

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

MÉTODO POR CLAREZA E ESTABILIDADE PRELIMINAR PARA
CEFTAROLINA FOSAMILA EM FORMULAÇÃO INJETÁVEL

Paula de Oliveira Moretto

Porto Alegre, 2022

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

MÉTODO POR CLAREZA E ESTABILIDADE PRELIMINAR PARA
CEFTAROLINA FOSAMILA EM FORMULAÇÃO INJETÁVEL

Dissertação apresentada por
Paula de Oliveira Moretto para
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Porto Alegre, 2022

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29/06/2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cassia Virginia Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Favero Reisdorfer Paula
Universidade Federal do Pampa

Profa. Dra. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira Moretto, Paula
MÉTODO POR CLAE-DAD E ESTABILIDADE PRELIMINAR PARA
CEFTAROLINA FOSAMILA EM FORMULAÇÃO INJETÁVEL / Paula
de Oliveira Moretto. -- 2022.
89 f.
Orientador: Andreas Sebastian Loureiro Mendez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Ceftarolina Fosamila. 2. Degradação Forçada. 3.
Estabilidade . 4. Identificação por LC-MS. 5. Produtos
de degradação. I. Sebastian Loureiro Mendez, Andreas,
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 mãe Carme Moretto, que sempre me apoiou durante toda minha trajetória profissional. Me encorajando há sempre ir em busca dos meus sonhos.

Ao meu pai, Paulo Moretto, que ao decorrer da vida me mostrou que deveria seguir na área da saúde.

À minha família, pela compreensão, paciência e apoio ao longo desse período acadêmico.

Ao meu namorado, Fernando Pimentel, pelo apoio, compreensão e motivação durante esse período de estudos.

A minha amiga, Fernanda Bitencourt, que me incentivou a procurar e realizar o mestrado na UFRGS, sem ela, nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez, pela orientação, paciência e motivação ao longo desse período acadêmico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS e aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar-UFRGS).

RESUMO

A ceftarolina fosamila, classificada como cefalosporina de quinta geração, é indicada ao tratamento de infecções de tecidos moles e/ou pneumonia causada principalmente por *Staphylococcus aureus*. Trata-se de um pró-fármaco, que após administração por via intravenosa, sofre hidrólise do grupo fosono e estabiliza-se em sua forma ativa, a ceftarolina. O presente estudo objetivou a validação de método para quantificação da ceftarolina fosamila por CLAE-DAD, e a avaliação da estabilidade preliminar da formulação após reconstituição e estocagem conforme previsto em bula. Os produtos de degradação majoritários em ensaio de degradação forçada também foram investigados. Foi validado um método de simples execução, com fase móvel composta por tampão de fosfato e acetonitrila. O método foi capaz de detectar o pró-fármaco ceftarolina fosamila e sua forma ativa ceftarolina, a qual é considerada produto de degradação quando presente na amostra reconstituída. Nos ensaios de estabilidade preliminar, usando como diluentes soluções salina e glicose 5%, avaliou-se o decaimento de concentração do fármaco. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e refrigerada. A ceftarolina fosamil é estável quando armazenada sob refrigeração por até 48h, com conteúdo residual do fármaco de 93,99% e 97,18% após 48h, respectivamente para os diluentes salina e glicose a 5%. Em temperatura ambiente, a concentração do fármaco manteve-se inalterada por até 2 horas de estocagem. A base livre de ceftarolina foi formada durante o teste de estabilidade, e sua concentração aumentou ao longo do tempo. Um estudo de degradação forçada também foi realizado para avaliação dos principais produtos de degradação, que foram identificados por análise LC-MS. Aplicando condições de estresse selecionadas, cinco produtos de degradação foram identificados estruturalmente, com variação na cadeia lateral e anel cefalosporínico. Pode-se destacar o anel β -lactâmico aberto e o fármaco livre de ceftarolina (base livre).

Palavras-chave: ceftarolina fosamila; degradação forçada; estabilidade; identificação por LC-MS; produtos de degradação.

ABSTRACT

Ceftaroline fosamil, classified as a fifth-generation cephalosporin, is indicated for the treatment of soft tissue infections and/or pneumonia caused mainly by *Staphylococcus aureus*. It is a prodrug and after intravenous administration, it undergoes hydrolysis of the phosphono group and stabilizes in its active form, ceftaroline. The study aimed to validate a method for quantifying ceftaroline fosamil by HPLC-DAD, and to evaluate the preliminary stability of the formulation after reconstitution and storage as provided in the package insert. Major degradation products and forced degradation assay were also investigated. A simple method was validated, with a mobile phase composed of phosphate buffer and acetonitrile. The method was able to detect the prodrug ceftaroline fosamil and its active form ceftaroline, which is considered a degradation product when present in the reconstituted sample. In the preliminary stability tests, using saline solutions and 5% glucose as diluents, the drug concentration decay was evaluated. The samples were stored at room temperature and refrigerated. Ceftaroline fosamil is stable when stored under refrigeration for up to 48 hours, with residual drug content of 93.99% and 97.18% after 48 hours, respectively for saline and 5% glucose diluents. At room temperature, drug concentration remained unchanged for up to 2 hours of storage. Ceftaroline free base was formed during the stability test, and its concentration increased over time. A forced degradation study was also carried out to evaluate the main degradation products, which were identified by LC-MS analysis. Applying selected stress conditions, five degradation products were identified structurally, with variation in the side chain and cephalosporin ring. The open β -lactam ring and the free drug of ceftaroline (free base) can be highlighted.

Keyword: ceftaroline fosamil; degradation products; stability; forced degradation; identification by LC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Exemplos de estruturas químicas de anéis básicos de componentes β -lactâmicos (Fonte: ARRUDA, 2019).....	29
Figura 3.2. Estrutura química básica das cefalosporinas (Fonte: ARRUDA, 2019).....	30
Figura 3.3. Estrutura química da Ceftarolina Fosamila (Fonte: LACALLE et al., 2021).....	31
Figura 3.4. Estrutura química da Ceftarolina (Fonte: LACALLE et al., 2021).....	31
Figura 3.5. Estrutura química da Ceftarolina Fosamila, suas ações e relação dos grupamentos com suas características (Fonte: LAUDANO, 2011).....	32
Figura 3.6. Estrutura química da Ceftarolina M-1, metabólito da Ceftarolina (Fonte: LACALLE et al., 2021).....	33
Figure 4.1. Chemical structures of ceftaroline fosamil (prodrug) (A) and ceftaroline (active form) (B).....	46
Figure 4.2. Representative chromatograms of ceftaroline fosamil standard (A) and sample (B), obtained during HPLC-DAD method validation. Ceftaroline fosamil (pro-drug): retention time of 5 minutes; Ceftaroline (degradation product): retention time of 8 minutes.....	53
Figure 4.3. Representative chromatograms from LC-MS analysis of arginine (A), ceftaroline fosamil (B), ceftaroline (C) and both drugs (ceftaroline fosamil and ceftaroline).....	53
Figure 4.4. Representative chromatograms from HPLC-DAD method development, assaying specificity: (A) thermal degradation (60 °C); (B) oxidative degradation (hydrogen peroxide 3%); (C) degradation by UVC light (3h); (D) degradation by alkaline medium (NaOH 0.1M).....	55
Figure 4.5. Mass spectra from ceftaroline fosamil reconstituted sample in saline at zero time (A) and after 24h (B) of storage at room temperature (25°C).....	58

Figure 4.6. Mass spectra from ceftaroline fosamil reconstituted sample in 5% glucose at zero time (A) and after 24h (B) of storage at room temperature (25°C).....	59
Figure 4.7. Mass spectrum obtained from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil samples submitted to forced degradation by UVA (A) and dry heat (B).....	60
Figure 4.8. Mass spectrum obtained from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil samples submitted to forced degradation by humidity during 48 hours.....	61
Figure 4.9. Mass spectrum obtained from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil samples submitted to forced degradation by NaOH 0.05N during 5 minutes.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Produtos de degradação gerados após exposição da ceftarolina fosamila a condições de estresse (KARPIUK et al., 2017).....	88
Table 4.1. Results obtained from linearity, LOD and LOQ, precision and accuracy study applied for validation of HPLC method for quantitation of ceftaroline fosamil in commercial sample.....	88
Table 4.2. Modifications studied in the robustness test applied to the development of quantitative HPLC-DAD for ceftaroline fosamil.....	89
Table 4.3. Average results of peak decay (%) for ceftaroline fosamil and peak growth (%) for ceftaroline from UFLC analysis applied to preliminary stability for samples stored in clinical use conditions. The samples were prepared in triplicate. For ceftaroline peak growth, mass balance of all peaks was considered (peak area was used as reference for % values).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

Cmax - concentração máxima sérica

CYP450 – Citocromo P450

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

HPLC - High performance liquid chromatography

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

IPTM - Infecções de pele e tecidos moles

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

PB – Proteína de ligação à penicilina

PLPs – Proteína de ligação à penicilina

PNSP - *Streptococcus pneumoniae* não suscetíveis à penicilina

7-ACA - Ácido 7-aminocefalosporânico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1. Beta-lactâmicos.....	29
3.1.1. Cefalosporinas.....	29
3.1.1.1. Ceftarolina Fosamila.....	30
3.2. Métodos analíticos	34
3.2.1. Cromatografia Líquida de alta eficiência.....	34
3.3. Estudo de estabilidade – aspectos gerais e estabilidade da ceftarolina fosamila.....	36
4. Capítulo I: Artigo Científico a ser submetido para publicação.	41
4.1. Artigo científico: Simultaneous monitoring of ceftaroline fosamil and its active form ceftaroline during stability study of commercial sample – a new stability-indicating HPLC method, drug decomposition in clinical use conditions and degradation products by LC-MS.....	43
4.1.1 Introduction.....	46
4.1.2 Materials and Methods	48
4.1.2.1 Chromatographic methods	48
4.1.2.1.1 Chemicals and reagents	48
4.1.2.1.2 Instrumentation and analytical conditions	48
4.1.2.1.3 Sample preparation for HPLC analysis	49
4.1.2.1.4 Analytical stability.....	50
4.1.3 Method validation.....	50
4.1.3.1 Specificity	50
4.1.3.2 Linearity	51

4.1.3.3	LOD and LOQ.....	51
4.1.3.4	Precision.....	51
4.1.3.5	Accuracy.....	51
4.1.3.6	Robustness.....	51
4.1.3.7	Preliminary stability and forced degradation	51
4.1.3.7.1	Preliminary stability of reconstituted sample	51
4.1.3.7.2	Forced degradation and degradation products by LC-MS	52
4.1.4	Results and discussion	52
4.1.4.1	Validation.....	54
4.1.4.1.1	Specificity.....	54
4.1.4.1.2	Linearity, Precision and Accuracy	55
4.1.4.1.3	Robustness.....	56
4.1.4.1.4	Preliminary stability and degradation products.....	56
4.1.4.1.4.1	Preliminary stability (drug decay and degradation products)	56
4.1.4.1.4.2	Degradation products from stress testing	59
4.1.5	Conclusions	62
4.1.6	References	62
5.	DISCUSSÃO GERAL	69
6.	CONCLUSÃO.....	75
7.	REFERÊNCIAS.....	79
8.	ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas não tratadas de maneira imediata podem gerar rápida propagação pelo organismo humano e levar o paciente a óbito. Como tratamento para esses tipos de infecções são administrados antibióticos, o qual podem ser de origem natural ou sintética. Entre as classes de antibióticos podem ser destacados os β -lactâmicos, os quais são amplamente utilizados no tratamento bacteriano, pois possuem amplo espectro de ação. Tem como mecanismo de ação a interrupção da formação da parede celular bacteriana, através da ligação covalente a proteína ligadora de penicilinas (PLP). Essa enzima está envolvida nas etapas terminais da reticulação peptidoglicana presente na parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BUSH e BRADFORD, 2016).

Entre as classes de compostos β -lactâmicos, pode-se citar as cefalosporinas. A sua estrutura química básica é constituída por um núcleo cefem, que consiste na fusão do anel diidroatiazínico e um anel β -lactâmico. As alterações das cadeias laterais originam, assim, as diferentes classes dessa família, com um amplo espectro de ação frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A ceftarolina fosamila é um exemplo de antimicrobiano da classe das cefalosporinas. É um cefalosporínico de quinta geração indicado para uso intravenoso. Ele é comumente utilizado para infecções complicadas de pele e tecidos moles causadas por isolados sensíveis de *Staphylococcus aureus*. Também é utilizado para tratamento de pneumonia adquirida na comunidade, a qual é uma infecção do parênquima pulmonar adquirida fora dos hospitais, causada por isolados sensíveis de *Streptococcus pneumoniae* e em tratamentos de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, β -lactâmicos do grupo das cefalosporinas (AZEVEDO, 2014; GRAU et al., 2014; ARRUDA, 2019).

Esse medicamento é utilizado em hospitais, com aplicação por via intravenosa em bolsas de infusão. Sua administração ocorre a cada 12 horas por infusão com tempo de 60 minutos. Conforme previsto em bula, após reconstituição, o medicamento deve ser administrado nas primeiras 6 horas ou armazenado sob refrigeração por até 24 horas. Alguns estudos foram realizados para avaliação dessa estabilidade, evidenciando que o fármaco é mais instável quando armazenado em temperatura ambiente do que em. A temperatura mais elevada pode gerar a hidrólise do grupo fosono gerando o produto de degradação ceftarolina, sua forma ativa (MADFAI et al.,

2017; WYETH, 2020). Além disso, pode haver geração de produtos de degradação. Karpiuk e colaboradores (2017) investigaram produtos de degradação após o fármaco ser exposto a condições de estresse. Entre os produtos avaliados foram mencionadas impurezas isoméricas e a presença de um epímero Δ^3 -ceftaroline. Por isso, a avaliação da estabilidade do medicamento em uso clínico ou sob condições de estresse são fatores importantes para garantir a eficiência do medicamento no tratamento terapêutico.

A literatura descreve poucos métodos para quantificação de ceftarolina fosamila. Esses métodos foram capazes de detectar apenas o pró-fármaco ceftarolina fosamila. Já o presente estudo realizou validação de método que detectou pico base da ceftarolina fosamila e sua forma ativa ceftarolina. A natureza lipofílica das cefalosporinas oferece excelente retenção em coluna de fase reversa, com as variações da cadeia lateral do núcleo do ácido 7-aminocefalosporínico, facilitando a resolução cromatográfica. Para o método há diferentes possibilidades de mistura para a fase móvel, podendo ser tampão ou uma base. Além disso, sua análise tende a ser rápida, com detecção em até 10 minutos (SUNEETHA E VENKANNA, 2013; ALI et al., 2015; JÚNIOR, 2017; KARPIUK et al., 2017).

Considerando que há poucos estudos para esse fármaco descritos na literatura científica, há necessidade de maior aprofundamento nos trabalhos de investigação analítica da ceftarolina fosamila em sua formulação comercial, no campo de metodologia analítica de quantificação, estabilidade, e presença de potenciais produtos de degradação. Neste contexto, o presente trabalho se insere e procura oportunizar ampliar o leque de trabalhos de ordem analítica, no aspecto de controle de qualidade de medicamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a validação de método analítico para quantificação de ceftarolina fosamila, pós-reconstituição, a realização de estudo de degradação forçada para identificação de produtos de degradação e a avaliação da estabilidade preliminar em condições de uso clínico.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver e validar método analítico por CLAE-DAD para quantificação de ceftarolina fosamila, pós-reconstituição;
- ✓ Estudar a degradação forçada da ceftarolina fosamila, a partir das condições utilizadas para determinação da especificidade do método de CLAE-DAD;
- ✓ Avaliar preliminarmente a estabilidade do fármaco, na formulação reconstituída, aplicando-se condições de preparo e estocagem que mimetizem o uso clínico;
- ✓ Aplicar a técnica por LC-MS para detecção e identificação de produtos de degradação da ceftarolina fosamila.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Beta-lactâmicos

Os β -lactâmicos constituem a classe de antibiótico mais utilizada para tratamento bacteriano. Uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, no período de 2004 a 2014, avaliou que 65,24% dos antibióticos injetáveis utilizados eram β -lactâmicos e que as cefalosporinas compreendiam 47,49% destas prescrições (BUSH e BRADFORD, 2016).

Os β -lactâmicos passaram por desenvolvimento contínuo ao longo dos anos, a fim de melhorar as propriedades como potência, espectro de atividades, perfis farmacocinético e de segurança, para combater a resistência bacteriana. Podem ser destacadas quatro classes principais de β -lactâmicos, as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmas e monobactamas, apresentados na Figura 3.1. A ligação no anel β -lactâmico com outros diferentes anéis, como por exemplo, o anel tiazolidínico, nas penicilinas, ou o anel di-hidrotiazina, nas cefalosporinas, são características que proporcionam o amplo espectro dentro dessa classe (AZEVEDO, 2014).

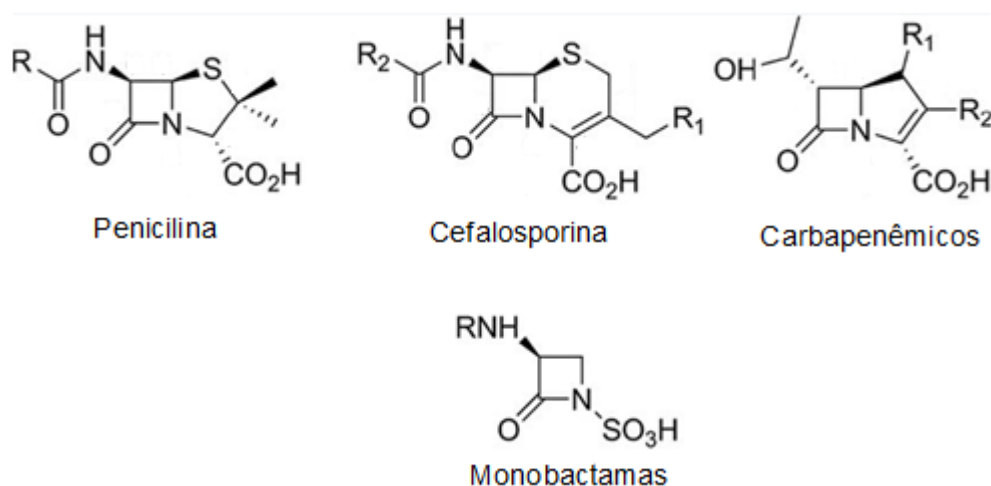


Figura 3.1. Exemplos de estruturas químicas de anéis básicos de componentes β -lactâmicos (Fonte: ARRUDA, 2019).

3.1.1. Cefalosporinas

O grupo das cefalosporinas é extenso e possui cinco gerações, dependendo do espectro bacteriano. A primeira geração possui baixo espectro, pois tem ação em bactérias Gram-positivas. A segunda geração, surgiu por volta da década de 70, e possui o grupo metoximino na posição 7, gerando maior eficácia para bactérias Gram-

negativas do que Gram-positivas. A terceira geração surgiu no final da década de 70 e tem como foco ação nas bactérias Gram-negativas. A quarta geração possui adição de grupos acídicos nas cadeias introduzidas na posição 7, gerando maior estabilidade na presença da enzima β -lactamase. A quinta geração é a última a ser lançada e possui enorme potencial de ação, devido ao seu espectro de ação contra bactérias multirresistentes. A maioria destes de última geração são utilizados apenas na forma farmacêutica pó para solução injetável. As cefalosporinas possuem como estrutura básica o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), fazendo união com o anel dihidrotiazínico, conforme apresentado na figura 3.2 (BAPTISTA, 2013; AZEVEDO, 2014; ARRUDA, 2019; BRASIL, 2020).

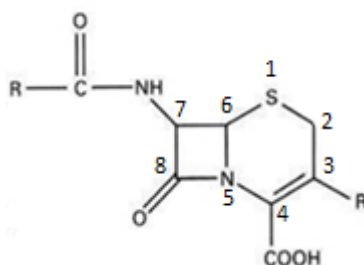


Figura 3.2. Estrutura química básica das cefalosporinas (Fonte: ARRUDA, 2019).

3.1.1.1. Ceftarolina Fosamila

A ceftarolina fosamila (Figura 3.3) é comercializada na forma de pó para solução injetável. É um antimicrobiano cefalosporínico de quinta geração, que age através da inibição das proteínas de ligação à penicilina (PB) que são ligadas às membranas citoplasmáticas. O pró-fármaco ceftarolina fosamila, quando administrado por via intravenosa, é rapidamente convertido por fosfatases plasmáticas em sua forma ativa ceftarolina (Figura 3.4) (BIEK et al., 2010; BARSKY et al., 2018,).

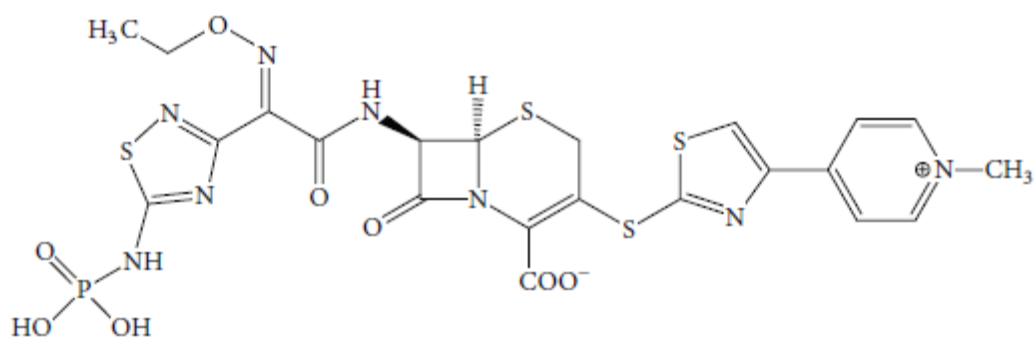


Figura 3.3. Estrutura química da Ceftarolina Fosamila (Fonte: LACALLE et al., 2021).

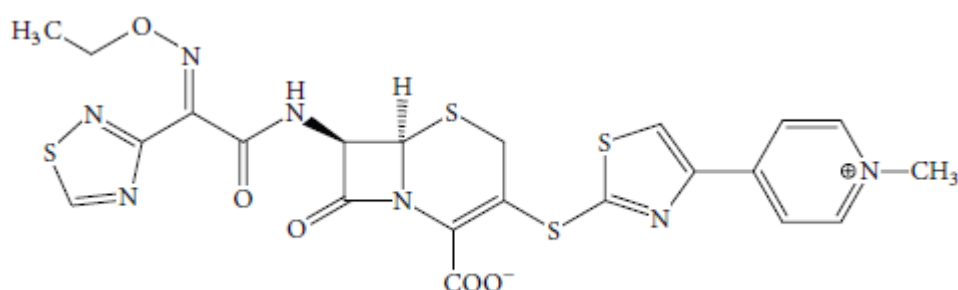


Figura 3.4. Estrutura química da Ceftarolina (Fonte: LACALLE et al., 2021).

Conforme Figura 3.5 é possível observar a estrutura química da ceftarolina fosamila e suas ações antimicrobianas. O anel 1,3-tiazol na posição C3 e o grupo oxima na posição C7 são responsáveis pela atividade anti-MRSA. O grupo fosfono presente apenas no pró-farmaco, aumenta sua solubilidade, facilitando a conversão em sua forma ativa. As seguintes características físico-química, são descritas pra a Ceftarolina Fosamila (DRUSANO, 2010; LAUDANO, 2011; LACALLE et al., 2021):

- Nome químico: (6*R*,7*R*)-7-[(2*Z*)-2-ethoxyimino-2-[5-(phosphonoamino)-1,2,4-thiadiazol-3-yl]acetyl]amino]-3-[4-(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)-1,3-thiazol-2-yl]sulfanyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate

- Aparência: pó amarelo embranquecido a amarelo pálido.

- Fórmula molecular: C₂₂H₂₂N₈O₈PS₄

- Peso molecular: 684,7 g/mol

- pKa (ácido forte): 1,31

- pKa (base forte): 0,31

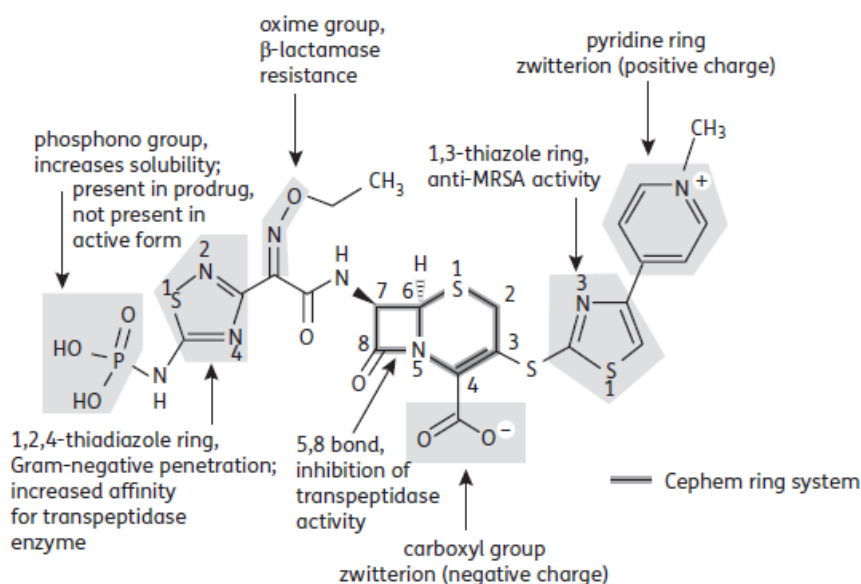


Figura 3.5. Estrutura química da Ceftarolina Fosamila, suas ações e relação dos grupamentos com suas características (Fonte: LAUDANO, 2011).

A Ceftarolina Fosamila é uma nova cefalosporina com amplo espectro, possuindo atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, além das cepas resistente a MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), devido à afinidade pelas proteínas de ligação à Penicilina (PLPs). Estudos demonstram que a Ceftarolina tem elevada afinidade para PLP2a das bactérias MRSA e às PLP2x das bactérias *Streptococcus pneumoniae* não suscetíveis à penicilina (PNSP) (DRUSANO, 2010; KARPIUK et al., 2017).

A ceftarolina fosamila é comumente administrada por via intravenosa, com dosagem de 600 mg a cada 8 ou 12 horas, por infusão de uma hora, obtendo concentração máxima sérica (C_{max}) de 20 mg/mL. A mesma dosagem administrada por via intramuscular, pode produzir uma C_{max} de 8,5 mg/L após 2 horas. Após administrada ela é rapidamente convertida na sua forma ativa. Sua ligação às proteínas plasmáticas é baixa, cerca de 20-30%, e a ceftarolina não é distribuída para os eritrócitos. Possui farmacocinética linear com tempo de meia vida de 1,6h para uma dosagem e 2,6h após dosagens múltiplas (ASTRA ZENECA, 2016; RICCOBENE et al., 2020).

A ceftarolina sofre hidrólise do anel beta-lactâmico para formar o metabólito de anel aberto e inativo (ceftarolina M-1), Figura 3.6. O sistema CYP450 não é uma via metabólica significativa, com isso possui baixa interação medicamentosa. A forma ativa e seus metabólitos são eliminados, principalmente, por via renal com depuração de 4-7 L/hora. Após uma dose única de 600 mg, 65% do fármaco ativo é excretado na urina, em indivíduos saudáveis. A eliminação da ceftarolina é afetada em pacientes com função renal diminuída, principalmente os que possuem creatinina > 50 mL/min. Para esses indivíduos é necessário ajuste de dosagem, pois o tempo de meia vida pode aumentar para 6 horas (SARAVOLATZ et al., 2011; ALI et al., 2015; LACALLE et al., 2021; RICCOBENE et al., 2020).

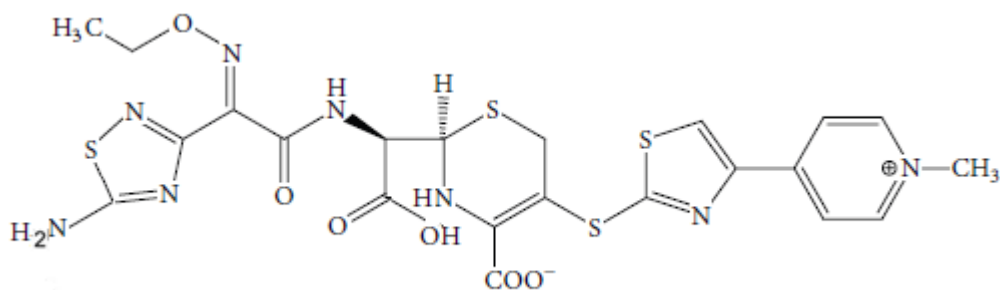


Figura 3.6. Estrutura química da Ceftarolina M-1, metabólito da Ceftarolina (Fonte: LACALLE et al., 2021).

A ceftarolina fosamila possui amplo espectro de ação para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse medicamento é comumente utilizado no tratamento de infecções de pele e tecidos moles, além de ser utilizado para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. As infecções de pele e tecidos moles (IPTM) são muito comuns em pacientes, sendo que as situações graves podem chegar a 4,3 – 10,5% dos episódios sépticos, podendo ocasionar o óbito de 1,3 – 7,2% desses (SOUZA, 2003; PIRES et al., 2015; MALHEIRO et al., 2017).

Esse fármaco também é utilizado no tratamento de pneumonia adquirida na comunidade, a qual é uma infecção do parênquima pulmonar adquirida fora de hospitais e/ou instalações de cuidados prolongados. A causa mais comum nessas infecções é o microrganismo *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo), o qual está envolvido em 30 a 70% dos casos. Em um estudo realizado em Portugal, esta doença é descrita como a causadora de sepse grave em 35,6 a 51,9% dos adultos hospitalizados em cuidados intensivos, podendo ocasionar choque séptico em 49,2%

destes (MARQUES et al., 2010; CUPURDIJA, 2015; ASTRA ZENECA, 2016; WELTE et al., 2019; SANTOS, 2020).

Além dos adultos, essa doença é ainda mais agressiva em crianças. Estima-se que em 2015 houve 921 mil mortes de crianças com menos de 5 anos em todo o mundo. No Brasil, em 2017, 1.117.779 de internações hospitalares ocorreram com crianças menores de cinco anos devido a esse quadro infeccioso, podendo ser considerado uma das principais causas de internação (CARVALHO, 2020; NGOCHO, 2020).

3.2. Métodos analíticos

Os métodos analíticos, antes de serem colocados na rotina de análise de medicamentos, devem ser validados, conforme exigência da ANVISA através da RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. A validação do método é fundamental para a garantia da qualidade das análises de um produto. Ela deve garantir, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados. Por isso, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, robustez adequadas para a análise. Para os estudos de estabilidade, os métodos de análise são as ferramentas de avaliação do comportamento do fármaco em termos de identificação, quantificação (teor) e detecção de produtos de degradação (EPSHTEIN, 2004; BRASIL, 2017).

3.2.1. Cromatografia Líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (em inglês, HPLC - High performance liquid chromatography) é a técnica analítica de separação mais utilizada. Essa técnica é considerada muito sensível e de fácil adaptação para determinações quantitativas. Em uma única análise é possível separar os componentes, individualmente, de uma mistura. A separação desses componentes ocorre em duas fases imiscíveis, uma móvel e outra estacionária. Para a fase estacionária podem ser utilizados compostos sólidos, porosos ou em pequenas partículas. Já na fase móvel, a separação ocorre por solventes que podem possuir diversas polaridades. Sendo assim, a separação baseia-se na migração de diferentes compostos de uma mistura que ocorre pela diferente interação entre duas fases imiscíveis (SCOTT, 2003).

Em busca de trabalhos na literatura científica para análise da ceftarolina fosamila e determinação da estabilidade, poucos estudos com este foco são encontrados. Pode-

se mencionar o trabalho de Ali e colaboradores (2015), que descreve o desenvolvimento de método de quantificação por CLAE-DAD para determinação deste fármaco. São destacados alguns aspectos como a preparação da fase móvel através de mistura simples de acetonitrila e tampão dihidrogeniofosfato de amônia, sendo testada a faixa ideal de pH para haver a separação da ceftarolina fosamila e baixo tempo de análise. Em pH 7,0, 8,0 e 10 os resultados foram insatisfatórios, pois houve baixo tempo de retenção. Os melhores resultados foram demonstrados em pH 9,0, com detecção do fármaco em 4 minutos. A maior área do pico cromatográfico foi obtida com comprimento de onda de detecção em 240,6 nm, em concentração de 5 µg/mL da amostra, a qual foi preparada por protocolo relativamente simples. A taxa de fluxo foi 1.0 mL/min. Na validação os autores mencionam que o método apresenta especificidade de análise nas condições selecionadas para o estudo, além de ser uma análise simples, precisa e rápida.

Em outro estudo, também foi proposto método por CLAE-DAD, sendo que o desenvolvimento do método foi iniciado pela determinação da fase móvel. Foram testadas as misturas de metanol:água, água:acetonitrila, metanol:acetonitrila:água. A melhor fase móvel foi aquela formada pela mistura de tampão:acetonitrila:metanol na proporção 40:30:30. A taxa de fluxo foi de 1.0 mL/min e o comprimento de onda em 242 nm. Nessas condições o fármaco foi retido a 3,53 min, destacando-se a rapidez analítica, a relativa simplicidade na execução e a precisão dos resultados analíticos (SUNEETHA E VENKANNA, 2013).

O estudo de Karpiuk e colaboradores (2017) destaca que devido à estrutura do anel e grupos laterais ionizáveis das cefalosporinas, elas apresentam características que permitem sua análise por CLAE em fase reversa. A natureza lipofílica dessa classe de antimicrobiano oferece excelente retenção em colunas de fase reversa, com as variações da cadeia lateral do núcleo do ácido 7-aminocefalosporinico, facilitando a resolução cromatográfica. Durante o desenvolvimento de um método por CLAE para este fármaco, em trabalho destes autores, foram obtidos método gradiente, com fase móvel de tampão de acetato de amônia (50 mM) pH 3,5 e acetonitrila. O estudo de Lacalle e colaboradores (2021) realizou quantificação de ceftarolina em plasma humano por HPLC, com fase móvel de tampão de dihidrogeniofosfato de amônia e

acetonitrila (85:15, v:v), taxa de fluxo de 1mL/min e comprimento de onda de detecção em 238 nm.

Em outro estudo realizado por Junior (2017), foi proposto o desenvolvimento de dois métodos para quantificação da ceftarolina fosamila em produto farmacêutico: ensaio microbiológico por difusão em ágar-cilindros em placas, e CLAE-DAD. Neste último, a análise ocorreu por técnica de fase reversa, em fase móvel de simples composição. Durante a validação foram testadas diferentes combinações na fase móvel, como metanol, trietilamina e acetonitrila. A água utilizada foi testada em diferentes valores de pH (4,0 – 9,0) a partir da mistura de água com trietilamina 1% pH 5,0:acetonitrila (87:13). A velocidade de fluxo foi de 1.0 mL/min, detecção em 242 nm e temperatura do forno de 30°C. O autor destaca que o método foi validado de acordo com compêndios oficiais, apresentando linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.

3.3. Estudo de estabilidade – aspectos gerais e estabilidade da ceftarolina fosamila

Estudos de estabilidade para medicamentos são importantes para testar e evidenciar se há variação da qualidade do produto em função do tempo, variações climáticas como temperatura, luz e umidade. Além disso, também deve ser avaliado outros fatores relacionados às propriedades físicas e químicas do ativo, excipientes da formulação, material de embalagem e acondicionamento e processo de fabricação. Através dessas análises realizadas, de acordo com a periodicidade estabelecida em protocolos e com resultados dentro dos critérios de aceitação, é possível chegar ao prazo de validade do produto, ou seja, a data limite em que o mesmo permanece com a qualidade que possuía no momento de sua fabricação. Nos resultados avaliados durante o estudo de estabilidade, a potência do medicamento não pode estar reduzida mais do que 10%, desde que os produtos de degradação estejam seguramente identificados e com seus efeitos previamente conhecidos, para evitar possíveis efeitos adversos em pacientes (ICH, 2003; DOLHAN, JELINSKA, MANUSZEWSKA, 2014; BRASIL, 2019).

Para que seja possível chegar ao prazo de validade estabelecido são realizados estudos de estabilidade de longa duração, acelerada, degradação forçada e, por fim, de acompanhamento. As informações que são obtidas nesses estudos caracterizam

a estabilidade do produto, podendo ser classificado em termolábil, hidrolisável, ou fotoinstável, e devem ser analisados os possíveis produtos de degradação. Essas alterações provenientes da exposição do fármaco às variações extremas, podem comprometer seu efeito farmacológico. Com essas informações obtidas, torna-se mais fácil garantir a segurança e eficácia do fármaco, optando-se assim por excipientes adequados, e processo de fabricação, materiais de embalagem e acondicionamento que sejam mais apropriados para cada tipo de fármaco (OKERMAN, HENDE, ZUTTER, 2007; BISHT et al., 2017).

Em estudos de estabilidade de degradação forçada, o medicamento é colocado sob condições severas como temperatura, umidade, oxidação, luz e susceptibilidade à hidrólise em uma ampla faixa de pH. As amostras são coletadas nos tempos previstos, conforme descrito em protocolo e analisadas para identificação de possíveis produtos de degradação, estabelecendo-se as rotas das degradações que possam estar envolvidas quando o produto é exposto a esses tipos de condições de estresse. Estudos de degradação fornecem informações muito importantes com relação a estabilidade da formulação durante o seu ciclo de vida, visto que, após comercialização, o armazenamento do medicamento nem sempre é conforme indicado em bula. Por isso, esse estudo é indicado a ser incorporado em projetos e programa de estabilidade de novos medicamentos (SINGH, 2013; BRASIL, 2019).

Para a estabilidade da ceftarolina fosamila, poucos estudos são também descritos na literatura. Karpiuk e colaboradores (2017) investigaram a estabilidade deste fármaco na formulação farmacêutica, com foco na identificação e determinação de produtos de degradação. O medicamento foi submetido a condições de estresse (temperatura, hidrólise ácida, básica e oxidante, fotólise e umidade) e após um período foi analisado por CLAE-DAD. Estão descritos na tabela 3.1 os sete principais produtos de degradação, oriundos de condições de degradação forçada por temperatura e por luz UVC (254 nm), os quais foram identificados por LC-MS.

As impurezas número um, dois e três foram observadas quando a solução de ceftarolina fosamila foi armazenada em temperatura ambiente por um longo período (14-29 dias) ou em altas temperaturas. Já a impureza número quatro foi identificada em amostras armazenadas em temperatura ambiente e também em amostras do fármaco após reconstituição. O teor da impureza foi estimado em cerca de 3,6%,

correspondendo a 3,6 vezes a área do pico principal obtido com solução de 1% de ceftarolina fosamila. Essa impureza perdeu cerca de 80 Da, correspondente ao peso molecular do grupo fosfono. Com base nesses dados sugere-se que essa molécula é a ceftarolina, forma ativa do fármaco. A impureza número cinco foi observada em amostras com temperaturas elevadas e armazenadas por 29 dias. Ela possui o mesmo peso molecular e fórmula molecular da impureza quatro, podendo ser um isômero da forma ativa do fármaco, sendo sugerido como identidade a criação de Δ^3 -ceftarolina.

A impureza número seis foi identificada após exposição à luz UVC (254 nm) em diferentes tempos de 2h à 24h. Esse processo de fotodegradação gerou a impureza com peso molecular de 604,7, e sugeriu-se que é um isômero E da ceftarolina. O último produto de degradação foi identificado em amostra de ceftarolina fosamila após reconstituição e o teor foi estimado em 0,7%. O espectro de massa de fragmentação foi semelhante à impureza número quatro, com exceção da m/z 603.1. A diferença do peso molecular entre essas duas impurezas é de 42 Da, assim a estrutura continha a porção acetilamino substituída por um anel 1,2,4-tiadiazol. Sugere-se que essa substância foi formada devido ao uso de tampão acetato como solvente da fase móvel.

Outro estudo, realizado por Madfai e colaboradores (2017), abordou um estudo de estabilidade física e química da ceftarolina fosamila em dispositivo de infusão elastomérica. O medicamento foi reconstituído e diluído em soro fisiológico ou glicose 5% até chegar em uma concentração final de 6 mg/mL. Essa concentração é utilizada para o tratamento de endocardite, osteomielite e infecções pulmonares. As amostras preparadas foram armazenadas em diferentes condições de temperatura (4 °C – 35 °C). Foram retiradas alíquotas para análise do tempo zero até 144 horas (4 °C) e do tempo zero até 24 horas (25°, 30° e 35 °C). Foram realizadas análises de concentração do fármaco, pH, mudança de aspecto e formação de partículas. A ceftarolina fosamila apresentou estabilidade química até 144 horas na temperatura de 4 °C e 24 horas para temperatura de 25 °C. No entanto, perdeu cerca 12% da concentração quando armazenada de 30-35 °C no tempo 24h. Não houve alteração de pH nem formação de partículas para todas as temperaturas testadas. No teste de aspecto, foi identificada alteração na absorbância da amostra no tempo 24h para a temperatura de 30-35 °C.

Lacalle e colaboradores (2021) realizaram validação de método para quantificação da ceftarolina fosamila em plasma humano. Além disso, também realizou estudo de estabilidade para avaliação da quantificação do fármaco em plasma humano, após congelado em baixas temperaturas. A ceftarolina fosamila foi reconstituída e misturada com plasma humano livre de drogas para obter concentrações de 0,25 – 40 µg/mL. Uma alíquota dessa amostra foi misturada com metanol e centrifugada para que o sobrenadante fosse injetado em cromatógrafo a líquido. O método validado demonstrou ser rápido, simples e reprodutível. A ceftarolina fosamila é detectada em até 5 minutos da corrida. Foi analisada a estabilidade dessas amostras, as quais foram congeladas a -20 e -80 °C, após foram congeladas e descongeladas três vezes. A ceftarolina fosamila se manteve estável até 2 semanas, quando congeladas a -20 °C e até 3 meses à -80 °C. A estabilidade do medicamento após três ciclos de congelamento e descongelamento não demonstrou variação maior que 15% da concentração nominal. Outro estudo, de Grégorie e colaboradores (2016), também teve o objetivo de validar um método que fosse capaz de quantificar ceftarolina e outros antimicrobianos em plasma humano utilizado técnica por CLAE. Também foi realizado estudo de estabilidade para as amostras de ceftarolina fosamila em plasma à temperatura congelada e refrigerada. Além disso, também foi avaliado a concentração do fármaco em sangue total à temperatura ambiente. O plasma humano se manteve estável congelado por 3 meses e, após passar por três ciclos de congelamento e descongelamento, a variação do mesmo estava dentro de 15% da concentração inicial. O sangue total e o plasma contendo ceftarolina se mantiveram estáveis armazenados à 4 °C por até 7 dias ou em temperatura ambiente por até 8 horas.

4. Capítulo I: Artigo Científico a ser submetido para publicação.

4.1. Artigo científico: Simultaneous monitoring of ceftaroline fosamil and its active form ceftaroline during stability study of commercial sample – a new stability-indicating HPLC method, drug decomposition in clinical use conditions and degradation products by LC-MS.

Abstract

Ceftaroline fosamil (prodrug) and ceftaroline (active form; degradation product) were simultaneously determined by a new stability indicating HPLC method. These two forms were monitored during stability investigation of drug formulation reconstituted solution following the same conditions used for clinical use (refrigeration and room temperature). In general terms, ceftaroline fosamil is stable when stored at refrigerator until 48h, with a drug residual content of 93.99% (in saline diluent) and 97.18% (in 5% glucose diluent). At room temperature, its chemical stability is critical, being necessary attention in the time infusion. Ceftaroline free basis was formed during stability testing, and its concentration has increased along the time. A forced degradation study was also performed for evaluation of the main degradation products, which were identified by LC-MS analysis. Applying selected stress conditions, five degradation products were structurally identified, with variation on side chain and cephalosporinic ring. The opened b-lactam ring and ceftaroline free basis can be highlighted.

Keywords: Ceftaroline fosamil; HPLC; Stability-indicating method; Degradation products; LC-MS.

4.1.1 Introduction

Ceftaroline fosamil (Figure 4.1A) is a new cephalosporin with a broad spectrum against Gram positive and Gram-negative bacteria, and especially active against to MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) resistant strains. It is a fifth-generation cephalosporin antimicrobial that acts by inhibiting penicillin-binding proteins (PBP). Recent studies have shown ceftaroline has a high affinity for PLP2a (penicillin-binding proteins 2a) from MRSA bacteria and PLP2x from penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* (PNSP) bacteria. In terms of chemical structure and activity, the 1,3-thiazole ring at position C3 and the oxime group at position C7 are responsible for anti-MRSA activity (Biek et al., 2010; Drusano, 2010; Kaushik et al., 2011).^[1-3]

Ceftaroline fosamil is currently marketed as a powder for injection (Zinforo®). The phosphono group present only in the prodrug increases its solubility, becoming easy the conversion to its active form. The prodrug ceftaroline fosamil, when administered intravenously, is rapidly converted by plasma phosphatases to its active form ceftaroline (Figure 4.1B) (Laudano, 2011; Barsky et al., 2018; Riccobene et al., 2020).^[4-6]

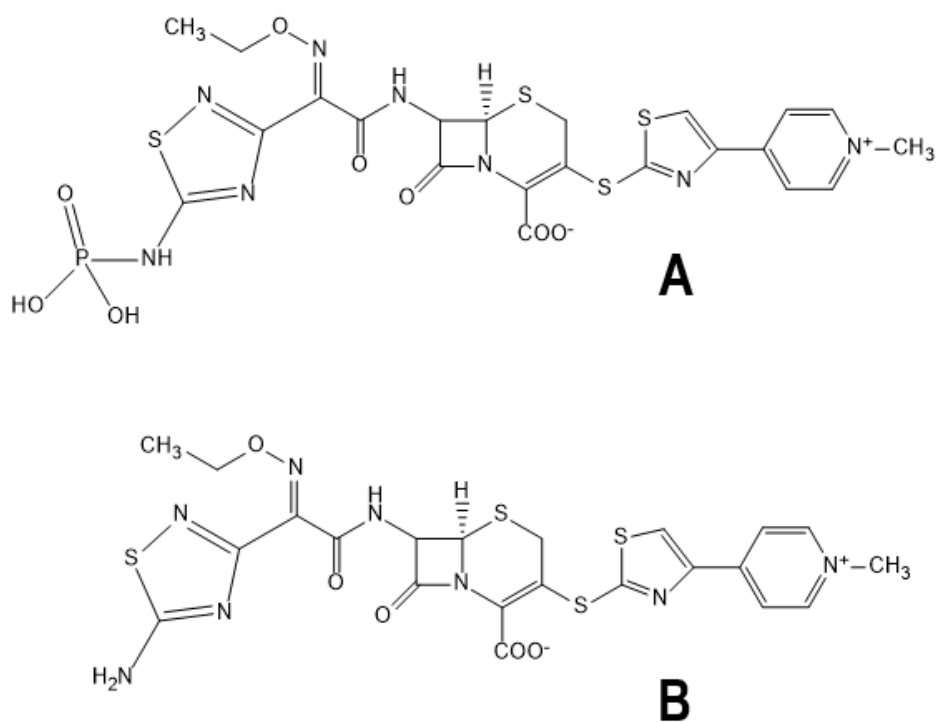


Figure 4.1. Chemical structures of ceftaroline fosamil (prodrug) (A) and ceftaroline (active form) (B).

Concerning analytical focus, some bioanalytical methods can be highlighted. Ceftaroline fosamil have been mentioned in some works involving biological matrixes and analysis through HPLC, applying DAD and MS detection. Alarcia-Lacalle et al.^[7] have proposed the drug quantitation in plasma samples, establishing a pharmacokinetic profile. The analysis is rapid (5 min) and reproducible, running samples in an isocratic mode, with analytical results ranging 0.5-40 mg/ mL. Another work, with focus on simultaneous determination of drugs in human plasma, a LC-MS method was applied with pre-treatment based on methanol precipitation followed by solid-phase extraction. For all drugs, including ceftaroline, a satisfactory data reproducibility was obtained, with a limit of quantitation of 0.2 mg/L for ceftaroline (Grégoire et al., 2016).^[8]

For raw material and commercial samples, few studies are described in literature. With focus on method validation, Ali et al.^[9] proposed an HPLC-DAD method, whose performance considered the validation parameters from ICH (ICH, 2005).^[10] The drug was detected at 4.3 min at 214 nm, and the free basis (ceftaroline) was not mentioned. Recently, Junior et al.^[11] developed two quantitative methods for ceftaroline fosamil in powder for injection: HPLC-DAD and microbiological assay. The former focused the degradation products from stress degradation, allowing to measure a residual drug concentration and to separate the main degradation products. The quantitative bioassay (agar-diffusion method) was developed as an alternative method, allowing analytical response ranging from 2.0-8.0 mg/mL drug concentration. In that work, ceftaroline free basis (active metabolite; degradation product) is not mentioned during the analytical development.

In terms of drug stability, some works have investigated the stability of ceftaroline fosamil using protocols of forced degradation or testing storage conditions similar to clinical use (Karpiuk et al., 2017; Al Madfai et al., 2018; Bhattacharya et al., 2015).^[12-14] In solid state, crystallinity and moisture content controls must be considered for long term stability at 25°C (Ikeda et al., 2008).^[15] In this work, some decomposition curves illustrated the correlation between cristallinity and temperature in aspects of stability. In an approach focused on degradation products, Karpiuk et al.^[12] investigated the stability of ceftaroline fosamil in commercial formulation, applying protocols of forced degradation and analyzing the samples through LC-MS. By fragmentation route, the drug decomposition involved the loss of fosamyl moiety and modification in the side

chain containing pyridine and dihydrothiazine rings. Another study by Al Madfai et al. [13] describes a physical and chemical stability study of ceftaroline fosamil in a commonly used elastomeric device. After dilution in saline and 5 % glucose, the drug remained stable when stored at refrigeration (4 °C), but when exposed at 25, 30 and 35 °C, it was necessary attention during infusion time.

The present study aimed an analytical investigation focused on ceftaroline fosamil commercial formulation, purposing a new stability indicating HPLC-DAD method for simultaneous monitoring of both pro-drug and free basis. Aspects of stability forced degradation, stability in conditions of clinical use, mass balance for major degradation product and identification of degradation products by LC-MS were also explored.

4.1.2 Materials and Methods

4.1.2.1 Chromatographic methods

4.1.2.1.1 Chemicals and reagents

Ceftaroline fosamil powder for injection with known content (Lot: 0008D9; 102.7%) was used as standard reference. Commercial samples of ceftaroline fosamil (Zinforo® 600 mg; Lot: 0009E0) were purchased from local supplier. Acetonitrile was obtained from Supelco (Merck, USA) and anhydrous monobasic sodium phosphate P.A. was obtained from Synth (Labsynth, BR). Purified water was obtained using a Milli-Q Plus® system (Millipore, Bedford, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

4.1.2.1.2 Instrumentation and analytical conditions

The HPLC method (Method A) was performed on a Liquid Chromatograph Shimadzu, equipped with a degasser DGU-20A5, LC-20 AT pump, SIL-20 A/C autosampler, SPD-M20A detector and CTO-20 A/C 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 UFLC method (Method B) was performed on a 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. For LC-MS analysis (Method C), a Liquid Chromatograph Shimadzu Nexera-i LC-2040C Plus coupled to Triple quadrupole Shimadzu LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used. In

terms of analytical conditions, three methods (Methods A, B and C) are described below, depending on its application in the study.

Method A: For validation study, an HPLC column ACE[®] 5 C-18 with dimensions 150 x 4.6 mm, 5.0 µm, was used for analysis, which occurred in a gradient system with a flow rate of 1.0 mL/min using a mobile phase consisting of water and anhydrous monobasic sodium phosphate 10 mM (pH 3.5) (A) and acetonitrile (B) (v/v). A combinative elution was employed, as follows: linear gradient of 10%-20% B from the injection time until 10.0 min, and isocratic elution with 10% B for 5 min (10.01-15.0 min). The wavelength of the UV-Vis detector was set to 242 nm. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore). The column oven was operated at 40°C. The injection volume was 20 µL.

Method B: For preliminary stability, peak area reduction was monitored along the time. An HPLC column NST[®] C-18 with dimensions 150 x 4.6 mm, 5.0 µm, was used, being performed a gradient system with a flow rate of 1.0 mL/min using a mobile phase consisting of water and formic acid 0.1% (pH 3.5) and acetonitrile (v/v). A combinative elution was employed, as follows: linear gradient of 10%-20% B from the injection time until 10.0 min, and isocratic elution with 10% B for 5 min (10.01-15.0 min). The wavelength of the UV-Vis detector was also set at 242 nm. Column oven temperature and injection volume were the same of method A.

Method C: With focus on major degradation products, the conditions employed for LC-MS analysis were interface ESI positive, mass range m/z 100.0 - 600.0, collision energy 5.0V, scan speed 508 u/sec, event time 1.0 sec, nebulizing gas flow of 3.0 L/min, and heating gas flow of 10 L/min. For the coupled LC system: data acquisition of LC stops time 1.0 min, sampling 200 msec, stop time 1.0 min, oven temperature 40 °C, flow rate of 0.3 mL/min, mobile phase composed by water and acetonitrile (50:50, v/v) (isocratic elution), and an Acquity UPLC[®] C18 column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 µm particle size).

4.1.2.1.3 Sample preparation for HPLC analysis

Ceftaroline fosamil reference standard was accurately weighed and dissolved in a 25 mL volumetric flask with ultrapure water to obtain a concentration of 400.0 µg/mL. This solution was diluted in the same solvent to yield a final concentration of 40.0 µg/mL. For commercial sample (powder for injection), drug amount (10 mg) was obtained from a sample pool previously weighed, followed by the same procedure.

Both sample and standard solutions were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore®) before the injection.

4.1.2.1.4 Analytical stability

To evaluate the analytical stability during experiments, ceftaroline fosamil commercial sample was prepared, in triplicate, as the same protocol described on 2.1.3. The concentration of analysis 40 µg/mL was worked for all samples, being a reference for zero time. The drug residual %, in comparison room temperature (25°C) and refrigeration (4°C), was measured by HPLC along the time: zero, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 24h.

4.1.3 Method validation

The HPLC (Method A, 2.1.2) was validated according to the validation parameters recommended by official guidelines (ICH,2005).^[10]

4.1.3.1 Specificity

Forced degradation study was performed testing heat, acid, basic, photolysis and oxidant media. All results were compared to reference and sample solution, not degraded, prepared in the same day.

Thermal degradation: ceftaroline fosamil sample was reconstituted in ultrapure water at a concentration of 400.0 µg/mL and stored on dry air oven at 60 °C for 90 minutes. An aliquot of this solution was diluted with the same solvent for a theoretical drug concentration of 40.0 µg/mL;

Acid and alkaline hydrolysis: ceftaroline fosamil samples were reconstituted in ultrapure water at a concentration of 400.0 µg/mL and then diluted to a concentration of 40 µg/mL using 1 mol of HCl or 0.1 mol of NaOH. The reaction times were 5 minutes to alkaline degradation, and 2 hours for acid degradation.

Oxidation: an exactly weighed amount of sample was reconstituted in ultrapure water at a concentration of 400.0 µg/mL and diluted to a concentration of 40.0 µg/mL using 3% hydrogen peroxide (H₂O₂). The degradation times were 30 minutes and 1 hour.

Photolysis: One milliliter of a solution containing 400.0 µg/mL of ceftaroline fosamil was placed in a closed 1 cm quartz cell, which was exposed to UVC (254 nm) and UVA (352 nm) chambers (30W, 2700 lm) for 3 hours. A control sample was also exposed to UV light, protected with aluminum sheet. After the degradation time, samples were diluted to 40.0 µg/mL in ultrapure water and analyzed.

4.1.3.2 Linearity

Ceftaroline fosamil reference solutions were prepared, in triplicate, in the concentrations of 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 and 70.0 µg/ mL. Standard plots were constructed, and linearity was evaluated statistically by linear regression analysis and applying ANOVA (analysis of variance).

4.1.3.3 LOD and LOQ

Calibration curves of the ceftaroline fosamil standard and signal to noise ratio were used for calculation of LOD and LOQ. The ratios 3:1 and 10:1 was used to determinate LOD and LOQ respectively, from the study of linearity.

4.1.3.4 Precision

Repeatability (intraday) and intermediate precision (interday) were performed. Six sample solutions of ceftaroline fosamil powder for injection were prepared at 40.0 µg/mL in three different days. The analyses were done in triplicate and results were expressed as RSD of the analytical measurements.

4.1.3.5 Accuracy

Accuracy was determined by the recovery of known amounts of ceftaroline fosamil reference standard added to samples. The added levels were 10%, 20% and 40% of the sample concentration (40.0 µg/mL). Results were expressed as the percentage of ceftaroline fosamil reference standard recovered from the sample.

4.1.3.6 Robustness

For robustness testing, few modifications in the chromatographic conditions were made flow rate, detection wavelength and analytical column. Drug content and chromatographic performance was used as reference for this parameter.

4.1.3.7 Preliminary stability and forced degradation

4.1.3.7.1 Preliminary stability of reconstituted sample

Samples of ceftaroline fosamil in solution NaCl and 5% glucose were prepared, according to the recommendation from manufacturer (Wyeth Pharmaceutical). About 60 mg of the drug was exactly weighed and diluted in 20 mL of each solution. The samples were prepared in triplicate. After preparation, the solutions were stored at 4 °C (refrigerator), and an aliquot (1 mL) was collected for analysis at 0, 4, 8, 12, 24, 36

and 48 hours. Samples were also stored at 25 °C (dry air oven), and aliquots were removed at 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours. For UFLC-DAD analysis (Method B, 2.1.2), a dilution was performed until the concentration of 60.0 µg/mL.

From peak area of ceftaroline fosamil and ceftaroline, the absolute values were used to perform a mass balance, to have an illustrative behavior of ceftaroline peak growth concomitantly to ceftaroline fosamil peak decay. Area values were transformed in %, to become easy the interpretation.

4.1.3.7.2 *Forced degradation and degradation products by LC-MS*

For the forced degradation assay (Method C, 2.1.2), ceftaroline fosamil samples were prepared in a concentration of 40.0 µg/mL and exposed to previously selected conditions described below:

- Oxidative degradation: sample exposed for 30 minutes to 10% H₂O₂ solution;
- Acid hydrolysis: sample exposed for 30 minutes in 1 M HCl;
- Photolysis: sample exposed to UVA light (352 nm; 30W, 2700 lm) for 5 hours;
- Alkaline hydrolysis: sample exposed for 5 minutes in 0.05M NaOH;
- Humidity: solid sample exposed to an environment with 80% humidity for 48 hours;
- Temperature: the sample was exposed for 3 hours at a temperature of 50 °C in dry air oven.

After degradation, samples were analyzed by mass spectrometry (Method C, 2.1.2), performing an UPLC system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer.

4.1.4 **Results and discussion**

During the development of the analytical method, it was detected two peaks in the chromatographic run: ceftaroline fosamil at approximately 5 minutes and another peak at approximately 8 minutes (Figure 4.2). The only excipient in the formulation (Zinforo®) is arginine, which is detected earlier in the chromatogram (Figure 4.3A). Thus, it was performed a LC-MS analysis to identify those peaks in the sample. In Figure 4.3 it is possible to observe the chromatograms of arginine (A), ceftaroline fosamil (*m/z* 685) (B), ceftaroline (*m/z* 605) (C) and both drugs (ceftaroline fosamil and ceftaroline) (D). Ceftaroline is considered by drug manufacturer as a degradation product and may be present in the sample until 4.0%. Thus, the quantitative proposed method was developed also with focus on the separation of these two substances, simultaneously in the same chromatographic run.

The experimental results obtained from quantitative HPLC-DAD method indicated that the chromatographic system was suitable for the intended analysis, with analytical parameters within the recommended values in the literature. Figure 4.2 illustrates the chromatographic run of ceftaroline fosamil used as standard (Figure 4.2A) and as sample (Figure 4.2B). In both, the pro-drug and degradation product were detected at approximately 5 minutes and 8 minutes respectively.

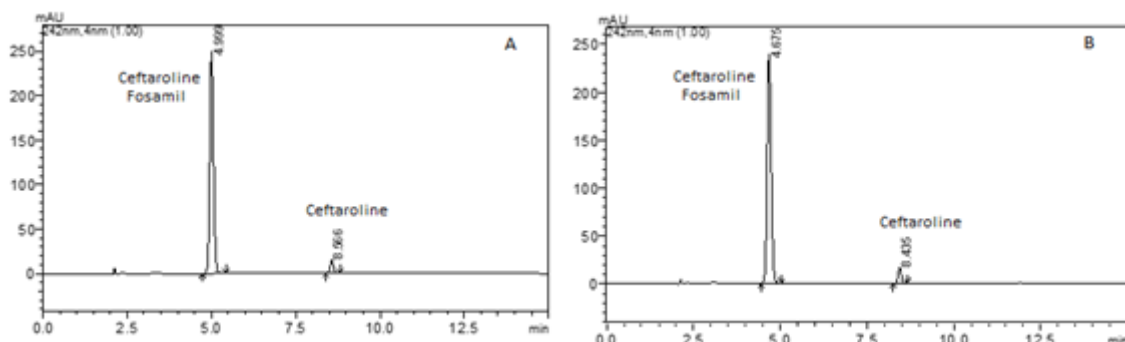


Figure 4.2. Representative chromatograms of ceftaroline fosamil standard (A) and sample (B), obtained during HPLC-DAD method validation. Ceftaroline fosamil (pro-drug): retention time of 5 minutes; Ceftaroline (degradation product): retention time of 8 minutes.

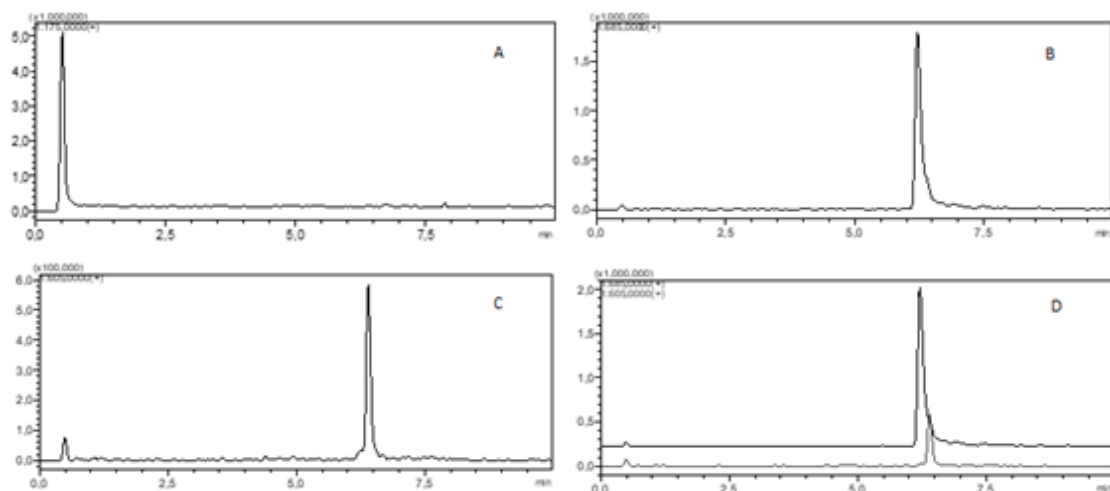


Figure 4.3. Representative chromatograms from LC-MS analysis of arginine (A), ceftaroline fosamil (B), ceftaroline (C) and both drugs (ceftaroline fosamil and ceftaroline).

To guarantee reliability in terms of stability of solutions during the experimental step, samples were analyzed after storage at room temperature and under refrigeration, at concentration of analysis 40 mg/mL. The results indicated that ceftaroline fosamil, prepared for quantitative analysis, is stable at refrigeration (4°C) during 24 h, with content ranging 99.93-100.17%. At room temperature, it is indicated to perform the

analysis right after the preparation of the solution, even though the residual content after 2h was 98.44%.

4.1.4.1 Validation

4.1.4.1.1 Specificity

Under thermal degradation (60°C), ceftaroline fosamil residual content was approximately 14% after 90 minutes. The peak of ceftaroline fosamil has decreased while the peak of ceftaroline basis has increased, demonstrating the one possible degradation route in this condition (Figure 4.4A). The loss of phosphono group is mentioned by Karpiuk et al. ^[12], during LC-MS analysis of stressed samples of this antibiotic.

In the oxidative condition (hydrogen peroxide 3%), the drug content reduced approximately 11% in a period of 90 minutes, not being visualized any degradation product (Figure 4.4B). When exposed to alkaline hydrolysis (NaOH 0.1M), the drug showed a high degradation even in a short period. The decomposition was immediate, over 86% of its initial content in 5 minutes (Figure 4.4D). In acid hydrolysis (HCl 1M), a poor degradation was observed, with a content decay of approximately 5% after 2 hours. Poor degradation was also observed when exposed the sample to UVA photolysis, with a drug decrease of 5% after 3 hours. In UVC, at the same time, the degradation was larger, approximately 54%, with probable degradation products being detected in the retention time of 4 minutes, near of the peak of ceftaroline fosamil (Figure 4.4C). In a general view, our results indicate there are no interferences of compounds in the analysis of ceftaroline fosamil, classifying the method as stability-indicating and specific for drug determination in pharmaceutical formulation.

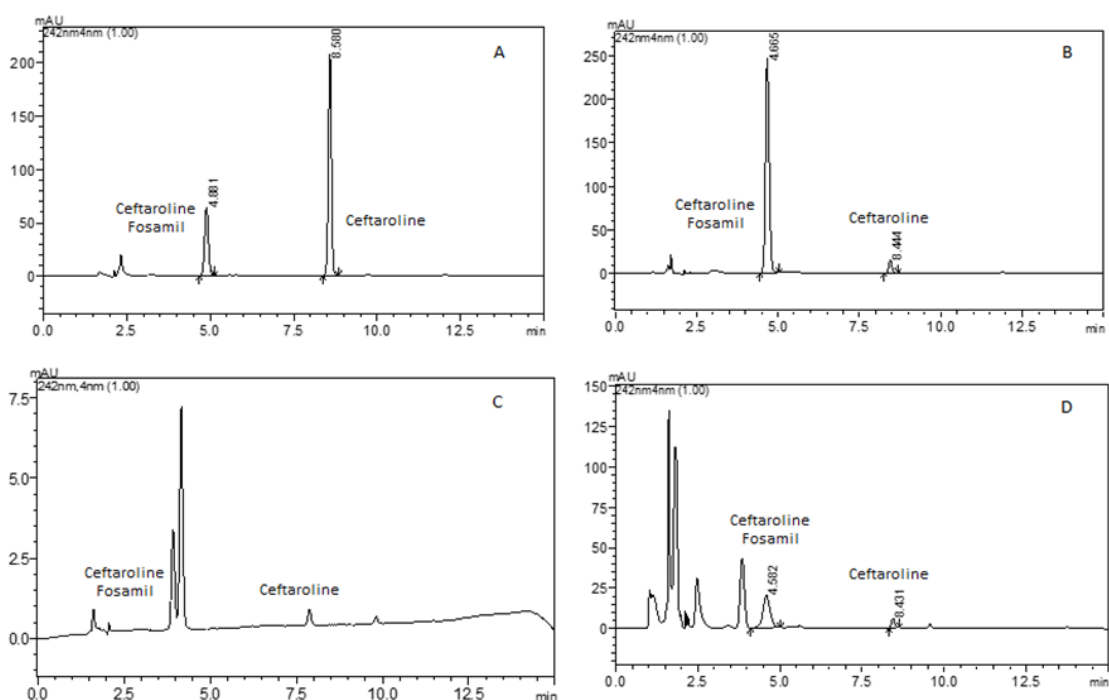


Figure 4.4. Representative chromatograms from HPLC-DAD method development, assaying specificity: (A) thermal degradation (60 °C); (B) oxidative degradation (hydrogen peroxide 3%); (C) degradation by UVC light (3h); (D) degradation by alkaline medium (NaOH 0.1M).

All samples exposed to stress conditions showed the presence of ceftaroline peak in the chromatographic run, as observed for not degraded sample. Ceftaroline free basis is considered a degradation product by manufacturer laboratory, when present in the formulation. The pro-drug ceftaroline fosamil has in its structure the phosphono group that is easily hydrolysable, to becomes ceftaroline (Alarcia-Lacalle et al., 2021; Karpiuk et al., 2017; Okerman et al., 2007).^[7,12,16]

4.1.4.1.2 Linearity, Precision and Accuracy

Standard curves were constructed in a range of 10.0 - 70.0 µg/mL, whose mean line equation was $y=45042x - 12646$ with correlation coefficient $r = 0.999$ (Table 4.1). Statistical analysis by ANOVA confirmed the linear regression ($F_{\text{calculated}} = 9,193 > F_{\text{critical}} = 4.60$, $p=0.05$) and shows that there is no deviation from linearity ($F_{\text{calculated}} = 1.49 < F_{\text{critical}} = 2.95$, $p=0.05$). As also shown in Table 4.1, the LOD and LOQ values were 1.74 and 5.28 µg/ml respectively, which indicate the sensitivity of the method for drug quantitation from commercial sample. LOQ is bellow of the first point of calibration curve, which guarantees reliability working into the concentration range purposed.

For precision, the quantitative values showed repeatability (intra-day assay) with low variation with RSD ranging from 1.05-2.24% (Table 4.1). Inter-day assays showed good results, with reproducible data in the three days of analysis. Ceftaroline fosamil content in powder for injection was 99.07% (RSD=2.04%), obtained from interday precision (Table 4.1).

4.1.4.1.3 Robustness

By using the chromatographic conditions established for quantitative assay, the ceftaroline fosamil content was 103.68% during robustness testing. After few modifications in the method conditions (Table 4.2), possible to occur in the routine, the drug content ranged from 103.47 – 103.87% (RSD=0.12%), demonstrating the ability of the method to be reproducible even under small analytical variations.

4.1.4.1.4 Preliminary stability and degradation products

4.1.4.1.4.1 Preliminary stability (drug decay and degradation products)

For preliminary stability, aliquots from the reconstituted samples were taken along the time for both NaCl and 5% glucose diluents, followed by UFLC analysis. Considering the different analytical conditions employed for this assay (see 2.1.2, Method B), previously established for further analysis by LC-MS, it was measured the peak area reduction for each sample, allowing to verify how it is the drug behavior when stored in conditions similar to clinical use, i.e., drug concentration, storage temperature and diluents. Table 4.3 shows the percentage of drug residual considering 100% for zero time and peak area reduction for all times, comparing storage at refrigerator 4°C (refrigerator) and at 25°C (dry air oven).

According to the analytical data obtained, it is possible to observe that in both solutions of ceftaroline fosamil the content remained stable in all times, when stored in the refrigerator. However, when stored at room temperature (25°C) the peak area decayed along the time, reaching the biggest peak area reduction of 35.79% in 24 hours. It is remarkable that in the two solutions stored at different temperatures over the time, the peak of ceftaroline has increased. It can be suggested that the degradation is related to a hydrolysis reaction of the phosphono group, converting ceftaroline fosamil in ceftaroline. Also, it is important to consider the absence of proportionality between areas from pro-drug and degradation product, due to

complexity involved in degradation routes or other products and sub-products being concomitantly formed.

Observing the obtained results in comparison to recommendation from drug manufacturer, which indicates the drug can be stored at room temperature up to 6 hours and at refrigerator for up to 24 hours, a different degradation behavior at 25°C is demonstrated. Preliminarily, the drug residual area was approximately 94% in 2 h, not being adequate the conclusion about other storage times to guarantee the drug stability. Under refrigerated conditions, the results of this work are in accordance with the recommended by manufacturer laboratory. Besides, a recent study carried out by Al Madfai et al. [13], in which ceftaroline fosamil was diluted in saline solution (NaCl) and 5% glucose, and stored at 5, 25, 30 and 35°C, the samples evaluated in the time ranging 2 to 144 hours, stored a 5°C, showed a drug concentration between of 98.4 and 101%, demonstrating to be very stable in this condition. At the highest temperatures, the drug was stable up to 12 hours after dilution, but after this period the initial concentration decreased 12%. Preliminary stability data presented can illustrate the drug is unstable in higher temperatures, being necessary attention during handling and storage.

Concomitant to monitoring the drug area decay, the samples were submitted to LC-MS analysis, for degradation products detection. In Figure 4.5, a mass spectrum from analysis of ceftaroline fosamil diluted in saline, at zero time and after 24 hours at room temperature, is illustrated. The m/z 685 signal corresponds to ceftaroline fosamil and the m/z 605 to ceftaroline. At 24 hours, the mass signal intensity at m/z 605 increases, suggesting a possible formation of this degradation product. The signal m/z 707, is possible to be related to a sodium adduct that may has bound to ceftaroline fosamil during the analysis.

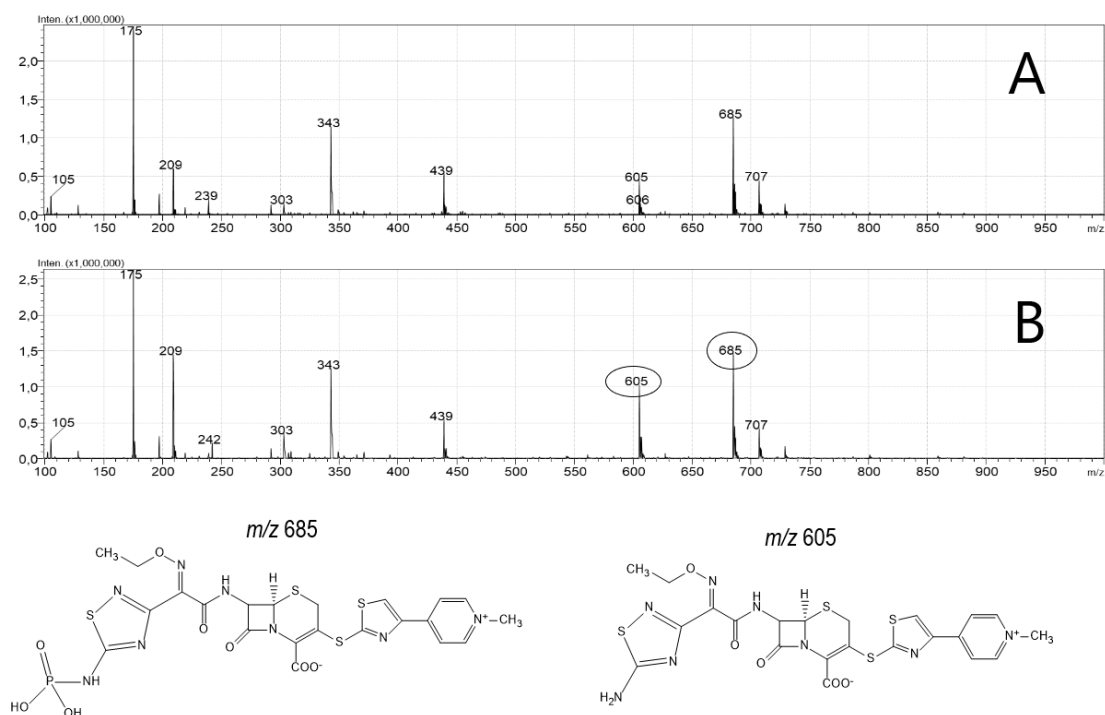


Figure 4.5. Mass spectra from ceftaroline fosamil reconstituted sample in saline at zero time (A) and after 24h (B) of storage at room temperature (25°C).

Figure 4.6 shows the result from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil in glucose 5%. In this sample, the ceftaroline signal (m/z 605) also increases in 24 hours, demonstrating the possible degradation with loss of phosphono group. Considering the presence of glucose (molar mass = 180.15 g/mol), the signal at m/z 801, only observed for these samples, could be attributed to a degradation product formed from a reaction between this sugar and ceftaroline (m/z 605). At m/z 627 signal, a sodium adduct is probably formed. Another suggestion involves lost of oxime and methyl groups from original drug, although much less probable to occur as suggested by the structure.

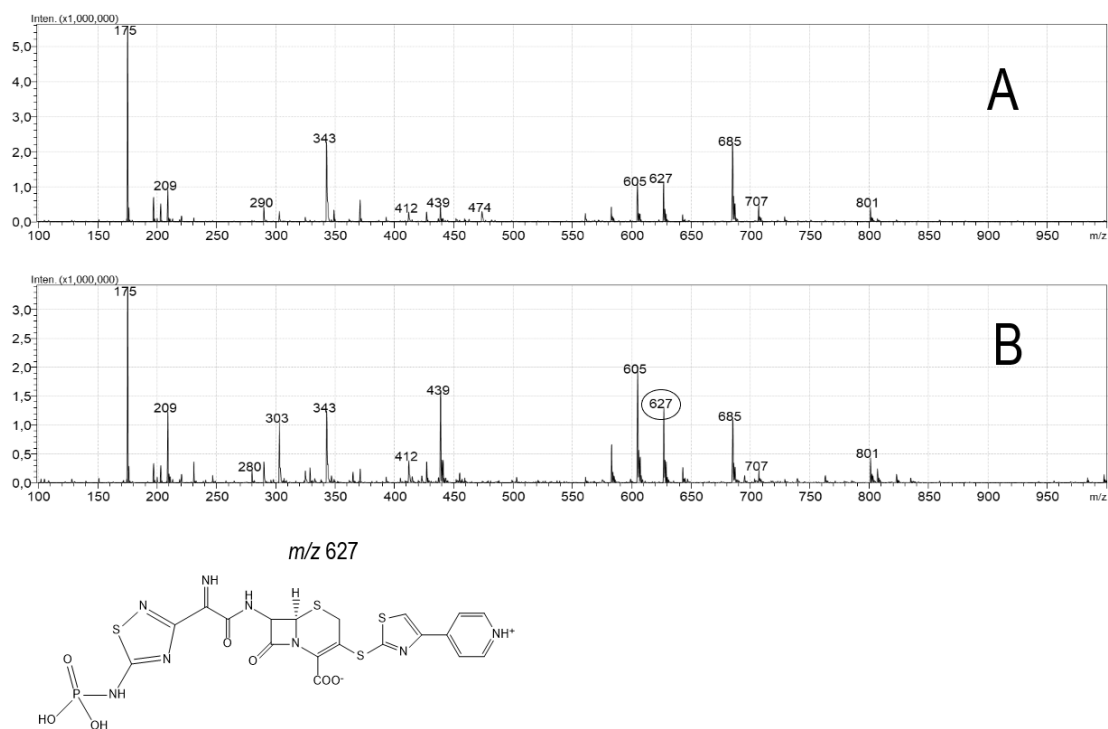


Figure 4.6. Mass spectra from ceftaroline fosamil reconstituted sample in 5% glucose at zero time (A) and after 24h (B) of storage at room temperature (25°C).

4.1.4.1.4.2 Degradation products from stress testing

With focus on degradation products, the samples exposed to UVA light for 5 hours, temperature and high humidity (>80%) were promisor. In Figure 4.7, it is shown the mass spectra obtained from analysis of photolytic and thermal degradation samples, respectively, being suggested the probable chemical structures. From photolysis degradation, the compound with m/z 859 signal can be chemically identified as being ceftaroline possessing additional oxime group and 1,2,4-thiadiazole ring. Here, it is important to highlight for dimerization process which can occur with some β -lactams antibiotics (Mendez et al., 2008; Barbosa et al., 2019; Barbosa et al., 2021).^[17-19] Maybe, dimerization could be considered for this drug to explain the stability behavior. When submitted to thermal degradation, the signal at m/z 605 is shown with high abundance, being considered an important way for drug degradation. Two signals at m/z 430 and 209 could also to be identified in this full spectrum, referent to side chain and β -lactam ring.

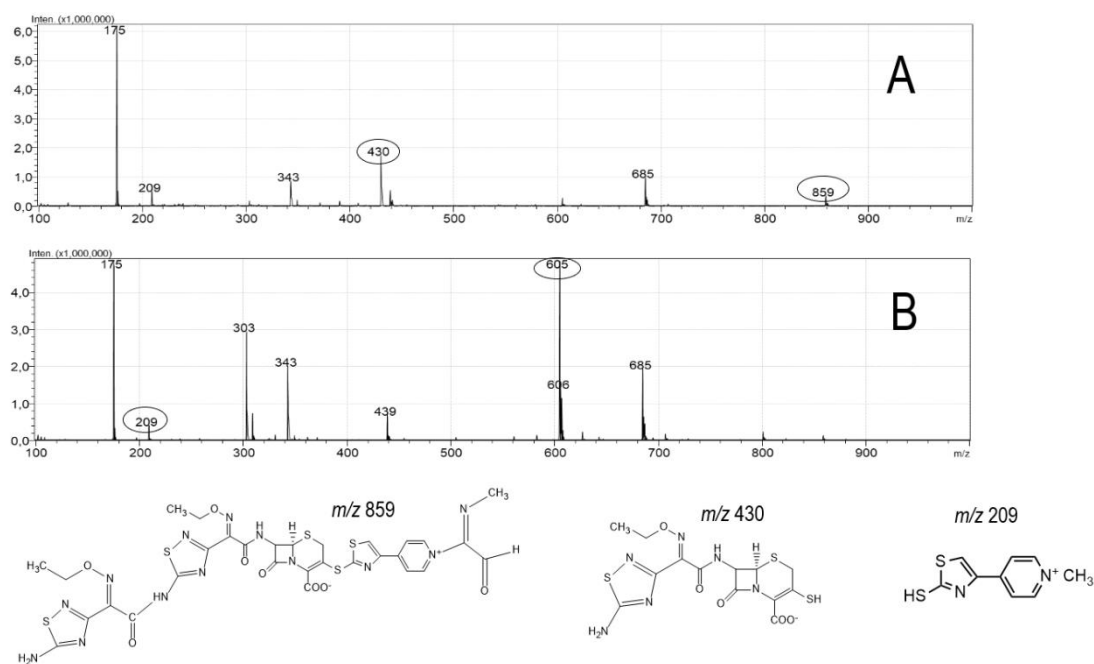


Figure 4.7. Mass spectrum obtained from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil samples submitted to forced degradation by UVA (A) and dry heat (B).

Ceftaroline fosamil powder was stored in a desiccator with sodium chloride solution for 48 hours, to evaluate the degradation by humidity. According to the results presented in Figure 4.8, the degraded sample presented two degradation products and their structures were suggested. The signal m/z 859, also seen in the spectra from photolysis degradation, is referred to the compound ceftaroline with additional oxime group and 1,2,4-thiadiazole ring. In the full spectra, a signal at m/z 623 can be attributed to a known compound ceftaroline M-1 (metabolite). For this, ceftaroline undergoes hydrolysis of the beta-lactam ring to form this ring-open and inactive metabolite. Here, the signals at m/z 430 and 209, already seen for photolysis, was detected with considerable abundance.

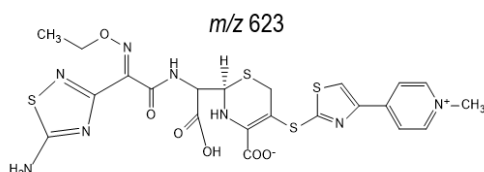
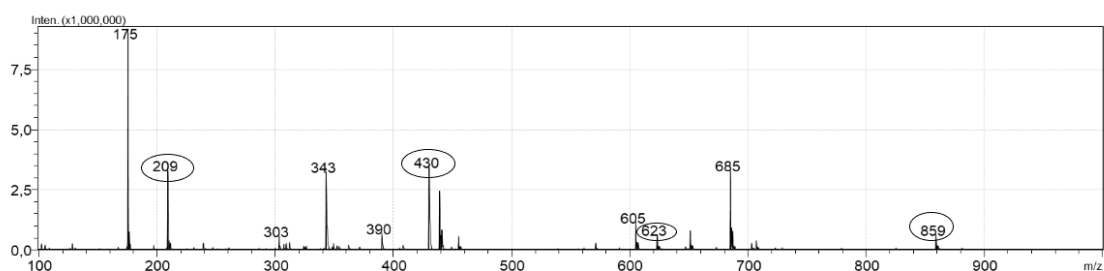


Figure 4.8. Mass spectrum obtained from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil samples submitted to forced degradation by humidity during 48 hours.

The alkaline degradation was also performed for ceftaroline fosamil, considering the drug susceptibility for β -lactams antibiotics. Here, a minimal concentration of NaOH is enough for chemical modification. As expected, the β -lactam ring is opened immediately after the contact with the degradant. Figure 4.9 shows the mass spectra obtained, with signal at *m/z* 703 which is referred for that degradation product. It is important to consider this chemical reaction as possible to occur during clinical or laboratorial routines, since a rapid contact with water and alkaline medium are easy to happen and can led to modifications on formulation or analytical samples.

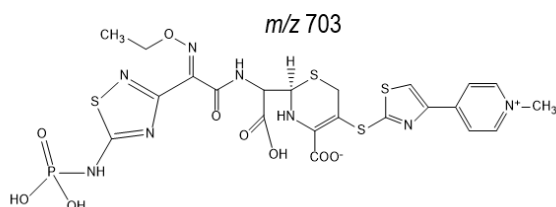
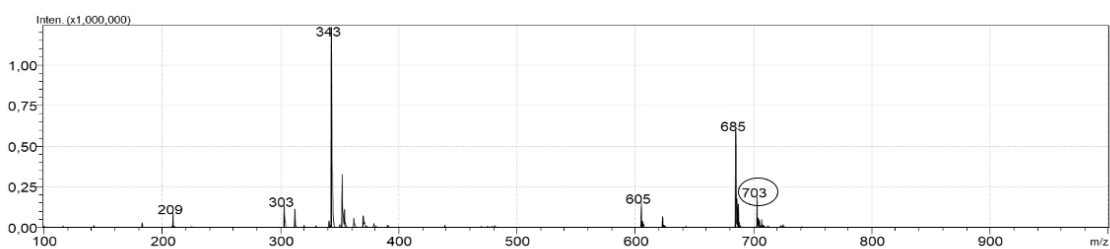


Figure 4.9. Mass spectrum obtained from LC-MS analysis of ceftaroline fosamil samples submitted to forced degradation by NaOH 0.05N during 5 minutes.

4.1.5 Conclusions

The HPLC method studied was considered adequate for simultaneous analysis of ceftaroline fosamil and ceftaroline in drug product, allowing to monitor this degradation product during routine analysis. Through stability testing and applying elucidative technique it was possible to identify five degradation products, with a common reaction involving b-lactam ring, oxime group and phosphono group. In addition, the stability profile for reconstituted samples, stored in conditions similar to clinical use, indicated samples must be carefully handled at room temperature, since the decomposition occurs rapidly.

4.1.6 References

[1] Biek, D.; Critchley, I. A.; Riccobene, T. A.; Thye, A. D. Ceftaroline fosamil: a novel broad-spectrum cephalosporin with expanded anti-gram-positive activity. *J. Antimicrob. Chemoter.* **2010**, *65*, iv9–iv16. DOI: 10.1093/jac/dkq251.

[2] Drusano, G. L. Pharmacodynamics of ceftaroline fosamil for complicated skin and skin structure infection: rationale for improved anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity. *J. Antimicrob. Chemoter.* **2010**, *65*, iv33–iv39. DOI: 10.1093/jac/dkq253.

[3] Kaushik, D.; Rathi, S.; Jain, A. Ceftaroline: a comprehensive update. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2011**, *27*, 389–395. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.017.

[4] Laudano, J. B. Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. *J. Antimicrob. Chemoter.* **2011**, *66*, iiiii11–iiii8. DOI: 10.1093/jac/dkr095.

[5] Barsky, E. E.; Pereira, L. M.; Sullivan, K. J.; Wong, A.; Mcadam, A. J.; Sawicki, G. S.; Priebe, G. P.; Goobie, S. M. Ceftaroline pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2018**, *17*, 25–31. DOI: 10.1016/j.jcf.2017.10.010.

[6] Riccobene, T. A.; Carrothers, T. J.; Knebel, W.; Raber, W. S.; Chan, P. L. S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic target attainment in adult and pediatric patients following administration of ceftaroline fosamil as 5-minute infusion. *Clin. Pharmacol.*

Drug. Dev. **2020**, *10*, 420–427. DOI: 10.1002/cpdd.907.

[7] Alarcia-Lacalle, A.; Barrasa, H.; Maynar, J.; Canut-Blasco, A.; Gómez-González, C.; Solinís, M. A.; Isla, A.; Rodríguez-Gascón, A. Quantification of ceftaroline fosamil in human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: application to pharmacokinetic studies. *Pharmaceutics*. **2021**, *13*, 959. DOI: 10.3390/pharmaceutics13070959.

[8] Grégoire, M.; Leroy, A. G.; Bouquié, R.; Malandain, D.; Dailly, E.; Boutoille, D.; Renaud, C.; Jolliet, P.; Caillon, J.; Deslandes, G. Simultaneous determination of ceftaroline, daptomycin, linezolid and rifampicin concentrations in human plasma by on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 17–26. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.10.008.

[9] Ali, F.; Singh, G.; Sahu, P. L.; Kumar, R.; Trivedi, M. M. Development and validation of analytical method for the estimation of ceftaroline fosamil in bulk and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *4*, 929–938.

[10] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). <https://ich.org/page/quality-guidelines> (accessed December 14, 2022).

[11] Junior, I. J. M.; Sponchiado, R. M.; Cordenonsi, L. M.; Oppe, T.; Schapoval, E. E. S. Ceftaroline fosamil: development a rapid HPLC method indicating stability and bioassay for determination in pharmaceutical formulation, stability and cytotoxicity studies. *Drug Anal. Res.* **2021**, *5*, 36–44. DOI: 10.22456/2527-2616.120343.

[12] Karpiuk, I.; Katarzyna, M.; Katarzyna, B.; Kiljan, M.; Tyski, S. Identification and determination of related substances of ceftaroline fosamil in medicinal product by high performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass

spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *145*, 651–660. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.07.060.

[13] Al Madfai, F.; Zaidi, S. T. R.; Ming, L. C.; Wanandy, T.; Patel, R. P. Physical and chemical stability of ceftaroline in an elastomeric infusion device. *Eur. J. Hosp. Pharm.* **2018**, *25*, e115–e119.

[14] Bhattacharya, S.; Parekh, S.; Dedhiya, M. In-use stability of ceftaroline fosamil in elastomeric home infusion systems and MINI-BAG plus containers. *Int. J. Pharm. Compound.* **2015**, *19*, 432–436.

[15] Ikeda, Y.; Ban, J.; Ishikawa, T.; Hashiguchi, S.; Urayama, S.; Horibe, H. Stability and stabilization studies of TAK-599 (ceftaroline fosamil), a novel N-Phosphono type prodrug of anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin T-91825. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1406–1411. DOI: 10.1248/cpb.56.1406.

[16] Okerman, L.; Hende, J. V.; Zutter, L. D. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *586*, 284–288. DOI: 10.1016/j.aca.2006.10.034.

[17] Mendez, A.; Chagastelles, P.; Palma, E.; Nardi, N.; Schapoval, E. Thermal and alkaline stability of meropenem: degradation products and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* **2008**, *350*, 95–102. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.08.023.

[18] Barbosa, F. S.; Pezzi, L. C.; Paula, F. R.; Eller, S.; Schapoval, E. E. S.; Oliveira, T. F.; Mendez, A. S. L. Stability study of doripenem antibiotic applying LC-ESI-Q-TOF method and in silico prediction: An analytical investigation focused on degradation products. *Microchem. J.* **2021**, *166*, 106230. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106230

[19] Barbosa, F. S.; Pezzi, L. C.; Tsao, M.; Oliveira, T. F.; Macedo, S. M. D.; Schapoval, E. E. S.; Mendez, A. S. L. Stability and degradation products of imipenem applying

high-resolution mass spectrometry: An analytical study focused on solutions for infusion. *Biomed. Chromatogr.* **2019**, 33, e4471. DOI: 10.1002/bmc.4471.

5. DISCUSSÃO GERAL

Para a validação do método analítico de quantificação da ceftarolina fosamila na formulação comercial, inicialmente iria ser utilizado o método do Junior (2017). Neste recente trabalho, foi proposto o desenvolvimento de dois métodos para quantificação da ceftarolina fosamila em produto farmacêutico: ensaio microbiológico por difusão em ágar-cilindros em placas, e CLAE-DAD. Neste último, a análise ocorreu por técnica de fase reversa, em fase móvel de simples composição. Durante a validação foram testadas diferentes combinações na fase móvel, como metanol, trietilamina e acetonitrila. A água utilizada foi testada em diferentes valores de pH (4,0 – 9,0) a partir da mistura de água com trietilamina 1% pH 5,0:acetonitrila (87:13). A velocidade de fluxo foi de 1.0 mL/min, detecção em 242 nm e temperatura do forno de 30°C. O autor destaca que o método foi validado de acordo com compêndios oficiais, apresentando linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez. Este trabalho, apesar de permitir a quantificação da ceftarolina fosamila, em momento algum menciona a presença da ceftarolina durante a corrida cromatográfica, o que o torna limitante à aplicação do método, em especial no foco de avaliação da estabilidade. A presença da ceftarolina na mesma corrida de análise da ceftarolina fosamila foi observada durante o desenvolvimento desta parte experimental na presente dissertação, algo não destacado por Júnior (2017). Conforme dados do Laboratório produtor, a ceftarolina pode ser oriunda da degradação da ceftarolina fosamila, e pode estar presente na formulação dentro de seu prazo de validade, como produto de degradação, conforme especificação prevista em laudo (4%). A não presença deste produto no trabalho de Júnior (2017) pode indicar a falta de informação ou até mesmo a co-eluição não detectada durante o desenvolvimento do método.

Com isso, avaliando os artigos pesquisados, foram realizados testes preliminares para estabelecer as melhores condições de análise da ceftarolina fosamila em proposta de CLAE-DAD. Durante a validação foram testadas diferentes condições de fase móvel, como água e ácido fórmico 0,1%, ácido trifluoracético (TFA) em concentrações de 0,1%, 0,05% e 0,01%, acetato de amônia 10mM (pH 3,5) e ácido acético 0,1% (pH 3,24). Estabeleceu-se como melhor condição de fase móvel a mistura de fosfato de sódio monobásico anidro (10mM) pH 3,5 e acetonitrila (90:10). A velocidade do fluxo foi de 1,0 mL/min, o detector em 242 nm e a temperatura do

forno em 40°C. Foi realizado método gradiente, o qual foi capaz separar o pró-fármaco ceftarolina fosamila em 5 minutos e a sua forma ativa, a ceftarolina em 7,5-8,0 minutos. O método foi validado demonstrando resultados confiáveis, robustos e precisos.

Para estabilidade preliminar, alíquotas das amostras reconstituídas foram retiradas ao longo do tempo para os diluentes NaCl e 5% de glicose, seguidas de análise por HPLC. Considerando as diferentes condições analíticas empregadas para este ensaio previamente estabelecidas para posterior análise por LC-MS, mediu-se a redução da área do pico para cada amostra, permitindo verificar como está o comportamento do fármaco quando armazenado em condições de uso clínico em hospitais, ou seja, concentração do fármaco, temperatura de armazenamento e diluentes. A Table 4.3 mostra a porcentagem de resíduo de medicamento considerando 100% para o tempo zero e redução da área de pico para todos os tempos, comparando o armazenamento em refrigerador a 4°C (refrigerador) e a 25°C (estufa de ar seco).

De acordo com os dados analíticos obtidos, é possível observar que em ambas as soluções de ceftarolina fosamil o teor se manteve estável em todos os tempos, quando armazenado em refrigerador. No entanto, quando armazenado em temperatura ambiente (25°C) a área do pico decaiu ao longo do tempo, atingindo a maior redução da área do pico de 35,79% em 24 horas. É possível observar que nas duas soluções armazenadas em temperaturas diferentes, ao longo do tempo, o pico da ceftarolina aumenta. É possível sugerir que durante a degradação do fármaco ocorra uma reação de hidrólise do grupo fosono, convertendo a ceftarolina fosamil em ceftarolina. Também é importante considerar a ausência de proporcionalidade entre as áreas de pró-fármaco e produto de degradação, devido à complexidade envolvida nas rotas de degradação ou outros produtos e subprodutos sendo formados concomitantemente.

Observando nossos resultados em comparação com a recomendação do fabricante do medicamento, que indica que o medicamento pode ser armazenado em temperatura ambiente por até 6 horas e em refrigerador por até 24 horas, temos um comportamento de degradação diferente a 25°C. Preliminarmente, a área residual do fármaco foi de aproximadamente 94% em 2 h, não sendo adequada uma conclusão sobre outros tempos de estocagem para garantir a estabilidade do fármaco. No refrigerador, nossos resultados estão de acordo com o recomendado. Além disso, um

estudo recente realizado por Madfai et al., em que a ceftarolina fosamil foi diluída em solução salina (NaCl) e glicose 5%, e armazenada a 5, 25, 30 e 35°C, as amostras avaliadas no tempo variando de 2 a 144 horas, armazenadas a 5°C, apresentaram concentração da droga entre 98,4 e 101%, mostrando-se bastante estável nesta condição. Nas temperaturas mais altas, o fármaco manteve-se estável até 12 horas após a diluição, mas após esse período a concentração inicial diminuiu 12%. Os dados preliminares de estabilidade apresentados ilustram que o medicamento é instável em temperaturas mais elevadas, sendo necessária atenção durante o manuseio e armazenamento

Concomitantemente ao monitoramento da degradação da área da droga, as amostras foram submetidas à análise LC-MS, para detecção de produtos de degradação. A ceftarolina fosamila diluída em solução salina, em temperatura ambiente, apresentou sinal m/z 685 corresponde à ceftarolina fosamil e o m/z 605 à ceftarolina. Essa mesma amostra foi analisada após 24 horas, e a intensidade do sinal de massa em m/z 605 aumenta, sugerindo uma possível formação deste produto de degradação. Outro sinal detectado foi a m/z 707, acredita-se que um aduto de sódio pode ter se ligado à ceftarolina fosamil durante a análise.

A ceftarolina fosamil em glicose 5%, apresentou sinal da ceftarolina (m/z 605) também aumenta em 24 horas, demonstrando a possível degradação com perda do grupo fosfono. No sinal m/z 627, provavelmente é formado um aduto de sódio. Outra sugestão envolve a perda de grupos oxima e metila do medicamento original, embora muito menos provável de ocorrer conforme sugerido pela estrutura. Considerando a presença de glicose (massa molar = 180,15 g/mol), o sinal em m/z 801 poderia ser atribuído a um produto de degradação formado a partir da reação entre este açúcar e a ceftarolina (m/z 627). Este sinal (m/z 801) só aparece na amostra de droga diluída com glicose.

Com foco em produtos de degradação, as amostras expostas à luz UVA por 5 horas, temperatura e umidade elevada (>80%) foram promissoras. A partir da degradação da fotólise, o composto com sinal m/z 859 pode ser quimicamente identificado como sendo ceftarolina possuindo grupo oxima adicional e anel 1,2,4-tiadiazol. Aqui, é importante destacar o processo de dimerização que pode ocorrer com alguns antibióticos b-lactâmicos (Mendez et al., 2008; Barbosa et al., 2019;

Barbosa et al., 2021). Talvez, dimerização. poderia ser considerado para este medicamento para explicar o comportamento de estabilidade. Quando submetido à degradação térmica, o sinal em m/z 605 apresenta-se com elevada abundância, sendo considerado um importante meio de degradação do fármaco. Dois sinais em m/z 430 e 209 também puderam ser identificados neste espectro completo, referentes à cadeia lateral e ao anel beta-lactâmico.

O pó de ceftarolina fosamil foi armazenado em dessecador com solução de cloreto de sódio por 48 horas, para avaliação da degradação pela umidade. O sinal m/z 859, também observado na fotólise, é referente ao composto ceftarolina com grupo oxima adicional e anel 1,2,4-tiadiazol. No espectro completo, um sinal em m/z 623 pode ser atribuído a um composto conhecido ceftarolina M-1 (metabólito). Para isso, a ceftarolina sofre hidrólise do anel beta-lactâmico para formar esse metabólito de anel aberto e inativo.

A degradação alcalina também foi trabalhada para a ceftarolina fosamil, considerando a suscetibilidade da droga aos antibióticos β -lactâmicos. Aqui, uma concentração mínima de NaOH é suficiente para modificação química. Como esperado, o anel β -lactâmico é aberto imediatamente após o contato com o degradante, com sinal em m/z 702 que é referido para aquele produto de degradação.

Ao todo foram identificados dez produtos de degradação, sendo eles com sinais m/z 209, m/z 430, m/z 605, m/z 623, m/z 627, m/z 685, m/z 702, m/z 707, m/z 801 e m/z 859. Todos provenientes do estudo de estabilidade preliminar, utilizando o fármaco diluído em solução salina e glicose 5% e no estudo de degradação forçada.

Os resultados apresentados no estudo contribuem para avaliação da estabilidade de ceftarolina fosamila em condições de uso clínico e avaliação de possíveis produtos de degradação. Isso ressalta os cuidados que devem ser tomados com o medicamento quando manipulado e administrado na rotina hospitalar, garantindo a qualidade do tratamento para o paciente. Além disso, foi validado um método analítico para quantificação de ceftarolina fosamila em que foi possível identificar o produto de degradação ceftarolina. Deixando o método mais seguro na análise de rotina, visto que não foi encontrado artigos científicos que destacassem esta detecção simultânea.

6. CONCLUSÃO

- O método proposto para quantificação de ceftarolina fosamila por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado, utilizando um sistema de fase reversa com gradiente, fase móvel composta por tampão e acetonitrila e apresentando como um método rápido, de fácil execução e robusto;
- No estudo de estabilidade preliminar da ceftarolina fosamila pós-reconstituição, mimetizando condições de uso clínico, observou-se a estabilidade do fármaco quando armazenado em temperatura refrigerada por até 48 horas, em solução de salina ou glicose 5%. Porém, quando armazenado em temperatura ambiente, a área do pico decaiu ao longo do tempo, atingindo maior redução em 24 horas, para as mesmas soluções;
- O estudo de degradação forçada da ceftarolina fosamila permitiu observar-se a intensa degradação do fármaco quando submetido a condições de estresse, com destaque para a degradação térmica e fotolítica;
- Foi possível aplicar a técnica por LC-MS para identificar produtos de degradação majoritários oriundos de condições de degradação forçada da ceftarolina fosamila, como calor seco, fotólise e umidade acima de 80%;
- Em todos os espectros de massas obtidos na análise por LC-MS foi possível observar o produto de degradação ceftarolina, oriunda da perda do grupo fosfono presente na ceftarolina fosamila. Na análise dos produtos de degradação, também foi possível identificar um sinal m/z que poderia referir à forma inativa, de anel aberto, a ceftarolina M-1.
- Ao todo foram identificados dez produtos de degradação, sendo eles com sinais m/z 209, m/z 430, m/z 605, m/z 623, m/z 627, m/z 685, m/z 702, m/z 707, m/z 801 e m/z 859. Todos provenientes do estudo de estabilidade preliminar, utilizando o fármaco diluído em solução salina e glicose 5% e no estudo de degradação forçada.

7. REFERÊNCIAS

ALI, F.; SINGH, G.; SAHU, P. L.; KUMAR, R.; TRIVEDI, M. M. Development and validation of analytical method for the estimation of ceftarolina fosamil in bulk and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 8, p. 929-938, 2015.

ARRUDA, C. J. M. et al. Revisão Bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**. nº 11, 982-995, 2019.

AZEVEDO, S. M. M. Farmacologia dos Antibióticos beta-lactâmicos. 2014, 70. Dissertação de mestrado integrado. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Porto.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismo de Resistência aos Antibióticos. Dissertação de mestrado. 2013, 51. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa.

BARSKY, E. E.; PEREIRA, L. M.; SULLIVAN, K. J.; WONG, A.; MCADAM, A. J.; SAWICKI, G. S.; PRIEBE, G. P.; GOOBIE, S. M. Ceftaroline pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with cystic fibrosis. **Journal of cystic Fibrosis**. 17, 25-31, 2018.

BIEK, D.; CRITCHLEY, I. A.; RICCOBENE, T. A.; THYE, D. A. Ceftaroline fosamil: a novel broad-spectrum cephalosporin with expanded anti-gram-positive activity. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. 65, 9-16, 2010.

BISHT, R.; RUPENTHAL, I. D.; SCREEBHAVAN, S.; JAISKWAL, J. K. Development of a novel stability indicating RP-HPLC method for quantification of Connexin43 mimetic peptide and determination of its degradation kinetics in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. 365-373, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 de julho, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 de dezembro

de 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº318, de 6 de novembro de 2019. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 de novembro de 2019.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – Bases Teóricas e uso Clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/cefalosporinas.htm. Acesso em: maio/2022.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. b-Lactams and b-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 6(8), 1-22, 2016.

CARVALHO, C. M. N. Community-acquired pneumonia among children: the latest evidence for an updated management. **Jornal de pediatria**. 96(S1) 29-38, 2020.

CUPURDIJA, V.; LAZIC, Z.; PETROVIC, M.; MOJSILOVIC, S.; CEKEREVAC, I.; RANCIC, N.; JAKOVLJEVIC, M. Community-acquired pneumonia: economics of inpatient medical care vis-à-vis clinical severity. **Jornal de pneumologia**. 41(1) 48-57, 2015.

DOLHAN, A.; JELINSKA, A.; MANUSZEWSKA, M. Stability indicating HPLC method for the determination of cefquinome sulfate. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 71, n. 2, p. 249-264, 2014.

DRUSANO, G.L., Pharmacodynamics of ceftaroline fosamil for complicated skin and skin structure infection: rationale for improved anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, iv33-39, 2010.

EPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 38, n. 4, p. 212-228, 2004.

GRAU, S.; SOLÍ, L.; LUQUE, S. Farmacocinetica y farmacodinamia de ceftarolina. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**. 32(supl 2), 15-20, 2014.

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.

JUNIOR, I. J. M. Desenvolvimento e validação de bioensaio para determinação de ceftarolina em pó para solução injetável – estudo preliminar de estabilidade. 2017. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre.

KARPIUK, I.; KATARZYNA, M.; KATARZYNA, B.; KILJAN, M.; TYSKI, S. Identification and determination of related substances of ceftaroline fosamil in medicinal product by high performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 651-660, 2017.

LAUDANO, J.B., Ceftaroline fosamila: a new broad-spectrum cephalosporin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, iii11-iii18, 2011;

LACALLE, A.A., et al. Quantification of ceftaroline in human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: application to pharmacokinetic studies. **Pharmaceutics**. v. 13, 959, 2021.

MADFAI, F. A.; ZAIDI, S. T. R.; MING, L. C.; WANANDY T.; PATEL, R. P. Physical and chemical stability of ceftaroline fosamil in an elastomeric infusion device. **British Medical Journal**. P 1-5, 2017.

MALHEIRO, L. F.; MAGANO, R.; FERREIRA, A.; SARMENTO, A.; SANTOS, L. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. **Revista Brasileira de terapia intensiva**. 29(2), 195-205, 2017.

MARQUES, R.M.; NUNES, A.; SOUZA C.; MOURA, F.; GOUVEIA, J.; RAMOS, A. Pneumonia adquirida na comunidade numa unidade de cuidados intensivos. **Revista Portuguesa de pneumologia**. Vol. 16, nº2 223-235, 2010.

NGOCHO, J. S.; HORUMPENDE, P. G.; JONGE, M. I.; MMBAGA, B. T. Inappropriate treatment of Community-acquired pneumonia among children under five years of age in tanzania. **Internatioanal Journal of Infectious Diseases**. 93 56-61, 2020.

OKERMAN, L.; HENDE, J. V.; ZUTTER, L. D. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. **Analytica chimica acta**. 284-288, 2007.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, Present and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. vol. 55, n. 11, 4943-4960, 2011.

PIRES, C. A.; SANTOS, M. A. L; OLIVEIRA, B. F.; SOUZA, C. R.; BELARMINO, L. N. M; MARTINS, M. F. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na região do Amazonas, Brasil. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**. 6(2), 45-50, 2015.

RICCOBENE, T.A., CARROTHERS, T.J., KNEBEL, W., RABER, S., CHAN, P.L.S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic target attainment in adult and pediatric patients following administration of ceftaroline fosamil as 5-minute infusion. **Clinical Pharmacology in Drug Development**. v.10, 420-427, 2020.

SANTOS, M.C. Pneumonia adquirida na comunidade. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/manual/pneumonia.htm>. Acesso em maio/2022.

SARAVOLATZ, L.D.; STEIN, G. E.; JOHNSON, L. B. Ceftaroline: A Novel cephalosporin with Activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Reviews of anti-infective agents**. 52(9), 1156-1163, 2011.

SCHOTT, R.P.W. Principles and Practice of Chromatography. 2003. Disponível em: <http://www.farmatel.yolasite.com/resources/Principles%20and%20practice%20of%20LC.pdf>. Acessado em maio/2022.

SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N.; SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 71-88, 2013.

SOUZA, C. S. Infecções de tecidos moles. Erisipela. Celulite. Síndromes infecciosas mediadas por toxinas. **Simpósio: Urgências e emergências infecciosas**. Cap. II, 351-356, 2003.

SUNEETHA, A.; VENKANNA, C. K. Development and Validation of stability indicating RP-HPLC method for estimation of ceftarolina fosamila in bulk and its parenteral dosage forms. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, 2013.

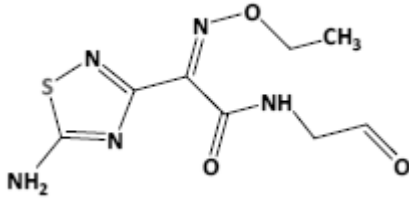
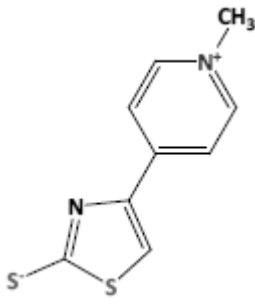
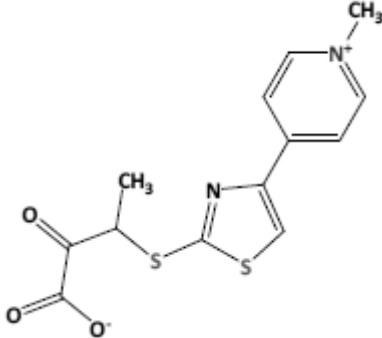
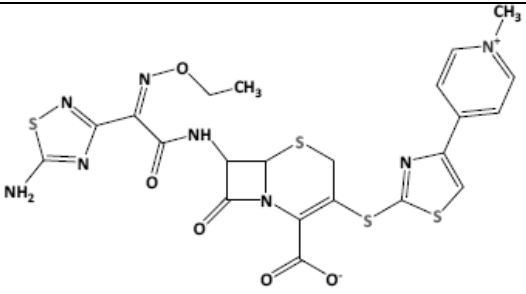
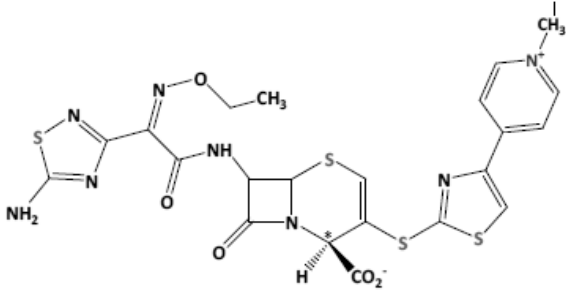
SBOC Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. ANVISA aprova Zinforo (ceftarolina fosamila) para infecções complicadas de pele e tecidos moles e pneumonia adquirida na comunidade. Disponível em: <http://www.s boc.org.br/anvisa-aprova-zinforo-ceftarolina-fosamila-para-infeccoes-complicadas-de-pele-e-tecidos-moles-e-pneumonia-adquirida-na-comunidade>. Acesso em maio/2022.

TOOKE, C.L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; COLENSO, C. K.; HIRVONEN, V. H. A.; TAKEBAYASHI, Y.; SPENCER, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**. 431, 3472-3500, 2019.

WELTE, T., KANTECKI, M., STONE, G. G., HAMMOND, J. Ceftaroline fosamil as a potential treatment option for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 54, 410-422, 2019.

8. ANEXOS

Tabela 3.1 – Produtos de degradação gerados após exposição da ceftarolina fosamila a condições de estresse (KARPIUK et al., 2017).

	[M+H] ⁺	Peso molecular	Fórmula molecular sugerida	Estrutura química sugerida
1	258.1	257.3	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃ S	
2	209.0	208.3	C ₉ H ₈ N ₂ S ₂	
3	309.0	308.4	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃ S ₂	
4	605.1	604.7	C ₂₂ H ₂₀ N ₈ O ₅ S	
5	605.1	604.7	C ₂₂ H ₂₀ N ₈ O ₅ S ₄	

6	605.1	604.7	$C_{22}H_{20}N_8O_5$ S_4	
7	647.1	646.7	$C_{24}H_{22}N_8O_6$ S_4	

Table 4.1. Results obtained from linearity, LOD and LOQ, precision and accuracy study applied for validation of HPLC method for quantitation of ceftaroline fosamil in commercial sample.

Parameters		Results	
Linearity			
Slope		45,042	
Intercept		12,646	
Correlation coefficient (r)		0.9999	
Calibration range		10.0 - 70.0 µg/mL	
LOD and LOQ			
LOD		1.74 µg/mL	
LOQ		5.28 µg/mL	
Precision		Amount (%)^a	RSD (%)
Day 1		96.94	2.12
Day 2		100.98	1.05
Day 3		99.27	2.24
Inter-day		99.07	2.04
Accuracy		Mean of recovery (%)^b	RSD (%)
Spiked amount (%)			
10		97.63	3.22
20		94.46	3.32
40		98.89	3.25

^aSamples in six replicates by day. ^b Samples in triplicate.

Table 4.2. Modifications studied in the robustness test applied to the development of quantitative HPLC-DAD for ceftaroline fosamil.

Factor	Modification 1	Nominal	Modification 2
λ Detection	238 nm	242 nm	246 nm
Flow rate	0.9 mL/min	1.0 mL/min	1.1 mL/min
Column	Phenomenex®	ACE®	Phenomenex®

Table 4.3. Average results of peak decay (%) for ceftaroline fosamil and peak growth (%) for ceftaroline from UFLC analysis applied to preliminary stability for samples stored in clinical use conditions. The samples were prepared in triplicate. For ceftaroline peak growth, mass balance of all peaks was considered (peak area was used as reference for % values).

Dry air oven (25°C)								
Sample	Diluent	0h	2h	4h	6h	8h	12h	24h
Ceftaroline Fosamil	NaCl	100%	94.35%	80.27%	80.75%	68.71%	86.65%	70.40%
Ceftaroline		100%	106.57 %	111.62 %	112.57 %	118.58 %	117.30 %	123.76 %
Ceftaroline Fosamil	Glucose 5%	100%	92.70%	81.62%	85.89%	83.54%	79.48%	64.21%
Ceftaroline		100%	106.92 %	109.52 %	112.90 %	114.69 %	115.75 %	126.96 %
Refrigerator (4°C)								
Sample	Diluent	0h	4h	8h	12h	24h	36h	48h
Ceftaroline Fosamil	NaCl	100%	98.95%	95.78%	95.28%	97.71%	93.14%	93.99%
Ceftaroline		100%	105.95 %	107.31 %	107.52 %	107.59 %	108.40 %	110.08 %
Ceftaroline Fosamil	Glucose 5%	100%	99.76%	98.68%	97.95%	97.50%	97.39%	97.18%
Ceftaroline		100%	105.64 %	107.30 %	106.25 %	108.50 %	109.56 %	111.26 %