios.

### 8.2.3. Linhagem celular

Devido a relatos anteriores de toxicidade renal de derivados carbapenêmicos, os experimentos foram realizados utilizando linhagem celular Vero-rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

### 8.2.4. Ensaios de viabilidade celular

A citotoxicidade das amostras foi avaliada através do ensaio de MTT, que através de análise colorimétrica, quantifica a redução do sal tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em formazam, pela ação de desidrogenases mitocondriais. Essa reação ocorre apenas em células vivas e com mitocôndrias ativas, e é relacionada à viabilidade celular. Outro teste realizado foi o ensaio de incorporação de vermelho neutro. Este ensaio é

baseado na capacidade de células viáveis em incorporar e ligar o corante vermelho neutro. O corante vermelho neutro é incorporado através de transporte passivo pela membrana plasmática das células e armazenado nos lisossomos, ou seja, células mortas ou danificadas não conseguem reter o corante.

Na realização de ensaios de MTT e vermelho neutro, as amostras degradadas de meropenem e imipenem foram adicionadas de modo a atingir as concentrações de 150 e 75 µg/mL, respectivamente. Estas concentrações foram escolhidas de acordo com a concentração plasmática máxima atingida por estes fármacos em seus diferentes esquemas de doses (meropenem: dose de 2 g a cada 8 horas; imipenem: dose de 1 g a cada 6 horas).

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação abaixo e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados estão apresentados na forma de média ± erro padrão da média. E a comparação estatística entre os grupos foi realizada por ANOVA seguido por teste *post-hoc* de Bonferroni.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. controle positivo}}{\text{Abs. controle negativo}} \times 100$$

O controle positivo foi realizado tratando as células com uma solução do tensoativo triton, que provoca a morte. E para o controle negativo foi utilizado apenas as células em meio de cultura, sem tratamento.

#### 8.2.4.1. Ensaio de MTT

Para a realização do ensaio de MTT, as células Vero foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço. A suspensão da cultura de células em meio de cultura foi incubada por um período de 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. Após o período de incubação, as células foram tratadas com as amostras degradadas de meropenem ou imipenem, e novamente incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. Na

sequência, a solução de MTT foi adicionada, e as células foram incubadas por 2 h. Depois desse tempo, a solução foi retirada e adicionou-se 100 µL de dimetilsulfóxido para solubilizar os cristais de formazan formados. A leitura das placas foi realizada em 585 nm em leitor de placa de poços múltiplos (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### 8.2.4.2. Ensaio de vermelho neutro

No ensaio de vermelho neutro, assim como no ensaio de MTT, as células Vero foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço. A suspensão da cultura de células em meio de cultura foi incubada por um período de 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. Após o período de incubação, as células foram tratadas com as amostras degradadas de meropenem ou imipenem, e novamente incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. Após este período, o meio foi substituído por PBS contendo 50 mg/mL de vermelho neutro. As células foram mantidas a 37 °C por 2 h e, em seguida, lavadas com PBS e lisadas com uma solução de 50% etanol/1% de ácido acético glacial. A absorbância foi medida à 540 nm em leitor de placa de poços múltiplos (SpectraMax® MiniMax™ 300, CA, USA).

### 8.3. Resultados e discussão

Uma das principais formas de avaliação da toxicidade *in vitro* ocorre através de ensaios de viabilidade celular. Estes ensaios têm um papel central na toxicologia preditiva, tanto na avaliação da toxicidade aguda de produtos químicos quanto como uma fonte de dados experimentais para métodos *in silico* (POHJALA et al., 2007). Os ensaios de viabilidade celular por MTT e vermelho neutro demonstraram uma leve toxicidade nas amostras degradadas de meropenem e imipenem.

Para o imipenem, foram analisadas amostras preparadas em solução fisiológica e em solução de glicose 5 % após 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas a temperatura ambiente. A análise físico-química descrita no Capítulo I demonstrou que nestas condições o fármaco apresenta um perfil semelhante de degradação em ambos os fluidos de infusão (Tabela 8.1), e detectou a presença de três principais produtos de degradação, formados em ambas as

condições de estudo. Estes produtos foram formados pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, dimerização, e reação entre o imipenem e a cilastatina presente no medicamento. As estruturas químicas estão apresentadas no capítulo I.

Tabela 8.1. Teor residual das amostras de imipenem armazenadas à temperatura ambiente. Quantificação realizada por CLAE-DAD.

Tempo (h)	Teor % <sup>a</sup> (DPR)	
	Solução fisiológica	Solução de glicose 5%
0	99,78 (0,68)	100,19 (0,77)
2	98,00 (1,44)	96,45 (1,25)
4	95,03 (1,23)	93,12 (1,39)
8	87,63 (1,25)	85,23 (1,18)
12	82,02 (0,98)	79,66 (0,84)
24	80,02 (0,68)	69,13 (2,71)

<sup>a</sup> média de três amostras individuais

Para as amostras preparadas em solução fisiológica, através do ensaio de MTT, é possível observar uma leve toxicidade, que apresentou diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular, a partir de quatro horas de estocagem. No ensaio de vermelho neutro, a diferença de viabilidade celular já é observada a partir de duas horas de estocagem (Figura 8.1). Mesmo uma degradação semelhante, e com os mesmos produtos de degradação formados, as amostras preparadas em solução de glicose 5 % não apresentaram diferença significativa nas amostras degradadas em relação ao controle. Uma possível explicação para isto é que esta linhagem celular é essencialmente glicolítica, e a presença de glicose nas amostras pode estar induzindo uma proliferação maior das células, fazendo com que o efeito citotóxico não seja observado. Como as amostras degradadas apresentaram uma toxicidade muito baixa, por mais que algumas células morram, elas estariam se multiplicando mais rápido. As amostras degradadas também foram comparadas com o tempo zero (T0), mas não houve diferença significativa. Os resultados estão apresentados na Figura 8.1.

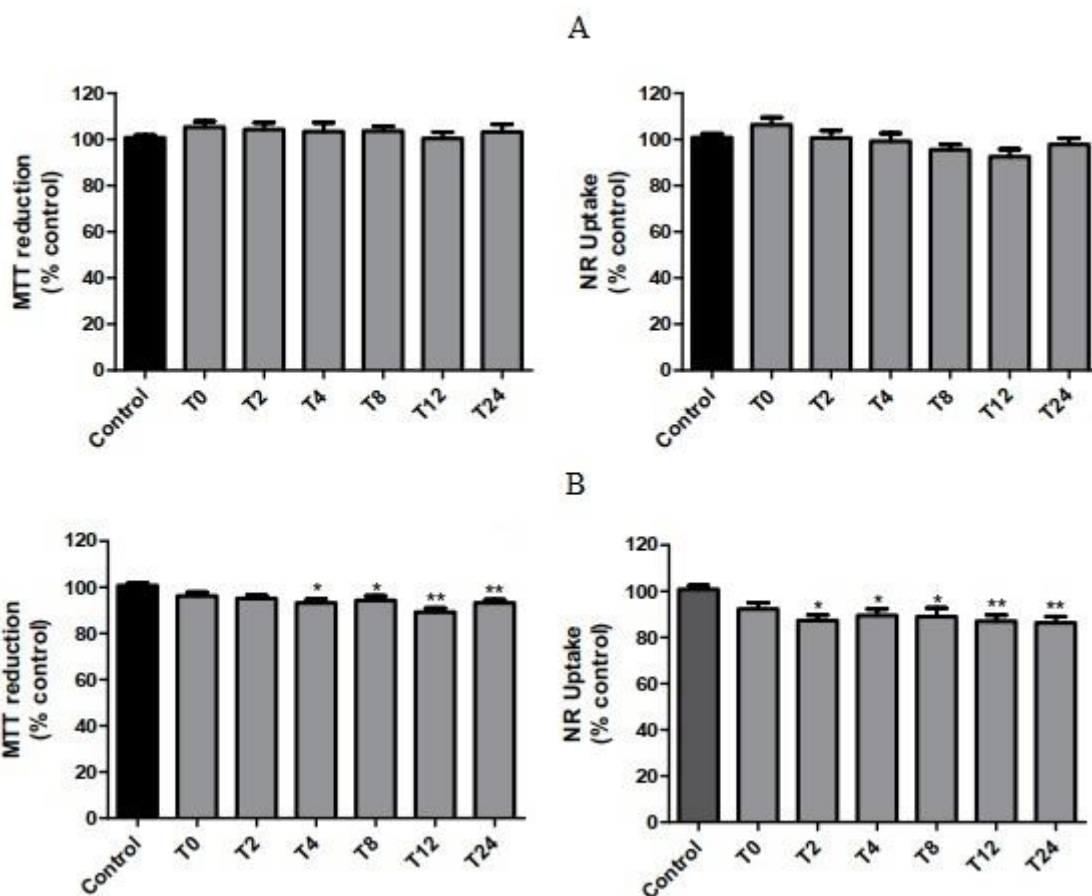


Figura 8.1. Ensaios de viabilidade celular por redução de MTT e incorporação de vermelho neutro para amostras degradadas de imipenem. (A) Amostras preparadas em solução de glicose 5 %. (B) Amostras preparadas em solução fisiológica. Concentração de imipenem no tempo zero = 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . ( $n = 3$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Para o meropenem, a análise físico-química descrita no Capítulo II demonstrou uma diferença no perfil de degradação, com uma maior degradação das amostras diluídas em solução de glicose 5 % em relação às amostras preparadas em solução fisiológica (Tabela 8.2). Houve também diferença nos produtos de degradação formados. Em solução fisiológica foi detectado apenas o produto da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, e em solução de glicosada, além da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, também observou-se um segundo produto de degradação formado pela ligação do meropenem com uma molécula de glicose.



Tabela 8.2. Teor residual das amostras de meropenem armazenadas à temperatura ambiente. Quantificação realizada por CLAE-DAD.

Tempo (h)	Teor % <sup>a</sup> (DPR)	
	Solução fisiológica	Solução de glicose 5%
0	99,98 (1,68)	100.17 (0,98)
2	97,55 (1,54)	94.33 (0,96)
4	96,68 (0,20)	90.88 (1,35)
8	95,49 (0,41)	85.20 (0,50)
12	94,23 (1,05)	79.07 (0,72)
24	92,06 (1,16)	72.99 (0,76)

<sup>a</sup> média de três amostras individuais

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular demonstraram uma leve toxicidade, assim como para as amostras degradadas de imipenem. Para as amostras preparadas em solução fisiológica, o ensaio de redução de MTT apresentou uma redução da viabilidade celular após oito horas de estocagem. No ensaio de incorporação de vermelho neutro, a redução na viabilidade celular é observada a partir de quatro horas de estocagem. Nos ensaios com as amostras preparadas em solução de glicose 5 %, o mesmo viés reportado para o imipenem foi encontrado, no qual a glicose presente nas amostras possivelmente auxiliou na proliferação celular. Na comparação das amostras degradadas com o tempo zero (T0), o teste de MTT demonstrou redução significativa após doze horas de estocagem, e no ensaio de vermelho neutro não observou-se diferença significativa. Os resultados estão apresentados na Figura 8.2.

Embora a toxicidade encontrada tenha sido muito leve para ambos os fármacos, é importante levar-se em consideração que as amostras foram preparadas mimetizando suas condições de utilização, e que mesmo em concentrações condizentes com as concentrações plasmáticas máximas dos fármacos, é possível visualizar o efeito tóxico após um curto período de estocagem.

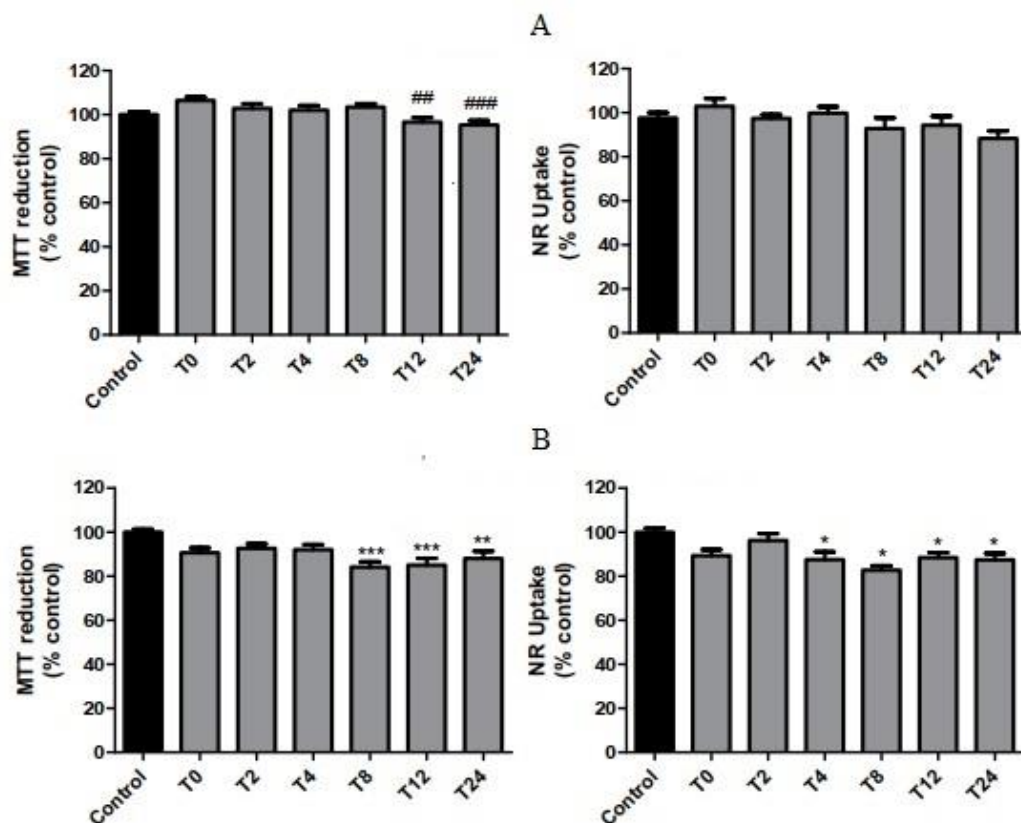


Figura 8.2. Ensaios de viabilidade celular por redução de MTT e incorporação de vermelho neutro para amostras degradadas de meropenem. (A) Amostras preparadas em solução de glicose 5 %. (B) Amostras preparadas em solução fisiológica. Concentração de meropenem no tempo zero = 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (n = 3; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001). As amostras marcadas com “#” apresentaram diferença significativa em relação ao T0 (## = p < 0,01; ### = p < 0,001).

#### 8.4. Conclusão

Os ensaios de redução de MTT e vermelho neutro demonstraram-se ferramentas muito úteis na predição da toxicidade aguda das amostras degradadas de imipenem e meropenem. Com base nestes resultados, fica como perspectiva futura a realização de outros testes *in vitro*, como testes de potencial de membrana mitocondrial, ensaio cometa e monitoramento intracelular de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por ensaio colorimétrico utilizando 2,7-diacetato de diclorofluoresceína, de forma a compreender melhor os mecanismos envolvidos na toxicidade *in vitro* desses compostos.

---

## 9. DISCUSSÃO GERAL

---



## 9. Discussão geral

A estabilidade é um dos aspectos mais importantes a serem considerados na pesquisa e desenvolvimento de insumos farmacêuticos e medicamentos. A eficácia e a segurança de um produto farmacêutico dependem diretamente de sua estabilidade, de forma que a presença de produtos de degradação e demais impurezas relacionadas ao fármaco podem comprometer sua ação farmacológica e, em alguns casos, levar a efeitos adversos (CARMO et al., 2018). Cabe ressaltar que a estabilidade de uma formulação farmacêutica não está relacionada apenas com a estabilidade química do fármaco, mas também com outros fatores que podem afetar sua concentração ou liberação a partir da forma farmacêutica, como evaporação de solvente, adsorção com recipientes ou materiais de embalagem, precipitação, crescimento microbológico, dentre outros. Portanto, não é apenas a ausência de impurezas ou produtos de degradação que define a qualidade de uma formulação, mas sim a constância de uma série de fatores químicos, físicos e microbiológicos (MERBE et al., 2014).

Considerando apenas impurezas e produtos de degradação, e o fato de que sua presença, mesmo que em pequenas quantidades, pode resultar em efeitos significativos na qualidade de um medicamento, estudos analíticos focados na formação de produtos de degradação são sempre pertinentes, tanto para o desenvolvimento de um sólido portfólio científico, quanto para atender a requisitos regulatórios (BRASIL, 2015a; ICH, 2003). Carmo e colaboradores (2017) analisaram os principais motivos que levaram a ANVISA a recusar pedidos de registro de medicamentos no Brasil durante o ano de 2015. Destes, 33,3 % dos pedidos recusados estão relacionados com problemas de estabilidade e fotoestabilidade do medicamento, 26,1 % relacionados a validação do método analítico e 18,8 % relacionados ao controle de qualidade. Dentro destes problemas citados, encontram-se principalmente a ausência no controle de impurezas e a não utilização de métodos analíticos indicativos de estabilidade.

Devido a sua presença, geralmente em baixas concentrações, para a análise faz-se necessária a utilização de métodos adequados. Hoje, a técnica

mais utilizada para este tipo de análise é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV). Porém, a adição de novas dimensões à separação cromatográfica por técnicas hífenadas oferece novas oportunidades, com análises mais rápidas, sensíveis e com maior potencial de geração de dados. A utilização de métodos hífenados é especialmente útil quando os padrões das impurezas não estão disponíveis no mercado, e faz-se necessária a caracterização das mesmas (NICOLAS et al., 1998; ERMER et al., 2000). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas é a técnica mais utilizada para esta finalidade, pois permite a caracterização de pequenas quantidades de produtos de degradação, sem a necessidade de prévio isolamento.

Visando garantir a qualidade e a segurança dos medicamentos comercializados no Brasil, bem como uma maior harmonização com normativas internacionais, a ANVISA está constantemente atualizando suas legislações no que tange o controle de qualidade farmacêutico. Como exemplo, destaca-se nos últimos anos a publicação da RDC nº 53/2015, que estabelece limites para presença de produtos de degradação em medicamentos, o guia para obtenção do perfil de degradação em medicamentos (Guia 04/2015), e a RDC nº 166/2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2015a; BRASIL, 2015b; BRASIL, 2017). Além destes, a ANVISA recentemente publicou a RDC nº 318/2019, que estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Neste documento, além dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, também é regulamentada a realização de um estudo de estabilidade em uso, e de estabilidade pós-reconstituição ou diluição.

Considerando a necessidade de reconstituição e diluição dos antibióticos carbapenêmicos imipenem, meropenem e doripenem, e a já reportada instabilidade em solução, o presente trabalho teve como principal objetivo a avaliação da estabilidade destes fármacos em condições de utilização clínica, e a identificação dos produtos de degradação formados. Para a quantificação das amostras, diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos e validados.

No desenvolvimento deste trabalho diferentes métodos analíticos foram propostos, para a condução dos estudos de estabilidade. Para a análise do imipenem, um método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado. Este método utiliza um sistema de fase reversa e se apresentar uma alternativa mais simples em relação ao método farmacopeico, que utiliza sais de pareamento iônico em sua fase móvel. Para a análise do meropenem, com o objetivo de desenvolver um método específico, rápido e fácil, capaz de detectar e caracterizar produtos de degradação em pequenas quantidades, sem a necessidade de isolamento ou purificação, é proposto um método quantitativo por ESI-Q-TOF e infusão direta. O método validado demonstrou-se adequado para análise quantitativa do meropenem, e permitiu caracterizar e monitorar a formação dos produtos de degradação, em um tempo de análise de 30 segundos. Para análise do doripenem, também com o objetivo de quantificar o fármaco e identificar os produtos de degradação formados, desenvolveu-se um método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Quanto à estabilidade pós-reconstituição, o imipenem apresentou uma maior taxa de degradação quando comparado ao meropenem e doripenem, testados nas mesmas condições. Quando armazenado à temperatura ambiente, o imipenem apresentou maior tendência de degradação nas amostras preparadas em solução de glicose 5 %, sendo observado decaimento de aproximadamente 7 % de seu teor inicial em apenas 4 horas. Para as amostras preparadas em soro fisiológico e armazenadas sob refrigeração, o fármaco manteve o teor acima de 90 % durante 12 horas. Para esta mesma condição, mas em solução glicosada, o imipenem manteve-se com teor acima de 90% durante 8 horas.

Para a estabilidade pós-reconstituição do meropenem, foi estudada na concentração de 50 mg/mL, reconstituída em água para injeção, simulando sua utilização na forma de bolus, na qual, após 4 horas à temperatura ambiente, teve decaimento de teor em aproximadamente 6 %. Para as amostras reconstituídas e em fluidos de infusão (5 mg/mL), observou-se uma extensa degradação do fármaco quando diluído em glicose 5 %, e em apenas 4 horas à temperatura ambiente ocorreu um decaimento de aproximadamente 10 % de

seu teor inicial. Já o doripenem apresentou perfil de decomposição semelhante em ambos os diluentes testados, e após 4 horas em temperatura ambiente os valores encontrados para teor foram de 96,74% e 96,48%, para amostras reconstituídas em NaCl 0,9% e em glicose 5%, respectivamente. As amostras armazenadas sob refrigeração permaneceram estáveis por até 72 horas.

Quanto aos produtos de degradação formados no estudo pós-reconstituição, a principal via de degradação observada foi através da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, que ocorreu nos três fármacos de estudo. Com destaque também para produtos formados por dimerização.

No estudo com o imipenem, baseando-se nas massas dos íons  $[M+H]^+$  e nas fragmentações obtidas através de experimentos de MS/MS, foram propostas as estruturas químicas dos respectivos produtos. Os produtos de degradação nomeados como DP-1 e DP-2, tratam-se de um produto formado pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, e um produto dimérico do fármaco, já descritos anteriormente na literatura por Smith e colaboradores (1990). Já o produto de degradação DP-3 é formado pela interação entre uma molécula hidrolisada de imipenem e a cilastatina, e este é o primeiro relato na literatura de sua formação. As composições elementares mais prováveis foram obtidas com alto grau de confiança, onde o erro de massa encontrado foi de 1,25, -0,33 e 1,82 ppm para os produtos DP-1, DP-2 e DP-3, respectivamente.

Para o meropenem, através das análises por ESI-Q-TOF, observou-se a formação de dois produtos de degradação, um deles de  $m/z$  402, formado em ambos os fluidos de infusão, e outro de  $m/z$  564, formado apenas nas amostras diluídas em soro glicosado. O produto de  $m/z$  402 trata-se de um produto formado pela clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico, que tem sua estrutura já descrita na literatura. Já para o produto de degradação de  $m/z$  564, formado apenas em soro glicosado, é proposta uma estrutura resultante da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, seguido de sua ligação a uma molécula de glicose.

No estudo com o doripenem, as análises LC-ESI-QTOF possibilitaram separar e detectar a formação de três produtos de degradação. Nos primeiros tempos de análise, após 4 horas de armazenamento, já é possível observar a formação de um produto de degradação, identificado como um dímero do



fármaco. Após 8 horas de armazenamento, foi possível detectar a presença de produtos de degradação gerados pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, e somente após 16 horas de armazenamento foi possível visualizar um terceiro produto de degradação, identificado como outro dímero do fármaco.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade intrínseca dos fármacos, o meropenem e doripenem também foram submetidos a testes de estresse. Nestes testes, observou-se que as principais vias de degradação destes fármacos relacionam-se a condições hidrolíticas e oxidativas. Ambos os fármacos apresentaram um perfil de decomposição semelhante, no qual o principal fator de degradação foi a hidrólise em meio alcalino, que em curtos intervalos de tempo, levou à degradação total dos fármacos. Em soluções contendo  $H_2O_2$  (3 %), também foi proposto um novo mecanismo de degradação para estes fármacos. Este mecanismo envolve o ataque do agente oxidante à ligação dupla localizada entre os carbonos 2 e 3 do anel de cinco membros, levando à formação de um intermediário epóxi, seguido da perda do ácido carboxílico. Uma reação semelhante foi descrita por Callen e colaboradores (1994) em estudo da degradação oxidativa da tiagabina. Os dois principais produtos de degradação, dihidroxi tiagabina e cetotiagabina, provavelmente foram gerados com envolvimento de um intermediário epóxi transitório. Ambos os fármacos apresentaram a formação de dímeros, porém em condições diferentes. Para o meropenem, um dímero foi identificado em condições de elevada umidade, e para o doripenem os produtos diméricos foram identificados submetendo o fármaco à hidrólise em meio neutro.

Além dos ensaios físico-químicos, foi proposto um método microbiológico para a determinação da potência do imipenem em sua forma farmacêutica. Este fármaco ainda não apresentava tal método descrito na literatura, enquanto que o meropenem e o doripenem já apresentam métodos publicados, que foram desenvolvidos no próprio laboratório no qual este trabalho foi desenvolvido (LCQFar-UFRGS) (MENDEZ et al., 2006; FURH et al., 2013).

Os ensaios microbiológicos para a determinação da potência de antibióticos são técnicas oficiais e bem estabelecidas, capazes de demonstrar

mudanças sutis, não observadas por métodos químicos. Este método foi desenvolvido com o objetivo de futuramente ser utilizado na análise de amostras oriundas de estudos de estabilidade. O método foi desenvolvido utilizando a técnica de difusão em ágar cilindros em placas, e o microrganismo utilizado foi o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. O método foi validado seguindo guias oficiais, e demonstrou-se adequado para análises quantitativas do imipenem. O objetivo inicial era o desenvolvimento do método para a determinação da potência antimicrobiana das amostras degradadas de imipenem, porém por questões logísticas, as amostras degradadas não foram analisadas por este ensaio.

Uma avaliação preliminar da citotoxicidade das amostras degradadas de imipenem e meropenem também foi realizada. O estudo foi realizado através de ensaios de redução de MTT e incorporação de vermelho neutro. O estudo foi conduzido utilizando amostras submetidas à estabilidade pós-reconstituição, onde células (linhagem Vero) foram incubadas com amostras em diferentes tempos de degradação. Os resultados preliminares indicaram uma leve toxicidade das amostras degradadas, tanto de imipenem quanto de meropenem, após um curto período de estocagem. Estes resultados instigam a realização de novos testes para compreender melhor os efeitos e os mecanismos envolvidos na toxicidade de amostras degradadas destes fármacos.

Por fim, os resultados descritos neste trabalho apresentam contribuições no campo analítico, com a proposição de diferentes métodos para aplicação na análise destes derivados carbapenêmicos. Os dados gerados a partir de estudos de estabilidade fortalecem a literatura científica e o conhecimento a respeito desta importante classe de antibióticos. Também ressaltam os cuidados a serem tomados durante o preparo e a administração dos mesmos na rotina de sua utilização em hospitais.

---

## 10. CONCLUSÕES

---



## 10. Conclusões

### *Desenvolvimento analítico:*

- ✓ O método indicativo de estabilidade proposto para análise do imipenem por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado utilizando um sistema de fase reversa com eluição gradiente, apresentando-se como uma alternativa mais simples em relação a métodos farmacopeicos que utilizam sais de pareamento iônico;
- ✓ Um ensaio microbiológico por difusão em ágar-cilindros em placa foi desenvolvido e validado para determinação da potência antimicrobiana do imipenem;
- ✓ Para a quantificação do meropenem e a identificação de produtos de degradação, foi desenvolvido um método rápido de análise, utilizando infusão direta de amostra em espectrômetro de massas de alta resolução (ESI-QTOF);
- ✓ O método proposto por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-QTOF) demonstrou-se adequado para quantificação segura do doripenem, e também para identificação de produtos de degradação.

### *Estudos de estabilidade:*

- ✓ Na avaliação da estabilidade pós-reconstituição do imipenem, o fármaco manteve seu teor acima de 90 % por até 4 horas quando armazenado a temperatura ambiente em ambas as soluções.
- ✓ A análise por ESI-Q-TOF possibilitou propor a estrutura química de três produtos de degradação, formados em ambos os fluidos de infusão testados. Estes produtos foram formados pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, pela reação de dimerização do imipenem, e outro pela ligação do imipenem a uma molécula de cilastatina;
- ✓ O estudo de estabilidade pós-reconstituição do meropenem demonstrou uma maior degradação do fármaco quando preparada em solução de

glicose 5 %. Em quatro horas à temperatura ambiente houve um decaimento de aproximadamente 10 % de seu teor inicial. Nas mesmas condições, as amostras preparadas em NaCl 0,9 % apresentaram um decaimento de aproximadamente 4 %;

- ✓ No estudo pós-reconstituição do meropenem foram detectados dois produtos de degradação: um formado pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, em ambas as condições testadas, e outro produto oriundo da ligação do meropenem com a glicose;
- ✓ No estudo de estabilidade forçada do meropenem, quatro produtos de degradação foram identificados. A degradação oxidativa levou à formação de N-óxido e à descarboxilação. Em condições hidrolíticas, identificou-se produto oriundo da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, e em condições de elevada humidade identificou-se um dímero do fármaco;
- ✓ Na estabilidade pós-reconstituição, o doripenem apresentou perfil de degradação semelhante quando diluído em NaCl 0,9% e em glicose 5%, sendo identificados três produtos de degradação, dois deles gerados por um processo de dimerização e outro formado pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico;
- ✓ Nos testes de estresse, foram detectados seis produtos de degradação e, com base na análise *in silico* e nos dados de massa exata e MS/MS, foram propostas suas estruturas químicas.

#### *Citotoxicidade in vitro:*

- ✓ Os ensaios de redução de MTT e de incorporação de vermelho neutro demonstraram a uma baixa toxicidade das amostras degradadas de imipenem e meropenem, quando utilizada linhagem celular Vero.

---

## 11. REFERÊNCIAS

---





## 11. Referências

ABDEL-MOETY, E. M.; ELRAGEHY, N. A.; HASSAN, N. Y.; REZK, M. R. Selective determination of ertapenem and imipenem in the presence of their degradants. **Journal of Chromatographic Science**. v. 48, p. 624 – 30, 2010.

ALMARSSON, O.; KAUFMAN, M. J.; STONG, J. D.; WU, Y.; MAYR, S.M.; PETRICH, M. A.; WILLIAMS, J. M. Meropenem Exists in Equilibrium with a Carbon Dioxide Adduct in Bicarbonate Solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 87, n. 5, p. 663, 1998.

ASTRAZENECA. Meronem. Bula. 2014.

BARBOSA, F. S.; CASSOL, J. P. E.; BATISTA, L. A. C. CORDEIRO, E. W.; CASTRO, M. C.; POHLMANN, A. R.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GARCIA, C. V.; MENDEZ, A. S. L. Stability of doripenem in reconstituted solution – thermal and oxidative decomposition kinetics and degradation products by LC–MS. **Biomedical Chromatography**. v. 31, p. e3940, 2017.

BIOCHIMICO. Meropenem-trihidratado. Bula. 2015.

BIRNBAUM, J.;KAHAN, F. M.;MACDONALD J. S. Carbapenems, A New Class of Beta-Lactam Antibiotics. **The American Journal of Medicine**. v. 78, 1985.

BOUDER, F. Regulating impurities in pharmaceutical products: a tolerability of risk approach?. **Expert Review of Clinical Pharmacology**. v. 1, p. 241 – 250, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº53, de 4 de dezembro de 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2015a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. 2015b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 nov. 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintéticos. Perguntas e respostas. 2019b.

CAI, S.; RU, C. Chromatographic determination of polymerized impurities in meropenem. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, p. 585 – 589, 2005.

CARMO, A. C. M.; PIRAS, S. S.; ROCHA, N. F. M.; GRATIERI, T. Main Reasons for Registration Application Refusal of Generic and Similar Pharmaceutical Drug Products by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA). **BioMed Research International**. v. 2017, p. 1 – 10, 2017.

CARMO, A. C. M.; PEREIRA, R. S.; GRATIERI, T. Brazilian requirements for stability indicating methods. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 98, p. 58 – 63, 2018.

CIELECKA-PIONTEK, J.; ZAJAC, M.; JELINSKA, A. A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 46, p. 52 – 57, 2008.

CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A. The UV-derivative spectrophotometry for the determination of doripenem in the presence of its degradation products **Spectrochimica Acta Part A**. v. 77, p. 554 – 557, 2010b.

CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A. Catalytic effect of buffers on the degradation of doripenem in aqueous solutions. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**. v. 102, p. 37 – 47, 2011a.

CIELECKA-PIONTEK, J.; MICHALSKA, K.; ZALEWSKI, P.; JELIŃSKA, A. Recent Advances in Stability Studies of Carbapenems. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 7, p. 213 – 227, 2011b.

CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A; DOŁHAN A.; ZALEWSKI, P. Kinetic and thermodynamic analysis of degradation of doripenem in the solid state. **International journal of chemical kinetics**. v. 44, p. 722 – 728, 2012.

CODEVILLA, C. F.; LANGE, A. D. C.; ANDRADE, J. M. M.; SEGALIN, J.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Photodegradation kinetics of Iodenafil carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and in vitro cytotoxicity. **Analytical Methods**. v. 5, p. 6511 – 6516, 2013.

GIORDANI, A.; KOBEL, W.; GALLY, H. U. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, p. 1 – 15, 2011.

GONNELLA, N. C. **LC-NMR Expanding the Limits of Structure Elucidation**. New York. Taylor & Francis Group. 2013.

EDWARDS, J. R. Meropenem: a microbiological overview. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 36, p. 1 – 17, 1995.

EI-GAMAL M. I.; BRAHIM I, HISHAM, N.; ALADDIN, R.;MOHAMMED, H.; BAHAAELDIN, A. Recent updates of carbapenem antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 131, p. 185 – 195, 2017.

ELRAGEHY, N.A.; ABDEL-MOETY, E.M.; HASSAN, N.Y.; REZK, M.R. Stability-indicating determination of meropenem in presence of its degradation product. **Talanta**. v. 77, p. 28 – 32, 2008

ERMER, J.; VOGEL, M. Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis. **Biomedical Chromatography**. v. 14, p. 373 – 383, 2000.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**, 6<sup>a</sup> ed. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FORSYTH, R.J.; IP, D.P. Determination of imipenem and cilastatin sodium in Primaxin® by first order derivative ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 12, p. 1243 – 1248,1994.

FUHR, F.; PALIOSA P. K.; COSTA, M. C. N., GARCIA, C. V.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M.; MENDEZ, A. S. L. Bioassay Applied to Quantitative Determination of Doripenem in Powder for Injection – Method Validation and Degradation Kinetics Study. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 9, p. 244 – 251, 2013.

GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M. Activity of a novel carbapenem, doripenem, against anaerobic pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 63, p. 447 – 454, 2009.

GÖRÖG, S. Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 101, p. 2 – 16, 2018

GRANT, E. M.; ZHONG, M.; AMBROSE, P. G.; NICOLAU, D. P.; NIGHTINGALE, C. H.; QUINTILIANI, R. Stability of meropenem in a portable infusion device in a cold pouch. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 57, p. 992 – 5, 2000.

HOLM, R.; ELDER, D. P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 87, p. 118 – 135, 2016.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS Q1A(R2). 2003.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities in new drug substances Q3A(R2). 2006a.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities in new drug products Q3B(R2). 2006b.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorizations for pharmaceuticals M3(R2). 2009.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceutical to limit potential carcinogenic risk M7(R1). 2017.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R7). 2018.

JAIN, D.; BASNIWAL. P. K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 86, p. 11 – 35, 2013.

JANSSEN PHARMACEUTICALS. DORIBAX® for injection 500 mg Powder for Intravenous Infusion – Product Information. 2009.

JOHNSIRANI, P.; WANI, A. A.; BHARATAM, P. V.; NANJAPPAN, S. LC-ESI-QTOF-MS analysis utilizing gas-phase fragmentation reactions subjected to ESI-IS-CID and ESI CID-MS/MS conditions to study the degradation behaviour of sorafenib tosylate: NMR and *in vitro* cytotoxicity and apoptosis detection studies of hydrolytic degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 177, p. 112881, 2020.

KALARIYA, P. D.; RAJU, B.; BORKAR, R. M.; NAMDEV, D.; GANANADHAMU, S.; NANDEKAR, P.P.; SANGAMWAR, A. T.; SRINIVAS, R. Characterization of forced degradation products of ketorolac tromethamine using LC-ESI/Q/TOF/MS/MS and *in silico* toxicity prediction. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 44, p. 380 – 391, 2014.

KNAPP, K. M.; ENGLISH B. K. Carbapenems. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. v. 12, p. 175 – 185, 2001.

KEEL, R. A.; SUTHERLAND C. A.; CRANDON J. L.; NICOLAU D. P. Stability of doripenem, imipenem and meropenem at elevated room temperatures. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 37, p. 174 – 185, 2011.

LEVSEN, K.; PREISS, A.; GODEJOHANN, M. Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples. **Trends in analytical chemistry**. v. 19, p. 27 – 48, 2000.

MANTOVANI, L.; SAYAGO, C.; DE CAMARGO, V. B.; SILVEIRA, V.; GARCIA, C.; SCHAPOVAL, E. ; MENDEZ, A.S.L. Stability-indicating RP-HPLC Method for Analysis of the Antibiotic Doripenem in Pharmaceutical Formulation Comparison to UV Spectrophotometry and Microbiological Assay. **Acta Chromatographica**. v. 24, p. 367 – 382. 2012.

MARTÍNEZ, M. J. F.; GARCÍA, M. G.; SÁNCHEZ, E. G.; SÁNCHEZ, J. E.G. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 28, p. 56-64, 2010.

MATTHEWS, S. J.; LANCASTER, J. W. Doripenem Monohydrate, A Broad-Spectrum Carbapenem Antibiotic. **New drug. Clinical Therapeutics**. v. 31, Number 1, 2009.

MENDEZ, A. S. L.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 33, p. 947 – 954. 2003.

MENDEZ, A. S.L.; WEISHEIMER, V.; OPPE, T. P.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E.S. Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v, 37. p, 649 –653. 2005.

MENDEZ, A. S. L.; DALOMO, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 1363 – 1366. 2006.

MENDEZ, A.; CHAGASTELLES, P.; PALMA, E.; NARDI, N.; SCHAPOVAL, E. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 350, p. 95 – 102. 2008.

MÉNDEZ, R.; ALEMANY, T.; MARTÍN-VILLACORTA, J. Catalytic effect of buffers on degradation of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in aqueous solution. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. v. 39, p. 831 – 835. 1991.

MERBEL, N.; SAVOIE, N.; YADAV, M.; OHTSU, Y.; WHITE, J.; RICCIO, M F.; DONG, K.; VRIES, R.; DIANCIN, J. Stability: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. **The American Association of Pharmaceutical Scientists journal**. v. 16, n. 3. 2014.

MERCK SHARP & DOHME FARMACÉUTICA LTDA. Tienam®. Bula. 2013.

MEHTA, S.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Strategy for identification and characterization of small quantities of drug degradation products using LC and LC-MS: Application to valsartan, a model drug. **Drug Testing and Analysis**. v. 2, p. 82 – 90. 2010.

MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M.; SEOTOCHNIK, D. E. The carbapenems: new broad spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v, 24. p 1 – 7. 1989.

NARAYANAM, M.; HANDA, T.; SHARMA, P.; JHAJRA, S.; MUTHE, P. K.; DAPPILI, P. K.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 87, p. 191 – 217. 2014

NICOLAU, D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opinion Pharmacotherapy**. v, 9. p. 3 – 27. 2008

NICOLAS, E. C.; SCHOLZ, T. H. Active drug substance impurity profiling Part II. LC:MS:MS fingerprinting. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 16, p. 825 – 836. 1998.

NOUDA, H.; MATSUMURA, H.; TANIO, T.; SUNAGAWA, M. Structural features of carbapenems compounds for nephrotoxicity: effect of C-2 side chain. **The Journal of Antibiotics**. v. 49, p. 603 – 606, 1995.

ÖZKAN, Y.; KÜÇÜKGÜZEL, İ.; ÖZKAN S. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. A rapid, sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. **Biomedical Chromatography**. v. 15, p. 263 – 266. 2001.

PATEL, P. R.; COOK, S. E. Stability of meropenem in intravenous solutions. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v, 54. 1997.

POHJALA, L.; TAMMELA, P.; SAMANTA, S.; YLI-KAUHALUOMA, J.; VUORELA, P. Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays. **Analytical Biochemistry**. v. 362, p. 221 – 228. 2007.

Primaxin® by first order derivative ultravioleta spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**. v. 12, n. 10, p. 1243 – 1248. 1994.

PSATHAS, P. A.; KUZMISSION, A.; IKEDA, K; YASUO, S. Stability of Doripenem in Vitro in Representative Infusion Solutions and Infusion Bags. **Clinical Therapeutics**. v. 30, p. 11, 2008.



REDDY, P; SOWJANYA; P; SHANMUGASUNDARAM P; NAIDU, P. Y; HANUMANARAJU, G. V; KARTHIKEYAN, R. Stability indicating ultra performance liquid chromatography method for the simultaneous estimation of doripenem and its degradation products. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v, 37. p, 298 – 310. 2014.

ROY, J. Pharmaceutical impurities – a mini review. **AAPS PharmSciTech**. v. 3, p. 1 - 8, 2002.

SAIDA, S. J.; MANIKANDANA, A.; KALIYAPERUMAL, M.; RUMALLA, C. S.; KHAN, A. A.; JAYARAMAN, V. B.; YANAKA, R.; RAO, S. V. Identification, isolation and characterization of dolutegravir forced degradation products and their cytotoxicity potential. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 174, p. 588 – 594. 2019

SAHM, D. In Vitro Activity of Doripenem. **Clinical Infectious Diseases**. V.49, n.1, p. 11 – 16. 2009.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R.P. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 69, p. 148 – 173. 2012.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. p. 55 – 66. 2003.

SMITH, G. B.; DEZENY, G. C.; DOUGLAS, A. W. Stability and kinetics of degradation of imipenem in aqueous solution. **Journal of pharmaceutical sciences**. v, 79. p, 732 – 740. 1990.

SWANSON, D. J.; DEANGELIS, C.; SMITH, I. L.; ACHENTHAH, J. J. Degradation kinetics of imipenem in normal saline and in human serum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v, 29. p, 936 – 937, 1986.

TAKEUCHI, Y.; SUNAGAWA, M.; ISOBE, Y.; HAMAZUME, Y.; NOGUCHI, T. Stability of a 1 beta-methylcarbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338) in aqueous solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 43, p. 689 – 8692. 1995.

THOMASI, S. S.; OLIVEIRA, L. M.; VENÂNCIO, T.; FERREIRA, A. G. Aplicação de LC-SPE/NMR na Rápida Identificação de Compostos Orgânicos em Fitoterápico. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**. V. 2, p. 13 – 22. 2017

TUNE, B. M. Effect of organic acid transport inhibitors on renal cortical uptake and proximal tubular toxicity of cephazolidine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 181, p. 250 – 256. 1972

USP 37. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 37<sup>th</sup> ed. Rockville. United States pharmacopeial convention. 2014.

WINGERT, N. R.; ARBO, M. D.; GOETHEL, G.; COSTA, B.; ALTKNECHT, L. F.; GARCIA S. C.; STEPPE, M. In vitro toxicity assessment of rivaroxaban degradation products and kinetic evaluation to decay process. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 42, p. 509 – 518. 2018.

WISEMAN, L. R.; WAGSTAFF, A. J.; BROGDEN, R. N.; BRYSON, H. M. Meropenem. A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy. **Drug Evaluation**. v. 50, p. 73 – 101. 1995

YOSHIOKA, S; STELLA, V.S. **Stability Drugs and Dosage Forms**. New York. Kluwer Academic / Plenum Publisher. 2000.