

Produtos de degradação oxidativa do sulfametoxazol

Oxidative sulfamethoxazole degradation products

Temis Weber Furlanetto Corte, Eloir Paulo Schenkel, Elfrides Eva Scherman Schapoval

RESUMO – Obteve-se produtos de degradação oxidativa do sulfametoxazol através da oxidação branda com peróxido de hidrogênio em ácido acético e verificou-se a presença dos mesmos em formulações contendo sulfametoxazol + trimetoprima através de cromatografia líquida de alta eficiência. Determinou-se a atividade antibacteriana e a toxicidade dos produtos de degradação do sulfametoxazol.

UNITERMOS – Sulfametoxazol, produto de degradação, oxidação, trimetoprima.

SUMMARY – Products of oxidative sulfamethoxazole degradation were obtained by mild oxidation with hydrogen peroxide in acetic acid. Their presence was detected in formulations containing sulfamethoxazole + trimethoprim by high performance liquid chromatography.

The antibacterial activity and toxicity of the products of sulfamethoxazole degradation were determined.

UNITERMS – Sulfamethoxazole, degradation product, oxidation, trimethoprim.

INTRODUÇÃO

A instabilidade de preparações à base de sulfonamidas, tem sido atribuída, particularmente a reações de oxidação (De Souza, 1984). Reações estas, que ocorrem no grupamento amino aromático primário, podendo originar hidroxilamina, azo, azoxi e nitroso derivados (Schirmann & Delavarenne, 1980). Os derivados nitroso e hidroxilamina têm sido relatados como possíveis antígenos nas reações de hipersensibilidade a sulfonamidas (Rieder *et al*, 1988). Frente a relevância deste tema procurou-se neste trabalho obter os produtos de degradação oxidativa do sulfametoxazol através de oxidação branda com peróxido de hidrogênio em meio ácido e verificar a presença dos mesmos, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em comprimidos e suspensão oral contendo sulfametoxazol (SMZ) e trimetoprima (TMP).

Além disto foram testadas a atividade antibacteriana e a toxicidade dos produtos de degradação de SMZ.

MATERIAIS E MÉTODOS

Degradação oxidativa

Foi preparada uma solução de SMZ 0,5% (p/v) em ácido acético glacial, contendo 6,0g de peróxido de hidrogênio por litro e deixado 48 horas à temperatura ambiente e luz do dia.

Separação dos produtos de degradação oxidativa

A separação dos produtos de degradação oxidativa do SMZ foi feita por cromatografia em coluna. O material de empacotamento foi sílica 60 (120,0g) e o eluente isopropanol: clorofórmio: tolueno: hidróxido de amônio (12:3:3:1) com fluxo 1,5mL/min. A amostra foi dissolvida em dimetilformamida 0,5g/mL (p/v).

Identificação

Espectroscopia no infravermelho (IV): Shimadzu modelo IR-408, em pastilhas de brometo de potássio.

Espectrometria de massas (EM): Varian Mat 44, injeção direta.

Ressonância nuclear magnética (RNM): Varian Gemini 2000.200 MHz, solvente dimetilsulfóxido - D6.

Cromatografia bidimensional em camada delgada

Foram utilizadas placas com uma camada de 0,25mm de espessura de sílica HF254, ativadas a 120°C. As cubas utilizadas foram revestidas com papel de filtro e saturadas antes do uso. O eluente empregado foi clorofórmio: metanol: ácido acético (110:10:1) e a detecção com luz ultravioleta.

Degradação térmica e ambiental

Comprimidos contendo 400mg de SMZ e 80mg de TMP, bem como suspensão oral contendo 4,0% SMZ e 0,8% de TMP, em suas embalagens originais

de fabricação, foram mantidos durante 9 meses à temperatura de 60°C e à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Na análise por CLAE foi empregada uma solução obtida a partir dos comprimidos 0,30% (p/v) em metanol e uma diluição da suspensão oral 0,30% (v/v) em metanol, respectivamente. Como padrão foi empregada solução de produtos de degradação do SMZ 1mg/mL em metanol. A cromatografia foi em fase reversa com coluna Micropax- mcH-10 (30cm x 60cm). A fase móvel foi ácido fosfórico 0,05M: acetonitrila (70:30), 1mL/min. A sensibilidade do detector 0,01 AUF. A absorvância foi determinada em 254nm. A velocidade do registro foi de 10mm/min. e a sensibilidade 0,2V.

Ensaio biológicos

Comparação das atividades antibacterianas dos produtos de degradação do SMZ com o SMZ.

As amostras foram SMZ 0,4mg/mL e produto de degradação do SMZ 0,4mg/mL, sendo diluente o tampão fosfato de potássio pH=8,0. O método usado foi o de difusão em ágar com cilindros em placas segundo Farmacopéia Americana XXIªed. Os microorganismos usados foram *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e os meios de cultura: 1, 3, 11 segundo Grove & Randall.

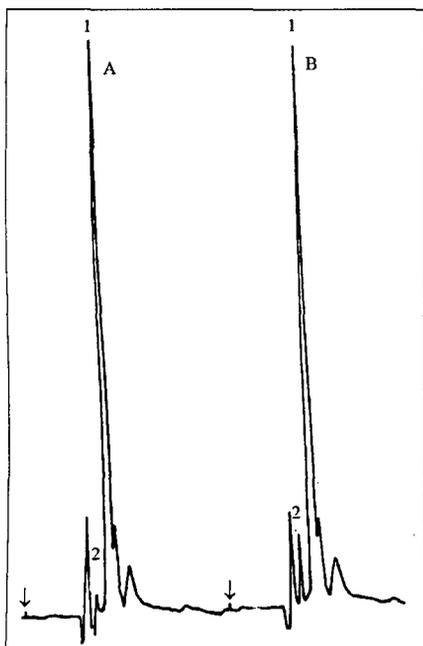
Recebido em 16/7/93

Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, (Brasil)

FIGURA 1

Cromatograma da suspensão oral estocada à temperatura ambiente (A) e a 60°C (B) durante 9 meses por cromatografia líquida de alta eficiência.

Condições de cromatografia: coluna Micro Pax nCH-10, fase móvel H₃PO₄ 0,05M : CH₃CN (70:30), fluxo 1ml/minuto, sensibilidade do detector 0,01 AUFS, comprimento de onda 254nm, velocidade de registro 10mm/minuto, sensibilidade do detector 0,2V.



1 - sulfametoxazole, 2 - produto de degradação

Comparação das atividades antibacterianas do SMZ, TMP, Produtos de degradação do SMZ, Produtos de degradação do SMZ + TMP, SMZ + TMP.

As amostras empregadas foram SMZ 80µg/mL, TMP 16µg/mL, produtos de degradação do SMZ 80µg/mL. O ensaio foi realizado segundo item anterior.

Toxicidade aguda

Foram empregados camundongos, *swiss*, machos, adultos pesando entre 18,0 e 22,0g conforme recomendado pela Farmacopéia Brasileira, IV^a ed. A amostra foi produtos de degradação do sulfametoxazol na dose de 45,71mg/kg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A instabilidade de preparações farmacêuticas à base de sulfonamidas pode

ser causada por reações de oxidação (De Souza, 1984). A verificação da presença de produtos de oxidação em formulações é importante uma vez que a hidroxilamina e o nitroso derivado têm sido relatados como possíveis antígenos nas reações de hipersensibilidade às sulfonamidas (Rieder *et al*, 1988).

Souza (1984) tentando reproduzir as reações de oxidação que ocorrem em formulações contendo SMZ durante a estocagem, submeteu o SMZ a oxidação branda com peróxido de hidrogênio 6,0g/L em ácido sulfúrico 0,1M à temperatura ambiente e luz do dia. Os produtos de degradação precipitados em meio ácido apresentaram rendimento de 4,6%.

No presente trabalho, o SMZ foi oxidado com peróxido de hidrogênio 6,0g/L em ácido acético com rendimento de 67,0% de precipitado. Este precipitado foi fracionado por cromatografia em coluna, sendo que a segunda fração eluída tinha o rendimento de 60,0%. A cromatografia bidimensional da segunda fração, utilizando como eluente clorofórmio: metanol: ácido acético (110:10:1), demonstrou que a mesma era a mistura de 2 substâncias que se interconvertem. Pela dificuldade de separação das mesmas optou-se por realizar os experimentos com esta mistura.

Na análise espectroscópica verificou-se que o espectro no infravermelho era semelhante ao descrito para a 4-hidroxilamina-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida (Souza, 1984) afora a banda em 1473cm⁻¹, mais intensa, e característica do nitroso derivado que sugere a mistura destes dois compostos.

A análise por espectrometria de massas revelou fragmentação característica de sulfonamidas estando presentes os picos m/z=60 (95,80%), m/z=76 (100,00%), m/z=92 (43,18%), m/z=106 (28,39%), m/z=156 (32,12%), m/z=173 (38,04%), m/z=237 (40,0%) e m/z=267 (38,04%).

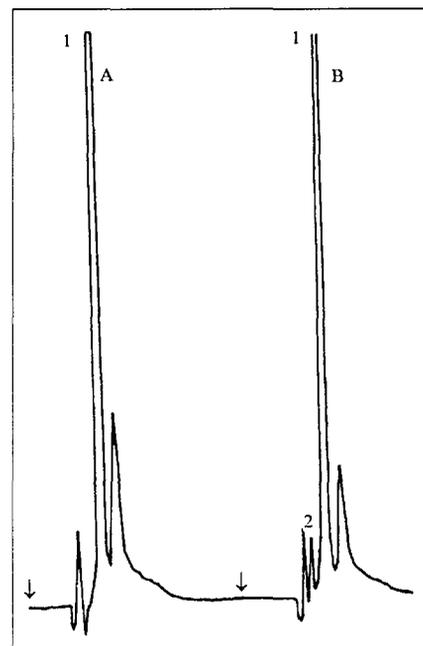
No espectro de ressonância magnética prótonica observou-se a presença de um singlete em 2,31 ppm, correspondendo a três prótons metílicos na posição 5 do anel isoxazolil, num singlete em 6,18 ppm correspondendo a um próton na posição 4 do anel isoxazolil o que identifica o radical -N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida. A presença de dois compostos parassubstituídos foi comprovada através de dois pares de dubletes em 8,11 e 8,15 ppm e 8,03 e 8,47 ppm correspondendo cada par a quatro prótons aromáticos.

Pelo deslocamento químico destes prótons aromáticos verificou-se que

FIGURA 2

Cromatograma de comprimidos estocados à temperatura ambiente (A) a 60°C (B) durante 9 meses por cromatografia líquida de alta eficiência.

Condições de cromatografia: coluna Micro Pax nCH-10, fase móvel H₃PO₄ 0,05M : CH₃CN (70:30), fluxo 1ml/minuto, sensibilidade do detector 0,01 AUFS, comprimento de onda 254nm, velocidade de registro 10 mm/minuto, sensibilidade do detector 0,02V.



1 - sulfametoxazole, 2 - produto de degradação

uma das substâncias apresentava grupo doador de elétrons em posição para enquanto o outro apresentava grupo retirador de elétrons em posição para (Turczan & Medwick, 1972).

A análise espectroscópica levou a identificação dos produtos como o 4-Nitroso-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida e a 4-hidroxilamina-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida.

A pesquisa de produtos de degradação oxidativa do sulfametoxazol em amostras de comprimidos e suspensão oral foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência nas condições estabelecidas por Pianetti (1986) para o doseamento de sulfametoxazol + trimetoprima em formulações. Os tempos de retenção dos compostos foram de 2,31cm para a hidroxilamina e 2,90cm para o nitroso derivado. A presença do pico com tempo de retenção de 2,31cm,

TABELA 1
Atividade antibacteriana do sulfametoxazol e dos produtos de degradação do sulfametoxazol

Microorganismo	Sulfametoxazol	Produtos de degradação		
	Halo de inibição ($\bar{x} \pm s$) mm	CV%	Halo de inibição ($\bar{x} \pm s$) mm	CV%
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,58 ± 0,34	2,33	8,44 ± 0,17*	2,01
<i>Escherichia coli</i>	14,30 ± 0,41	2,87	8,40 ± 0,17*	2,02

Teste "t" Student: * significativo p < 0,01.

TABELA 2
Atividade antimicrobiana da trimetoprima, da trimetoprima + sulfametoxazol e da trimetoprima + produtos de degradação

Substância ativa	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Halo de inibição ($\bar{x} \pm s$) mm	CV%	Halo de inibição ($\bar{x} \pm s$) mm	CV%
Trimetoprima	13,83 ± 0,57	4,12	18,80 ± 0,31	1,65
Trimetoprima + Sulfametoxazol	20,69 ± 0,17*	0,82	22,84 ± 0,48*	2,10
Produtos de degradação + Trimetoprima	14,61 ± 0,38	2,60	19,27 ± 0,38	1,97

Teste "t" Student: * Significativo para p < 0,01 comparado com a trimetoprima.

correspondente à hidroxilamina, foi detectado em comprimidos e suspensão oral estocados a 60°C, e em suspensão oral estocada a temperatura ambiente. O pico com tempo de retenção igual a 2,90cm, correspondente ao nitroso derivado, nestas condições de operação fica encoberto pelo pico do sulfametoxazol, não podendo ser verificada a sua presença (Figuras 1 e 2).

A atividade antibacteriana da mistura hidroxilamina e nitroso derivado foi testada *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, tendo sido constatado que os produtos de degradação do sulfametoxazol têm menor atividade antibacteriana que o sulfametoxazol (Tabela 1). Buscando comprovar a reduzida atividade dos produtos de degradação, foram realizados testes com soluções de SMZ + TMP e produtos de degradação do SMZ + TMP, e estes demonstraram que o sinergismo presente na associação do SMZ + TMP, determinante do aumento da ati-

vidade antibacteriana em relação à atividade de cada um dos componentes, não ocorre da mesma forma na associação dos produtos de degradação com a TMP, pois esta associação tem a mesma atividade antimicrobiana que a TMP isolada conforme Tabela 2.

No teste de toxicidade aguda não se constatou nenhuma mudança de comportamento ou óbito entre os animais utilizados, durante 48 horas de observação, na dose administrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Clarke, E. G. C. & Humphreys, D. J. A note on the identification of sulfonamides by thin-layer chromatography. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 22:845-47, 1970.
- 2 - De Souza, A. A. *Degradation oxydative de sulfamides a usage therapeutique. Isolation, structure et methodes d'analyse des produits formes*. França, Universite, Paris-SUD, 1984 (tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- 3 - De Souza, A. A., Baylocq, D. & Pellerin, F. Degradation oxydative de sulfamides a usage therapeutique. *Talanta*, 35:875-8, 1988.
- 4 - Pianetti, G. A. *Controle de qualidade de duas formas farmacêuticas contendo sulfametoxazol + trimetoprima*. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação da UFRGS, 1986 (dissertação de Mestrado).
- 5 - Ressler, C. & Knapp, M. Liquid chromatography of oxidized sulfanilamide derivatives. *Journal of Liquid Chromatography*, 8:443-53, 1985.
- 6 - Rieder, M. J. et alii. Synthesis and in-vitro toxicity of hidroxilamine metabolites of sulfonamides. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244:724-7, 1988.
- 7 - Schirmann, J. P. & Delavarenne, S. Y. *Hydrogen peroxid in organic chemistry*. Paris: Edition et Documentation Industrielle, 1980.
- 8 - Turczan, J. W. & Medwick, T. Identification of sulfonamides by NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61:434-43, 1972.