

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

Estudo de Estabilidade do Antibiótico Meropenem

Tese apresentada por
Andreas Sebastian Loureiro Mendez
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

M538e Mendez, Andreas Sebastian Loureiro
Estudo de estabilidade do antibiótico meropenem / Andreas Sebastian Loureiro Mendez – Porto Alegre: UFRGS, 2007. - xxvi, 246p.: il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Meropenem. 2. Antibióticos carbapenêmicos. 3. Estabilidade de medicamentos. 4. Cinética de degradação. 5. Produtos de degradação. 6. Controle de qualidade de medicamentos. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Título.

CDU: 615.2.07:615.28

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico esta Tese à minha mãe Glaci,
aos meus irmãos Ângela, Esteban e Daniel,
e aos meus avós Romeu e Francisca.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval, pelo exemplo profissional e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Martin Steppe, pela amizade.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ), por disponibilizar a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do LEPCQ, pelo convívio, amizade e muitos momentos de alegria. Em especial aos acadêmicos Jean e Mariana pela participação direta no trabalho.

À Cássia, pelo companheirismo, amizade e carinho em todos os momentos.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade, pela disponibilidade de infra-estrutura e pela receptividade.

Ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da UFRGS, na pessoa do acadêmico Eduardo Palma, pela disponibilidade de infra-estrutura, pelo importante auxílio em análises de identificação e pela receptividade.

À Profa. Dr. Adriana Pohlmann, pelo importante auxílio na fase final da Tese.

À Profa. Dr. Gilsane Lino Von Poser, pela receptividade e pelo ensinamento de algumas técnicas utilizadas no trabalho.

À Profa. Dr. Vera Lima, por disponibilizar a estrutura laboratorial em algumas etapas do trabalho.

À Profa. Dr. Nance Nardi e ao acadêmico Pedro Chagastelles, do Departamento de Genética da UFRGS, pela receptividade e importante auxílio no desenvolvimento dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Laboratório de Lectinologia do Departamento de Bioquímica da UFRGS, na pessoa do acadêmico Roger Dresch, por disponibilizar a infra-estrutura laboratorial em algumas etapas do trabalho.

Ao Curso de Farmácia da UPF e da URI-Campus Erechim, pelas oportunidades de crescimento profissional.

A todos que participam de minha vida, em todas as intensidades.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 MEROPENEM - ASPECTOS GERAIS.....	11
3.1.1 Considerações gerais.....	11
3.1.2 Síntese.....	16
3.1.3 Análise quantitativa.....	18
3.1.4 Descrição geral.....	23
3.2 MEROPENEM - ESTABILIDADE.....	25
3.2.1 Considerações gerais sobre estabilidade.....	25
3.2.2 Estabilidade e produtos de degradação de derivados β -lactâmicos e carbapenemas.....	33
3.2.3 Estabilidade e produtos de degradação do meropenem.....	46
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	55
4.1 AMOSTRAS DE TRABALHO.....	57
4.1.1 Substância Química de Referência (SQR).....	57
4.1.2 Amostra comercial.....	57
4.2 SELEÇÃO DOS FATORES DE DEGRADAÇÃO.....	58
4.2.1 Metodologia.....	58
4.2.1.1 Degradação térmica.....	58
4.2.1.2 Degradação por catálise ácida e básica.....	58
4.2.1.3 Análise por CLAE.....	59
4.2.1.3.1 Condições cromatográficas.....	59
4.2.1.3.2 Preparo das amostras.....	60
4.2.2 Resultados e discussão.....	61
4.3 CINÉTICA QUÍMICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA.....	74

4.3.1 Metodologia	74
4.3.1.1 Degradação térmica.....	74
4.3.1.2 Análise por CLAE.....	75
4.3.1.2.1 Condições cromatográficas.....	75
4.3.1.2.2 Preparo das amostras.....	75
4.3.1.3 Ensaio microbiológico.....	75
4.3.1.3.1 Descrição do ensaio.....	76
4.3.1.3.2 Preparo das amostras.....	76
4.3.1.4 Cálculos da cinética de degradação.....	77
4.3.2 Resultados e discussão	78
4.4 ISOLAMENTO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	95
4.4.1 Metodologia	95
4.4.1.1 Produtos de degradação térmica.....	95
4.4.1.1.1 Preparo das amostras degradadas.....	95
4.4.1.1.2 Cromatografia em coluna.....	95
4.4.1.1.3 Cromatografia em camada delgada analítica.....	96
4.4.1.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	98
4.4.1.1.5 Modificação do sistema eluente e união das frações.....	98
4.4.1.1.6 Cromatografia em camada delgada preparativa.....	99
4.4.1.1.6.1 Isolamento dos produtos de degradação.....	100
4.4.1.2 Produtos de degradação em meio alcalino.....	101
4.4.1.2.1 Preparo das amostras degradadas e isolamento dos produtos de degradação.....	101
4.4.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	101
4.4.2 Resultados e discussão	102
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	125
4.5.1 Metodologia	125
4.5.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	125
4.5.1.2 Espectroscopia de massas (MS).....	126
4.5.2 Resultados e discussão	127
4.5.2.1 Meropenem SQR em metanol deuterado.....	128
4.5.2.2 Meropenem SQR em DMSO deuterado.....	145
4.5.2.3 Produto de degradação PD1.....	152
4.5.2.4 Produto de degradação PD3.....	162
4.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE	171

4.6.1 Metodologia	171
4.6.1.1 Preparo das amostras.....	171
4.6.1.2 Separação das células mononucleares.....	172
4.6.1.3 Teste de citotoxicidade.....	173
4.6.2 Resultados e Discussão	173
5. CONCLUSÕES	183
6. REFERÊNCIAS	187
ANEXOS	201
BIOGRAFIA	241

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas representativas das penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas.....	11
Figura 2 - Estruturas químicas de algumas carbapenemas de uso clínico.....	12
Figura 3 - Estrutura química do meropenem.....	13
Figura 4 - Representação esquemática dos intermediários envolvidos na síntese do meropenem.....	17
Figura 5 - Representação esquemática do intermediário envolvido na síntese do núcleo carbapenêmico.....	17
Figura 6 - Representação esquemática dos intermediários envolvidos na síntese do meropenem.....	17
Figura 7 - Estrutura química do metabólito do meropenem.....	19
Figura 8 - Cromatogramas de amostras de meropenem degradadas por calor e por tratamento com hidróxido de sódio 0,02N	22
Figura 9 - Rota de degradação ácida e básica da penicilina.....	33
Figura 10 - Reação de degradação do anel cefalosporínico em pH ácido ou básico.....	34
Figura 11 - Reação de hidrólise do anel cefalosporínico do antibiótico ceftazidima.....	34
Figura 12 - Estruturas químicas da ampicilina e do ácido penilóico.....	35
Figura 13 - Produtos de degradação com anel β -lactâmico rompido, obtidos a partir da degradação de um composto carbapenêmico.....	36
Figura 14 - Representação esquemática da rota de degradação de um derivado carbapenêmico.....	37
Figura 15 - Representação esquemática da degradação de um derivado carbapenêmico.....	37
Figura 16 - Representação esquemática da rota de degradação alcalina de trinemas.....	38
Figura 17 - Rota de degradação do imipenem, levando à formação de um produto dimérico.....	40
Figura 18 - Reação de degradação de um composto carbapenêmico, levando à formação de um produto dimérico.....	41
Figura 19 - Representação esquemática do rearranjo tautomérico do metabólito de anel β -lactâmico rompido oriundo do imipenem.....	42
Figura 20 - Representação esquemática das estruturas isoméricas do panipenem.....	42
Figura 21 - Representação esquemática dos produtos de degradação do ertapenem.....	43

Figura 22 - Representação esquemática de produtos de degradação do ertapenem.....	44
Figura 23 - Representação esquemática de produtos de degradação do ertapenem.....	45
Figura 24 - Representação esquemática de produtos poliméricos oriundos da degradação do meropenem.....	51
Figura 25 - Cromatogramas representativos da análise do meropenem reconstituído em água, submetido à degradação à 25 °C e 40 °C por 48 horas.....	52
Figura 26 - Perfil de degradação do meropenem reconstituído em água e armazenado a 25 °C e a 40 °C.....	53
Figura 27 - Perfil de degradação do meropenem reconstituído em água (50 mg/mL) e armazenado a 40 °C.....	63
Figura 28 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR e amostra reconstituída submetida a degradação térmica.....	64
Figura 29 - Perfil de degradação do meropenem pó para solução injetável armazenado a 80 °C.....	65
Figura 30 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR e meropenem pó para solução injetável submetido a degradação térmica	67
Figura 31 - Perfil de degradação do meropenem em solução submetido a degradação em meio ácido.....	69
Figura 32 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR e meropenem em solução submetido à degradação em meio ácido.....	70
Figura 33 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem em solução submetido à degradação em meio ácido.....	71
Figura 34 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR e meropenem em solução submetido à degradação em meio alcalino.....	72
Figura 35 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem pó para solução injetável nas temperaturas de 70 °C, 80 °C e 90 °C.....	82
Figura 36 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem solução reconstituída nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C.....	84
Figura 37 - Curvas de degradação do meropenem solução reconstituída e pó para solução injetável submetidos à degradação em temperatura de 45 °C e 90 °C, respectivamente.....	88
Figura 38 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem pó para solução injetável na temperatura de 90 °C, obtidas através da análise por ensaio microbiológico.....	89
Figura 39 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem solução reconstituída na temperatura de 45 °C, obtidas através da análise	

por ensaio microbiológico.....	90
Figura 40 - Ilustração das placas representativas do ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas.....	91
Figura 41 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem solução reconstituída submetido à degradação térmica.....	93
Figura 42 - Cromatograma representativo da análise por CLAE do meropenem pó para solução injetável submetido à degradação térmica.....	94
Figura 43 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia em coluna.....	107
Figura 44 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia em coluna.....	108
Figura 45 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia em coluna.....	109
Figura 46 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada da amostra oriunda da união das frações da coluna.....	110
Figura 47 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR e da amostra oriunda da união das frações da coluna cromatográfica.....	111
Figura 48 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada preparativa da amostra oriunda da união das frações da coluna cromatográfica.....	112
Figura 49 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada analítica dos produtos de degradação térmica do meropenem.....	113
Figura 50 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada analítica dos produtos de degradação térmica do meropenem e de possíveis interferentes do isolamento dos produtos.....	114
Figura 51 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR e do produto de degradação PD1.....	116
Figura 52 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE e espectros de absorção dos picos cromatográficos referente à análise do meropenem SQR e do produto de degradação PD1.....	117
Figura 53 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do produto de degradação PD2.....	119
Figura 54 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem e da amostra de meropenem degradada na presença de hidróxido de sódio 0,1 N por 10 minutos.....	121
Figura 55 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do produto de degradação PD3.....	122
Figura 56 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE e espectros de absorção dos picos cromatográficos referente à análise do meropenem SQR e do produto de degradação PD3.....	123

Figura 57 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE e espectros de absorção dos picos cromatográficos referente à análise da amostra de meropenem submetido à degradação em meio básico e em meio ácido.....	124
Figura 58 - Estrutura química do meropenem.....	129
Figura 59 - Espectro de RMN ¹ H do meropenem em metanol.....	130
Figura 60 - Espectro de correlação COSY do meropenem em metanol.....	131
Figura 61 - Espectro de RMN ¹³ C do meropenem em metanol.....	135
Figura 62 - Espectro DEPT do meropenem em metanol.....	136
Figura 63 - Espectro HSQC do meropenem em metanol.....	137
Figura 64 - Ilustração das prováveis fragmentações do meropenem na análise por espectrometria de massas.....	140
Figura 65 - Espectro de massas do meropenem SQR, obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray.....	141
Figura 66 - Espectro de massas do meropenem SQR, obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray.....	142
Figura 67 - Espectro de massas (MS-MS) do meropenem SQR, obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray.....	144
Figura 68 - Espectro de RMN ¹ H do meropenem em DMSO.....	147
Figura 69 - Espectro de correlação COSY do meropenem em DMSO.....	148
Figura 70 - Espectro de RMN ¹³ C do meropenem em DMSO.....	150
Figura 71 - Espectro HSQC do meropenem em DMSO.....	151
Figura 72 - Estrutura química do produto de degradação PD1.....	152
Figura 73 - Espectro de RMN ¹ H do produto de degradação PD1.....	153
Figura 74 - Espectro de correlação COSY do produto de degradação PD1..	154
Figura 75 - Espectro de RMN ¹³ C do produto de degradação PD1.....	157
Figura 76 - Espectro HSQC do produto de degradação PD1.....	158
Figura 77 - Rota de decomposição para formação do produto de degradação PD1.....	160
Figura 78 - Rota de eliminação da cadeia lateral alcoólica para formação do produto de degradação PD1.....	161
Figura 79 - Espectro de massas do produto de degradação PD3, obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray.....	163
Figura 80 - Estrutura química do produto de degradação PD3.....	162
Figura 81 - Espectro de RMN ¹ H do produto de degradação PD3.....	165
Figura 82 - Espectro de correlação COSY do produto de degradação PD3..	166
Figura 83 - Espectro de RMN ¹³ C do produto de degradação PD3.....	167
Figura 84 - Espectro HSQC do produto de degradação PD3.....	168

Figura 85 - Viabilidade celular resultante do teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> aplicado ao meropenem, amostras degradadas e produto de catálise básica.....	180
Figura 86 - Representações gráficas das análises por citometria de fluxo.....	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações mínimas do meropenem frente a bactérias aeróbias Gram-negativas, bactérias aeróbias Gram-positivas e bactérias anaeróbias.....	14
Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas na análise do meropenem por CLAE.....	60
Tabela 3 - Valores de teor residual de meropenem no produto reconstituído submetido à degradação térmica.....	62
Tabela 4 - Valores de pH do meropenem como produto reconstituído antes e após a degradação térmica.....	65
Tabela 5 - Valores de teor residual de meropenem pó para solução injetável submetido à degradação térmica.....	66
Tabela 6 - Valores de teor residual de meropenem em solução submetido à degradação em meio ácido.....	69
Tabela 7 - Valores de pH das soluções de meropenem preparadas em meio ácido e em meio básico.....	73
Tabela 8 - Valores de concentração residual de meropenem pó para solução injetável obtidos na avaliação da cinética de degradação térmica a 70 °C, 80 °C e 90 °C.....	81
Tabela 9 - Valores de concentração residual de meropenem solução reconstituída obtidos na avaliação da cinética de degradação térmica a 25 °C, 35 °C e 45 °C.....	83
Tabela 10 - Valores de concentração residual de meropenem solução reconstituída e pó para solução injetável obtidos na avaliação da cinética de degradação térmica a 45 °C e 90 °C, respectivamente.....	87
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos k , $t_{1/2}$ e t_{90} , para o meropenem solução reconstituída a 25 °C, 35 °C e 45 °C, e para o meropenem pó para solução injetável a 70 °C, 80 °C e 90 °C.....	92
Tabela 12 - Relação dos sistemas eluentes utilizados no desenvolvimento do método por cromatografia em coluna.....	97
Tabela 13 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H , correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o meropenem em metanol.....	132
Tabela 14 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C , dados de espectro DEPT, correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o meropenem em metanol.....	138
Tabela 15 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H , correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o meropenem em DMSO.....	146
Tabela 16 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C , correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o	149

meropenem em DMSO.....	
Tabela 17 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹ H, correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o produto de degradação PD1.....	152
Tabela 18 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹³ C, correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o produto de degradação PD1.....	156
Tabela 19 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹ H, correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o produto de degradação PD3.....	164
Tabela 20 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹³ C, correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o produto de degradação PD3.....	169
Tabela 21 - Viabilidade celular resultante do teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> aplicado ao meropenem, amostras degradadas e produto de catálise básica.....	179

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DAD	<i>Dyode array detector</i>
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DHP-1	Deidropeptidase renal humana do tipo 1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
MS	Espectrometria de massas
PDA	<i>Photodiode array detector</i>
PD1	Produto de degradação 1
PD2	Produto de degradação 2
PD3	Produto de degradação 3
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
USP	The United States Pharmacopeia

RESUMO

A estabilidade de medicamentos constitui um tema atual e de grande importância no meio científico. Tem sido constantemente abordada em estudos direcionados à avaliação da qualidade das preparações farmacêuticas. O meropenem, um antibiótico carbapenêmico de amplo espectro de ação, é utilizado como um importante recurso terapêutico para o tratamento de infecções graves. Por ser um agente antimicrobiano ativo e eficaz, de uso clínico em muitos países, torna-se necessária a pesquisa mais aprofundada de sua estabilidade, propiciando um maior entendimento dos aspectos que podem influenciar na sua manipulação e armazenamento. O presente trabalho objetiva a avaliação da estabilidade do meropenem em condições de degradação forçada, contemplando a determinação da cinética de degradação, o isolamento e identificação de produtos de decomposição e a determinação da citotoxicidade das amostras degradadas e dos produtos isolados. Amostras de meropenem pó para solução injetável (500 mg) e solução reconstituída em água (50 mg/mL) foram submetidas à degradação térmica em diferentes temperaturas. Para a decomposição ácido-base, soluções aquosas de meropenem a 1,0 mg/mL foram preparadas em HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M, e estocadas a 25 °C. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em sistema de fase reversa. Para o ensaio de determinação cinética, as amostras submetidas à maior temperatura de degradação foram também analisadas por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas. O isolamento do produto de degradação térmica foi efetuado através da combinação das técnicas de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa. Para o produto oriundo de catálise básica, a identificação foi efetuada diretamente na amostra degradada, não havendo a necessidade de prévio isolamento. A elucidação estrutural dos produtos de degradação foi realizada por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. As amostras degradadas e o produto de catálise básica foram avaliados *in vitro* quanto ao potencial citotóxico frente a células mononucleares. Para determinação da viabilidade celular, os conteúdos celulares foram avaliados por citometria de fluxo. Os resultados dos ensaios de cinética química indicaram que o meropenem sofre decomposição térmica seguindo reação de primeira ordem. As amostras degradadas apresentaram uma acentuada redução de teor, com formação de produtos de degradação. As técnicas cromatográficas de

purificação utilizadas permitiram o isolamento de um produto oriundo da degradação térmica da solução reconstituída. A identificação demonstrou que o mesmo teve uma modificação estrutural extensa, gerada a partir de reações de decomposição passíveis de ocorrer para o derivado carbapenêmico avaliado. Para o produto de degradação básica, verificou-se o rompimento do anel β -lactâmico, em reação característica destes compostos. A avaliação preliminar da citotoxicidade indicou que as amostras ensaiadas apresentam toxicidade celular *in vitro* após 48 horas de incubação, fornecendo indícios de necessidade de atenção para este aspecto. A totalidade dos resultados obtidos neste trabalho permite a conclusão de que a estabilidade do meropenem é um tema de grande relevância e deve ser considerada na hora da manipulação do produto, de modo a evitar problemas de qualidade oriundos de amostras degradadas e seus produtos de degradação.

Palavras-chave: meropenem, cinética de degradação, estabilidade térmica, decomposição ácido-base, produtos de degradação.

ABSTRACT

Stability study of the antibiotic meropenem

The stability of pharmaceuticals is a current and important subject in the scientific field. It has been frequently cited in studies related with the quality evaluation of pharmaceutical preparations. Meropenem, a carbapenemic antibiotic with broad spectrum, is used as an important therapeutic agent for the treatment of several infections. Since it is an active and effective antimicrobial, used in many countries, it is necessary the complete research about its stability, providing more knowledge about the aspects that could influence in its handle and storage. The aim of this work is the evaluation of meropenem stability in forced degradation conditions, including the determination of degradation kinetics, the isolation and identification of decomposition products and the cytotoxicity evaluation of degraded samples and isolated products. Meropenem powder for injection (500 mg) and reconstituted solution in water (50 mg ml⁻¹) were submitted to thermal degradation. For acid-basic decomposition, meropenem aqueous solution at 1.0 mg ml⁻¹ were prepared in HCl 0.1 M and NaOH 0.1 M, and stored at 25 °C. The samples were analysed by high performance liquid chromatography, in reverse phase system. In the kinetics determination, the samples stored at 45 °C and 90 °C were also evaluated by microbiological assay, applying the cylinder-plate method. The isolation of thermal degradation product was carried out by column chromatography and preparative thin layer chromatography. For the product obtained through basic catalysis, the identification was done directly in the degraded sample, without previous isolation. The structural elucidation of degradation products was performed by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The degraded samples and basic catalysis product were evaluated with respect to cytotoxic potential *in vitro* against mononuclear cells. The cellular viability was determined by flow cytometry. The results of chemical kinetics indicated that thermal decomposition of meropenem is described by first order reaction. The degraded samples showed a significant reduction in the potency, with formation of degradation products. The chromatographic purification techniques allowed the isolation of one thermal degradation product. For the basic degradation product, it was verified the hydrolysis of β -lactam ring, in a characteristic reaction for these compounds. The preliminary cytotoxicity evaluation indicated that samples were toxic after 48 hours. The results

obtained in this work allowed to conclude that the stability of meropenem is a subject of great importance and should be considered in the handle of the product, in order to avoid quality problems from degraded samples and degradation products.

Key words: meropenem, degradation kinetics, thermal stability, acid-basic decomposition, degradation products.

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos carbapenêmicos constituem uma classe de antibacterianos de amplo espectro de ação. A introdução destes fármacos na terapêutica, na década de 80, levou a um acréscimo da eficácia clínica no tratamento de infecções graves, muitas vezes provocadas por bactérias multiresistentes. Desde sua descoberta, novos derivados vêm sendo desenvolvidos, de modo a ampliar os recursos disponíveis à terapia antimicrobiana.

Em 1996, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso do antibiótico meropenem (HELLINGER e BREWER, 1999). Este derivado β -metilcarbapenêmico é comercializado unicamente na forma farmacêutica pó para solução injetável, restringindo-se ao uso hospitalar. Sua eficácia e segurança têm justificado a utilização em muitos países como um importante agente terapêutico. Tal importância torna necessário o contínuo estudo acerca deste antibiótico, contemplando as diferentes áreas de interesse.

Nesse contexto, os trabalhos direcionados à avaliação da qualidade da preparação farmacêutica podem ser destacados. Os estudos de estabilidade têm grande importância, visto que permitem elucidar o comportamento do fármaco frente a diversos fatores de degradação, possibilitando aprimorar, entre vários aspectos, as condições de manipulação e armazenamento. Não se limitando a isso, os ensaios de estabilidade têm abrangência à identificação dos produtos de degradação, à elucidação dos mecanismos de degradação e à determinação da cinética química de decomposição (MATTHEWS, 1999; LACHMAN *et al.*, 2001; REYNOLDS *et al.*, 2002; BRASIL, 2005; KLICK *et al.*, 2005).

Os antibióticos carbapenêmicos, pertencentes à classe dos β -lactâmicos, apresentam problemas de estabilidade térmica, principalmente quando em solução (TAKEUCHI *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 2005; DALHOFF *et al.*, 2006; SAJONZ *et al.*, 2006). Esta relatada instabilidade, aliada à importância da temperatura nas reações de degradação dos fármacos e na determinação das condições de armazenamento (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; LACHMAN *et al.*, 2001), torna fundamental a pesquisa em torno da termolabilidade destes derivados.

Nesse sentido, alguns trabalhos relatam a suscetibilidade do meropenem aos fatores de degradação temperatura e umidade (TAKEUCHI *et al.*, 1993; TAKEUCHI

et al., 1995; MENDEZ, 2003; MENDEZ *et al.*, 2005). Além disso, a necessidade de reconstituição no momento da administração tem levado ao desenvolvimento de estudos direcionados à determinação da estabilidade deste antibiótico como produto reconstituído, nas condições de armazenamento utilizadas na rotina clínica (PATEL, 1996; PATEL e COOK, 1997; GRANT *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2004).

Em estudo recente (MENDEZ, 2003), referente ao desenvolvimento de métodos analíticos e à avaliação preliminar da estabilidade térmica do meropenem como produto reconstituído, foram obtidos resultados indicativos de uma acentuada instabilidade do fármaco. Uma análise criteriosa destes resultados, bem como a limitação do número de trabalhos abordando os produtos de degradação, estimulou o desenvolvimento de um estudo amplo, abrangendo a avaliação da estabilidade do fármaco em diferentes condições de degradação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da estabilidade do antibiótico meropenem na forma farmacêutica pó para solução injetável e como produto reconstituído frente a diferentes fatores de degradação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudo de degradação forçada do meropenem na forma farmacêutica pó para solução injetável e como produto reconstituído, frente à temperatura;
2. Estudo de degradação forçada do meropenem em solução, frente a agentes de catálise ácida e básica;
3. Determinação da cinética de degradação térmica do meropenem na forma farmacêutica pó para solução injetável e como produto reconstituído, fazendo uso de técnicas analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência-detector ultravioleta e por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas;
4. Determinação da atividade antimicrobiana das amostras de meropenem submetidas à degradação térmica para o ensaio de cinética química de degradação, fazendo uso de ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas;
5. Estudo de isolamento de possíveis produtos de degradação majoritários do meropenem oriundos da decomposição pelos fatores de degradação avaliados, fazendo uso da combinação de técnicas cromatográficas por cromatografia em camada delgada analítica, cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência-detector ultravioleta;
6. Identificação dos produtos de degradação majoritários isolados, fazendo uso da combinação de técnicas analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência-

detector ultravioleta, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C ;

7. Proposta das vias de decomposição do meropenem envolvidas na formação dos produtos de degradação isolados;
8. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das amostras degradadas e dos produtos de degradação isolados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MEROPENEM - ASPECTOS GERAIS

3.1.1 Considerações gerais

Os derivados carbapenêmicos são conhecidos como agentes antibacterianos potentes e de amplo espectro de ação, características estas determinadas por sua estabilidade frente às β -lactamases em geral. Estruturalmente, são similares às penicilinas e cefalosporinas, diferenciando-se pela substituição do átomo de enxofre por um átomo de carbono (posição 1) (por isso denominado “carba”), e pela presença de uma insaturação entre os carbonos 2 e 3 do mesmo núcleo (por isso denominado “penema”) (Figura 1) (NORRBY, 1995; HELLINGER e BREWER, 1999; ASBEL e LEVISON, 2000; KNAPP e ENGLISH, 2001; DALHOFF *et al.*, 2006).

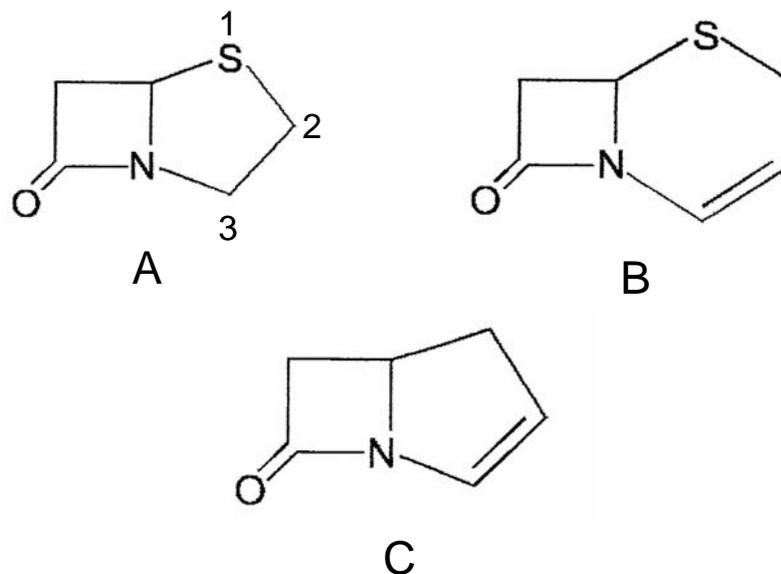


Figura 1 - Estruturas químicas representativas das penicilinas (A), cefalosporinas (B) e carbapenemas (C) (DALHOFF *et al.*, 2006).

O primeiro representante das carbapenemas, a tienamicina, foi isolado, em 1979, a partir do microrganismo *Streptomyces cattleya* (PROUS, 1988; DARVILLE, 1999). Embora com atividade antibacteriana promissora e estabilidade às β -lactamases, apresentava instabilidade química e toxicidade ao sistema renal

(PROUS, 1988; MATSUMOTO e MURATANI, 2004). Estudos de desenvolvimento de novos derivados permitiram a obtenção de compostos estáveis e ativos. Atualmente, os antibióticos carbapenêmicos de uso clínico são o imipenem, o meropenem, o ertapenem, o panipenem e o biapenem, todos de uso parenteral (BUYNAK, 2006) (Figura 2).

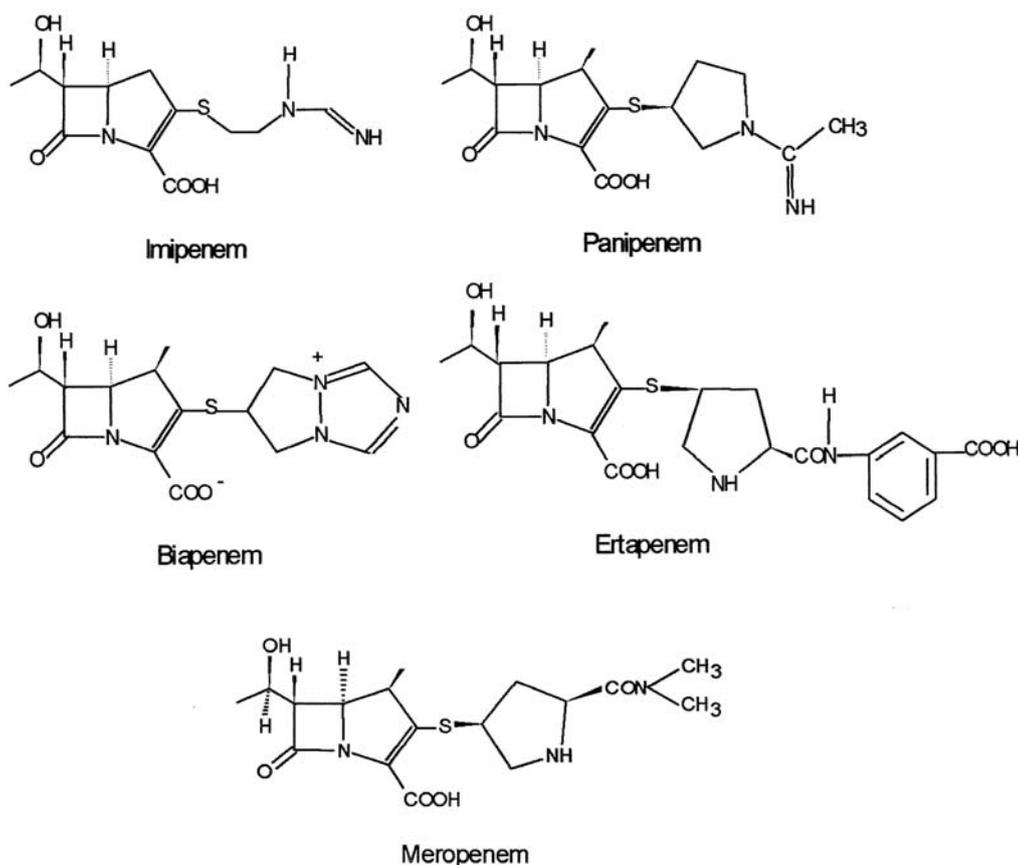


Figura 2 - Estruturas químicas de algumas carbapenemas de uso clínico (BUYNAK, 2006).

O meropenem (Figura 3), um derivado dimetilcarbamil pirrolidinil da tienamicina, é utilizado em diversos países como um importante recurso terapêutico para o tratamento intensivo de infecções graves, muitas vezes de origem ou causa desconhecida (DRUG THERAPY REVIEW, 1995; MANDELL e PETRI, 1996; BLUMER, 1997). No Brasil, é comercializado, atualmente, por quatro Laboratórios: AstraZeneca (Meronem[®]), BioChimico (Mepenox[®]), Química Haller (Meroxil[®]) e Eurofarma (meropenem – medicamento genérico). A forma farmacêutica é o pó para

solução injetável, sendo apresentado como frascos-ampola contendo 500 mg ou 1000 mg de meropenem anidro, para uso intravenoso.

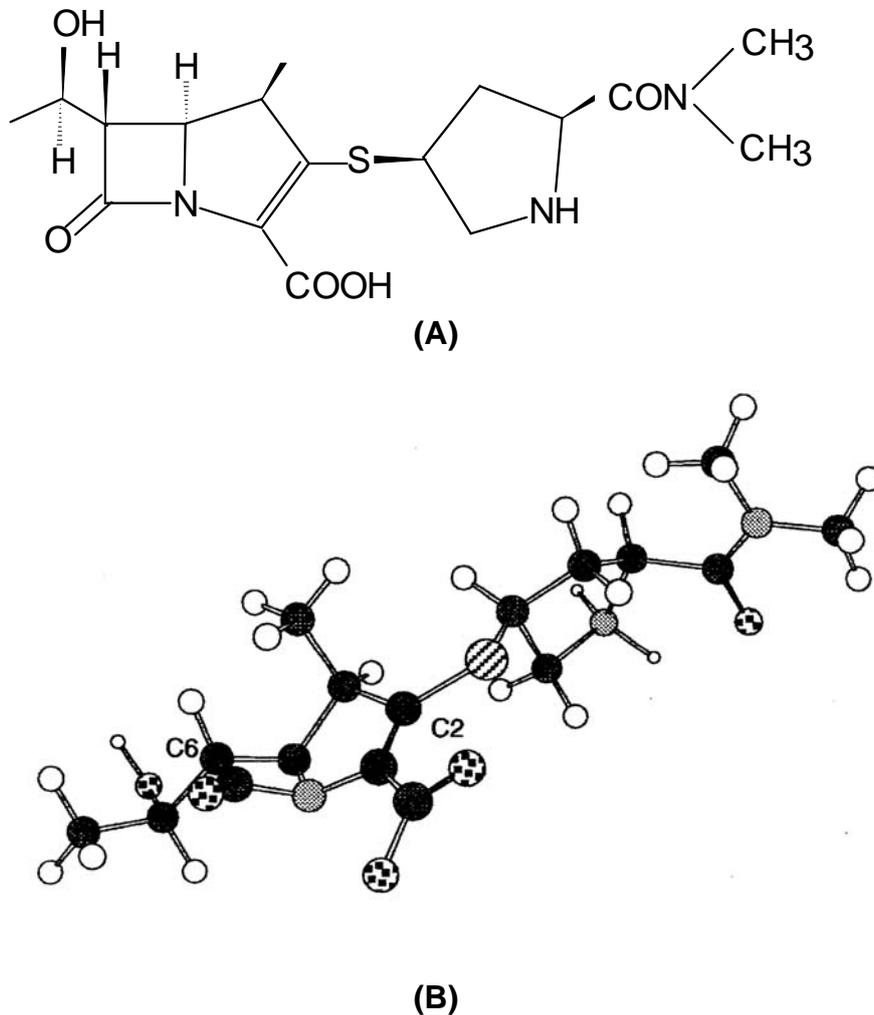


Figura 3 - Estrutura química do meropenem (A). Estrutura cristalográfica do meropenem obtida por análise em raio-x (B) (NISHIMURA *et al.*, 1998). Valores de pK_a : 2,9 (grupamento ácido carboxílico) e 7,4 (grupamento amínico do anel pirrolidínico) (TAKEUCHI *et al.*, 1995).

Dada sua importância na terapia antimicrobiana, é grande o número de trabalhos publicados relatando a atividade antibacteriana e a eficácia clínica deste antibiótico. A Tabela 1 ilustra, de forma resumida, o espectro de ação do meropenem, bem como os valores de concentração inibitória mínima (CIM) frente aos microrganismos. Tem destaque o amplo espectro contra bactérias aeróbias Gram-negativas, bactérias aeróbias Gram-positivas e bactérias anaeróbias (WISEMAN *et al.*, 1995; PFALLER e JONES, 1997; BRADLEY *et al.*, 1999).

Tabela 1 - Concentrações mínimas do meropenem para inibir 90% do crescimento dos microrganismos (CIM₉₀), frente a bactérias aeróbias Gram-negativas, bactérias aeróbias Gram-positivas e bactérias anaeróbias (WISEMAN *et al.*, 1995; COULTON e HUNT, 1996; PFALLER e JONES, 1997; BRADLEY, 1997; HURST e LAMB, 2000; SCHAUMANN *et al.*, 2000; RHOMBERG *et al.*, 2004, TURNER, 2005).

Microrganismo	CIM₉₀ (mg/L)*
Bactérias aeróbias Gram-negativas	
<i>Burkholderia cepacia</i>	< 8,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,12 – 0,25
<i>Escherichia Coli</i>	0,03 – 0,064
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,13 – 0,16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03 – 0,064
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0,008
<i>Morganella morganii</i>	0,12 – 0,25
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,03
<i>Neisseria meningitides</i>	0,016
<i>Proteus mirabilis</i>	0,06 – 0,25
<i>Proteus vulgaris</i>	0,13 – 0,25
<i>Providencia rettgeri</i>	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,05 – 8,0
<i>Pseudomonas putida</i>	8,0
<i>Serratia marcescens</i>	0,06 – 0,36
Bactérias aeróbias Gram-positivas	
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,0 – 16,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25
<i>Staphylococcus aureus (SM)**</i>	0,12 – 0,25
<i>Staphylococcus epidermidis (SM) **</i>	4,0 – 4,32
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,06 – 0,13
<i>Streptococcus pyogenes</i>	< 0,06
Bactérias anaeróbias	
<i>Bacteróides fragilis</i>	0,25 – 0,5
<i>Bacteróides vulgatus</i>	0,5 – 1,0
<i>Clostridium difficile</i>	0,25 – 2,0

* Valores de CIM₉₀ até 4,0 mg/L indicam a susceptibilidade do microrganismo. Valores de CIM₉₀ entre 4,0 mg/L e 16,0 mg/L indicam moderada susceptibilidade do microrganismo.

** SM = sensíveis à metilina.

Tabela 1 (continuação)

Microrganismo	CIM ₉₀ (mg/L)*
Bactérias anaeróbias	
<i>Clostridium perfringens</i>	0,03 – 0,25
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,25
<i>Peptococcus magnum</i>	0,25
<i>Prevotella bivia</i>	0,5

* Valores de CIM₉₀ até 4,0 mg/L indicam a susceptibilidade do microrganismo. Valores de CIM₉₀ entre 4,0 mg/L e 16,0 mg/L indicam moderada susceptibilidade do microrganismo.

A partir de uma pesquisa detalhada da literatura, é possível o aprofundamento acerca dos dados de atividade do meropenem frente aos principais patógenos causadores de infecções graves recorrentes. Em geral, são descritos resultados de comparação com a atividade de outros agentes antimicrobianos comumente utilizados (ISENBERG *et al.*, 1999; LOWE e LAMB, 2000; ALDRIDGE, 2002; FRANCESCHINI *et al.*, 2002; TURNER, 2004; RHOMBERG *et al.*, 2004; KIFFER *et al.*, 2005; WATANABE *et al.*, 2005; MASTERTON e TURNER, 2006; ONG *et al.*, 2007).

O potencial antibacteriano do meropenem também é avaliado através de estudos clínicos, voltados à determinação de sua eficácia. De modo geral, esse antibiótico, administrado isoladamente ou em associação, é eficaz no tratamento de infecções intra-abdominais, infecções respiratórias, infecções urinárias, meningite, febre neutropênica e septicemia, entre outros casos (DRUG THERAPY REVIEW, 1995; WISEMAN *et al.*, 1995; BLUMER, 1997; KNAPP e ENGLISH, 2001; DALHOFF *et al.*, 2006).

Em estudos específicos, a eficácia do meropenem é determinada pela observação da resposta clínica e bacteriológica nos pacientes submetidos ao tratamento com este agente antibacteriano. Na maioria dos casos, é relatada uma boa eficácia clínica, com a erradicação do patógeno responsável e a cura da infecção. Quanto à tolerabilidade, em geral o tratamento é bem aceito, com poucos relatos de efeitos adversos (NORRBY, 1995; SOLBERG, 1995; ARRIETA, 1997;

BASOLI *et al.*, 1997; AKOVA *et al.*, 1999; ZANETTI *et al.*, 1999; RATJEN, 2001; MATSUMOTO e MURATANI, 2004).

Apesar de seu amplo espectro de ação e de sua destacada atividade, alguns trabalhos vêm continuamente descrevendo casos de resistência bacteriana ao meropenem. Estes estudos são direcionados à identificação das cepas resistentes e das enzimas β -lactamases responsáveis por tal característica. Para a grande maioria dos patógenos causadores de graves infecções, já foram observados casos de resistência microbiana ao antibiótico de estudo (BRADLEY *et al.*, 1999; LIVERMORE e WOODFORD, 2000; GEORGOPAPADAKOU, 2002; RICE, 2003; GOOSSENS e GRABEIN, 2005; MOLOUGHNEY *et al.*, 2005; MASTERTON e TURNER, 2006; PATERSON, 2006; PUERTO *et al.*, 2006).

3.1.2 Síntese

Os estudos de desenvolvimento do meropenem surgiram a partir da necessidade de obtenção de um derivado estável à deidropeptidase renal humana do tipo 1 (DHP-1). Esta enzima é responsável pela hidrólise do imipenem, o que obriga sua administração junto à cilastatina, um inibidor da DHP-1 (DALHOFF *et al.*, 2006).

A síntese do meropenem está descrita em alguns trabalhos (SUNAGAWA *et al.*, 1990; COULTON e HUNT, 1996; PRASHAD *et al.*, 1998). SUNAGAWA e colaboradores (1990) relatam a síntese da cadeia lateral, e a união da mesma com o núcleo carbapenêmico para obtenção do meropenem (Figura 4). A obtenção deste núcleo é relatada por COULTON e HUNT (1996), estando como um intermediário na síntese da tienamicina (Figura 5).

O núcleo carbapenêmico do meropenem também pode ser sintetizado a partir de um intermediário do tipo α -ceto éster. A adição da cadeia lateral previamente sintetizada a este intermediário, junto a reações específicas de ciclização do mesmo, leva à obtenção final do meropenem (Figura 6) (PRASHAD *et al.*, 1998).

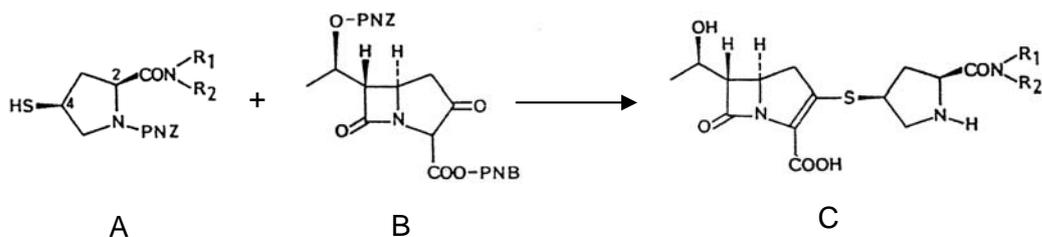


Figura 4 - Representação esquemática dos intermediários envolvidos na síntese do meropenem (C). Cadeia lateral (A), núcleo carbapenêmico (B) (SUNAGAWA *et al.*, 1990).

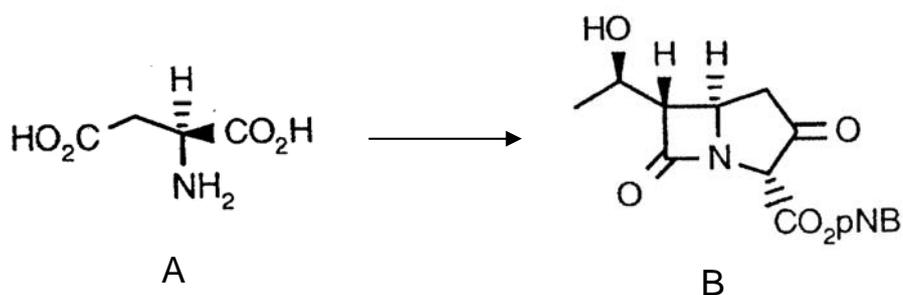


Figura 5 - Representação esquemática do intermediário envolvido na síntese do núcleo carbapenêmico (B). Ácido L-aspártico (A) (COULTON e HUNT, 1996).

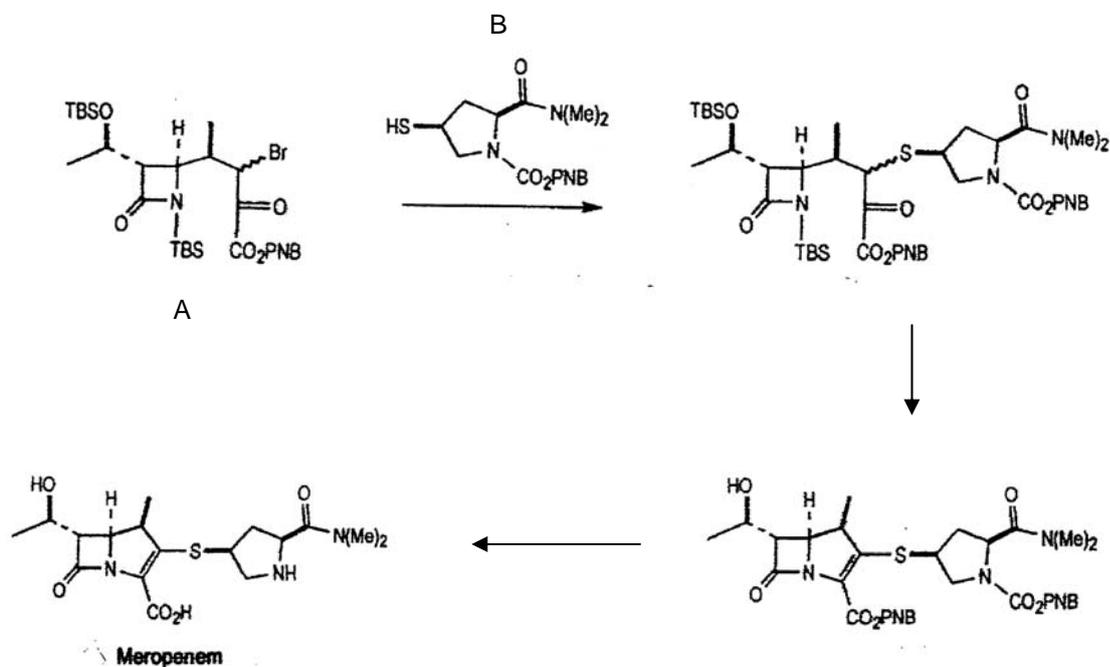


Figura 6 - Representação esquemática dos intermediários envolvidos na síntese do meropenem. Intermediário α -ceto éster (A), cadeia lateral (B) (PRASHAD *et al.*, 1998).

3.1.3 Análise quantitativa

Estudos científicos descrevem a determinação quantitativa do meropenem em fluidos biológicos. Foram desenvolvidas as técnicas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (AL-MESHAL *et al.*, 1995; ELKHAÏLI *et al.*, 1996; BOMPADRE *et al.*, 1998; IP *et al.*, 1998; LEVÊQUE *et al.*, 1998; DUPUIS *et al.*, 1998; EHRLICH *et al.*, 2001; ÖZKAN *et al.*, 2001; ROBATEL *et al.*, 2002) e eletroforese capilar (MRESTANI *et al.*, 1999; TANIGUCHI *et al.*, 1999; KITAHASHI e FURUTA, 2005) para doseamento deste antibiótico em plasma e urina. Estas técnicas analíticas permitem o monitoramento seguro dos pacientes, com sensibilidade e rapidez de análise.

Para o método por CLAE, os mais variados sistemas eluentes foram propostos, como por exemplo, a mistura de acetato de amônia 10,53 mmol/L:acetonitrila (95:5,0; v/v) (ELKHAÏLI *et al.*, 1996), a mistura de tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,0:metanol (70:30; v/v) (BOMPADRE *et al.*, 1998) e a mistura de tampão fosfato monobásico 50 mM: acetonitrila (95:5,0; v/v) (EHRLICH *et al.*, 2001).

Em 1995, AL-MESHAL e colaboradores descreveram um método por CLAE para determinação quantitativa do meropenem em plasma, realizando uma comparação com o método microbiológico de difusão em ágar-cilindros em placas, no qual utilizou-se *Escherichia coli* como microrganismo teste. A fase móvel descrita neste trabalho é composta por água:acetonitrila:ácido acético glacial (78:21,2:0,8; v/v/v). O método por CLAE propiciou uma análise rápida, com resultados precisos e exatos, ao contrário do ensaio microbiológico, que, embora com boa sensibilidade, não demonstrou boa capacidade analítica.

Alguns estudos propõem a determinação quantitativa do metabólito do meropenem (ICI 213689, ZM 213689 ou UK1a) (Figura 7), em plasma e urina, por técnica de radioimunoensaio (BALLARD *et al.*, 1996) ou cromatografia líquida de alta eficiência (ROBATEL *et al.*, 2002). Este metabólito, formado minoritariamente, provém da hidrólise do anel β -lactâmico pela enzima DHP-1 (MOUTON e VAN DEN ANKER, 1995; MOON *et al.*, 1997).

ROBATEL e colaboradores (2002) descreveram o desenvolvimento e validação de um método por CLAE para determinação simultânea do meropenem e seu metabólito em plasma e fluido de diálise obtidos de pacientes internados e submetidos à hemodiálise. A eluição cromatográfica envolveu um sistema gradiente, com fase móvel composta por uma mistura de metanol e cloreto de tetrabutilamônio 0,005M (pH=7,4), e a seguinte programação de eluição: início com proporção 10/90, passagem para proporção 50/50 aos 10 minutos e passagem para proporção 10/90 aos 27 minutos, sendo mantida até o término da corrida aos 35 minutos. A detecção foi realizada por UV em comprimento de onda de 208 nm. A corrida cromatográfica propiciou a análise do meropenem em um tempo de retenção em torno de 14,0 minutos, enquanto seu metabólito foi detectado em um tempo de retenção em torno de 5,0 minutos. O método desenvolvido apresentou uma análise exata e precisa do meropenem e seu metabólito no plasma e fluido de diálise, em concentrações que variaram de 15 µg/mL a 60 µg/mL. A metodologia desenvolvida demonstrou ser uma ferramenta segura para análise do antibiótico carbapenêmico em fluidos biológicos e pode ser utilizada para detectar um provável acúmulo do metabólito em pacientes com disfunções renais.

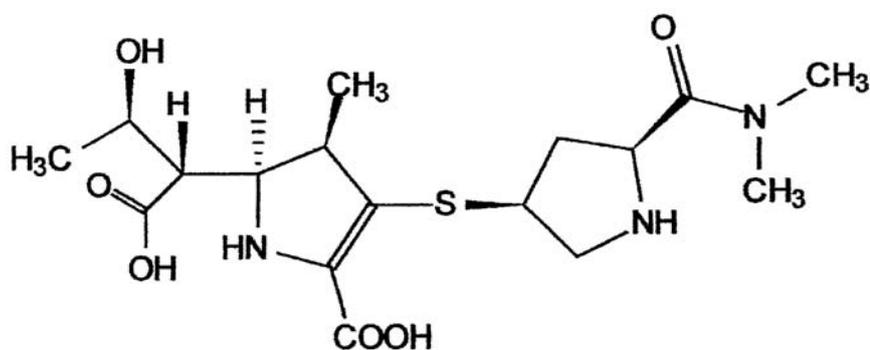


Figura 7 - Estrutura química do metabólito (ICI 213689, ZM 213689 ou UK1a) do meropenem.

Em trabalho recente, é descrito um método por CLAE para determinação do meropenem em fluido biliar obtido de ratos submetidos a experimentos de microdiálise. O sistema cromatográfico faz uso de uma fase móvel composta por mistura de ácido fosfórico monossódico 50 mM (pH=3,0) e metanol na proporção 80:20 (v/v). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, com detecção por UV em comprimento de onda de 298 nm. O método proposto foi validado adequadamente,

demonstrando ser sensível, linear, preciso e exato, além de permitir a análise rápida do meropenem, que apresentou um tempo de retenção de 6,2 minutos (CHANG *et al.*, 2002).

A determinação do meropenem por eletroforese capilar também é descrita. O ensaio proposto objetiva a quantificação deste antibiótico em soro por técnica de injeção direta. Como tampão de corrida, utilizou-se solução de tetraborato de sódio 25 mM, ajustado a pH 10,0 com hidróxido de sódio, com adição de SDS a 90 mM. O ensaio foi efetuado por cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC). A detecção do fármaco ocorreu a 297 nm, em um tempo de migração de 7,2 minutos. A técnica eletroforética proposta permitiu uma análise precisa e exata do meropenem em matriz biológica (KITAHASHI e FURUTA, 2005).

Quanto à análise do meropenem pó para solução injetável, alguns trabalhos têm descrito métodos analíticos quantitativos, a maioria envolvendo a determinação por CLAE.

ÖZKAN e colaboradores (2001) propõem a quantificação deste antibiótico, na forma farmacêutica, por CLAE. O método utiliza um sistema de fase reversa e detector do tipo ultravioleta (UV), além de fazer uso da cefepima como padrão interno. A eluição é do tipo isocrática e a fase móvel é composta por uma mistura de tampão fosfato monobásico 15 mM:acetonitrila:metanol (84:12:4,0; v/v/v). Embora o trabalho não apresente a validação do método, nem mesmo a determinação de parâmetros analíticos importantes, como a especificidade e a robustez, a metodologia proposta permite uma análise aparentemente precisa e exata, com rápida detecção do antibiótico (tempo de retenção=7,2 minutos).

A United States Pharmacopeia (USP 29, 2006) disponibiliza as monografias do meropenem pó para solução injetável e matéria-prima. Para a determinação quantitativa do antibiótico, é descrita a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um sistema de fase reversa e detector UV. A eluição também é isocrática e a fase móvel é composta pela mistura de solução de hidróxido de tetrabutilamônio (25%) diluído em água (15mL para 735 mL de água, e acidificação a pH 7,5 com ácido fosfórico), acetonitrila e metanol na proporção 75:15:10 (v/v/v). A

análise cromatográfica é rápida, com a determinação do meropenem num tempo de 6,0 a 8,0 minutos.

Em trabalho recente, referente à análise qualitativa e quantitativa do meropenem na forma farmacêutica, MENDEZ (2003) propôs a quantificação deste antibiótico através dos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do ultravioleta, e ensaio microbiológico – método de difusão em agar-cilindros em placas. Os métodos foram validados adequadamente, de acordo com as guias de validação relatadas na literatura.

MENDEZ e colaboradores (2003) descreveram a análise do meropenem pó para solução injetável por CLAE. O método foi validado através da determinação dos parâmetros analíticos linearidade, precisão, exatidão, especificidade, robustez e limites de detecção e quantificação. Utilizou-se a técnica de cromatografia em fase reversa, com eluição isocrática, em condições de fluxo de 1,0 mL/min e fase móvel composta por tampão fosfato monobásico 30 mM e acetonitrila (90:10; v/v), ajustada a pH 3,0 com ácido orto-fosfórico. Os compostos foram detectados por UV, em comprimento de onda de 298 nm. As amostras foram preparadas em água, o que pode ser considerado uma grande vantagem em análises de rotina. O método proposto permitiu a análise do meropenem num tempo de 6,8 minutos, e apresentou linearidade ($r=0,999$) na faixa de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, precisão ($\text{CV}\% < 1,0\%$) e exatidão (taxa de recuperação média = 99,72%). A especificidade do método foi avaliada submetendo-se a solução aquosa do antibiótico (100 $\mu\text{g/mL}$) ao calor (70 °C por 1,5 h) e ao tratamento com hidróxido de sódio 0,02 M por 10 minutos. Em ambos os casos, o meropenem não sofreu interferência dos produtos de degradação formados, os quais apareceram em tempos relativamente próximos: 2,76 minutos para o tratamento com calor e 2,38 minutos para o tratamento hidróxido de sódio (Figura 8). O método proposto também se mostrou robusto nas condições testadas, que incluíram variação da fase móvel (pH e % de acetonitrila) e troca da coluna. Desse modo, o método por CLAE foi plenamente validado e pode ser utilizado com segurança na análise rotineira deste antibiótico, em sua forma farmacêutica.

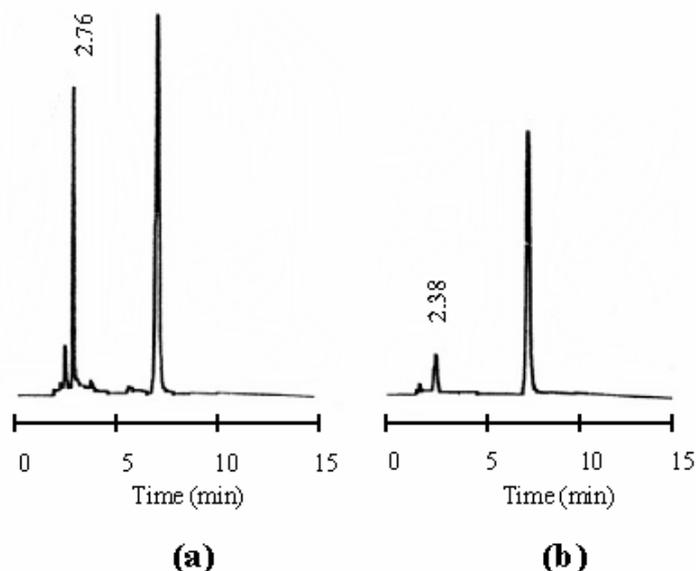


Figura 8 - Cromatogramas de amostras de solução aquosa de meropenem degradadas por calor (70 °C por 1,5 hora) (a) e por tratamento com hidróxido de sódio 0,02 M por 10 minutos (b). Produtos de degradação em tempos de retenção de 2,76 (a) e 2,38 (b) minutos (MENDEZ *et al.*, 2003).

Neste mesmo trabalho, MENDEZ e colaboradores (2003) propuseram a análise do meropenem pó para solução injetável por espectrofotometria na região do UV. O método apresentou-se adequado à análise, embora seja passível de interferência por produtos de degradação do antibiótico, como demonstrado em trabalho recente (MENDEZ, 2003). Neste estudo, a análise por espectrofotometria na região do UV de amostras degradadas de meropenem não resultou num perfil de degradação como o observado pelo método por CLAE e pelo ensaio microbiológico, os quais sempre apresentaram um teor residual de meropenem menor. Embora tenha sido demonstrada esta interferência, o método espectrofotométrico apresentou linearidade ($r=0,999$) na faixa de 5,0 a 35,0 $\mu\text{g/mL}$, precisão ($\text{CV}\% < 1,0\%$) e exatidão (taxa de recuperação média = 101,18%), além de ser rápido e não envolver o uso de solventes orgânicos tóxicos, uma vez que as amostras foram todas preparadas em água. Estas características indicam que o mesmo pode ser utilizado na análise de rotina do antibiótico meropenem.

O meropenem também pode ser determinado quantitativamente pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas (MENDEZ, 2003; MENDEZ *et al.*, 2005). A metodologia proposta faz uso da cepa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 como microrganismo teste. O método foi validado através da

determinação dos parâmetros analíticos linearidade, precisão e exatidão. As amostras foram preparadas diretamente em água e ensaiadas. O ensaio apresentou linearidade ($r=0,999$) na faixa de análise de 1,5 a 6,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo verificadas as seguintes médias de halos de inibição de crescimento: 17,39 mm, 21,23 mm e 25,04 mm para as concentrações de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 3,0 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além de linear, o método microbiológico se mostrou preciso (CV% intra-dia e inter-dia $< 1,0\%$) e exato (taxa de recuperação média = 102,01%). MENDEZ (2003), por meio de análise comparativa estatística, demonstrou que o ensaio microbiológico é equivalente ao método por CLAE descrito anteriormente. Além disso, o uso destes dois métodos na análise de amostras degradadas de meropenem permitiu a obtenção de um perfil de degradação semelhante, sugerindo que os produtos de degradação formados não apresentavam atividade microbiológica (MENDEZ, 2003; MENDEZ *et al.*, 2005).

3.1.4 Descrição geral (THE MERCK INDEX, 1996; PARFITT, 1999; USP DI, 2001)

O meropenem triidratado é um sólido em temperatura ambiente. Apresenta-se como um pó branco, cristalino e inodoro.

- **Nome químico:** Ácido (4*R*,5*S*,6*S*)-3-[(3*S*,5*S*)-5-dimetilcarbamilpirrolidin-3-il-tio]-6-[(1*R*)-1-hidroxietil]-4-metil-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-eno-carboxílico tridratado.
- **Siglas:** SM-7338, ICI-194660
- **Denominação:** Meropenem
- **Nomes comerciais:** Meronem^{1,2}; Mepenox¹; Meroxil¹; Meropenem (medicamento genérico)¹; Merrem³; Meropen⁴; Optinem⁵

¹ Brasil

² Alemanha, Holanda, Inglaterra, Bélgica

³ Estados Unidos, Canadá, Itália, Austrália

⁴ Japão

⁵ Áustria

- **Fórmula molecular:** $C_{17}H_{25}N_3O_5S \cdot 3H_2O$
- **Número de registro no Chemical Abstracts Service:**
 - 1) Meropenem anidro: CAS – 96036-03-02
 - 2) Meropenem triidratado: CAS – 119478-56-7
- **Categoria:** Antibiótico carbapenêmico
- **Massa molecular:**
 - 1) Meropenem anidro: 383,51
 - 2) Meropenem triidratado: 437,51
- **Composição elementar:**
 - 1) Meropenem triidratado: C 46,67%; H 7,14%; N 9,6% ; O 29,26% ; S 7,33%

3.2 MEROPENEM - ESTABILIDADE

3.2.1 Considerações gerais sobre estabilidade

A estabilidade é uma qualidade essencial para os produtos farmacêuticos. É definida como a capacidade de uma determinada formulação, em um material de acondicionamento específico, manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas durante um período determinado (O'DONNELL e BOKSER, 2006).

Muitos fatores afetam a estabilidade de um medicamento, incluindo a estabilidade da própria substância ativa, o potencial de interação entre substância ativa e excipiente, os processos de produção, a forma farmacêutica, o recipiente de armazenamento e as condições ambientais presentes durante a produção e o armazenamento do produto até o seu uso (O'DONNELL e BOKSER, 2006).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Em outras palavras, os fármacos e medicamentos podem ser alterados, com o tempo, por uma série de fatores, dentre eles a temperatura, a umidade, a luz, os gases atmosféricos, a pressão, os solventes, as trocas de pH, as interações, a contaminação microbiológica, entre outros (NUDELMAN, 1975). A degradação também pode ser ocasionada por fatores químicos, como incompatibilidades, oxidações, reduções, hidrólises, racemizações, entre outros. Estas reações químicas podem ser iniciadas ou aceleradas pelos fatores ambientais de temperatura, umidade e luz (O'DONNELL e BOKSER, 2006).

A degradação de um produto farmacêutico pode ocasionar inúmeras alterações em suas características, com sérias conseqüências a sua qualidade, tais como redução ou aumento de sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de

produtos de degradação tóxicos e perda da integridade do recipiente de armazenamento, entre outras (RHODES, 2000).

Embora sejam muitas as conseqüências oriundas da instabilidade dos produtos farmacêuticos, a redução da atividade da substância ativa, muitas vezes, é considerada a de maior importância. Em geral, adota-se a definição de que qualquer produto que contenha menos de 90 % do valor declarado do fármaco é de qualidade inaceitável (RHODES, 2000).

Levando em conta os inúmeros problemas decorrentes da degradação de um medicamento, torna-se muito importante a avaliação da estabilidade dos medicamentos, de forma a assegurar a identidade, a eficácia, a potência, a segurança e a pureza até o momento de seu uso, estabelecendo as condições mais apropriadas para sua armazenagem (NUDELMAN, 1975; MATTHEWS, 1999). A realização dos ensaios de estabilidade também tem como justificativa a garantia do bem-estar do paciente que usa o produto, a proteção da reputação do produtor, a exigência por parte dos órgãos reguladores e a obtenção de dados que podem ser de valor na formulação de outros produtos (RHODES, 2000).

Os estudos de estabilidade são obrigatórios para a autorização da comercialização de um medicamento. Os resultados devem ser documentados e apresentados de forma detalhada aos órgãos reguladores no caso de um novo fármaco, um novo medicamento e, caso o medicamento necessite reconstituição no momento da administração, para o produto reconstituído (MATTHEWS, 1999; LACHMAN *et al.*, 2001). Para os produtos que requerem reconstituição ou diluição é obrigatória a comprovação da estabilidade pelo período especificado, nas condições de armazenamento determinadas (BRASIL, 2005).

Os ensaios de estabilidade dos produtos farmacêuticos apresentam inúmeros objetivos, dentre eles a avaliação do comportamento dos fármacos ou medicamentos que se alteram com o tempo, por influência de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, além da determinação das condições ideais de armazenamento e do prazo de validade dos medicamentos (NUDELMAN, 1975; MATTHEWS, 1999; BRASIL, 2005). Segundo o FDA (2003), a avaliação da estabilidade permite estabelecer evidências de como a qualidade de um fármaco ou

de um produto farmacêutico varia com o tempo sob influência de uma variedade de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz.

Os estudos de estabilidade podem ser classificados como estudos acelerados, estudos de acompanhamento ou estudos de longa duração. A sua aplicabilidade está relacionada à possibilidade de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005).

Os estudos de estabilidade acelerados são projetados para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Em geral, devem ser conduzidos a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa, com alguma variação dependendo da forma farmacêutica. Os estudos de acompanhamento são realizados para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

Os estudos de longa duração são projetados para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. Em geral, devem ser realizados a $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / $65\% \pm 5\%$ de umidade relativa, com alguma variação dependendo da forma farmacêutica (BRASIL, 2005).

Com relação aos períodos mínimos de avaliação da estabilidade, a Resolução RE nº 1 de 29 de Julho de 2005 (BRASIL, 2005), descreve os períodos necessários de acordo com o prazo de validade requerido para um produto. Por exemplo, para concessão de um prazo de validade provisório de 24 meses, deverá ser aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou o relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração. Neste caso, o prazo de validade deverá ser confirmado mediante a apresentação de um estudo de estabilidade de longa duração de 24 meses de duração.

De acordo com o ICH (2003), o estudo de estabilidade de longa duração deve ser realizado em condições de armazenamento de $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / $65\% \pm 5\%$ por um período mínimo de 12 meses. Para o estudo de estabilidade acelerado, as condições de armazenamento devem ser de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / $75\% \pm 5\%$ por um período mínimo de 6 meses.

Embora a literatura preconize as condições de armazenamento para os diferentes ensaios de estabilidade, eventualmente outras condições podem ser utilizadas, como no caso dos medicamentos acondicionados em recipientes impermeáveis, em que não há necessidade de controle da umidade relativa (ICH, 2003).

A avaliação da estabilidade também pode ser efetuada pelo ensaio de estresse, também denominado estudo de degradação forçada, o qual permite determinar o efeito de condições extremas de degradação sobre o produto farmacêutico, excedendo aquelas utilizadas em estudos acelerados (ICH, 2003; KLICK *et al.*, 2005). Os estudos de degradação forçada têm importância em testes de pré-formulação, contribuindo para o desenvolvimento e otimização de formulações. Além disso, são utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos indicadores de estabilidade (KLICK *et al.*, 2005).

A degradação forçada é um recurso igualmente utilizado para a pesquisa de mecanismos de degradação dos fármacos e avaliação de potenciais produtos de degradação que não seriam observados em estudos acelerados ou de longa duração (REYNOLDS *et al.*, 2002; ICH, 2003; KLICK *et al.*, 2005). Degradação térmica, decomposição por hidrólise, decomposição oxidativa e fotólise estão entre os mecanismos de degradação aos quais os fármacos e produtos farmacêuticos podem ser submetidos nos ensaios de estresse (REYNOLDS *et al.*, 2002).

Para qualquer tipo de estudo, as informações sobre a estabilidade dos produtos farmacêuticos são obtidas a partir dos testes de estabilidade. Estes testes são definidos como o conjunto de técnicas projetadas visando definir o prazo de validade e o período de utilização de um medicamento em embalagem e condições de armazenamento especificadas. Dentre os testes, têm destaque aqueles voltados

à determinação de teor, à determinação de produtos de degradação, à análise de limites microbianos e à determinação de pH (BRASIL, 2005).

Para soluções e suspensões reconstituídas a partir de formulações de pó para injetável, a avaliação da estabilidade abrange estudos conduzidos a valores extremos e médios de pH do produto. Ensaio de simulação, na presença de materiais que entrem em contato com a injeção reconstituída, por exemplo, seringas plásticas e tubos intravenosos, também devem ser desenvolvidos. De modo geral, a avaliação da estabilidade destes produtos inclui estudos acelerados para análise das substâncias relacionadas, do pH da solução reconstituída, do tempo de reconstituição, da limpidez da solução reconstituída, da esterilidade do produto e da presença de endotoxinas bacterianas (BANSAL, 2002).

Além de uma pesquisa ampla em torno dos procedimentos adequados para a realização de ensaios de estabilidade, o desenvolvimento destes estudos exige um conhecimento teórico das reações de degradação e dos princípios de cinética química, visto que as reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química, podendo ser aceleradas através do aumento da temperatura (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

Os estudos de cinética de degradação, do ponto de vista técnico, apresentam vários objetivos, entre eles a obtenção experimental dos dados cinéticos, a proposição do mecanismo de reação, o planejamento dos experimentos necessários para confirmar as hipóteses propostas e o estabelecimento das condições para acelerar ou diminuir a velocidade de reação conforme necessidade. O conhecimento do mecanismo de degradação pode auxiliar amplamente na obtenção de maior estabilidade em formulações instáveis (NUDELMAN, 1975). Em outras palavras, as aplicações de estudos de cinética química resultam na produção de preparações farmacêuticas mais estáveis (MARTIN, 1993).

Os princípios de cinética química envolvem a avaliação da velocidade e ordem de reação, fatores estes intimamente ligados. A velocidade de reação é afetada por vários fatores, dentre eles a temperatura, os solventes, os agentes catalíticos ácidos e básicos, e a luz (MARTIN, 1993). A determinação da ordem de reação permite definir a variação da velocidade de reação com a concentração dos

reagentes (LACHMAN *et al.*, 2001). Reações de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem estão entre as mais importantes nos estudos de degradação de fármacos, embora estas últimas sejam mais raras (CARTENSEN, 2000). Para formas farmacêuticas sólidas, a decomposição dos fármacos ocorre por um perfil de ordem zero ou primeira ordem (CARTENSEN, 2000).

As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade independe da concentração dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade da reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. As reações de segunda ordem, em outro caso, se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência de um deles (NUDELMAN, 1975).

A determinação da ordem de reação, na prática, pode ser realizada através de representações gráficas, as quais devem relacionar a concentração da substância reagente em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração da substância reagente em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração da substância reagente em função do tempo (segunda ordem). A representação que fornecer a melhor reta é a que define a ordem de reação (NUDELMAN, 1975).

A partir da determinação da velocidade e ordem de reação, torna-se possível a obtenção de outros dados, característicos de estudos de estabilidade. Um deles é o $t_{90\%}$, que representa o tempo em que a concentração do fármaco atinge 90% da concentração inicial, um indicativo do tempo de vida útil (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001; WIGENT, 2006).

A determinação do $t_{90\%}$ também pode ser realizada através da degradação acelerada. Os métodos de envelhecimento acelerado levam em conta o fato de que a temperatura acelera a maioria dos processos de degradação de fármacos e medicamentos, com algumas exceções, como as reações fotolíticas (NUDELMAN, 1975).

Um dos métodos mais satisfatórios para exprimir a influência da temperatura sobre a velocidade de reação é a relação quantitativa proposta por Arrhenius, a qual permite, através de uma equação matemática característica, a determinação rápida

do tempo de vida útil do fármaco ou medicamento (NUDELMAN, 1975; GIL-ALEGRE *et al.*, 2001; LACHMAN *et al.*, 2001).

Os estudos de estabilidade abrangem também o desenvolvimento de métodos analíticos indicadores de estabilidade. Estes métodos devem permitir a quantificação exata da substância ativa, além de distinguir a mesma dos produtos de degradação. É importante que o método escolhido seja validado, a fim de assegurar a eficácia destes estudos (HONG e SHAH, 2000).

Quando há necessidade da detecção exata e da quantificação dos produtos de degradação, o uso de métodos indicadores de estabilidade é obrigatório. O desenvolvimento destes métodos se inicia com a detecção de produtos de degradação relevantes, oriundos de condições de degradação forçada, que também são formados em ensaios de estabilidade acelerada ou de longa duração. Além da capacidade de resolução e de detecção dos produtos de degradação, o método indicador de estabilidade deve ser viável para estabelecer as especificações, as condições de armazenamento e o prazo de validade do produto farmacêutico (BAERTSCHI, 2006).

A validação de um método analítico indicador de estabilidade parte da determinação de sua especificidade frente à análise da substância de interesse e seus produtos de degradação, os quais podem ser formados pela decomposição forçada do composto original. A precisão e a exatidão do ensaio também devem ser avaliadas, aplicando-se os mesmos princípios de validação dos métodos usuais. O desenvolvimento e validação dos métodos analíticos indicadores de estabilidade é justificado pela necessidade de técnicas potenciais para a separação dos componentes de uma mistura física do fármaco e seus produtos de degradação (BAKSHI e SINGH, 2002).

Os métodos cromatográficos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia quiral, cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa, além do método de eletroforese capilar, são considerados métodos indicadores de estabilidade. Por outro lado, os métodos não cromatográficos, como as técnicas titrimétricas, a espectroscopia de absorção atômica, a espectrofotometria na região do ultravioleta e a espectrofotometria na região do infravermelho, mesmo

precisos em alguns casos, não são considerados indicadores de estabilidade, portanto não adequados para aplicações nestes ensaios (HONG e SHAH, 2000).

Atualmente, o acoplamento de detector por espectrometria de massas à cromatografia líquida (LC-MS), cromatografia gasosa (GC-MS) e eletroforese capilar (CE-MS) tem sido bastante promissor nos estudos de estabilidade, apresentando vantagens como versatilidade, sensibilidade, capacidade de análise estrutural dos produtos de degradação e rápida determinação quantitativa dos produtos analisados (BAKSHI e SINGH, 2002). As técnicas de cromatografia líquida acoplada a detector UV – rede de fotodiodo e cromatografia líquida com detecção por ressonância magnética nuclear (LC-RMN) também constituem importantes ferramentas para a elucidação estrutural de produtos de degradação (REYNOLDS *et al.*, 2002).

Particularmente com relação à cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV – rede de fotodiodo, esta técnica analítica é amplamente utilizada para avaliação da pureza dos fármacos em análise qualitativa e quantitativa. Permite a separação de possíveis impurezas, como produtos de degradação e intermediários de síntese, auxiliando em sua identificação. O recurso de análise da absorvância medida em função do tempo de retenção propicia uma análise de pureza do pico cromatográfico obtido na corrida, o que confere um acréscimo significativo de eficiência, o que não é observado com detectores de comprimento de onda fixo (WIBERG *et al.*, 2004).

A técnica de LC-MS se destaca por suas características de rapidez, precisão e exatidão de análise, além da sensibilidade para detecção de traços de produtos de degradação formados, característica esta que não é observada quando se utiliza o método por CLAE acoplado a detector do tipo UV. Pode ser aplicada para determinar de modo completo a estabilidade de um produto farmacêutico, estabelecendo com segurança seu perfil de degradação (DARRINGTON e JIAO, 2004). A detecção por espectrometria de massas também permite a análise da pureza dos picos cromatográficos obtidos numa análise farmacêutica. Na área farmacêutica, a importância da técnica de LC-MS é justificada por suas inúmeras aplicações, dentre elas a identificação de novos compostos, a detecção de impurezas em produtos sintéticos e formulações, a caracterização de metabólitos,

além da aplicação em bioanálise quantitativa de amostras biológicas (NIESSEN, 1998).

3.2.2 Estabilidade e produtos de degradação de derivados β -lactâmicos e carbapenemas

A estabilidade dos antibióticos β -lactâmicos vem sendo continuamente estudada, principalmente com o surgimento dos novos compostos químicos desta classe. Algumas reações de degradação estão há muito elucidadas, tornando-se rotas clássicas para compostos que possuem o anel β -lactâmico característico destes antibióticos.

Um exemplo clássico de rota de degradação dos antibióticos β -lactâmicos é o rompimento do anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas em função do pH. Sabe-se que as penicilinas, quando submetidas ao meio básico, sofrem abertura de seu anel e formação do ácido penicilóico, como ilustrado na Figura 9. As cefalosporinas, do mesmo modo, podem ter seu anel rompido quando submetidas a pH ácido ou básico (Figura 10) (BASÁEZ e VANÝSEK, 1999).

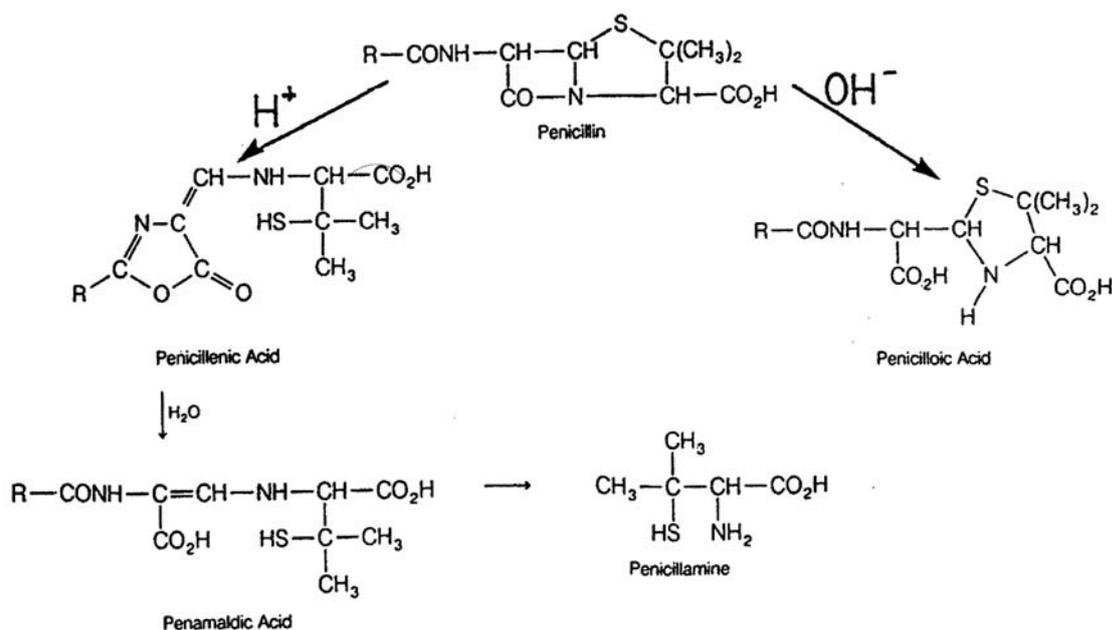


Figura 9 - Rota de degradação ácida e básica da penicilina (BASÁEZ e VANÝSEK, 1999).

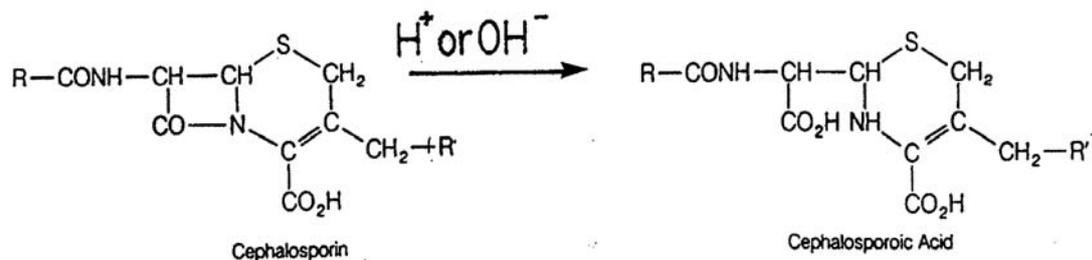


Figura 10 - Reação de degradação do anel cefalosporínico, em pH ácido ou básico (BASÁEZ e VANÝSEK, 1999).

Um outro exemplo de rompimento do anel β -lactâmico pode ser observado com a cefalosporina ceftazidima. Este fármaco, em solução aquosa, tem seu anel β -lactâmico hidrolisado (Figura 11), reação esta acelerada em condições de temperatura elevada (FARINA *et al.*, 1999). Neste mesmo estudo, a ceftazidima foi reconstituída em água para injeção e armazenada em diferentes temperaturas. A degradação foi monitorada por CLAE, eletroforese capilar e espectrofotometria na região do UV. Os dois primeiros métodos possibilitaram a separação dos produtos de degradação, enquanto o UV permitiu a observação de diferenças espectrais na solução degradada.

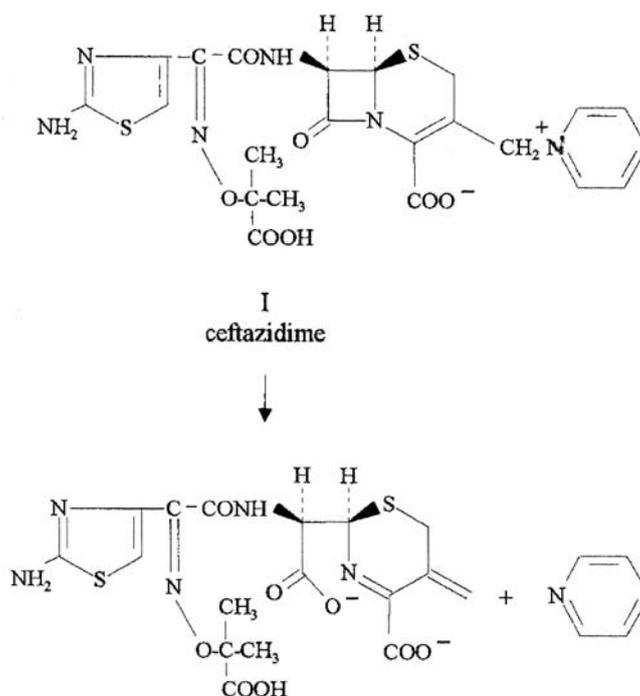


Figura 11 - Reação de hidrólise do anel cefalosporínico do antibiótico ceftazidima (FARINA *et al.*, 1999).

Em estudo de monitoramento da ampicilina e suas substâncias relacionadas, em amostras de soro e de produto farmacêutico (cápsulas), por ressonância magnética nuclear, é descrita a formação do ácido penilóico (Figura 12), um derivado de anel β -lactâmico rompido oriundo da degradação daquele antibiótico. Fatores de degradação como umidade em condições ácidas e básicas, temperatura e luz estão relacionadas com a degradação da ampicilina e formação de produtos comumente relatados na literatura (SHAMSIPUR *et al.*, 2002).

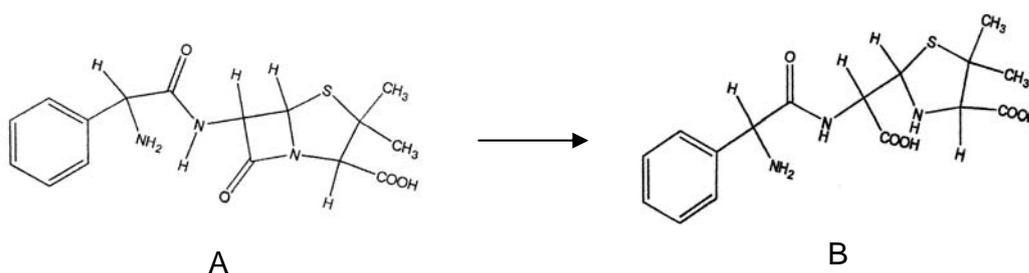


Figura 12 - Estruturas químicas da ampicilina (A) e do ácido penilóico (B) (SHAMSIPUR *et al.*, 2002).

Os antibióticos β -lactâmicos apresentam a característica de formação de derivados poliméricos. A amoxicilina tem sua qualidade associada à presença destes derivados na formulação, os quais podem ser formados durante a produção e armazenamento do produto. Para a determinação cromatográfica destas impurezas de alto peso molecular, foi proposto o desenvolvimento de técnica por cromatografia em gel filtração e comparação com a cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa. Embora os derivados poliméricos tenham sido obtidos comercialmente, observou-se a formação dos mesmos a partir do armazenamento do antibiótico em solução aquosa. A formação destes produtos é iniciada com a reação de polimerização entre a amoxicilina e o ácido amoxicilóico (PM=383). A partir disso, são formados os derivados diméricos da amoxicilina de anel β -lactâmico fechado (PM=730) e de anel β -lactâmico aberto (PM=748), e o derivado trimérico da amoxicilina (PM=1114). A técnica cromatográfica em gel filtração apresentou eficiência de separação das impurezas de alto peso molecular da amoxicilina, ao

contrário do ensaio por cromatografia líquida, que não permitiu a detecção segura destes polímeros (SHAN-YING *et al.*, 2003).

ROVATTI e colaboradores (1998) investigaram a eficiência da técnica de cromatografia líquida acoplada a detector de espectrometria de massas (LC-MS) na análise dos produtos de degradação de um composto sintético caracterizado pela existência de um núcleo carbapenêmico. Este produto, reconstituído em solução aquosa, foi estocado a 50 °C por 3 meses. A análise da solução degradada permitiu a observação de alguns produtos de degradação, dentre eles dois compostos caracterizados pela hidrólise do anel β -lactâmico, como ilustrado na Figura 13. Este trabalho demonstrou extrema eficiência da técnica de LC-MS na separação e identificação de produtos de degradação.

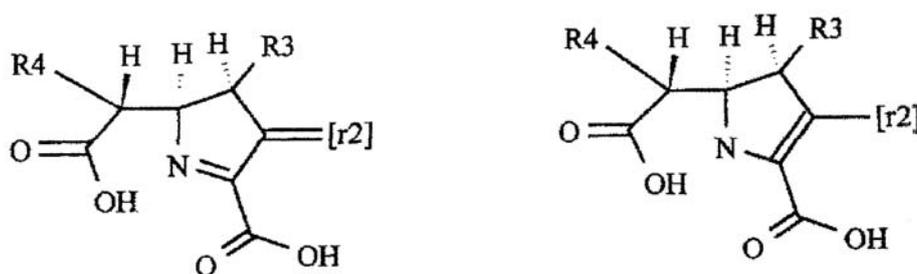


Figura 13 - Produtos de degradação com anel β -lactâmico rompido, obtidos a partir da degradação de um composto carbapenêmico, reconstituído e armazenado a 50 °C (ROVATTI *et al.*, 1998).

Em estudo de avaliação da estabilidade química de um derivado carbapenêmico sintetizado na forma cristalina e amorfa, são descritas possíveis rotas envolvidas em sua degradação. A abertura do anel β -lactâmico, em condições de umidade e temperatura, é observada em ambos os estados sólidos, embora a forma cristalina, contendo três moléculas de água, apresente uma degradação significativamente mais lenta que o composto amorfo. Além da hidrólise do anel β -lactâmico, a reação de degradação levou ao rompimento da cadeia lateral do composto carbapenêmico avaliado (Figura 14) (ALMARSSON *et al.*, 2000).

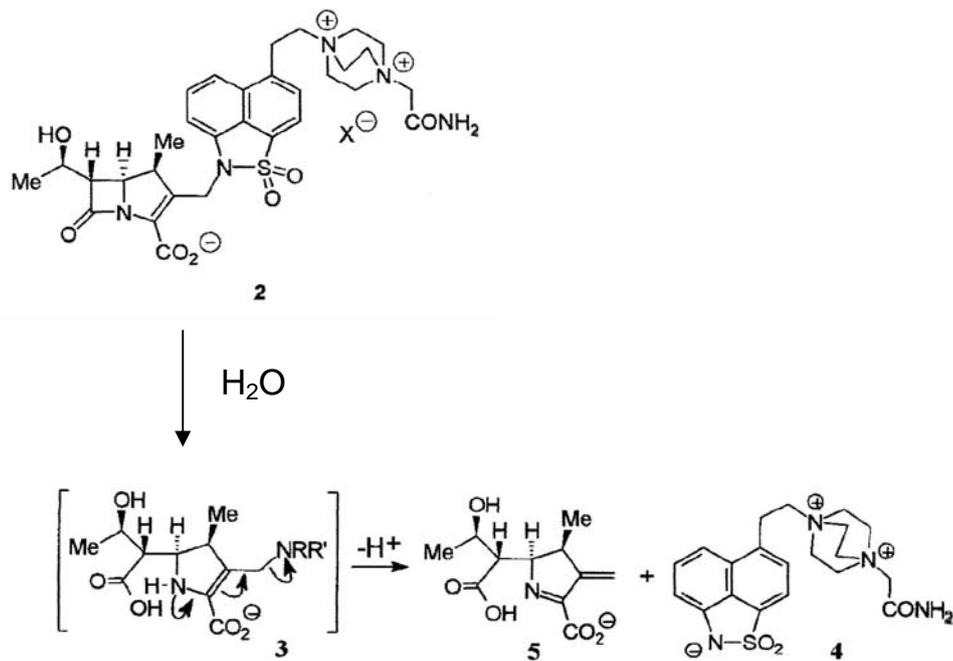


Figura 14 - Representação esquemática da rota de degradação de um derivado carbapenêmico (2) (ALMARSSON *et al.*, 2000).

Considerando a instabilidade do anel β -lactâmico à hidrólise em reações metabólicas, alguns ensaios são desenvolvidos para monitoramento dos metabólitos em amostras biológicas. ZHANG e colaboradores (2002), em trabalho de desenvolvimento de uma técnica por cromatografia líquida para detecção dos metabólitos de um novo derivado carbapenêmico, descreve a hidrólise do anel β -lactâmico e o rompimento da cadeia lateral como possíveis reações envolvidas na metabolização (Figura 15).

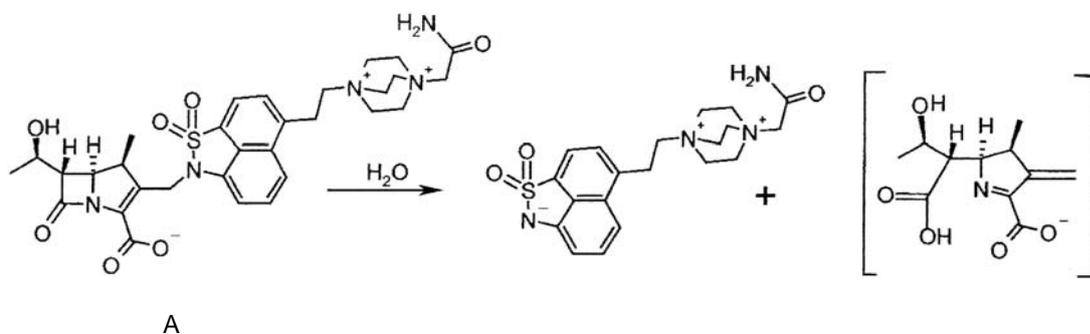


Figura 15 - Representação esquemática da degradação de um derivado carbapenêmico (A) (ZHANG *et al.*, 2002).

O melhor entendimento da reação de hidrólise do anel β -lactâmico requer a avaliação de trabalhos teóricos específicos. A hidrólise alcalina das carbapenemas tricíclicas (trinemas) é relatada em estudo recente. São descritas duas rotas para esta reação: transferência de próton ao anel β -lactâmico (rota a), e clivagem do mesmo anel com eliminação de cadeia lateral por rearranjo de elétrons (rota b). Observando a Figura 16, é possível visualizar estas duas rotas de degradação. O ponto de partida da reação de hidrólise alcalina é o ataque nucleofílico do íon hidróxido ao grupo carbonila do anel, que leva ao rompimento da ligação amídica (FASOLI e FRAU, 2005).

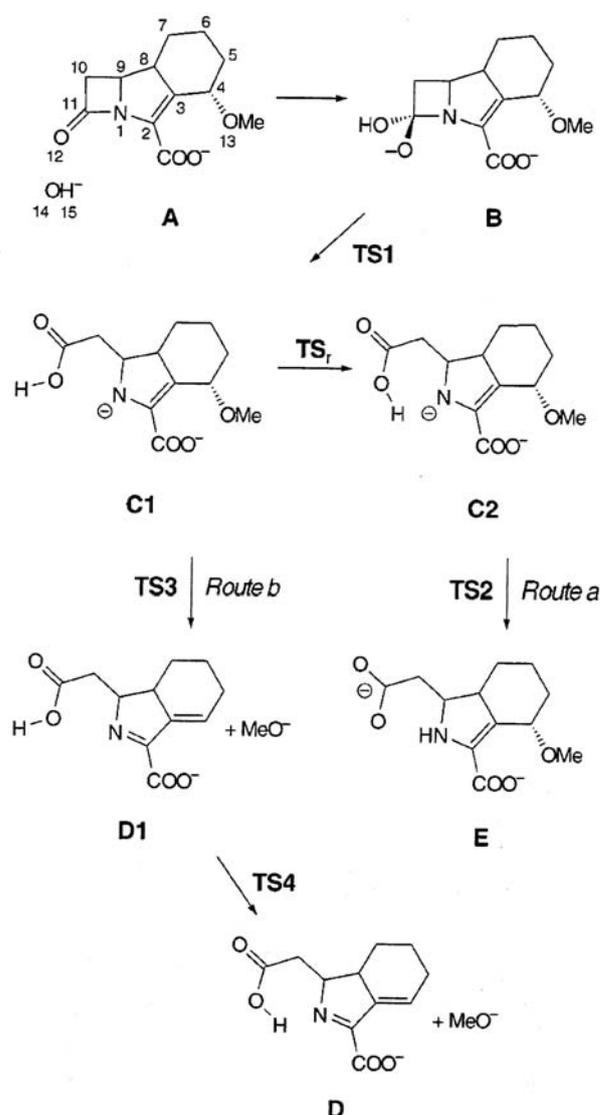


Figura 16 - Representação esquemática da rota de degradação alcalina de trinemas. Rota a (*Route a*) - transferência de próton ao anel β -lactâmico. Rota b (*Route b*) - clivagem do anel β -lactâmico com eliminação de cadeia lateral por rearranjo de elétrons (FASOLI e FRAU, 2005).

A estabilidade dos compostos carbapenêmicos vem sendo estudada com mais frequência em situações que mimetizam as condições utilizadas na rotina clínica, como avaliação da estabilidade em soluções de infusão, em diferentes bolsas de infusão e em diferentes condições de armazenamento, bem como a avaliação da compatibilidade dos antibióticos com outros fármacos comuns na terapêutica. Recentemente, houve um acréscimo no número de trabalhos publicados voltados à determinação de produtos de degradação das carbapenemas, com separação e identificação dos mesmos em amostras degradadas.

Alguns trabalhos descrevem o comportamento do antibiótico carbapenêmico imipenem em condições de degradação. A cinética de degradação deste fármaco, em solução de cloreto de sódio a 0,9% e em soro humano, foi estudada submetendo-se as amostras a diferentes temperaturas de armazenamento. Os resultados indicaram que este antibiótico, em solução salina, à concentração de 2,5 mg/mL, segue uma degradação de primeira ordem, apresentando um tempo de meia-vida de 2 horas a 37 °C. Em soro humano, na concentração de 100 µg/mL, o imipenem também apresentou uma degradação de primeira ordem, com um tempo de meia-vida de 10 horas a 37 °C. Os cálculos de inclinação das curvas de degradação indicaram uma energia de ativação em torno de 17 kcal/mol, valor característico de reações de hidrólise, sugerindo clivagem do anel β -lactâmico (SWANSON *et al.*, 1986).

Em estudo de avaliação da estabilidade do imipenem em solução aquosa submetida à decomposição catalisada por ácido ou base, determinou-se a cinética de degradação deste antibiótico nestas condições, bem como a provável via de degradação ácida e básica. Para obtenção das curvas cinéticas, foram preparadas soluções a pH 4,0 ou pH 9,0 fazendo uso de tampão 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) e tampão 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS) em diferentes concentrações molares. Os resultados de cinética de degradação demonstraram extensa decomposição deste antibiótico em intervalo de algumas horas. Uma solução de imipenem a 20 mg/mL, em pH 4,0, apresentou uma taxa de degradação de 90% após 3 horas de armazenamento a 20 °C. Para avaliação dos produtos de degradação, soluções aquosas deste antibiótico à concentração de 20 mg/mL ou 2 mg/mL foram tratadas com ácido sulfúrico até pH 4,0 ou com hidróxido de sódio até

pH 9,0, sendo armazenadas por 2 horas a 20 °C. A avaliação dos produtos de degradação permitiu a observação de diferentes rotas de degradação, dependendo do tratamento aplicado à amostra. Embora diferentes produtos tenham sido identificados, dependendo da via de degradação, tem destaque a formação do produto de degradação de anel β -lactâmico rompido e do derivado dimérico (Figura 17) (SMITH *et al.*, 1990).

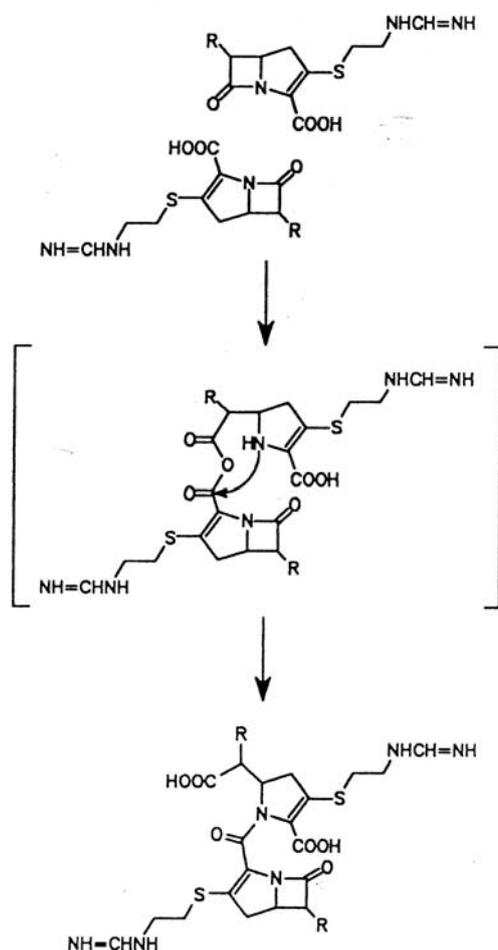


Figura 17 - Rota de degradação do imipenem, levando à formação de um produto dimérico (SMITH *et al.*, 1990).

Em trabalho referente à identificação, por LC-MS, de produtos de degradação de um novo composto com núcleo carbapenêmico, altamente ativo e que se encontra em fase de testes (ZHAO *et al.*, 2002), foram relatadas algumas prováveis rotas de degradação. Além da abertura do anel β -lactâmico, este trabalho descreveu

a formação de um composto dimérico a partir de uma reação nucleofílica entre o grupamento ácido e a carbonila do anel β -lactâmico (Figura 18).

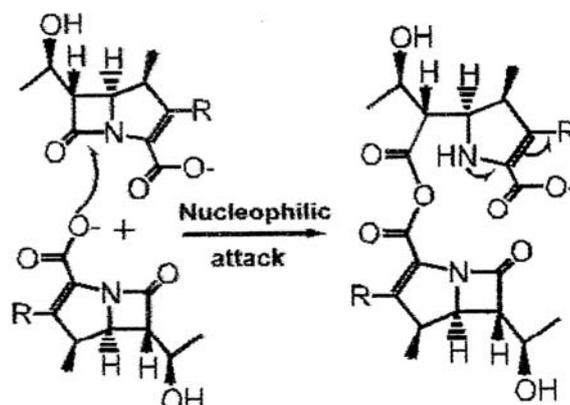


Figura 18 - Reação de degradação de um composto carbapenêmico, levando à formação de um produto dimérico (ZHAO *et al.*, 2002).

Recentemente, em trabalho de desenvolvimento de um método voltamétrico para detecção do metabólito primário do imipenem, é descrita a possibilidade de ocorrer um rearranjo tautomérico (Figura 19) na molécula deste metabólito, que tem a mesma estrutura do produto de degradação de anel β -lactâmico rompido (HILALI *et al.*, 2005). Neste mesmo trabalho, é observada a formação do referido produto de degradação após preparo de solução aquosa do imipenem em concentração de 10^{-3} M e estocagem por 2 horas a temperatura ambiente.

O derivado carbapenêmico panipenem tem sido investigado quanto a sua estabilidade em solução aquosa. Em solução a pH 5,0, e estocado a 40 °C, o panipenem sofre degradação seguindo uma cinética de primeira ordem. O mesmo perfil de cinética química é observado em outros valores de pH, embora uma degradação menos acentuada seja observada a pH 8,0 (ITO *et al.*, 2005). A literatura descreve que o panipenem pode estar em duas formas isoméricas, isômero *Z* (cis) e isômero *E* (trans) (Figura 20). O processo de isomerização é influenciado pelo pH. Em solução aquosa a pH ácido, é observada uma isomerização em menor velocidade, enquanto em soluções a pH alcalino, a reação de isomerização ocorre rapidamente. Partindo do panipenem em qualquer forma

isomérica, o preparo de soluções aquosas deste derivado leva à isomerização. Com o tempo, o equilíbrio de concentração das formas isoméricas na solução é alcançado (ITO *et al.*, 2005a).

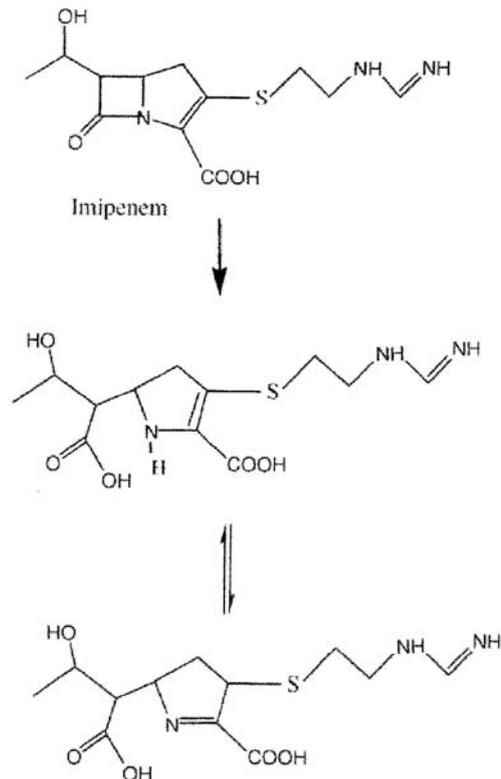


Figura 19 - Representação esquemática do rearranjo tautomérico do metabólito de anel β -lactâmico rompido oriundo do imipenem (HILALI *et al.*, 2005).

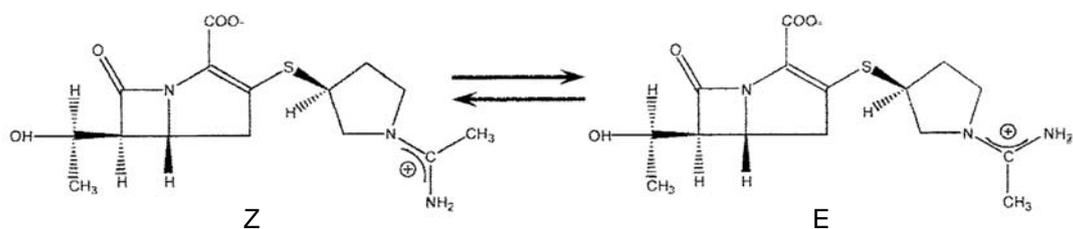


Figura 20 - Representação esquemática das estruturas isoméricas (configuração Z e configuração E) do panipenem (ITO *et al.*, 2005a).

Com relação ao derivado carbapenêmico ertapenem, a literatura descreve um trabalho específico de isolamento e caracterização de seus produtos de degradação diméricos. A formação dos produtos de degradação é facilitada em solução aquosa concentrada do ertapenem. A separação e o isolamento dos produtos ocorreram por cromatografia líquida de alta eficiência do tipo preparativa com eluição por gradiente. As frações contendo os produtos diméricos eram coletadas e, usando gelo seco, imediatamente congeladas devido à instabilidade a temperatura ambiente. Previamente à liofilização, as frações de alguns produtos eram submetidas à vácuo em evaporador rotatório para eliminação da acetonitrila oriunda do sistema eluente cromatográfico. Os produtos liofilizados eram então identificados através de análise por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. A Figura 21 ilustra a estrutura dos principais produtos de degradação diméricos do ertapenem. A análise destas estruturas permite a observação de que a formação dos dímeros ocorre, na grande maioria dos casos, a partir da reação entre os grupamentos carboxila e amina presentes no ertapenem e em seu derivado de anel β -lactâmico rompido (SAJONZ *et al.*, 2001).

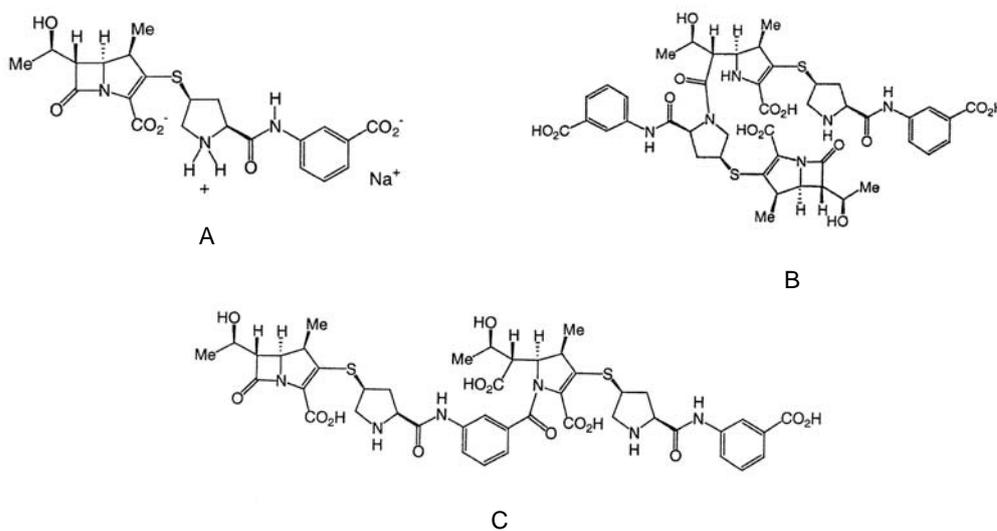


Figura 21 - Representação esquemática dos produtos de degradação do ertapenem (A). Produtos diméricos (B e C) (SAJONZ *et al.*, 2001).

Um estudo recente de desenvolvimento de um método por cromatografia líquida de alta eficiência do tipo preparativa para recuperação do ertapenem no processo de cristalização descreveu a estrutura de alguns produtos de degradação e impurezas de síntese. Destacam-se os produtos oriundos da hidrólise do anel β -

lactâmico rompido e da metanólise do mesmo anel (Figura 22) (SAJONZ *et al.*, 2006a).

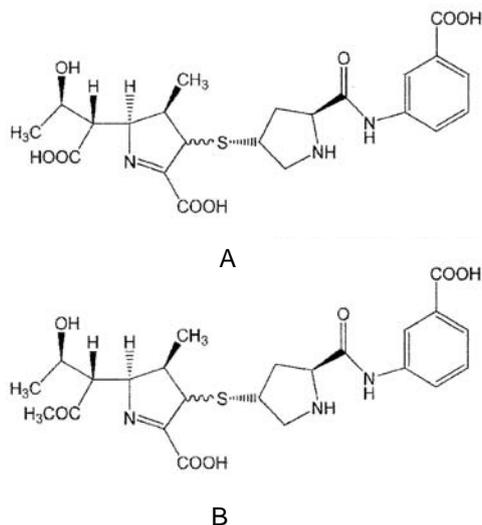


Figura 22 - Representação esquemática de produtos de degradação do ertapenem. Produto de anel β -lactâmico rompido (A) e da metanólise do mesmo anel (B) (SAJONZ *et al.*, 2006a).

SAJONZ e colaboradores (2006) desenvolveram também um método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de impurezas e produtos de degradação do ertapenem na matéria-prima. Soluções da matéria-prima foram preparadas e estocadas em diferentes condições de degradação, incluindo tratamento com ácido a pH 3,7, tratamento com base a pH 9,0 e tratamento com agente oxidante (peróxido de hidrogênio). Além disso, o ertapenem na forma sólida foi submetido à degradação forçada, através da exposição aos fatores de degradação temperatura (125 °C) e luz (luz ultravioleta). Dentre as impurezas e produtos de degradação detectados na análise cromatográfica, tem destaque o produto de anel β -lactâmico rompido, o produto oriundo de etanolise do mesmo anel, o produto dimérico e a cadeia lateral do ertapenem denominada ácido benzóico meta-amino prolina (Figura 23). Estes compostos foram detectados em todas as condições de degradação utilizadas no estudo.

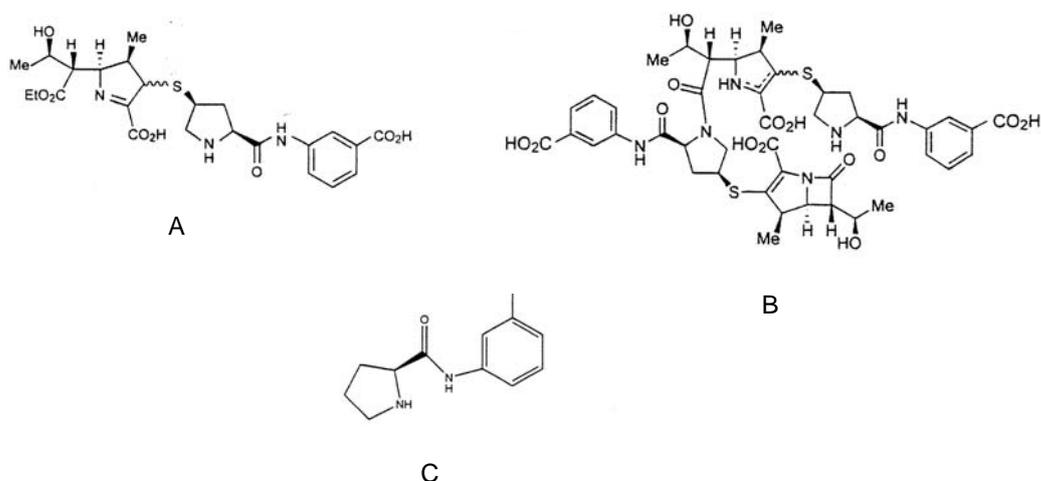


Figura 23 - Representação esquemática de produtos de degradação do ertapenem. Produto de etanolise do anel β -lactâmico rompido (A), produto dimérico (B) e cadeia lateral rompida (C) (SAJONZ *et al.*, 2006).

Neste mesmo trabalho, alguns produtos de degradação foram isolados. O derivado dimérico foi isolado por cromatografia líquida de alta eficiência do tipo preparativa. Após coleta do composto, a amostra foi submetida à evaporação em evaporador rotatório para eliminação da acetonitrila, componente da fase móvel. A solução aquosa restante foi tratada por liofilização. Quanto ao produto de anel β -lactâmico, seu isolamento envolveu o tratamento do ertapenem com solução de hidróxido de sódio, e posterior liofilização da solução degradada (SAJONZ *et al.*, 2006).

A estabilidade do ertapenem reconstituído em diferentes fluidos de infusão tem sido avaliada. Em solução de Ringer e cloreto de sódio 0,9%, reconstituído a concentração de 10 mg/L e 20 mg/L e mantido a 4 °C em bolsas de infusão de PVC (cloreto de polivinila), este antibiótico se manteve estável por até 72 horas. Quando estocado a 25 °C, a solução reconstituída do ertapenem, naquelas condições, deverá ser administrada num tempo máximo de 6 horas (MCQUADE *et al.*, 2004).

Recentemente, foi descrito um trabalho de avaliação da estabilidade do ertapenem em solução aquosa, em condição de pH variando de 0,42 a 12,5. Para obtenção dos diferentes valores de pH, foram utilizadas soluções de tampão fosfato,

acetato e borato, além de hidróxido de sódio e ácido clorídrico. As soluções finais do antibiótico, em concentração de 0,2 mg/mL, foram estocadas a temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. A maior estabilidade do ertapenem em solução aquosa foi observada na faixa de pH entre 5,0 e 6,0. O estudo termodinâmico e cinético permitiu classificar as reações de catálise ácido-base envolvidas, diferenciando a hidrólise do ertapenem catalisada por íons hidrogênio e por íons hidróxido (ZAJAC *et al.*, 2007).

3.2.3 Estabilidade e produtos de degradação do meropenem

Alguns estudos sobre a estabilidade do meropenem estão relatados na literatura. TAKEUCHI e colaboradores (1993) descreveram o desenvolvimento de formulação sólida deste antibiótico, contemplando diversos aspectos relacionados à sua estabilidade. Observou-se que o meropenem na forma triidratada forma uma estrutura cristalina, com ligações de hidrogênio intramoleculares, resultando em uma fase sólida com excelente estabilidade. Quando a água de cristalização é removida por tratamentos físicos, como secagem e pulverização, a estrutura sólida é desorganizada, com transformação do cristal triidratado em um pó amorfo, resultando em uma fase sólida instável.

Neste mesmo trabalho, verificou-se a estabilidade térmica do produto liofilizado quando o meropenem se encontrava no estado amorfo, como base livre ou como sal. Os resultados indicam uma acentuada instabilidade do antibiótico em ambas as situações, o que reforça a maior estabilidade da forma cristalina triidratada. A influência da adição do carbonato de sódio anidro no estudo de estabilidade térmica da formulação também foi investigada. O meropenem na forma triidratada foi misturado a este adjuvante, até uma dose final de 500 mg, e exposto por 24 horas a diferentes condições de umidade relativa: 11%, 22%, 33% e 44%. Os resultados indicaram que a mistura com carbonato de sódio anidro é estável em temperatura ambiente, em condição de umidade relativa de até 40%, não acarretando em comprometimento do produto final (TAKEUCHI *et al.*, 1993).

Um outro trabalho descreve a estabilidade do meropenem em solução aquosa, avaliando a influência do pH da solução e da temperatura. Os autores verificaram que o meropenem, assim como outros β -lactâmicos, apresenta maior

estabilidade em condições neutras do que ácidas ou alcalinas. Foram preparadas soluções deste antibiótico em tampão fosfato monobásico 0,224M, tampão ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico 0,1 M e tampão ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico 0,1M. Os resultados demonstraram uma acentuada degradação do meropenem em pH 4,1 a 25 °C, com redução de teor de aproximadamente 15% após 24 horas. Em pH 8,0, na mesma temperatura e tempo de estocagem, verificou-se uma redução de teor de aproximadamente 7% (TAKEUCHI *et al.*, 1995).

Neste mesmo estudo, TAKEUCHI e colaboradores (1995) descrevem a detecção de um produto de degradação formado pelo rompimento do anel β -lactâmico, uma reação comum nos antibióticos β -lactâmicos. Este produto é idêntico ao principal metabólito do meropenem, o UK-1a (Figura 7), descrito por alguns autores (BALLARD *et al.*, 1996; ROBATEL *et al.*, 2002). A formação deste produto também foi verificada pelo tratamento do antibiótico com hidróxido de sódio 1,0 M por 15 minutos (BALLARD *et al.*, 1996).

A degradação básica do meropenem também foi realizada por MENDEZ e colaboradores (2003), que submeteram a solução aquosa do fármaco ao tratamento com hidróxido de sódio 0,02 M por 10 minutos, como descrito no item 3.1.6. A degradação forçada levou à formação de um produto de degradação, detectado por CLAE (Figura 8), porém não identificado.

A compatibilidade do meropenem com outros fármacos injetáveis foi avaliada em estudo desenvolvido por PATEL (1996). Foram preparadas três concentrações do meropenem em cloreto de sódio 0,9%: 1,0 mg/mL, 20,0 mg/mL e 50,0 mg/mL. Os outros fármacos testados foram reconstituídos ou diluídos em água para injeção. A mistura do meropenem com os mesmos foi realizada em bolsas de cloreto de polivinila, as quais foram armazenadas em temperatura ambiente sob luz fluorescente. Os resultados demonstraram haver compatibilidade do meropenem com a maioria dos fármacos testados, dentre eles furosemida, metronidazol, metoclopramida, ranitidina, vancomicina, morfina, heparina, dexametasona e anfotericina B. Nas misturas contendo meropenem a 50 mg/mL foi observada incompatibilidade com diazepam, doxiciclina, gluconato de cálcio e zidovudina, misturas estas que apresentaram precipitação ou alteração de coloração após 30 minutos. Na concentração de 1,0 mg/mL, o meropenem foi incompatível com uma

solução de multivitaminas, sendo observada a formação de coloração amarelo-escura após 4 horas. Na concentração de 20,0 mg/mL houve incompatibilidade com os injetáveis aciclovir, doxiciclina e zidovudina. De modo geral, os resultados indicam a possibilidade de administração concomitante do antibiótico meropenem com outros injetáveis sem prejuízo da terapia.

PATEL e COOK, em 1997, realizaram um estudo para determinar a estabilidade do meropenem em diferentes fluidos de infusão, tais como água estéril para injeção, cloreto de sódio a 0,9%, solução de dextrose para injeção a 5%, solução de manitol para injeção a 2,5% e solução de Ringer. Os diversos fluidos de infusão, contendo o antibiótico em diferentes concentrações, foram armazenados em bolsas de cloreto de polivinila, nas temperaturas de 4 °C e 25 °C. Verificou-se uma maior estabilidade do meropenem na menor temperatura. Além disso, observou-se uma menor degradação do antibiótico quando o mesmo se encontrava na menor concentração. Por exemplo, quando reconstituído em água estéril para injeção a uma concentração de 50 mg/mL e armazenado a 25 °C, apresentou uma degradação de 10% após 8 horas. Na concentração de 2,5 mg/mL, nas mesmas condições, a mesma degradação de 10% somente foi observada após 24 horas. Quanto aos fluidos de infusão, foi verificada uma maior estabilidade em água estéril para injeção, cloreto de sódio a 0,9% e solução de Ringer.

Atualmente, a estabilidade do meropenem em diferentes fluidos de infusão, bem como sua compatibilidade em misturas com outros fármacos injetáveis, estão relatadas em literatura específica para medicamentos injetáveis (TRISSEL, 2003).

A acentuada instabilidade do meropenem reconstituído, em temperatura ambiente, levou os pesquisadores a trabalharem na possibilidade de que este antibiótico fosse mantido, durante a infusão, sob refrigeração. Para tal, testaram a sua estabilidade em cassetes portáteis resfriados por um dispositivo do tipo “gel frozen” e conectados à bomba de infusão, garantindo um armazenamento em temperatura inferior a 5 °C. Em concentração de 20 mg/mL e 30 mg/mL, o teor do antibiótico foi mantido por um período de até 24 horas, tornando mais segura a administração por infusão (GRANT *et al.*, 2000).

Em trabalho recente, JARURATANASIRIKUL e SRIWIRIYAJAN (2003) avaliaram a estabilidade do meropenem após reconstituição em solução salina e armazenamento em temperatura ambiente. Soluções de meropenem em concentração de 5 mg/mL foram armazenadas em ambiente climatizado, a 20 °C, por um tempo de 8 horas, ou em ambiente sem climatização, em temperatura variando entre 32 °C e 37 °C, pelo mesmo período. As soluções foram monitoradas durante o armazenamento, com coleta nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas. Os resultados indicaram uma maior degradação na maior temperatura, com redução de teor chegando a 11,85% após 8 horas, enquanto, nas amostras armazenadas em 25 °C, verificou-se uma redução de teor de 5,8 % após o mesmo período. Estes resultados estão de acordo com os dados relatados na literatura, confirmando a instabilidade deste antibiótico quando em solução.

Recentemente, foi disponibilizado na literatura um estudo de avaliação da estabilidade do meropenem em bolsas de cloreto de polivinila e dispositivo elastomérico de infusão, complementando os dados relatados até então. O meropenem foi reconstituído em água estéril para injeção e misturado com cloreto de sódio a 0,9% até as concentrações de 4,0 mg/mL, 10,0 mg/mL e 20,0 mg/mL. Estas soluções foram dispostas nos recipientes selecionados para avaliação da estabilidade e mantidas sob refrigeração a 5 °C por até 7 dias. As soluções de meropenem a 4,0 mg/mL mantiveram seu teor acima de 90% por até 7 dias nos dois dispositivos testados. Nas concentrações de 10,0 e 20,0 mg/mL, a degradação mostrou-se mais acelerada, com o teor sendo mantido acima de 90% até 5 dias de armazenamento. Não foram observadas diferenças de comportamento do fármaco quando armazenado nos diferentes dispositivos testados (SMITH *et al.*, 2004).

Em estudo de avaliação da farmacocinética do meropenem em pacientes portadores de fibrose cística, a estabilidade deste derivado foi estudada na condição utilizada na clínica, no momento da infusão. O antibiótico reconstituído foi disposto em bomba de infusão portátil, a qual foi mantida em dispositivos resfriados, para conservação da preparação durante a infusão. A determinação da estabilidade envolveu a análise quantitativa, por cromatografia líquida de alta eficiência, de amostras imediatamente reconstituídas e amostras coletadas após o intervalo de infusão (12 a 16 horas). Os resultados indicaram que a estabilidade do meropenem

foi mantida durante a infusão nas condições de estocagem utilizadas (KUTI *et al.*, 2004).

Os produtos de degradação ou impurezas de polimerização são comuns aos derivados β -lactâmicos. Tais produtos também foram descritos para o meropenem. A reação de polimerização foi relatada em estudo específico para avaliação de produtos de degradação poliméricos. A amostra sólida do meropenem foi exposta a 60 °C e 75% ou 90% de umidade relativa, de modo a forçar a degradação e levar a formação dos produtos de interesse. Através de ensaio cromatográfico por gel filtração, foi possível detectar alguns compostos poliméricos. Uma análise concomitante por cromatografia líquida acoplada a detector de espectrometria de massas também foi efetuada para fins comparativos. Para este método cromatográfico, utilizou-se eluição do tipo gradiente para permitir a separação dos produtos. Os produtos de degradação poliméricos do meropenem são formados pela reação entre a carbonila do anel β -lactâmico e a amina do anel pirrolidínico presente na cadeia lateral de sua estrutura. A Figura 24 ilustra os compostos poliméricos oriundos da degradação do meropenem (CAI e HU, 2005).

Um estudo preliminar de estabilidade térmica do antibiótico meropenem como produto reconstituído foi desenvolvido por MENDEZ e colaboradores (2005). As amostras foram preparadas em água estéril à concentração de 50 mg/mL e armazenadas, em seu frasco original, nas temperaturas de 25 °C e 40 °C, por um período de 48 horas. Alíquotas foram coletadas em intervalos de 12 horas e analisadas por CLAE, espectrofotometria na região do UV e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar- cilindros em placas. Os resultados deste estudo indicaram uma acentuada instabilidade do meropenem nas condições estabelecidas, com uma redução de teor de aproximadamente 56% a 25 °C e 88% a 40 °C, após 48 horas. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a detecção de produtos de degradação, como ilustrado na Figura 25. Estes produtos parecem ser ausentes de atividade antimicrobiana, tendo em vista que a análise microbiológica das amostras degradadas resultou em um perfil de degradação semelhante ao observado por CLAE (Figura 26).

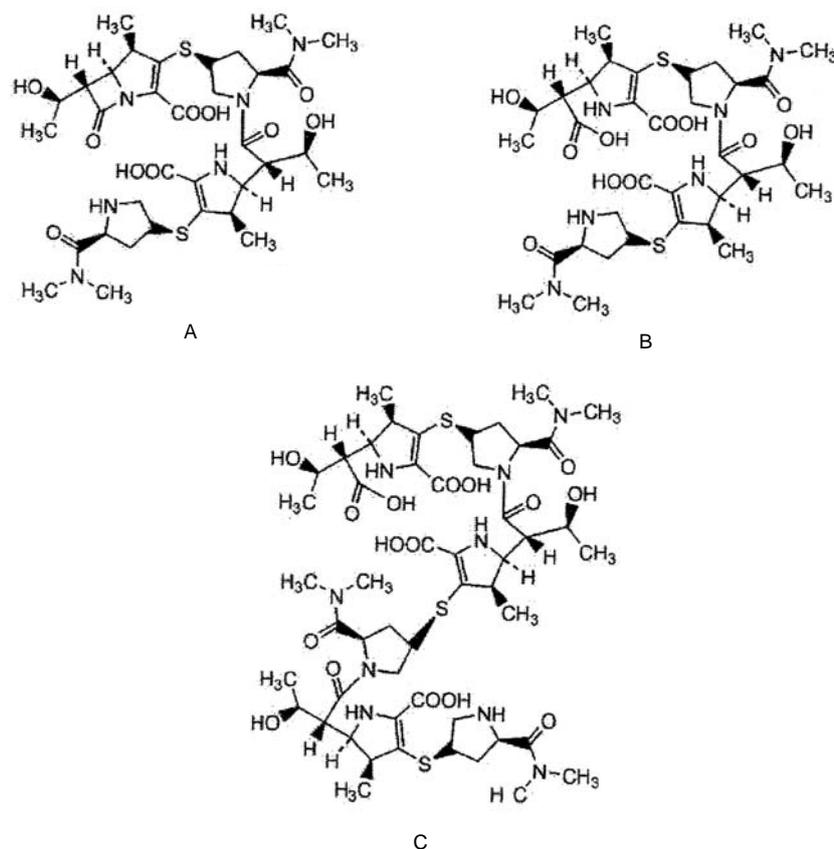


Figura 24 - Representação esquemática de produtos poliméricos oriundos da degradação do meropenem. Composto dimérico de anel β -lactâmico fechado (A), composto dimérico de anel β -lactâmico aberto (B), composto trimérico (C) (CAI e HU, 2005).

Como mencionado anteriormente, MENDEZ e colaboradores (2003) detectaram por CLAE alguns produtos de degradação do meropenem formados a partir de condições de degradação forçada. Como descrito no item 3.1.6, o armazenamento de uma solução aquosa deste antibiótico à 70 °C por 1,5 hora levou à formação de um produto de degradação detectado na corrida cromatográfica (Figura 8). Os tempos de retenção dos compostos de degradação ilustrados na Figura 8 se assemelham ao observado para um dos produtos de degradação descritos no trabalho especificado no parágrafo anterior (Figura 25) (MENDEZ *et al.*, 2005).

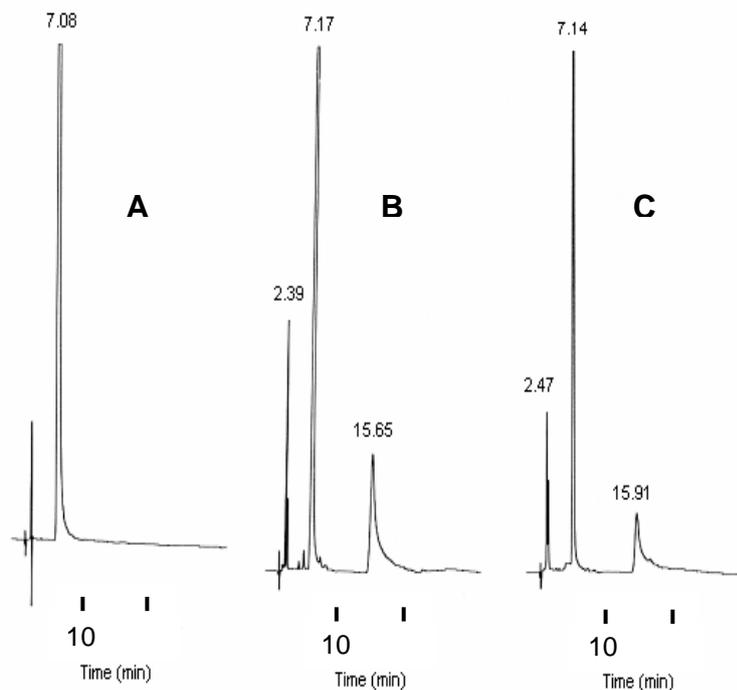


Figura 25 - Cromatogramas representativos da análise do meropenem reconstituído em água, submetido à degradação à 25 °C (B) e 40 °C (C) por 48 horas. Observação de produtos de degradação nos tempos de retenção aproximados de 2,40 e 15,90 minutos (B e C). Amostra não degradada (A), com detecção do meropenem em 7,0 minutos (MENDEZ *et al.*, 2005).

Como complementação dos dados de estabilidade descritos em trabalhos científicos, algumas informações fornecidas, em bulário, pelas empresas produtoras da formulação do antibiótico podem ser destacadas. Para as apresentações de Meronem[®], de Meroxil[®] e de Mepenox[®], o produto reconstituído em água a 50 mg/mL tem período de estabilidade de 8 horas à 15-25 °C ou de 48 horas à 4 °C. Junto a outros fluidos de infusão, a estabilidade é variável. Para as apresentações de meropenem - medicamento genérico, o período de estabilidade recomendado para a formulação reconstituída em água a 50 mg/mL é de 8 horas à 15-30 °C ou de 48 horas à 2-8 °C (ASTRAZENECA, 2004; BIOCHIMICO, 2005; EUROFARMA, 2005; QUÍMICA HALLER, 2005).

Quanto à estabilidade da formulação sólida, tal qual é comercializada, as empresas produtoras apresentam diferenças na indicação do prazo de validade. Para o Meronem[®], é informado um prazo de 3 anos, enquanto para os outros produtos comerciais, o prazo de validade recomendado é de 2 anos. As preparações devem ser conservadas em temperatura que não ultrapasse 25 °C

(ASTRAZENECA, 2004; BIOCHIMICO, 2005; EUROFARMA, 2005; QUÍMICA HALLER, 2005).

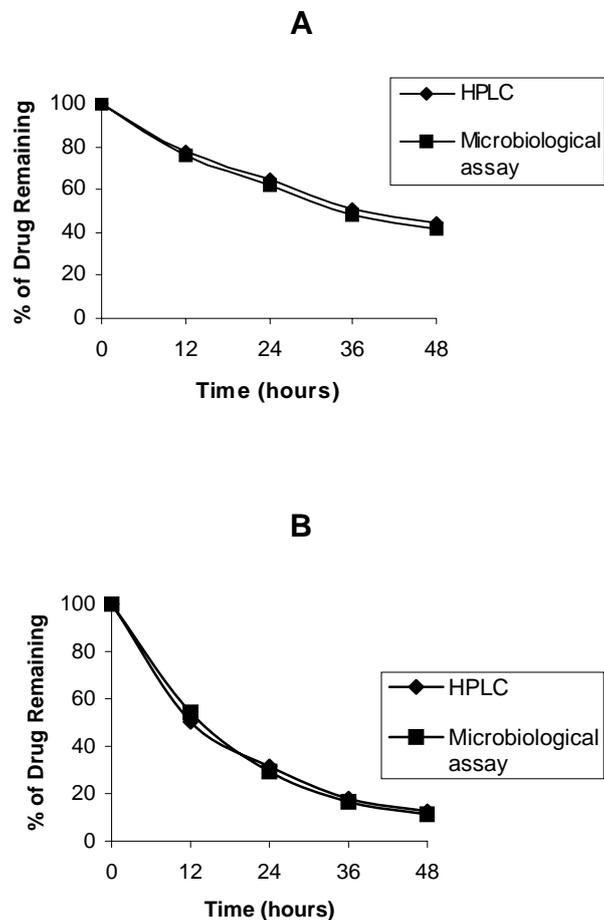


Figura 26 - Perfil de degradação do meropenem reconstituído em água (50 mg/mL) e armazenado a 25 °C (A) e a 40 °C (B). Análise por CLAE e ensaio microbiológico (MENDEZ *et al.*, 2005).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 AMOSTRAS DE TRABALHO

4.1.1 Substância Química de Referência (SQR)

Meropenem triidratado¹ (lote E-026), com teor estimado em 100,40% (equivalente a 88,40% de meropenem anidro), conforme especificado pelo certificado de análise.

Meropenem triidratado² (lote F0C201), com teor estimado em 99,98% como base anidra, conforme especificado pelo certificado de análise.

4.1.2 Amostra comercial

Frascos-ampola³ contendo 570 mg de meropenem triidratado como pó estéril para solução injetável (equivalente a 500 mg de meropenem anidro). Composição da formulação: 570 mg de meropenem triidratado, 104 mg de carbonato de sódio anidro.

Solução reconstituída⁴, em concentração equivalente a 50 mg/mL de meropenem anidro, obtida através da reconstituição do conteúdo de cada frasco-ampola em 10 mL de água desionizada.

¹ Gentilmente fornecido pela Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd. (Osaka, Japão).

² SQR especificação USP (United States Pharmacopeia – USP *standard reference*), gentilmente cedido pela AstraZeneca do Brasil.

³ Adquirido comercialmente. Nome comercial: Meronem® (AstraZeneca).

⁴ Produto reconstituído conforme recomendação do fabricante.

4.2 SELEÇÃO DOS FATORES DE DEGRADAÇÃO

4.2.1 Metodologia

4.2.1.1 Degradação térmica

Experimentos de degradação térmica do meropenem foram desenvolvidos através da exposição da amostra comercial deste antibiótico, na forma de pó para solução injetável e como solução reconstituída, a diferentes temperaturas de estocagem. As amostras degradadas foram monitoradas quanto ao teor e à formação de produtos de degradação. A exposição ao calor ocorreu em estufa de ar circulante De Leo[®].

Para a solução reconstituída, amostras, em triplicata, foram expostas à temperatura de 40 °C. Durante a exposição ao calor, alíquotas das amostras degradadas foram coletadas nos tempos de estocagem 0, 12, 18 e 24 h, e analisadas através do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

A degradação térmica do meropenem na forma pó para solução injetável foi avaliada através da exposição à temperatura de 80 °C. Nestes experimentos, as amostras foram expostas ao calor nos frascos em que são comercializadas. Para fins de teste, estas amostras, em triplicata, foram submetidas à degradação em frascos-ampola abertos. A avaliação da estabilidade foi efetuada através da análise do produto degradado, em diferentes tempos de estocagem (0, 10, 20 e 30 dias), por cromatografia líquida alta eficiência.

4.2.1.2 Degradação por catálise ácida e básica

Para a degradação das amostras, soluções dos agentes degradantes foram obtidas a partir de ácido clorídrico concentrado (Nuclear) e de hidróxido de sódio p.a. (Quimex). O preparo destes agentes foi efetuado com água ultrapura obtida de sistema de ultrapurificação (Filtrosul, Modelo Meta III).

A partir da amostra comercial de meropenem, foram preparadas soluções do antibiótico em concentração de 1,0 mg/mL. Para o preparo destas soluções, foram

pesadas quantidades exatas de meropenem, as quais foram transferidas para balões volumétricos apropriados à diluição requerida. O preparo das soluções foi efetuado diretamente com as soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, ambos nas concentrações molares de 0,1 M.

Depois de prontas, as amostras, em triplicata, foram estocadas em estufa de ar circulante (De Leo®) a 25 °C, sendo efetuadas coletas nos tempos 0, 5, 10, 15, 30 e 60 min. As amostras degradadas foram analisadas quanto ao teor e à formação de produtos de degradação, através do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2.1.3 Análise por CLAE

A avaliação cromatográfica foi realizada nas condições descritas em trabalho recente (MENDEZ, 2003; MENDEZ *et al.*, 2003), referente à validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise quantitativa do meropenem na forma farmacêutica.

4.2.1.3.1 Condições cromatográficas

Fosfato de potássio monobásico grau analítico (Synth), acetonitrila grau analítico para CLAE (Tedia), ácido orto-fosfórico grau analítico (Merck) e água ultrapura foram utilizados na composição da fase móvel. Para filtração, empregaram-se membranas de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro (MFS). O pH desta solução eluente foi medido em pHmetro DIGIMED, modelo DM-20.

Utilizou-se um sistema cromatográfico por técnica de fase reversa, com eluição do tipo isocrática. A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 30 mM e acetonitrila, na proporção 90:10 (v/v), respectivamente, e acidificada com ácido orto-fosfórico a pH 3,0. A desgaseificação da fase móvel foi efetuada com auxílio de gás hélio.

O desenvolvimento do método cromatográfico foi efetuado em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu, com controlador de sistema SCL-10A, bomba LC 10 AD, auto-injetor SIL-10AD, forno da coluna CTO-10AC, e detector DAD (dyode

array detector) SPD-M10A (Shimadzu, Kioto, Japan). Utilizou-se a coluna cromatográfica Metachem[®] LC RP-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m).

A Tabela 2 descreve resumidamente as condições cromatográficas utilizadas na análise do meropenem.

Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas na análise do meropenem por CLAE.

Característica	Descrição
Fase móvel	Tampão fosfato monobásico 30 mM: acetonitrila (90:10), acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico
Coluna	Metachem [®] LC RP-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m)
Fluxo de eluição	1,0 mL/min
Comprimento de onda	298 nm e 220 nm
Volume de injeção	20 μ L

4.2.1.3.2 Preparo das amostras

Para a análise quantitativa das amostras submetidas à degradação térmica e à degradação por meio ácido e básico, as mesmas foram diluídas até uma concentração teórica de meropenem de 100 μ g/mL. Preparou-se, também, uma solução de meropenem SQR equivalente a 100 μ g/mL de meropenem anidro. Para fins de análise qualitativa dos produtos de degradação, as amostras submetidas à degradação térmica foram diluídas até uma concentração teórica de meropenem de 500 μ g/mL e 1000 μ g/mL para a solução reconstituída e para a forma sólida, respectivamente.

Para o preparo da SQR e diluição das amostras degradadas em calor, foi utilizada água ultrapura, obtida a partir de sistema de ultrapurificação (Filtrosul, Modelo Meta III). No caso da degradação em meio ácido e em meio básico, as amostras foram diluídas nos respectivos meios. Todas as soluções foram filtradas em filtro Millex (Millipore). As diluições foram efetuadas fazendo uso de vidraria volumétrica.

A solução SQR e as amostras degradadas, depois de prontas, foram analisadas em duplicata.

4.2.2 Resultados e discussão

O estudo de estabilidade se inicia com a seleção dos fatores de degradação que devem ser utilizados para os ensaios. Esta escolha deve considerar os objetivos de elucidação de produtos de degradação e de determinação dos mecanismos de decomposição, a serem efetuados posteriormente. Tais objetivos são contemplados em estudos de degradação forçada (REYNOLDS *et al.*, 2002).

Em geral, a degradação por estresse deve ser conduzida em condições que induzam a decomposição termolítica, hidrolítica, oxidativa e fotolítica. De fato, é recomendada a avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos aos fatores de degradação ácido/base, temperatura, umidade, oxidação e luz (REYNOLDS *et al.*, 2002; KLICK *et al.*, 2005). Dada a sua capacidade de acelerar as reações de degradação (NUDELMAN, 1975), a temperatura pode ser utilizada de modo concomitante a outros fatores.

Considerando os relatos da literatura, destacados nos itens 3.2.2 e 3.3.3, abordando a instabilidade dos derivados carbapenêmicos, e dos β -lactâmicos em geral, à temperatura e à decomposição em meio ácido e meio básico, partiu-se para a avaliação da influência destas condições na degradação do meropenem. Embora a degradação deste antibiótico em altas temperaturas fora avaliada preliminarmente por MENDEZ (2003), a influência deste fator na estabilidade da forma sólida, bem como na formação de produtos de degradação passíveis de isolamento, não foi contemplada no referido trabalho.

Para a decomposição térmica, as amostras de meropenem foram expostas em condições de estresse, tanto no estado sólido como na condição de solução reconstituída. O meropenem pó para solução injetável foi disposto em estufa em seus frascos originais, porém abertos. Considerando que sua embalagem primária de comercialização propicia um ambiente inerte a umidade, a sua exposição ao ambiente externo condiciona uma possível degradação. Além disso, a literatura

descreve a instabilidade do meropenem a ambientes de alta umidade relativa (TAKEUCHI *et al.*, 1993).

Para as amostras reconstituídas, a concentração final de 50 mg/mL procurou mimetizar a condição recomendada pelo fabricante. Embora trabalhos mais direcionados à clínica descrevam a estabilidade deste antibiótico como solução reconstituída para administração, o enfoque não contempla produtos de degradação e seu possível isolamento.

A Tabela 3 descreve o decaimento da concentração do antibiótico em função do tempo, para amostras reconstituídas. A temperatura de 40 °C leva a uma degradação extensa do fármaco, com a redução do teor em aproximadamente 60% após 24 horas. Este resultado reproduz aquele verificado por MENDEZ (2003), também relatado em trabalho de MENDEZ e colaboradores (2005). O perfil de degradação nesta condição também pode ser visualizado na Figura 27.

Tabela 3 - Valores de teor residual de meropenem (%) no produto reconstituído (50 mg/mL) submetido à degradação em temperatura de 40 °C.

Tempo (horas)	Teor residual de meropenem (%)*	CV%
Zero	100,00	3,10
12	57,53	2,44
18	49,16	2,46
24	40,19	4,28

* Valor médio. Resultado da análise de três amostras reconstituídas, sendo que cada uma foi determinada duas vezes por CLAE.

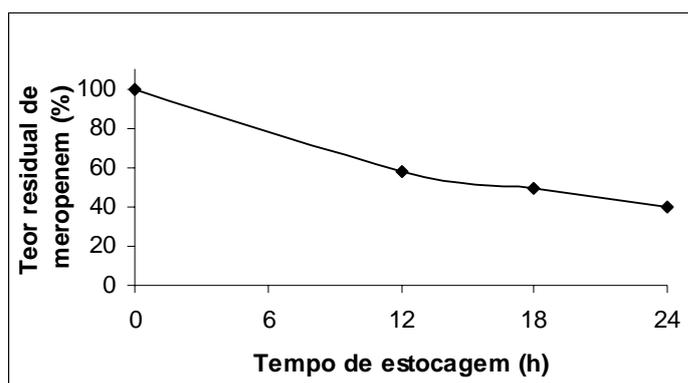


Figura 27 - Perfil de degradação do meropenem reconstituído em água (50 mg/mL) e armazenado a 40 °C. As amostras foram analisadas por CLAE.

Quanto aos produtos de degradação, a análise cromatográfica foi desenvolvida em equipamento com detector PDA (detector UV - rede de fotodiodos), o que possibilitou a observação criteriosa dos produtos formados em uma ampla faixa de comprimento de onda. A análise quantitativa foi efetuada em comprimento de onda de 298 nm, reproduzindo a condição de validação do método. Para observação dos produtos de degradação, o comprimento de onda de 220 nm foi utilizado em paralelo, visto que os produtos pareciam absorver com maior intensidade. Os espectros de absorção na região do UV, correspondentes aos picos cromatográficos, foram analisados preliminarmente, porém são abordados com maior ênfase durante a discussão do isolamento dos produtos de degradação.

Os cromatogramas ilustrados na Figura 28 permitem a observação de picos correspondentes a produtos de degradação com polaridades distintas. Em 20 minutos são visualizados picos correspondentes a produtos de degradação mais apolares. Por outro lado, no tempo de cerca de 3 a 4 minutos, produtos de degradação mais polares são eluídos, enquanto o meropenem é detectado no tempo de 7,8 minutos. Este perfil é observado nos dois comprimentos de onda trabalhados, embora em 220 nm a absorção dos produtos de degradação é mais acentuada. Num primeiro momento, estes produtos parecem de difícil isolamento por esta técnica, já que a degradação do meropenem parece gerar uma série de produtos de tempo de retenção muito próximo.

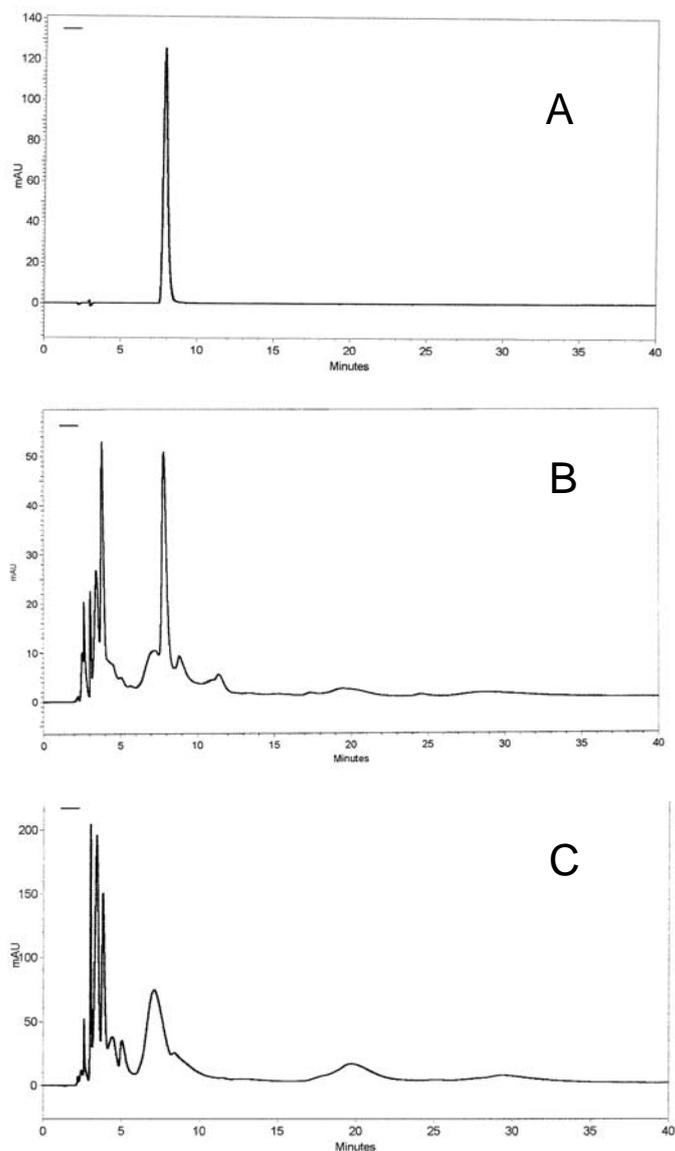


Figura 28 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 $\mu\text{g/mL}$ (A), e amostra reconstituída submetida a degradação térmica (40°C) por 24 horas e analisada a 500 $\mu\text{g/mL}$ (B e C). Detecção em 298 nm (A e B) e detecção em 220 nm (C). Meropenem detectado na faixa de 7,5 minutos (A), e produtos de degradação detectados na faixa de 3 a 4 minutos e na faixa de 20 minutos (B e C).

Levando em conta a importância do pH como teste de estabilidade a ser aplicado em produtos reconstituídos (BANSAL, 2002), as amostras reconstituídas foram analisadas quanto a esse parâmetro no momento da reconstituição e após o tempo máximo de estocagem. Os resultados estão ilustrados na Tabela 4, e indicam que o pH do produto reconstituído aumentou após a degradação, extrapolando os limites de especificação farmacopéica para o meropenem reconstituído (pH entre 7,3 e 8,3) (USP 29, 2006). Observou-se também que, à medida que a degradação se

acentuava, o produto reconstituído foi adquirindo coloração amarelo-pálida a castanho forte, porém manteve o aspecto de limpidez.

Tabela 4 - Valores de pH do meropenem como produto reconstituído (50 mg/mL) antes e após a degradação térmica à 40 °C por 24 horas.

Tempo de estocagem	pH*
Tempo zero	7,93
	7,85
	8,12
24 horas	8,42
	8,41
	8,39

* Resultados da análise de três soluções reconstituídas.

Na forma sólida, e a partir da exposição do antibiótico a temperatura de 80 °C, a Figura 29 destaca uma semelhança com a degradação da solução reconstituída. Entretanto, o perfil de degradação torna-se diferente quando se observa o tempo de exposição, de até 30 dias. Embora a temperatura seja um fator fundamental, a exposição da amostra ao ambiente externo pode ter sido fundamental para a degradação mais extensa do antibiótico. Conforme descrito na Tabela 5, o teor deste antibiótico situa-se na faixa de 40 % após 30 dias de exposição. É importante relatar a observação da mudança de coloração da formulação, a qual passou de uma coloração branca para amarelo-pardo, com crescente mudança de intensidade com o decorrer do tempo.

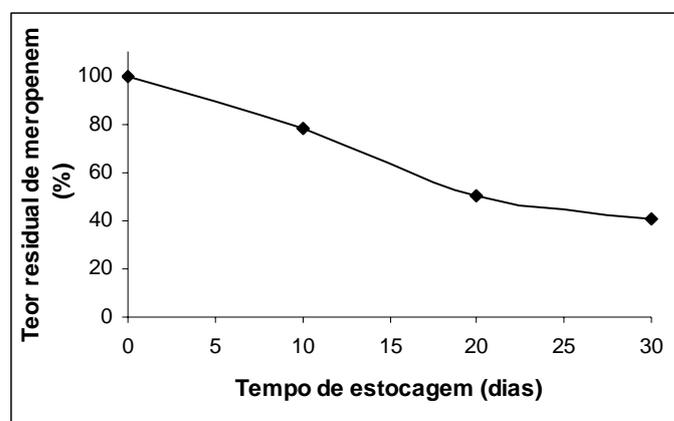


Figura 29 - Perfil de degradação do meropenem pó para solução injetável (500 mg) armazenado a 80 °C. As amostras foram analisadas por CLAE.

Tabela 5 - Valores de teor residual de meropenem (%) pó para solução injetável (500 mg) submetido à degradação em temperatura de 80 °C.

Tempo (dias)	Teor residual de meropenem (%)*	CV%
Zero	100,00	3,43
10	78,21	0,36
20	50,16	4,22
30	40,87	1,84

* Valor médio. Resultado da análise de três amostras sólidas, sendo que cada uma foi determinada duas vezes por CLAE.

Quanto à reprodutibilidade das análises quantitativas, o fato de as amostras serem dispostas para degradação em triplicata e de não serem misturadas durante o preparo das soluções de análise pode gerar uma variação incomum nas determinações analíticas. Esta diferença já é minimizada quando os resultados são expressos em termos de percentagem residual do fármaco. Isto é importante quando se leva em conta a possibilidade de haver diferença de teor entre diferentes unidades de um mesmo lote.

A análise cromatográfica das amostras degradadas de meropenem na forma sólida (Figura 30) sugere que a decomposição deste fármaco à temperatura, tanto como solução quanto no estado sólido, resulte na formação de produtos de degradação semelhantes. Embora com absorção bem menos intensa, estes produtos são melhor visualizados quando se observa o cromatograma referente à análise em 220 nm. A partir destes dados, é possível aplicar um estudo mais aprofundado de avaliação dos produtos formados por decomposição térmica e de possibilidade de purificação e isolamento por técnicas cromatográficas.

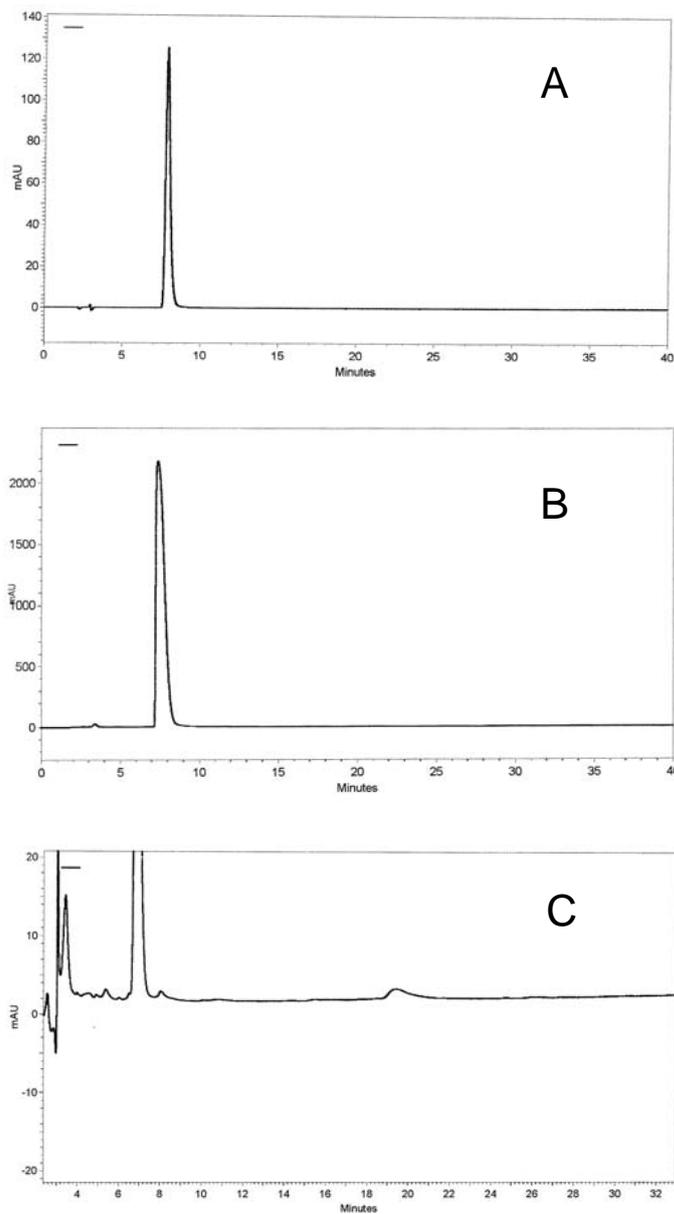


Figura 30 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 $\mu\text{g/mL}$ (A), e meropenem pó para solução injetável submetido a degradação térmica (80°C) por 30 dias e analisada a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (B e C). Detecção em 298 nm (A e B) e detecção em 220 nm (C). Meropenem detectado na faixa de 7,5 minutos (A e B), e produtos de degradação detectados na faixa de 3 a 4 minutos e na faixa de 20 minutos (C).

Na busca por potenciais fatores de degradação do meropenem, a instabilidade da estrutura β -lactâmica à hidrólise ácida e alcalina estimulou a avaliação destas condições (O'DONNELL e BOKSER, 2006). Para este antibiótico, a literatura relata um estudo sobre a sua estabilidade em solução, em diferentes valores de pH, inclusive com descrição de produtos de degradação formados em meio ácido e alcalino (TAKEUCHI *et al.*, 1995).

Freqüentemente, a reação de hidrólise é dependente do pH, ocorrendo a partir de catálises do tipo ácida (por íon hidrogênio) ou do tipo básica (por íon hidróxido). Em geral, esta reação de decomposição se torna drástica na presença de água na formulação, fator este responsável pela hidrólise de ligações do tipo éster, amida e β -lactama, presentes na estrutura de inúmeras classes de fármacos (RHODES, 2000; O'DONNELL e BOKSER, 2006).

Num primeiro momento, testou-se preliminarmente a relação de diferentes concentrações molares de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) com a concentração do fármaco em solução e a temperatura de estocagem. Como esperado, quanto maior a concentração do agente degradante, a temperatura e a concentração do fármaco em solução, maior a velocidade de degradação. A definição da condição de degradação considerou primordialmente a formação de produtos de degradação passíveis de isolamento.

O perfil de decomposição do meropenem em meio ácido (HCl 0,1 M) demonstra uma acentuada instabilidade do fármaco em solução. Os resultados quantitativos descritos na Tabela 6 mostram a extensa degradação do antibiótico após 60 minutos à 25 °C. Para melhor visualização, os mesmos resultados estão expressos na forma gráfica na Figura 31. Em virtude da rápida degradação do fármaco, o tempo zero de reação foi obtido a partir da análise de uma solução aquosa da amostra, sem presença do agente degradante. Para este fator de degradação, os resultados quantitativos parecem ser mais reprodutíveis provavelmente devido às amostras de meropenem a serem expostas à degradação serem pesadas a partir da mesma unidade farmacotécnica.

Tabela 6 - Valores de teor residual de meropenem (%) em solução (1,0 mg/mL) submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M).

Tempo (minutos)	Teor residual de meropenem (%)*	CV%
Zero	100,00	1,20
5	85,21	2,50
10	80,87	2,07
15	70,25	2,17
30	39,96	3,44
60	18,22	3,25

* Valor médio. Resultado da análise de três soluções submetidas à degradação, sendo que cada uma foi determinada duas vezes por CLAE.

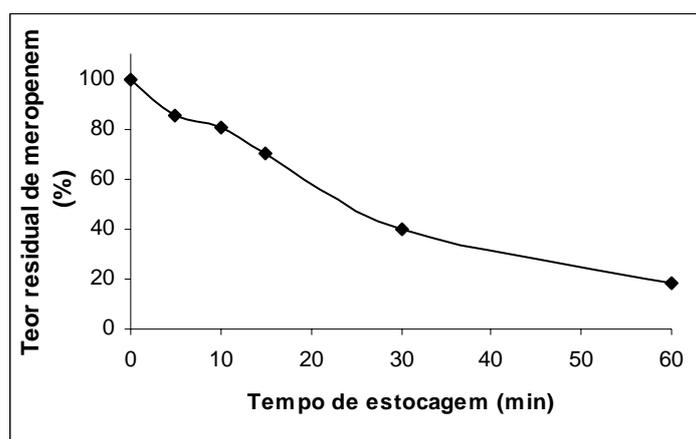


Figura 31 - Perfil de degradação do meropenem em solução (1,0 mg/mL) submetido a degradação em meio ácido (HCl 0,1 M). As amostras foram analisadas por CLAE.

Os cromatogramas obtidos permitem a verificação de formação de um único produto de degradação num tempo de retenção em torno de 3,5 minutos (Figura 32). Num primeiro momento, a característica mais polar deste produto está de acordo com um trabalho descrito na literatura (CAI e HU, 2005), no qual o produto de degradação do meropenem, de anel β -lactâmico rompido, é detectado em tempo de retenção inferior ao meropenem. Além disso, a hidrólise do anel β -lactâmico nestas

condições é uma primeira opção de raciocínio, considerando outras referências já citadas.

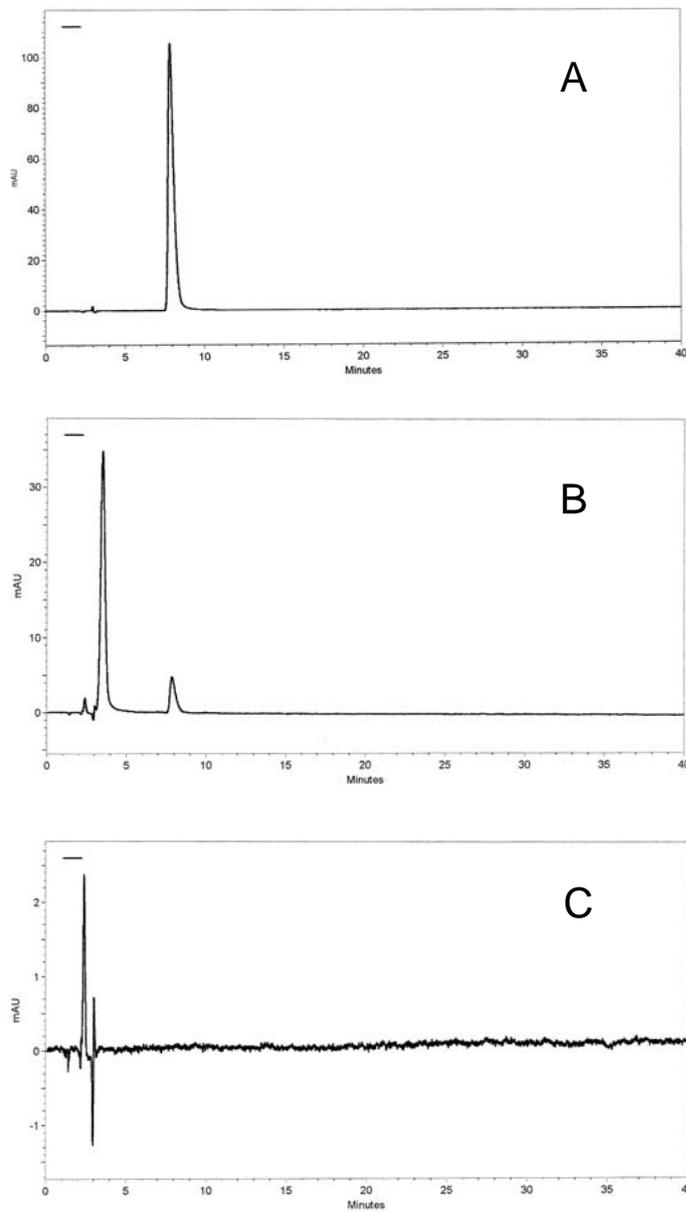


Figura 32 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 µg/mL (A), e meropenem em solução submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) por 60 minutos e analisada a 100 µg/mL (B). Branco de análise (C). Detecção em 298 nm (A) e detecção em 220 nm (B e C). Meropenem detectado na faixa de 8 minutos (A e B), e produto de degradação observado na faixa de 3,5 minutos (B).

É importante destacar a maior intensidade do pico cromatográfico do produto de degradação quando da detecção em comprimento de onda de 220 nm. A Figura 33 ilustra esta diferença de absorção na amostras degradadas, ilustrando a necessidade de trabalho em 220 nm quando é enfatizado o produto de degradação desta condição estudada.

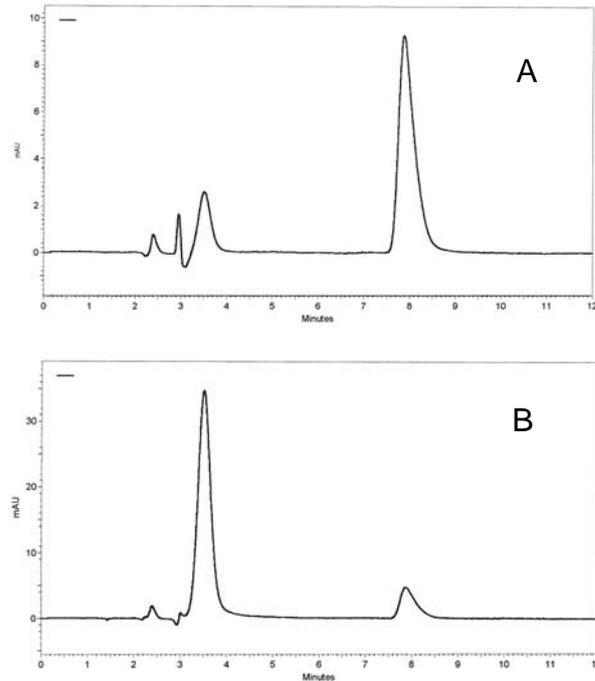


Figura 33 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem em solução submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) por 60 minutos e analisada a 100 µg/mL. Detecção em 298 nm (A) e detecção em 220 nm (B). Meropenem detectado na faixa de 8 minutos e produto de degradação observado na faixa de 3,5 minutos (A e B).

Quanto à catálise básica do meropenem (NaOH 0,1 M), as condições preliminares testadas ocasionaram sempre uma degradação imediata do fármaco, sem possibilitar sua quantificação para fins de perfil de degradação. Desse modo, é possível concluir que o meropenem é mais instável em meio alcalino, considerando os agentes de degradação utilizados neste estudo. Embora o trabalho de TAKEUCHI e colaboradores (1995) descreva uma maior velocidade de degradação do meropenem em faixa de pH mais ácido, os resultados de rápida degradação em meio alcalino são aceitáveis, visto que, no referido trabalho, o fator de degradação

pH era avaliado com o uso de agentes tamponantes, o que pode inviabilizar uma comparação direta.

Assim como para o meio ácido, a degradação do meropenem em meio alcalino levou à formação de um produto de degradação de maior polaridade, em tempo de retenção de aproximadamente 3,5 minutos (Figura 34). O tempo de retenção semelhante é indicativo de semelhança estrutural entre os produtos oriundos das condições de degradação estabelecidas. A formação de um único produto de degradação estimula o aprofundamento do estudo em torno desta condição de degradação com vistas ao seu isolamento e identificação.

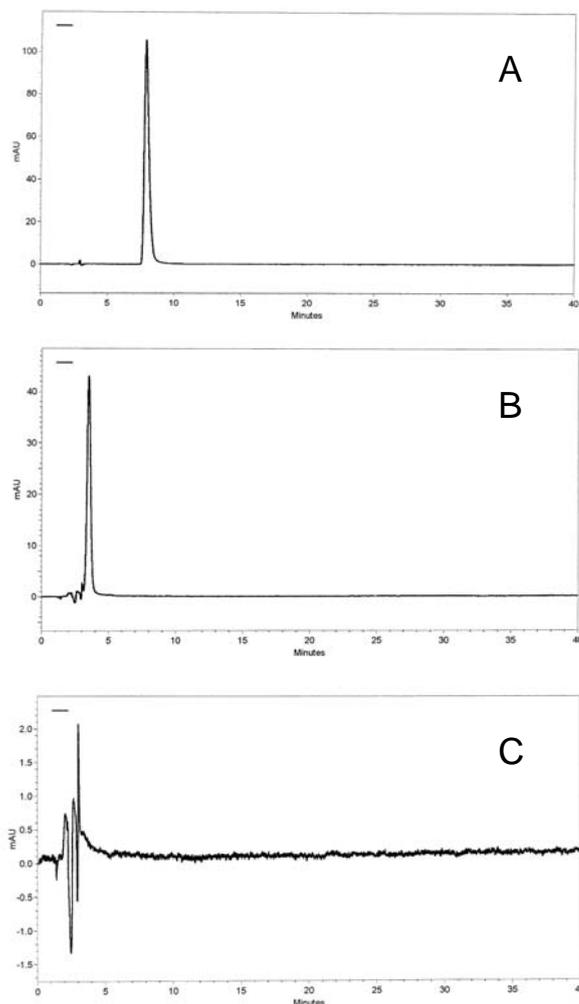


Figura 34 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 µg/mL (A), e meropenem em solução submetido à degradação em meio alcalino (NaOH 0,1 M) por 10 minutos e analisada a 100 µg/mL (B). Branco de análise (C). Detecção em 298 nm (A) e detecção em 220 nm (B e C). Meropenem detectado na faixa de 8 minutos (A e B), e produto de degradação observado na faixa de 3,5 minutos (B).

Complementando os resultados, o pH das soluções de meropenem submetidas à degradação em meio ácido e em meio alcalino esteve na faixa de 2,4 a 2,6 e de 8,7 a 8,9, respectivamente, conforme a Tabela 7. Cabe salientar que as soluções degradadas mantiveram as características de aspecto límpido e incolor.

Tabela 7 - Valores de pH das soluções de meropenem (1,0 mg/mL) preparadas em meio ácido (HCl 0,1 M) e em meio básico (NaOH 0,1 M). Análises efetuadas imediatamente após o preparo das soluções a serem expostas a degradação.

Agente catalítico	pH*
	2,41
Meio ácido (HCl 0,1 M)	2,47
	2,55
	8,70
Meio alcalino (NaOH 0,1 M)	8,75
	8,86

* Resultados da análise de três soluções submetidas à degradação.

4.3 CINÉTICA QUÍMICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

4.3.1 Metodologia

4.3.1.1 Degradação térmica

A cinética química de degradação do antibiótico meropenem foi desenvolvida para o fator de degradação temperatura. Para este estudo, amostras de meropenem pó para solução injetável e solução reconstituída, descritas no item 4.1, foram estocadas a diferentes temperaturas, em estufas de ar circulante De Leo[®]. Neste estudo, foram utilizadas três (3) temperaturas de estocagem, com monitoramento das amostras em sete (7) diferentes tempos. A análise das amostras degradadas objetivou a determinação do teor e a observação dos produtos de degradação.

Para o meropenem solução reconstituída, frascos de 500 mg de meropenem foram abertos e reconstituídos em água desionizada até concentração final de 50 mg/mL. Estas amostras, em seus frascos originais, foram expostas à temperatura de 25, 35 e 45 °C. A degradação foi avaliada nos tempos de estocagem 0, 6, 12, 18, 24, 30 e 36 h. Foram ensaiados dois frascos para cada tempo de estocagem em cada temperatura, compreendendo o mesmo lote. As amostras submetidas à degradação foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Em paralelo, um ensaio microbiológico foi efetuado para a determinação da cinética de degradação na maior temperatura.

A avaliação da cinética de decomposição do meropenem pó para solução injetável foi realizada através da exposição do produto a temperaturas de estocagem de 70, 80 e 90 °C. O produto foi submetido à degradação em frascos-ampola lacrados. A análise do produto degradado ocorreu nos seguintes tempos de estocagem:

- 70 °C - tempos de estocagem 0, 115, 152, 172, 225, 285 e 335 dias;
- 80 °C - tempos de estocagem 0, 115, 152, 172, 200, 245 e 295 dias;
- 90 °C - tempos de estocagem 0, 15, 43, 53, 60, 80 e 95 dias.

Neste caso, também foram ensaiados dois frascos do produto para cada tempo de coleta em cada temperatura, todos do mesmo lote. As amostras submetidas à degradação foram analisadas em duplicata, por cromatografia líquida de alta eficiência. Neste caso, a cinética de degradação na maior temperatura também foi efetuada por ensaio microbiológico.

4.3.1.2 Análise por CLAE

4.3.1.2.1 Condições cromatográficas

As mesmas condições descritas no item 4.2.1.3.1 foram aplicadas na análise cromatográfica.

4.3.1.2.2 Preparo das amostras

Para fins de análise quantitativa, as soluções de amostras degradadas foram preparadas a uma concentração teórica de meropenem de 100,0 µg/mL. Para avaliação dos produtos de degradação, as soluções foram preparadas a uma concentração teórica de meropenem de 500,0 µg/mL e de 1000,0 µg/mL para a solução reconstituída e para a forma sólida, respectivamente. Preparou-se, também, uma solução de meropenem SQR, descrita no item 4.1, equivalente a 100,0 µg/mL de meropenem anidro. Para todas as soluções, utilizou-se água ultrapura como solvente. Previamente à análise, as amostras eram filtradas em filtro Millex (Millipore). As diluições foram efetuadas fazendo uso de vidraria volumétrica.

A solução SQR e as soluções de amostras degradadas, depois de prontas, foram analisadas em duplicata.

4.3.1.3 Ensaio microbiológico

A quantificação do meropenem na forma farmacêutica através do ensaio microbiológico – método de difusão em água-cilindros em placas foi proposta em

estudos recentes (MENDEZ, 2003; MENDEZ *et al.*, 2005). Esta análise microbiológica contemplou as amostras de meropenem pó para solução injetável e meropenem solução reconstituída expostas às temperaturas de 90 °C e 45 °C, respectivamente.

4.3.1.3.1 Descrição do ensaio

Uma primeira etapa do método foi o preparo do inóculo. Para tal, utilizou-se uma cepa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 como microrganismo teste. Este microrganismo, mantido no refrigerador em meio de cultura número 1 (Merck) inclinado, foi repicado para outro tubo contendo o mesmo meio de cultura, e incubado a 35 °C por 24 horas. No momento do ensaio, o microrganismo, com o crescimento ativado, foi transferido para uma solução salina, até obter-se uma suspensão bacteriana a 25% ± 2% de transmitância, a 580 nm. A partir desta suspensão, preparou-se o inóculo a 1% em meio de cultura número 11 (Merck), mantido em banho-maria a 47 °C ± 1 °C até ser distribuído nas placas.

O ensaio foi realizado em capela de fluxo laminar. Iniciou-se pela adição de 20 mL de meio de cultura número 11 por placa, para formação da camada base. Após a solidificação desta, foram adicionados 5 mL de inóculo a 1%. A seguir, foram distribuídos 6 cilindros de aço inox (10 x 6 x 8 mm) por placa, nos quais adicionou-se 200 µL de solução de análise. Estas placas foram, então, incubadas em estufa a 35 °C ± 2 °C, por 18 horas. Após este período, procedeu-se a medida dos diâmetros dos halos de inibição, com auxílio de paquímetro digital.

4.3.1.3.2 Preparo das amostras

Quanto à análise das amostras degradadas, as mesmas foram preparadas a uma concentração teórica de meropenem de 6,0 ou 10,0 µg/mL, utilizando água desionizada como solvente. A maior concentração foi utilizada para as amostras com degradação mais acentuada, visando à quantificação na faixa linear do método (1,5 a 6,0 µg/mL). Em todos os ensaios foram desenvolvidas curvas padrão com as

concentrações de 1,5; 3,0; e 6,0 µg/mL de meropenem SQR, descrito no item 4.1. Estas soluções foram preparadas em água desionizada.

Foram ensaiadas seis placas para a análise do meropenem SQR e amostra degradada (tempo 0 h), num total de seis determinações por solução. Para os outros tempos de exposição à degradação, foram ensaiadas seis placas para cada tempo de estocagem (três placas para cada amostra exposta à degradação), num total de três determinações por amostra. Para estes tempos, também foi ensaiada uma amostra de meropenem SQR na concentração de 6,0 µg/mL em cada placa, para efeito de controle. O cálculo de potência do meropenem SQR foi efetuado através da equação de HEWITT. A potência das amostras degradadas foi determinada a partir da equação da reta das curvas padrão analisadas.

4.3.1.4 Cálculos da cinética de degradação

A determinação da cinética de degradação envolveu a análise da ordem de reação, constante de velocidade de reação (k), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e t_{90} . Este último parâmetro se refere ao tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90%.

Neste trabalho, a ordem de reação foi determinada para ambos os métodos utilizados, CLAE e ensaio microbiológico. A determinação dos outros parâmetros cinéticos ocorreu somente para a análise cromatográfica.

Os modelos cinéticos podem ser representados pelas seguintes equações (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN, 2000):

$$C = C_0 - kt \text{ (reação de ordem zero)}$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \text{ (reação de primeira ordem)}$$

$$1 / C = 1 / C_0 + kt \text{ (reação de segunda ordem)}$$

Onde C_0 é a concentração do fármaco no tempo zero, C é a concentração do fármaco após degradação por um tempo t, e k é a constante de reação.

A ordem de reação foi determinada através da obtenção de representações gráficas, plotando a concentração do fármaco em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração do fármaco em função do tempo (primeira ordem), e o inverso da concentração do fármaco em função do tempo (segunda ordem). A partir do cálculo dos coeficientes de correlação (r), determinou-se a ordem de reação considerando a melhor reta obtida (NUDELMAN, 1975).

Os parâmetros cinéticos foram obtidos segundo as equações a seguir, considerando uma reação de primeira ordem (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN, 2000):

$$k = (\ln C - C_0) / t$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k$$

$$t_{90} = 0,106 / k$$

4.3.2 Resultados e discussão

Os ensaios de cinética química são mencionados como parte integrante dos estudos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos. Os conhecimentos de cinética, aplicados à velocidade de degradação e possíveis mecanismos de reação envolvidos, permitem a discussão em torno de uma série de fatores envolvidos na formulação, estabilização e administração de fármacos (MARTIN, 1993).

A cinética química envolve o estudo das reações químicas e como elas são influenciadas por condições de concentração dos reagentes e dos produtos, além de fatores como solvente, pressão e temperatura (WIGENT, 2006). De fato, a concentração, a temperatura, a luz e os agentes catalíticos têm importância na relação com a velocidade e com o mecanismo de reação (MARTIN, 1993).

A avaliação da cinética química e da ordem das reações determina o conhecimento do perfil de degradação ou perfil concentração-tempo de um fármaco ou medicamento. Em especial para fármacos em solução, a elucidação da ordem de

reação permite a determinação de sua estabilidade, sob a influência de diferentes valores de pH e de diferentes soluções-tampão, ou em meios de catálise ácido-base (CARSTENSEN, 2000; CARSTENSEN, 2000a). A determinação da ordem de reação no estado sólido também é importante, e depende da exposição a condições adversas de estocagem (CARSTENSEN, 2000b).

A ausência de dados cinéticos completos abrangendo a degradação térmica do meropenem na forma sólida e como solução reconstituída para injeção foi decisiva na escolha da temperatura como fator a ser estudado. Os resultados preliminares de avaliação de degradação térmica deste fármaco também contribuíram para este objetivo. No caso da estabilidade em solução, em diferentes condições de pH, com agentes tamponantes, os dados cinéticos já estão descritos na literatura (TAKEUCHI *et al.*, 1995).

Na forma sólida, como pó para solução injetável, as avaliações cinéticas foram efetuadas em amostras submetidas à degradação térmica em suas embalagens primárias intactas, sem rompimento do lacre. Deste modo, é garantida a reprodutibilidade da condição de degradação para todas as amostras, bem como a confiança nos resultados analíticos finais. Uma vez abertas para a análise quantitativa, as amostras não foram reutilizadas para o mesmo fim. Embora os frascos abertos, com a amostra exposta ao ambiente externo, propiciem uma degradação mais acelerada, esta condição não foi selecionada para a avaliação cinética.

Os dados quantitativos estão descritos na Tabela 8. Para fins de cálculo, os resultados foram expressos como teor residual (%) ou percentagem residual de meropenem, considerando o teor da amostra do tempo zero como a referência para os cálculos. A escolha por três temperaturas e sete tempos de estocagem é oriunda da observação de bibliografia específica (NUDELMAN, 1975). A degradação em maior velocidade ocorreu na temperatura mais drástica (90 °C), a qual foi responsável por uma redução de teor de aproximadamente 85% após 95 dias de estocagem. Nas temperaturas de 70 e 80 °C, o fármaco se mostrou estável por um período maior. A mudança de coloração de branco para amarelo-pardo foi verificada em todas as condições avaliadas, sendo mais intensa na maior temperatura.

A partir da obtenção das representações gráficas pertinentes (Figura 35), a decomposição em primeira ordem é verificada para as três temperaturas estudadas. Os maiores valores de r foram observados com a plotagem dos dados de logaritmo da concentração residual pelo tempo de estocagem (Figura 35, B). Comparando os resultados das três plotagens realizadas, a saber, concentração residual por tempo de estocagem (Figura 35, A), logaritmo da concentração residual por tempo de estocagem (Figura 35, B) e inverso da concentração residual por tempo de estocagem (Figura 35, C), é visível a maior diferença dos valores de coeficiente de correlação na temperatura de 90 °C. Em outras palavras, a degradação mais acentuada é responsável pela confirmação da primeira ordem de reação para o fator temperatura, na condição avaliada.

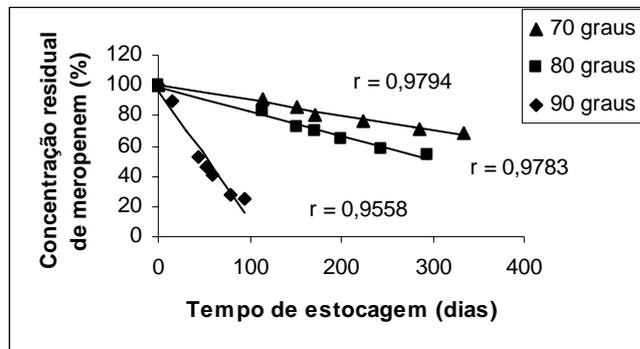
Como solução reconstituída, o meropenem também sofre uma degradação seguindo a primeira ordem de reação. A Tabela 9 relaciona os resultados da análise quantitativa do fármaco. Na temperatura de 45 °C, a percentagem residual de meropenem foi de 23,36% após 36 horas de estocagem. Na temperatura mais próxima da ambiente (25 °C), a redução de teor residual para valores inferiores a 90% foi verificada após 6 horas de estocagem. Neste caso, também se observou uma alteração brusca de coloração com o decorrer da degradação, passando de uma coloração amarelo-pálida clara para castanho intenso.

Uma nova análise das representações gráficas reproduz as conclusões traçadas para a forma sólida do antibiótico. A degradação segue reação de primeira ordem para todas as temperaturas avaliadas (Figura 36), uma vez que o maior valor de r também é obtido a partir da relação gráfica entre logaritmo da concentração residual e o tempo de estocagem (Figura 36, B). A maior diferença de linearidade entre as retas obtidas a partir das diferentes plotagens também é verificada para a maior temperatura (45 °C).

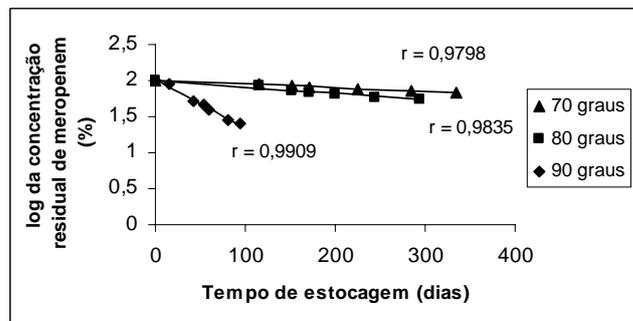
Tabela 8 - Valores de concentração residual de meropenem (%) pó para solução injetável (500 mg) obtidos na avaliação da cinética de degradação térmica nas temperaturas de 70 °C, 80 °C e 90 °C.

Temperatura	Tempo (dias)	Concentração residual de meropenem (%)*	CV%
70 °C	zero	100,00	1,08
	115	90,91	1,02
	152	86,31	1,57
	172	80,83	0,98
	225	76,04	1,60
	285	71,26	1,13
	335	67,97	0,33
80 °C	zero	100,00	0,97
	115	83,51	1,70
	152	72,68	1,77
	172	69,59	0,99
	200	64,41	1,87
	245	58,52	1,21
	295	54,46	0,52
90 °C	zero	100,00	0,64
	15	89,83	1,45
	43	53,19	1,82
	53	46,38	2,05
	60	40,36	1,94
	80	28,07	2,09
	95	24,78	1,46

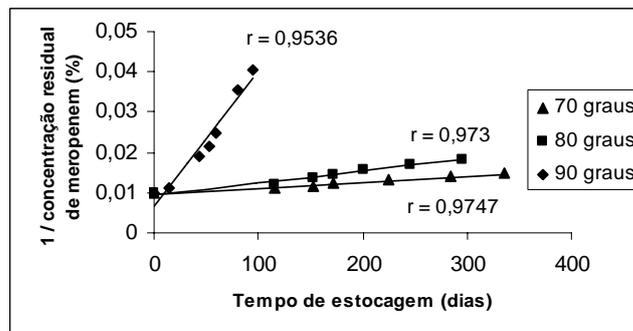
* Valor médio. Cada valor resulta da análise de duas amostras degradadas, sendo que cada uma foi determinada duas vezes por CLAE. Foram submetidas à degradação duas amostras para cada tempo de estocagem.



A



B



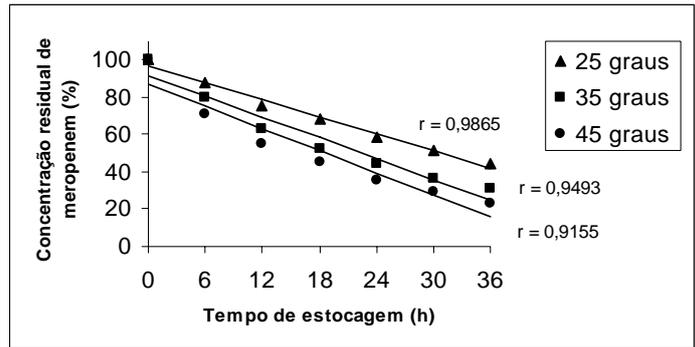
C

Figura 35 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem pó para solução injetável (500 mg) nas temperaturas de 70 °C, 80 °C e 90 °C. Curva concentração x tempo (A), curva log da concentração x tempo (B) e curva 1/concentração x tempo (C). As amostras foram analisadas por CLAE.

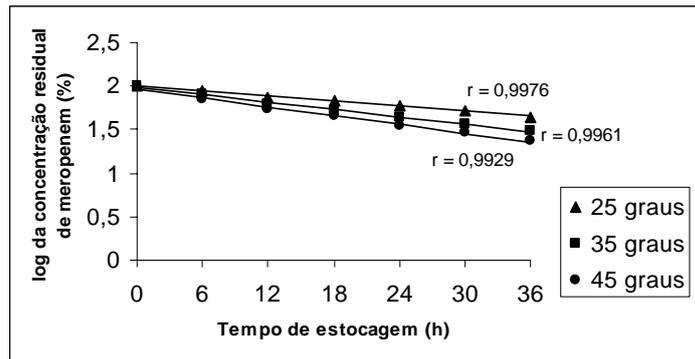
Tabela 9 - Valores de concentração residual de meropenem (%) solução reconstituída (50 mg/mL) obtidos na avaliação da cinética de degradação térmica nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C.

Temperatura	Tempo (horas)	Concentração residual de meropenem (%)*	CV%
25 °C	zero	100,00	0,16
	6	87,89	0,61
	12	75,07	0,75
	18	68,71	1,30
	24	58,53	3,08
	30	51,62	1,32
	36	44,43	0,84
35 °C	zero	100,00	0,25
	6	79,98	1,19
	12	63,16	0,72
	18	52,69	1,00
	24	43,92	1,04
	30	36,19	2,77
	36	31,03	1,18
45 °C	zero	100,00	0,48
	6	71,14	0,83
	12	54,91	1,88
	18	45,21	0,71
	24	35,78	1,91
	30	29,08	0,95
	36	23,36	2,27

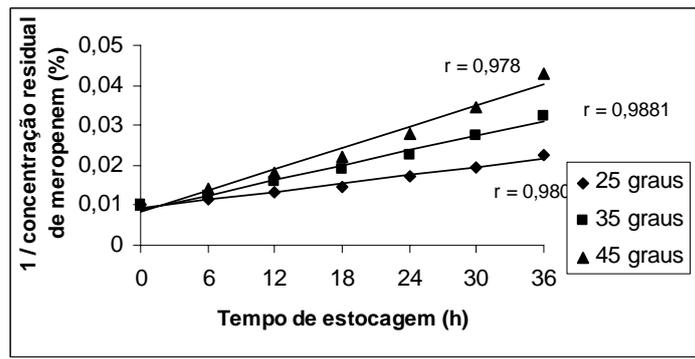
* Valor médio. Cada valor resulta da análise de duas amostras degradadas, sendo que cada uma foi determinada duas vezes por CLAE. Foram submetidas à degradação duas amostras para cada tempo de estocagem.



A



B



C

Figura 36 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem solução reconstituída (50 mg/mL) nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C. Curva concentração x tempo (A), curva log da concentração x tempo (B) e curva 1/concentração x tempo (C). As amostras foram analisadas por CLAE.

Uma análise mais aprofundada dos resultados obtidos tanto para o estado sólido quanto para o produto reconstituído permite uma mesma interpretação em termos de confirmação da ordem de reação envolvida na degradação. Para ambos os casos, a maior diferença de linearidade das retas descritas nas representações gráficas ocorreu para a maior temperatura de degradação. A justificativa para esta observação pode ser retirada da literatura, a qual relata a necessidade de um mínimo de degradação para a determinação correta da ordem de reação envolvida. Em geral, degradações na taxa de 10 a 20% não são apropriadas para determinar o referido parâmetro (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN, 2000).

Em termos de reprodutibilidade dos dados quantitativos resultantes do estudo de cinética proposto, a exposição das amostras em duplicata e a análise de modo individual, sem mistura dos conteúdos, podem gerar resultados analíticos com maior variação, o que, de modo geral, não foi observado para este estudo cinético. Como mencionado anteriormente, este inconveniente já é minimizado quando os resultados são expressos em termos de percentagem residual do fármaco, e não como teor de meropenem na amostra analisada. Embora de mesmo lote, uma diferença de teor é passível de ocorrer entre as suas diferentes unidades.

Embora as condições forçadas de degradação não reproduzam, neste caso, a situação de rotina de armazenamento do fármaco, os dados cinéticos fornecem informações importantes sobre a estabilidade da preparação. Além disso, a literatura relata alguns métodos utilizados para extrapolação dos resultados e previsão do comportamento do fármaco em condições normais, como é o caso do uso de ensaios acelerados para prever o prazo de validade de um produto por meio do método de Arrhenius (NUDELMAN, 1975; GIL-ALEGRE *et al.*, 2001; LACHMAN *et al.*, 2001).

Neste estudo, procurou-se padronizar a referência utilizada para o desenvolvimento dos ensaios e avaliação dos resultados. Outras referências, com outras propostas de ensaio e interpretação de resultados estão descritas na literatura (MARTIN, 1993; CARSTENSEN, 2000; CARSTENSEN, 2000a; LACHMAN *et al.*, 2001; WIGENT, 2006).

Com o objetivo complementar de avaliar a atividade antimicrobiana das amostras degradadas, aplicou-se o ensaio microbiológico quantitativo, validado por MENDEZ e colaboradores (2005). Através da relação quantitativa dos halos de inibição formados, é possível determinar o teor da amostra analisada, e com isso prever a sua potência.

A análise microbiológica foi efetuada para a avaliação da degradação do meropenem na forma sólida e como produto reconstituído. Entretanto, para cada caso, avaliou-se somente a condição mais drástica de degradação, ou seja, 90 °C para o pó e 45 °C para a solução reconstituída. Os dados quantitativos estão ilustrados na Tabela 10, junto aos dados de quantificação por CLAE, apresentados anteriormente. Na Figura 37, o decaimento da concentração do meropenem nas amostras degradadas, nas duas condições avaliadas, é mais bem visualizado. A semelhança de perfil de degradação obtida quando da quantificação pelos dois métodos ensaiados reproduz o resultado publicado por MENDEZ e colaboradores (2005) em estudo preliminar de estabilidade. Cabe salientar que MENDEZ (2003) relatou a existência de equivalência entre estes dois ensaios aplicados.

A equivalência destes dois métodos quantitativos é confirmada quando os resultados obtidos na análise microbiológica são aplicados para determinação da ordem de reação. Mais uma vez, a primeira ordem de reação é confirmada para o meropenem nas condições estudadas. Na Figura 38, referente à temperatura de 90 °C, observa-se a maior linearidade da reta na relação entre logaritmo de concentração e tempo de estocagem. Na temperatura de 45 °C, o mesmo resultado é observado (Figura 39). Estes dados estão de acordo com aqueles referentes à determinação por CLAE.

A quantificação por ensaio microbiológico, além de útil para estabelecer um perfil de degradação e para avaliar a cinética de decomposição, possibilita uma avaliação da potência das amostras degradadas. Neste trabalho, os resultados são indicativos de ausência de atividade antimicrobiana dos produtos de degradação, visto que o teor de meropenem determinado por CLAE e a potência do meropenem determinada por ensaio microbiológico se assemelham (Figura 37). Porém, é importante salientar que esta análise contempla a totalidade dos produtos presentes

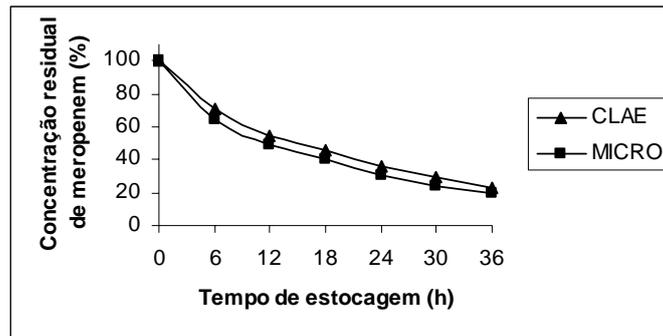
na amostra degradada. O estudo dos produtos de degradação isolados poderia fornecer um resultado diferente.

Tabela 10 - Valores de concentração residual de meropenem (%) solução reconstituída (50 mg/mL) e pó para solução injetável (500 mg) obtidos na avaliação da cinética de degradação térmica nas temperaturas de 45 °C e 90 °C, respectivamente. Análise por CLAE e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas.

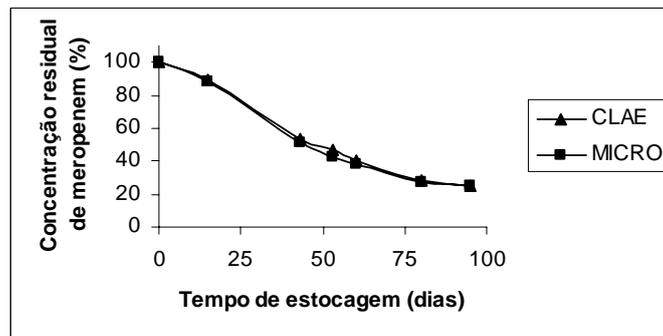
Temperatura	Tempo (horas)	Concentração residual de meropenem (%) [*] (CV%) – Análise da solução reconstituída	
		CLAE	MICRO ^{**}
45 °C	Zero	100,00 (0,48)	100,00 (3,95)
	6	71,14 (0,83)	64,74 (3,17)
	12	54,91 (1,88)	48,84 (1,85)
	18	45,21 (0,71)	40,40 (2,70)
	24	35,78 (1,91)	30,27 (3,87)
	30	29,08 (0,95)	24,00 (5,55)
	36	23,36 (2,27)	19,95 (2,01)
Temperatura	Tempo (dias)	Concentração residual de meropenem (%) [*] (CV%) – Análise do pó para solução injetável	
		CLAE	MICRO ^{**}
90 °C	Zero	100,00 (0,64)	100,00 (2,73)
	15	89,83 (1,45)	88,30 (3,04)
	43	53,19(1,82)	50,73 (2,65)
	53	46,38 (2,05)	42,89 (4,63)
	60	40,36 (1,94)	38,38 (1,74)
	80	28,07 (2,09)	26,87 (1,11)
	95	24,78 (1,46)	24,69 (2,06)

* Valor médio. Para análise por CLAE, cada valor resulta da análise de duas amostras degradadas, sendo que cada uma foi determinada duas vezes. Para análise por ensaio microbiológico foram ensaiadas seis placas para cada tempo de exposição (três placas para cada amostra), num total de três determinações por amostra.

** Ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas.

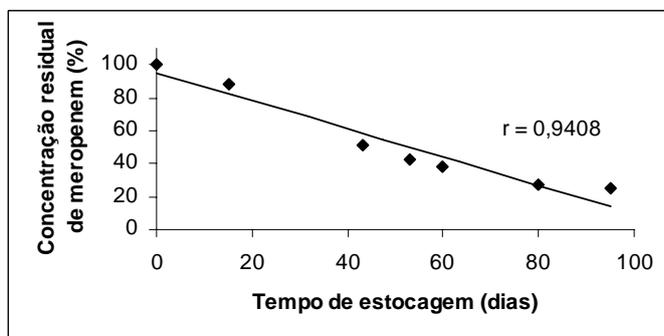


A

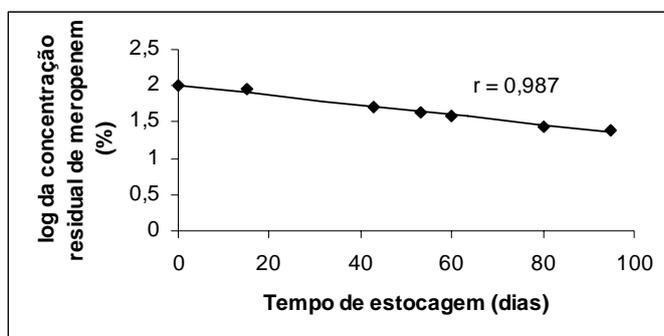


B

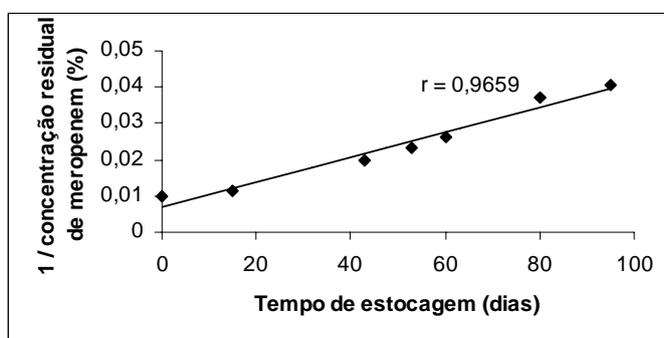
Figura 37 - Curvas de degradação do meropenem solução reconstituída (50 mg/mL) e pó para solução injetável (500 mg) submetidas à degradação em temperatura de 45 °C (A) e 90 °C (B), respectivamente. Análises por CLAE e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas (MICRO).



A

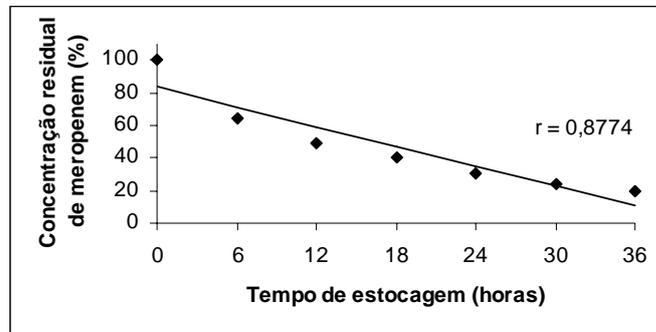


B

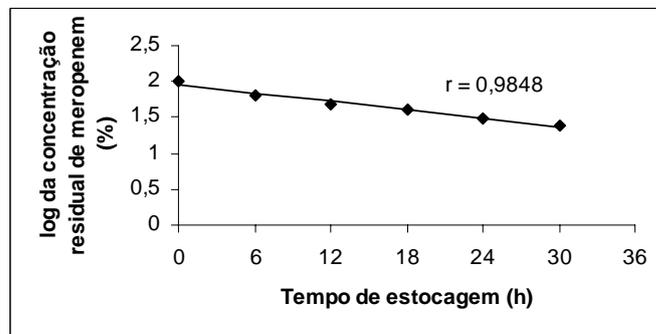


C

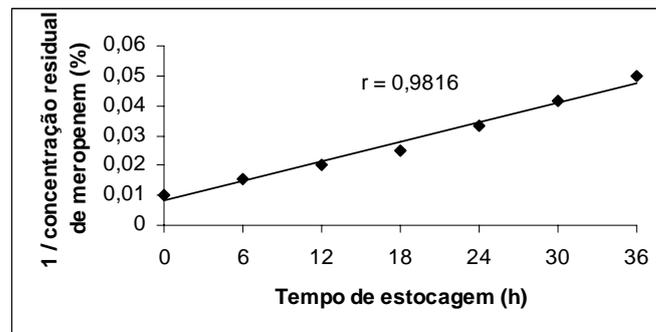
Figura 38 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem pó para solução injetável (500 mg) na temperatura de 90 °C. Curva concentração x tempo (A), curva log da concentração x tempo (B) e curva 1/concentração x tempo (C). As amostras foram analisadas por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas.



A



B



C

Figura 39 - Curvas cinéticas de degradação térmica do meropenem solução reconstituída (50 mg/mL) na temperatura de 45 °C. Curva concentração x tempo (A), curva log da concentração x tempo (B) e curva 1/concentração x tempo (C). As amostras foram analisadas por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas.

De forma representativa, as placas obtidas no ensaio microbiológico estão ilustradas na Figura 40. Na análise do meropenem SQR e das amostras do tempo zero, é possível observar a aplicação do ensaio 3 x 3 (Figura 40, A). Quando da

análise das amostras degradadas, fica claro o menor tamanho do halo de inibição em relação ao meropenem SQR ensaiado concomitante, indicando a redução da potência do antibiótico (Figura 40, B; Figura 40, C). Conforme ilustrado nessa Figura, a concentração teórica de análise das amostras degradadas, em alguns casos, esteve acima da concentração máxima de linearidade do método ($6,0 \mu\text{g/mL}$), visto que a degradação do meropenem foi drástica em algumas condições de degradação.

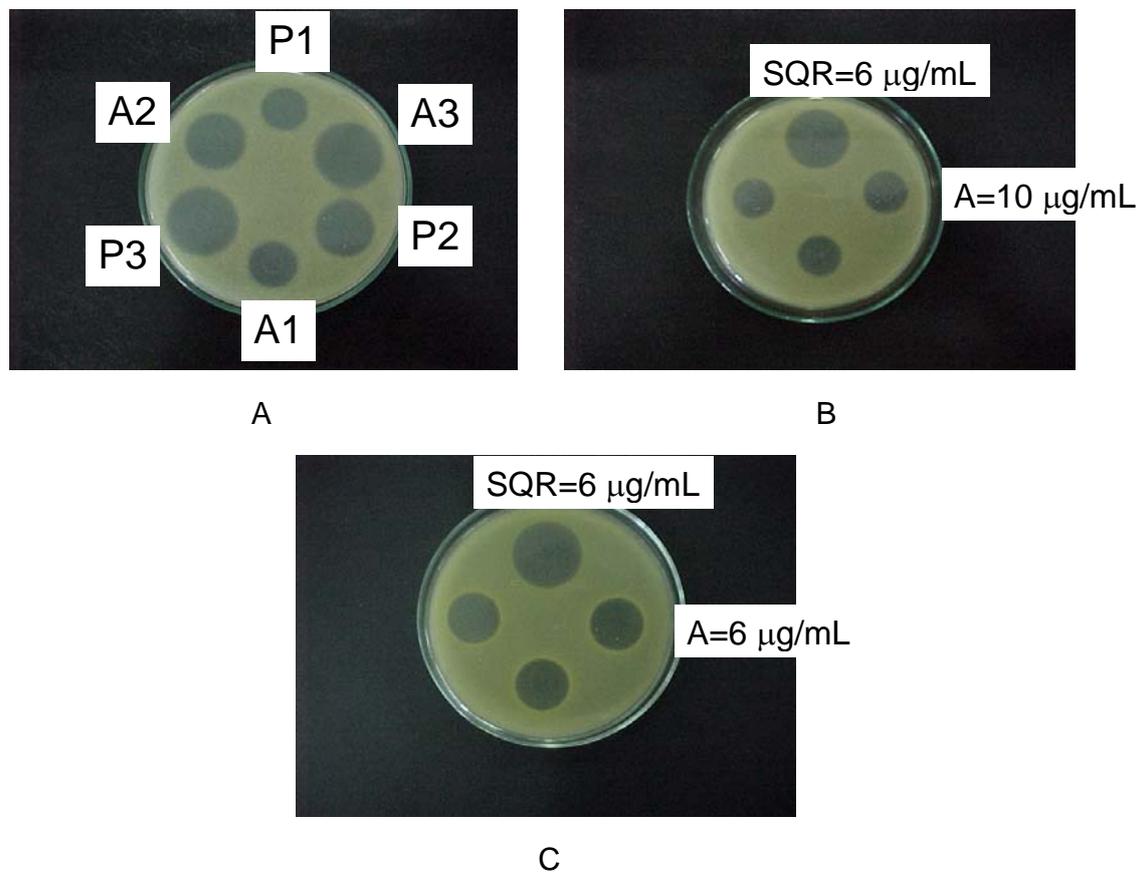


Figura 40 - Placas representativas do ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas. Análise da solução reconstituída no tempo zero (A): meropenem SQR $1,5 \mu\text{g/mL}$ (P1), $3,0 \mu\text{g/mL}$ (P2) e $6,0 \mu\text{g/mL}$ (P3); amostra tempo zero $1,5 \mu\text{g/mL}$ (A1), $3,0 \mu\text{g/mL}$ (A2) e $6,0 \mu\text{g/mL}$ (A3). Análise da solução reconstituída submetida à degradação a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 36h (B): meropenem SQR $6,0 \mu\text{g/mL}$ e amostra degradada $10,0 \mu\text{g/mL}$. Análise do pó para solução injetável submetido à degradação a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 53 dias (C): meropenem SQR $6,0 \mu\text{g/mL}$ e amostra degradada $6,0 \mu\text{g/mL}$.

Quanto aos parâmetros cinéticos k , $t_{1/2}$ e t_{90} , a sua determinação é dependente do resultado de ordem da reação, tendo em vista a diferença das equações cinéticas dependendo daquela informação. Para a constante k de velocidade de reação, o seu resultado final é oriundo de uma média das constantes de velocidade específicas para o decaimento de concentração de meropenem em cada tempo de coleta. A partir do valor de k , a aplicação das equações devidas permite a obtenção dos valores de $t_{1/2}$ e t_{90} .

A Tabela 11 descreve estes parâmetros cinéticos resultantes da degradação do meropenem na forma sólida e como produto reconstituído, em todas as temperaturas trabalhadas. Cabe reforçar que estes dados se referem à análise quantitativa por CLAE. Uma primeira avaliação destes resultados indica que, à temperatura ambiente, a amostra reconstituída de meropenem, na concentração recomendada pelo fabricante, reduz seu conteúdo a 90% (t_{90}) do valor inicial em cerca de 4 horas. Tal informação é importante para o armazenamento do produto na rotina clínica. Uma comparação deste resultado com a informação fornecida pelo fabricante, o qual indica a estabilidade do produto reconstituído em água a 50 mg/mL por um período de 8 horas em temperatura de 15 a 25 °C, revela haver uma importante diferença neste aspecto, que merece especial atenção.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos k , $t_{1/2}$ e t_{90} , para o meropenem solução reconstituída a 25 °C, 35 °C e 45 °C, e para o meropenem pó para solução injetável a 70 °C, 80 °C e 90 °C. Parâmetros determinados a partir de resultados analíticos obtidos por CLAE.

Amostra	Temperatura	k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	t_{90} (h)
Solução reconstituída	25 °C	0,022186	31,24	4,78
	35 °C	0,035292	19,64	3,00
	45 °C	0,045858	15,11	2,31
Amostra	Temperatura	k_{obs} (dias$^{-1}$)	$t_{1/2}$ (dias)	t_{90} (dias)
Pó para sol. injetável	70 °C	0,001199	630	96
	80 °C	0,002036	340	52
	90 °C	0,01366	51	8

Os parâmetros cinéticos para o meropenem na forma sólida não permitem uma análise tão conclusiva. Uma avaliação mais criteriosa, englobando a extrapolação gráfica destes resultados para a obtenção do t_{90} em temperatura

ambiente, poderá ser valiosa em estudos posteriores. Para tal, se faz necessária a aplicação de métodos gráficos descritos na literatura.

No sentido de avaliar a formação de produtos de degradação, alguns cromatogramas representativos da degradação da amostra reconstituída estão ilustrados na Figura 41. Os produtos de degradação formados mantêm o perfil verificado na análise inicial dos fatores de degradação do meropenem (item 4.2). Em temperatura de 45 °C, a análise da amostra estocada por 36 horas permite a visualização de produtos de degradação em tempos de retenção na faixa de 3 minutos, na faixa de 10 minutos e na faixa de 18 minutos. Observando criteriosamente este cromatograma (Figura 41, B), é possível verificar que são formados inúmeros produtos de degradação nesta condição de degradação, podendo-se prever dificuldade num eventual isolamento de produtos de degradação.

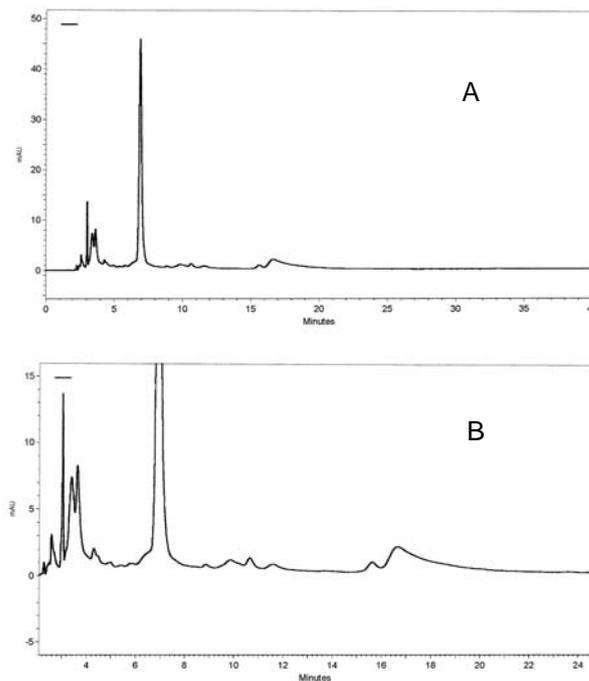


Figura 41 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem solução reconstituída submetido à degradação térmica (45°C) por 36 horas e analisado a 500 µg/mL. Detecção em 220 nm. Os cromatogramas identificados por A e B correspondem à mesma análise, com diferente ênfase para visualização dos picos cromatográficos. Meropenem é detectado em torno 7,0 minutos.

Quanto à amostra sólida, a detecção de produtos de degradação ocorreu somente na temperatura de 90 °C, e de forma pouco clara, apesar da extensa decomposição do antibiótico (Figura 42). Alguns produtos de degradação, em

quantidades mínimas, parecem apresentar tempo de retenção semelhante ao observado para a solução reconstituída, em torno de 3 minutos. Mesmo na análise de uma solução em concentração teórica de meropenem de 1000 $\mu\text{g/mL}$, e com detecção em 220 nm, não foi possível detectar produtos de degradação em maior quantidade. Devido a esta ausência, avaliou-se a corrida cromatográfica quanto à detecção na faixa de 190 a 800 nm, fazendo uso do recurso de detector por rede de fotodiodo, com varredura na faixa UV-visível. Tendo em vista a extensa degradação do fármaco, era de se esperar uma maior concentração dos produtos de degradação, porém os mesmos não foram detectados pelos recursos disponíveis. Hipóteses de decomposição dos próprios produtos formados devido à temperatura drástica (90 °C), e formação de compostos não detectáveis pela técnica em uso são então levantadas. Comparando com os resultados da análise preliminar dos fatores de degradação (item 4.2), em que a amostra no estado sólido foi submetida à degradação com a embalagem primária aberta, é possível verificar uma forte relação entre o contato da amostra com o ambiente externo ou umidade externa e a formação dos produtos de degradação. Assim sendo, para um posterior isolamento dos produtos de degradação, esta condição de degradação deverá ser considerada.

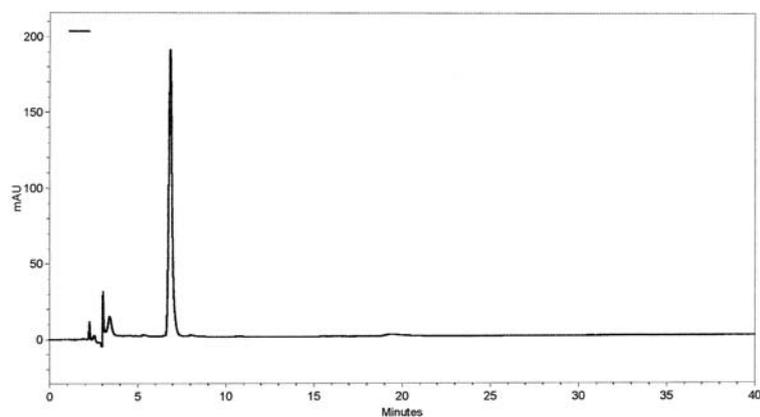


Figura 42 - Cromatograma representativo da análise por CLAE do meropenem pó para solução injetável submetido à degradação térmica (90°C) por 95 dias e analisado a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Detecção em 220 nm. Meropenem é detectado em torno 7,0 minutos.

Os resultados de determinação da cinética de degradação térmica do meropenem foram publicados recentemente, como pode ser observado no Anexo 1.

4.4 ISOLAMENTO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

4.4.1 Metodologia

O isolamento dos produtos de degradação do meropenem foi efetuado através da associação de diferentes técnicas cromatográficas.

4.4.1.1 Produtos de degradação térmica

4.4.1.1.1 Preparo das amostras degradadas

Amostras comerciais de meropenem, descritas no item 4.1, foram reconstituídas em água desionizada, a uma concentração final de 50 mg/mL. Depois de prontas, foram estocadas em estufa de ar circulante (De Leo[®]) a temperatura de 45 °C por 36 horas.

Após o tempo estipulado para degradação, as amostras foram distribuídas em tubos eppendorf, com capacidade de 1,5 mL, e então conservadas em freezer, a -20 °C. As amostras, congeladas, foram submetidas à secagem em equipamento concentrador com centrífuga Speed Vac Univapo 100H, com concentrador Unicryo MC 2L - 80 °C.

Após secagem, as amostras foram mantidas em freezer, enquanto em estoque.

4.4.1.1.2 Cromatografia em coluna

O método por cromatografia em coluna foi desenvolvido em coluna de vidro, de 20,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro interno. Para esta técnica cromatográfica, utilizou-se sílica gel 60 (Merck), tamanho de partícula 0,040-0,063 mm (230-400 mesh ASTM). Foram utilizados os solventes diclorometano (Nuclear) e metanol (Nuclear), ambos de grau analítico.

Inicialmente, foram pesadas 10,0 g de sílica, a qual foi então dispersa em diclorometano e introduzida na coluna para o devido empacotamento. O preparo da

amostra a ser ensaiada envolveu a trituração inicial com o auxílio de cadinho e pistilo de porcelana e a mistura com pequena quantidade de sílica. Adicionou-se à coluna uma quantidade de amostra correspondente a aproximadamente 200 mg de meropenem.

Neste trabalho, o sistema eluente variou de uma composição de característica apolar para uma composição de característica polar. Cada sistema eluente foi adicionado à coluna numa quantidade de 100 mL, sendo que as frações oriundas do mesmo eluente foram unidas para processamento posterior. A Tabela 12 descreve os sistemas eluentes utilizados durante a cromatografia em coluna, com as respectivas frações coletadas. Estas frações foram concentradas em evaporador rotatório (Fisatom 802D) à temperatura de 35 °C, com auxílio de trompa d'água.

A análise das frações ocorreu por cromatografia em camada delgada analítica.

4.4.1.1.3 Cromatografia em camada delgada analítica

O método por cromatografia em camada delgada analítica foi utilizado, num primeiro momento, para análise de todas as frações obtidas a partir da cromatografia em coluna. Para cada fração, o sistema eluente utilizado correspondeu ao mesmo sistema da cromatografia em coluna, descrito no item 4.4.1.1.2.

A migração cromatográfica foi efetuada em cromatoplasmas aluminizadas de sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck), com especificação de 0,25 mm de espessura de camada adsorvente, cortadas de modo a ter as dimensões aproximadas de 10 cm de comprimento e 5 cm de largura. Como revelador, utilizou-se lâmpada ultravioleta a 254 nm e 365 nm (Vilber Lourmat VL-6.LC).

As frações concentradas foram aplicadas por meio de tubos capilares a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa. Procedeu-se, então, a migração cromatográfica por toda a extensão da placa, até 1 cm abaixo da borda superior da mesma. Retirou-se da cuba cromatográfica e, após evaporação do solvente residual, efetuou-se a revelação e posterior medida dos valores de R_f.

Na mesma cromatoplaça de análise das frações, aplicou-se amostra de meropenem SQR, descrito no item 4.1, preparado em água desionizada a 1,0 mg/mL.

Tabela 12 - Relação dos sistemas eluentes utilizados no desenvolvimento do método por cromatografia em coluna

Fração	Sistema eluente (v:v)
1	Diclorometano
2	Diclorometano:metanol (98:02)
3	Diclorometano:metanol (96:04)
4	Diclorometano:metanol (94:06)
5	Diclorometano:metanol (92:08)
6	Diclorometano:metanol (90:10)
7	Diclorometano:metanol (88:12)
8	Diclorometano:metanol (86:14)
9	Diclorometano:metanol (84:16)
10	Diclorometano:metanol (80:20)
11	Diclorometano:metanol (76:24)
12	Diclorometano:metanol (72:28)
13	Diclorometano:metanol (68:32)
14	Diclorometano:metanol (62:38)
15	Diclorometano:metanol (56:44)
16	Diclorometano:metanol (50:50)
17	Diclorometano:metanol (44:56)
18	Diclorometano:metanol (38:62)

4.4.1.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

As frações obtidas por cromatografia em coluna foram também analisadas através do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

Inicialmente, as frações foram devidamente submetidas à secagem em evaporador rotatório, nas condições descritas no item 4.4.1.1.2. Depois de secas, cada fração foi reconstituída na mistura diclorometano:metanol (Nuclear) (50:50, v/v). Esta mesma mistura de solventes foi utilizada como branco. Preparou-se também uma solução de meropenem SQR, descrito no item 4.1, em concentração equivalente a 100 µg/mL de meropenem anidro, utilizando água desionizada como solvente. Previamente à análise, as amostras foram filtradas nas condições descritas no item 4.2.1.3.2.

A análise cromatográfica ocorreu nas condições e equipamento descritos no item 4.2.1.3.1.

4.4.1.1.5 Modificação do sistema eluente e união das frações

Através da observação do perfil cromatográfico das frações analisadas, efetuou-se a modificação de alguns sistemas eluentes de modo a permitir uma melhor separação dos possíveis produtos de degradação.

As frações 12, 13 e 14 foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica através de um sistema eluente formado por diclorometano:metanol (Nuclear) na proporção 95:05 (v/v). Do mesmo modo, as frações 15, 16, 17 e 18 foram analisadas com o mesmo sistema eluente. Mais uma vez, foi efetuada a análise concomitante do meropenem SQR em concentração de 1,0 mg/mL.

Devido à constatação de um perfil cromatográfico semelhante, padronizou-se a união das frações 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 após o desenvolvimento do método por cromatografia em coluna. Estas frações, após unidas, foram submetidas à concentração em evaporador rotatório, em condições descritas no item 4.4.1.1.2.

A fração final, concentrada, foi retirada do balão de secagem com auxílio de pipeta pasteur. Esta mesma pipeta foi utilizada para a lavagem final do balão com pequenas quantidades da mistura dos solventes diclorometano:metanol (Nuclear) (50:50, v/v).

4.4.1.1.6 Cromatografia em camada delgada preparativa

O método por cromatografia em camada delgada preparativa foi utilizado para o isolamento dos produtos de degradação oriundos da união das frações obtidas por cromatografia em coluna.

Sílica gel 60 GF₂₅₄ para cromatografia em camada fina (Merck) foi utilizada para o preparo das placas. Para cada 5 placas, foram pesadas 50 g de sílica gel. Após pesagem, misturou-se à sílica cerca de 140 mL de etanol, até adquirir consistência adequada. Distribuiu-se a sílica em placas de vidro previamente limpas e dispostas no sistema utilizado para preparo das placas (conjunto DESAGA HEIDELBERG), ajustado para espessura de 0,5 mm. Após, as placas prontas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante De Leo[®] por aproximadamente 1 hora a 100 °C.

Para a análise cromatográfica, preparou-se o sistema eluente composto pela mistura diclorometano:metanol (Nuclear) na proporção 95:05 (v/v). A amostra concentrada, oriunda da união das frações da cromatografia em coluna, foi reconstituída com a mistura de solventes diclorometano:metanol (Nuclear) (50:50, v/v). Esta amostra reconstituída foi aplicada, com auxílio de pipeta pasteur, a uma distância de 1 cm da borda inferior das placas, as quais foram dispostas em cuba cromatográfica contendo o sistema eluente. Procedeu-se, então, a migração cromatográfica por toda a extensão das placas, até 1 cm abaixo da borda superior das mesmas. Ao final, as placas foram retiradas da cuba cromatográfica e, após evaporação do solvente residual, efetuou-se a revelação através da exposição à lâmpada UV a 254nm e 365 nm.

4.4.1.1.6.1 Isolamento dos produtos de degradação

Após análise por cromatografia em camada delgada preparativa, os possíveis produtos de degradação detectados por este método foram submetidos a um processo de purificação. A purificação foi efetuada para cada produto de degradação.

Inicialmente, cada produto de degradação, detectado por lâmpada UV 254 nm, foi raspado com auxílio de espátula de metal. Esta raspagem foi efetuada em todas as placas cromatográficas. O material obtido a partir deste procedimento foi coletado em erlenmeyer, com o cuidado de não haver contaminação com outros produtos de degradação ou contaminantes.

Para a extração dos produtos de degradação, utilizou-se a mistura de solventes diclorometano:metanol (Nuclear) na proporção 50:50 (v/v). Ao frasco erlenmeyer contendo o produto de degradação obtido da análise cromatográfica, adicionou-se uma primeira quantidade da mistura de solventes. Imediatamente, este frasco foi colocado em ultra-som (Ultrasonic Cleaner Unique), por 5 minutos. Adicionou-se nova quantidade de mistura de solventes, com sonicação por mais 5 minutos. Após, a dispersão de sílica e solventes foi submetida à filtração em filtro G5, com auxílio de kitazato e de bomba de vácuo. Depois de finalizada a filtração, uma última quantidade da mistura de solvente extrator foi adicionada ao filtro contendo o material retido. Este procedimento foi efetutado para todos os produtos de degradação submetidos à purificação.

O produto oriundo da filtração foi então adicionado em balão de rotavapor e submetido à secagem em evaporador rotatório, conforme descrito no item 4.4.1.1.2. Após secagem, ao balão adicionou-se pequenas quantidades da mistura de solventes diclorometano:metanol na proporção 50:50 (v/v), para recuperação do produto de degradação contido no recipiente.

O produto isolado foi disposto em frasco pequeno de vidro, previamente pesado, e então analisado por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada analítica, conforme descrito nos itens 4.4.1.1.3 e 4.4.1.1.4, respectivamente. Para a cromatografia em camada delgada, o sistema eluente correspondeu ao mesmo utilizado para o isolamento por cromatografia em

camada delgada preparativa, ou seja, mistura de solventes diclorometano:metanol na proporção 95:05 (v/v).

Logo após retirada da quantidade de produto necessária para as análises, o restante do conteúdo do frasco foi submetido à secagem em evaporador rotatório (item 4.4.1.1.2). A secagem ocorreu diretamente no frasco de vidro no qual o produto seria conservado. Após evaporação, o frasco de vidro foi estocado em dessecador, o qual foi adequadamente fechado com auxílio de vácuo e disposto em local protegido da luz. No dessecador, o frasco foi mantido parcialmente aberto para evaporação residual dos solventes.

4.4.1.2 Produtos de degradação em meio alcalino

4.4.1.2.1 Preparo das amostras degradadas e isolamento dos produtos de degradação

Para a degradação, foram preparadas soluções de meropenem em hidróxido de sódio 0,1 M à concentração final de 1,0 mg/mL. Estas soluções foram estocadas em estufa de ar circulante (De Leo[®]) a temperatura de 25 °C por 10 minutos. Após este procedimento, as amostras foram dispostas em tubos tipo Falcon, previamente pesados, com capacidade de 10,0 mL, e então congeladas em freezer (-20 °C). As amostras, congeladas, foram submetidas à secagem em equipamento Speed Vac, descrito no item 4.4.1.1.1.

Após secagem, os tubos contendo o produto de degradação foram estocados em dessecador, o qual foi adequadamente fechado com auxílio de vácuo e disposto em local protegido da luz. No dessecador, o tubo contendo a amostra foi mantido parcialmente aberto para evaporação residual do solvente.

4.4.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras degradadas em meio alcalino foram analisadas através do método por cromatografia líquida de alta eficiência, descrito no item 4.2.1.3.1.

Efetuu-se a análise cromatográfica das soluções degradadas após o tempo de estocagem de 10 minutos e depois de submetidas à secagem em equipamento Speed Vac, conforme item 4.4.1.1.1.

Para a análise das soluções degradadas, as mesmas foram diluídas em água desionizada à concentração teórica de 100,0 µg/mL. No caso do produto seco, preparou-se uma solução na mesma concentração teórica, em água desionizada. Uma solução de meropenem SQR, descrito no item 4.1, foi preparada a concentração de 100,0 µg/mL em água desionizada, e avaliada junto ao produto de degradação.

4.4.2 Resultados e Discussão

A avaliação de produtos de degradação deve ser contemplada nos estudos de estabilidade. Quando estes produtos são detectados, algumas informações devem ser determinadas, dentre elas, procedimentos para isolamento e purificação, identidade e estrutura química, e proposição de mecanismos de formação, incluindo ordem de reação (CARSTENSEN, 2000).

Muitas são as técnicas analíticas disponíveis para determinação da concentração de uma substância ativa e para aplicação em um estudo de estabilidade. Neste último caso, os métodos devem ser caracterizados como indicadores de estabilidade, ou seja, capazes de discriminar entre o composto ativo e os produtos de decomposição formados nas condições de estocagem utilizadas durante o período de avaliação da estabilidade (HONG e SHAH, 2000).

Em estudos de degradação forçada, o método utilizado deve propiciar a separação do fármaco e de seus produtos de degradação, e até mesmo a análise individual destes produtos. Devido à necessidade de separação de muitos componentes durante a análise de amostras de estabilidade, os métodos cromatográficos têm destaque entre as técnicas analíticas. Além de sua capacidade de separação, a sensibilidade para detecção de pequenas quantidades de produtos de degradação também é uma grande vantagem. Vários métodos cromatográficos têm sido usados na análise qualitativa e quantitativa, destacando-se a cromatografia

em camada delgada (CCD), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa e as técnicas eletroforéticas (BAKSHI e SINGH, 2002).

A cromatografia e as técnicas afins são caracterizadas como um conjunto de técnicas capazes de separar componentes de misturas complexas, permitindo sua obtenção em frações ou seu isolamento de modo individual. Na classificação das técnicas cromatográficas, a cromatografia em camada delgada, a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia em coluna estão inseridas entre as técnicas de cromatografia líquida (NETO e NUNES, 2003).

A técnica por cromatografia em camada delgada apresenta as vantagens de separação rápida, versatilidade, reprodutibilidade e baixo custo. É considerada a mais simples e mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. Como técnica preparativa, pode ser utilizada para o isolamento de frações de misturas complexas ou na purificação de substâncias (LOPES, 1997; NETO e NUNES, 2003).

O isolamento e purificação por técnicas de cromatografia líquida também é possibilitado pela cromatografia em coluna. Neste ensaio, é permitida, de modo gradual ou abrupto, a mudança da polaridade do solvente em função da natureza da separação que se obtém durante a análise. Na maioria dos casos, as frações são coletadas e avaliadas por cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência. As frações similares são reunidas e o solvente evaporado, permitindo que os objetivos de separação cromatográfica sejam atingidos com um pequeno número de frações (NETO e NUNES, 2003).

Considerando os resultados obtidos na avaliação dos fatores de degradação (item 4.2) e na determinação da cinética química de degradação térmica (item 4.3), partiu-se para uma proposta de isolamento de produtos de degradação formados nas condições de degradação forçada por temperatura e catálise básica (NaOH 0,1 M).

A avaliação da degradação térmica do meropenem como produto reconstituído, descrita no item 4.2 e 4.3, permitiu a observação da formação de inúmeros produtos de degradação, detectados por CLAE. Por outro lado, a degradação do meropenem na forma sólida, embora acentuada em termos de

redução de teor, levou à formação dos produtos de degradação em menor quantidade. Esta constatação justifica o isolamento de produtos de degradação térmica a partir da amostra reconstituída do meropenem.

Para os produtos de degradação térmica, primeiramente objetivou-se a separação e isolamento pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa. Este estudo envolveu a adaptação das condições de eluição para uma coluna do tipo semi-preparativa, considerando os produtos de degradação objetivados. Após variação das condições cromatográficas, os produtos de degradação detectados majoritariamente pareciam ter interferência de outros compostos também detectados na corrida cromatográfica. Além disso, a necessidade de grande quantidade de água na fase móvel poderia prejudicar as frações coletadas, visto que a sabida degradação do meropenem em meio aquoso poderia ser aplicada para seus produtos. Uma possível etapa exaustiva de eliminação da água nas frações, talvez com a necessidade de temperatura elevada num evaporador rotatório, acabou por estimular a busca por outro método de isolamento.

Partiu-se então para o isolamento por cromatografia em camada delgada preparativa. Num primeiro momento, foram efetuados testes em placas de cromatografia em camada delgada analítica. O primeiro sistema eluente testado foi o proposto por MENDEZ (2003) para análise qualitativa do meropenem. O eluente era composto pela mistura butanol:ácido acético glacial:água (4:2:4, v/v/v), o que acabava por gerar uma corrida cromatográfica demasiadamente lenta. A não separação dos produtos de degradação por este sistema levou a mudanças no eluente cromatográfico. Vários outros sistemas, com diferentes solventes e diferentes proporções foram testados, alguns com resultados promissores, que, no entanto, não se reproduziam quando da passagem para a escala preparativa, principalmente pelo aspecto separação eficiente. Embora raros, alguns trabalhos descrevendo técnicas de cromatografia em camada delgada para análise de penicilinas e cefalosporinas foram consultados, porém não se apresentavam promissores para a carbapenema em estudo.

Na busca por um ensaio cromatográfico eficiente, foi desenvolvido um método por cromatografia em coluna. De modo preliminar, alguns testes foram efetuados

com o objetivo de aprendizado da técnica e de padronização das condições gerais para execução do ensaio. Uma análise preliminar das frações coletadas indicava a inexistência de frações puras, contendo um único produto. No entanto, a análise das frações por cromatografia em camada delgada fornecia resultados promissores no sentido da possibilidade de associação destas duas técnicas cromatográficas para isolamento dos produtos de degradação.

Depois de estabelecidas as condições do ensaio, foram desenvolvidos os experimentos voltados ao isolamento efetivo dos produtos de degradação. Uma primeira etapa incluiu a análise das frações por cromatografia em camada delgada analítica utilizando o mesmo sistema eluente responsável por sua eluição da coluna. Os resultados indicaram que nenhuma delas apresentava pureza adequada, além de não estarem separadas de modo satisfatório para um posterior isolamento por técnica preparativa. A análise das frações por CLAE também confirmava que as mesmas estavam impuras, o que acabava por configurar uma situação de inviabilidade de isolamento direto por técnica de coluna cromatográfica.

Uma nova avaliação dos resultados obtidos por CCD poderia indicar as ações a serem tomadas. Assim, a análise cromatográfica das frações mais apolares (fração 2, fração 3 e fração 4) permitia a detecção, embora em pequena quantidade, de produtos de degradação. A análise das frações mais polares, a partir da fração 12 (sistema eluente - diclorometano:metanol, 72:28, v/v), permitia a observação de uma mancha forte junto ao final da migração, ou seja, com R_f igual a 1, o que se repetia nas frações subseqüentes. Este resultado estimulou a alteração do sistema eluente utilizado para a análise cromatográfica destas frações polares para a proporção de eluente utilizada nas frações apolares 2 e 3, com aumento da proporção de diclorometano (diclorometano:metanol, 95:05, v/v). Com esta modificação, a mancha foi detectada em R_f menor, em torno 0,70, e em maior quantidade, provavelmente por estar mais concentrada nas frações de maior polaridade do sistema cromatográfico desenvolvido. Fica claro o entendimento desta modificação de polaridade e de afinidade pela fase estacionária quando se reflete que um sistema eluente mais polar propiciou a migração do componente de forma exacerbada (R_f igual a 1). Para sua maior retenção, se faz necessário torná-lo mais

afim pela sílica, de característica polar, e para isso deve-se diminuir sua afinidade pelo sistema eluente, portanto tornando-o mais apolar em relação à sílica.

A partir desta alteração de sistema eluente, foi possível verificar que o produto de degradação objetivado (PD1) estava presente em menor quantidade nas primeiras frações, sendo detectado em maior quantidade nas frações mais polares, ou seja, a partir da fração 12. É importante salientar que a comparação de polaridade utilizada neste trabalho somente se aplica à condição ensaiada. Tal afirmação vem da observação de que a fração 12 teoricamente não é uma fração polar, pois apresenta 72% de diclorometano em sua composição.

A Figura 43 ilustra um cromatograma representativo obtido a partir da análise por cromatografia em camada delgada das frações 3, 4, 6, 9, 12, 13, 14, 15, 16 e 18. É possível observar que o sistema eluente padronizado (diclorometano:metanol, 95:05, v/v) propicia a detecção de uma mancha em R_f de 0,71, bem separada de outros produtos também detectados. A revelação em comprimento de onda de 365 nm também permite a detecção de produtos de degradação, porém de modo menos conclusivo.

Numa avaliação mais criteriosa da Figura 43, é possível verificar que o meropenem SQR não é eluído com o sistema cromatográfico utilizado, o que confirma se tratar de um fármaco polar. O produto de degradação PD1 apresenta, então, menor polaridade que o meropenem. Quanto à amostra degradada total, submetida à degradação nas mesmas condições padronizadas para este estudo, os produtos de degradação não são detectados, talvez por estarem pouco concentrados, o que reforça a necessidade da técnica de cromatografia em coluna, que permite um trabalho com maior quantidade de amostra. As frações analisadas são concentradas de produto, basta citar a quantidade de amostra adicionada à coluna (200 mg).

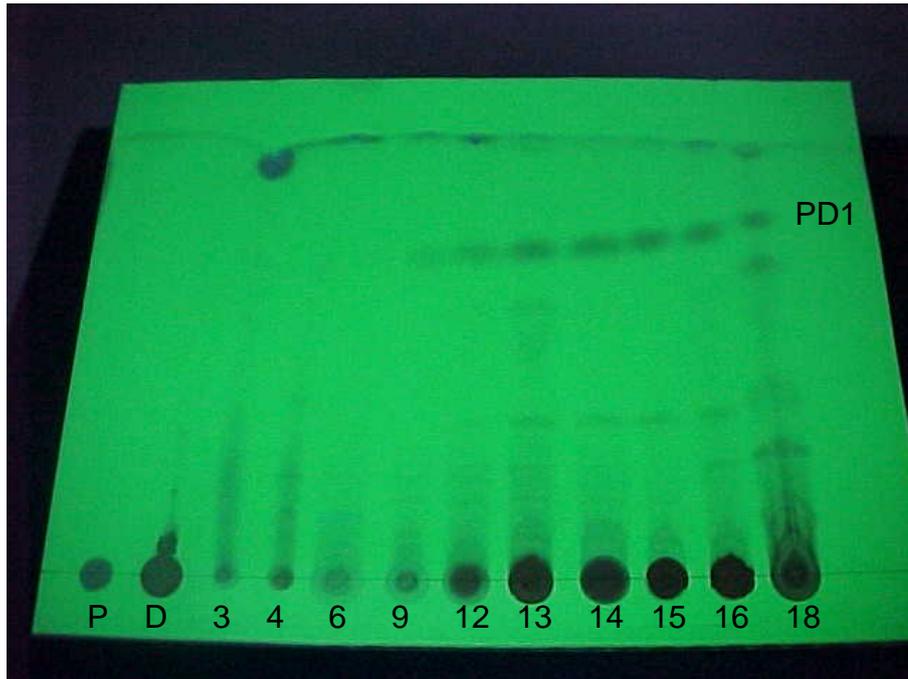


Figura 43 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia em coluna a partir de amostras de meropenem reconstituído submetido à degradação a 45 °C por 36 horas. Sistema eluente: diclorometano:metanol, 95:05, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm. Cada número ilustrado na figura corresponde ao número da fração analisada. P: meropenem SQR 1,0 mg/mL; D: amostra degradada total; PD1: produto de degradação em análise.

Uma análise mais específica das últimas frações é ilustrada na Figura 44. Novamente é detectado o produto PD1, agora com um Rf de 0,65. Esta variação de Rf é plenamente aceitável, tendo em vista as pequenas variações que podem ocorrer durante o preparo do sistema eluente ou do sistema cromatográfico como um todo. Além disso, a técnica desenvolvida objetiva a análise de produtos de degradação em uma matriz complexa.

Neste momento é possível discutir a relação da provável característica de apolaridade do produto PD1 com a afinidade pelos sistemas eluentes utilizados na cromatografia em coluna, não esquecendo que o termo apolar é utilizado comparativamente ao meropenem. Considerando que a proporção diclorometano:metanol presente nos sistemas utilizados para eluição da fração 12 até a fração 18 varia de 72:28 (v/v) até 38:62 (v/v), é possível afirmar que o produto de degradação provavelmente apresenta uma característica de polaridade em equilíbrio com as características dos eluentes utilizados. Numa outra concepção, o

produto de degradação PD1 seria formado em grande quantidade, o que acarretaria na sua presença em várias frações da coluna. É importante destacar que o fato do produto apresentar um melhor Rf com o sistema eluente diclorometano:metanol (95:05, v/v) não quer dizer que o mesmo tenha a característica de polaridade igual ao sistema eluente referido. Cabe lembrar que os sistemas cromatográficos são diferentes, com componentes e condições também diferentes.

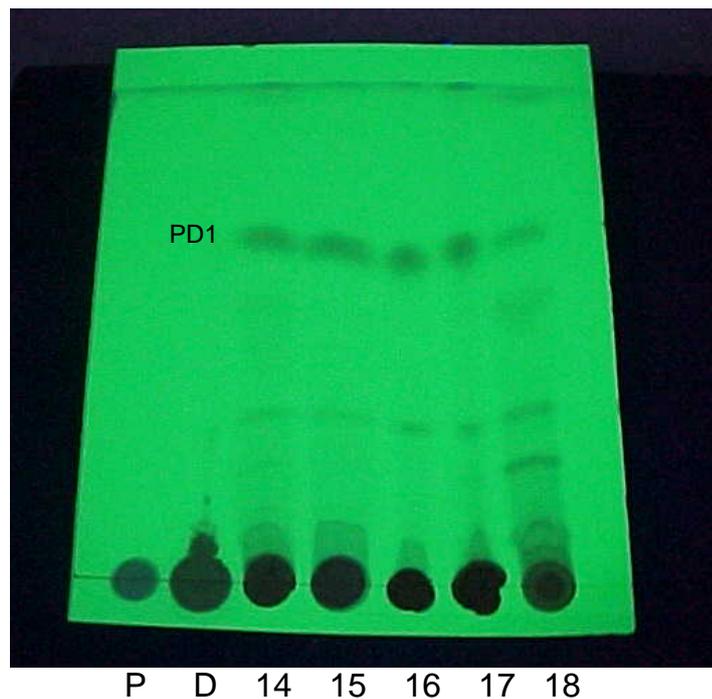


Figura 44 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia em coluna a partir de amostras de meropenem reconstituído submetido à degradação a 45 °C por 36 horas. Sistema eluente: diclorometano:metanol, 95:05, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm. Cada número ilustrado na figura corresponde ao número da fração analisada. P: meropenem SQR 1,0 mg/mL; D: amostra degradada total; PD1: produto de degradação em análise.

A observação da forte coloração no ponto de aplicação, mesmo após a eluição, estimulou a modificação do sistema eluente para possibilitar a detecção de produtos de degradação em maior quantidade. Entretanto, os vários sistemas eluentes testados não propiciaram a detecção de produtos passíveis de isolamento pelo conjunto de técnicas propostas. A Figura 45 ilustra um cromatograma representativo da análise das frações por CCD com um sistema eluente de acentuada polaridade (diclorometano:metanol, 15:85, v/v). Esta maior polaridade

possibilitou a migração dos produtos antes retidos no ponto de aplicação, porém as manchas não apresentaram boa resolução em termos de separação.

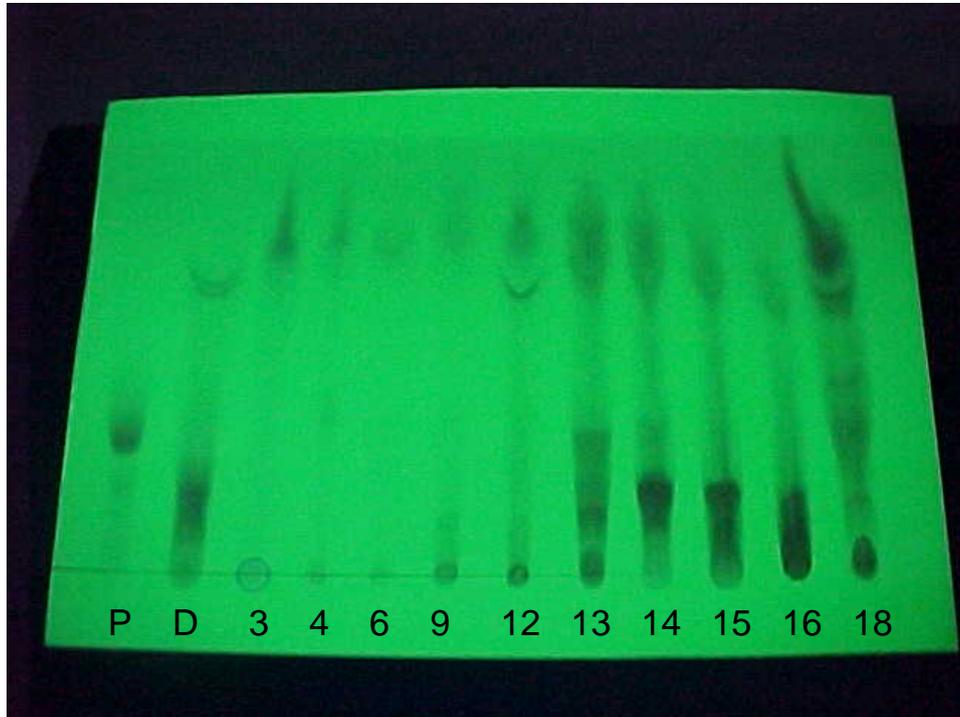


Figura 45 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia em coluna a partir de amostras de meropenem reconstituído submetido à degradação a 45 °C por 36 horas. Sistema eluente: diclorometano:metanol, 15:85, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm. Cada número ilustrado na figura corresponde ao número da fração analisada. P: meropenem SQR 1,0 mg/mL; D: amostra degradada total.

Levando em conta a detecção do produto PD1 nas últimas frações da coluna (fração 12 a fração 18), as mesmas foram unidas, procedimento este adotado para os ensaios desenvolvidos. As boas perspectivas de isolamento do produto PD1 levaram à avaliação de sua presença nas amostras de pó para solução injetável submetidas à degradação a 80 °C por 30 dias, conforme descrito no item 4.2. De acordo com o cromatograma ilustrado na Figura 46, o produto de degradação PD1 está presente na forma sólida do meropenem exposta à degradação. A condição de degradação ensaiada poderia ser utilizada neste estudo de isolamento e purificação. Nesta mesma figura, é possível verificar a detecção do produto PD1 na amostra oriunda da união das frações da coluna, condição esta padronizada para a continuidade do estudo de isolamento.

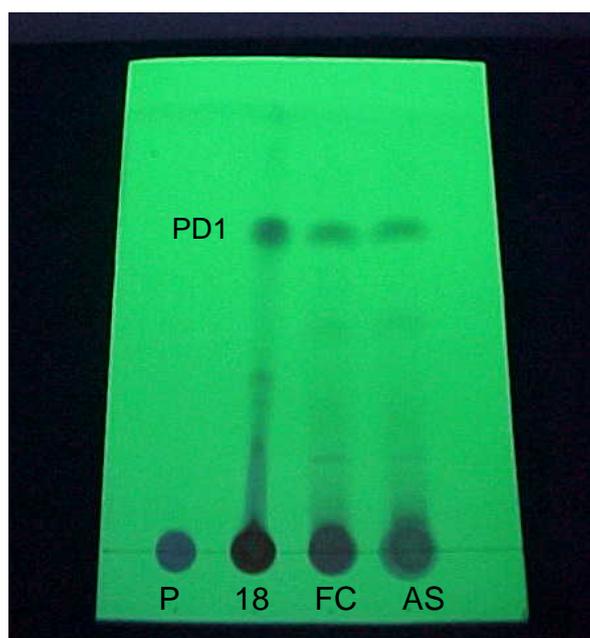


Figura 46 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada da fração 18 (18), da amostra oriunda da união das frações da coluna (FC), da amostra sólida de meropenem degradado a 80°C por 30 dias (AS) e do meropenem SQR 1,0 mg/mL (P). Sistema eluente: diclorometano:metanol, 95:05, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm.

A partir da tomada de decisão de unir as frações de interesse, uma nova análise qualitativa por CLAE foi efetuada, objetivando a observação do perfil cromatográfico desta nova amostra, oriunda da união das frações da coluna cromatográfica. Na Figura 47, é possível observar o cromatograma referente à análise dessa amostra. A análise cromatográfica permite a detecção de uma série de produtos de degradação, caracterizando a amostra analisada como uma mistura complexa de diferentes componentes. Este perfil cromatográfico pode ser comparado com o perfil da amostra degradada total, referente ao meropenem reconstituído a 50 mg/mL e degradado a 45 °C por 36 horas, utilizada como origem do isolamento dos produtos de degradação. Este resultado demonstra que a técnica de cromatografia em coluna utilizada neste estudo teria a principal função de permitir a concentração de produtos de degradação para um isolamento posterior. Cabe salientar que a análise foi realizada em 220 nm, em virtude da maior detecção de produtos de degradação neste comprimento de onda.

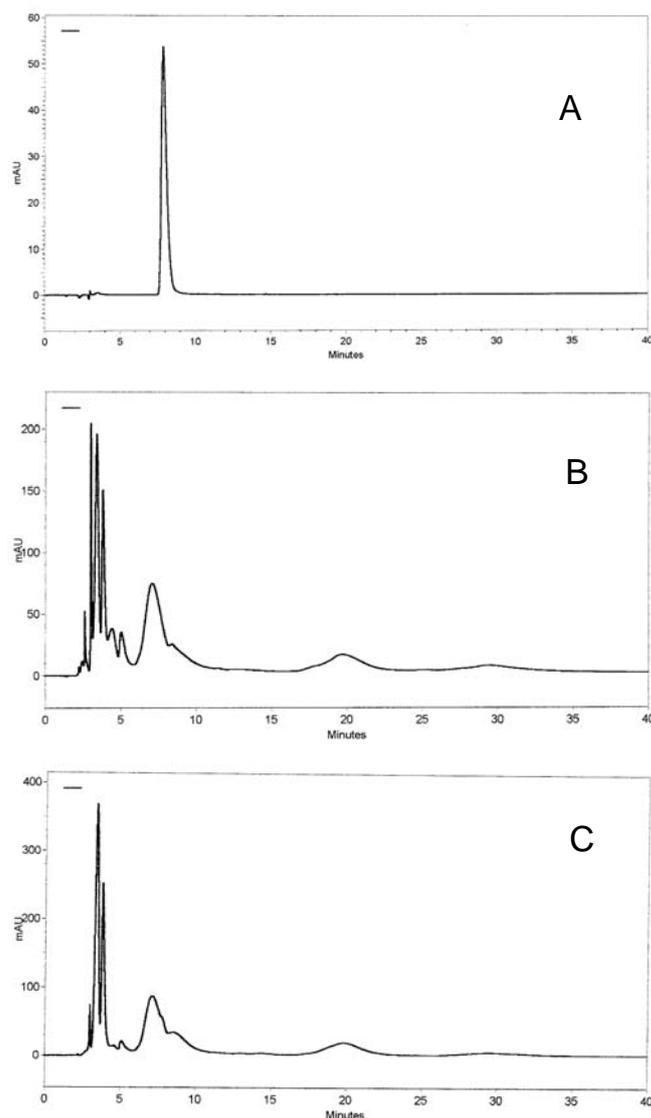


Figura 47 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 $\mu\text{g/mL}$ (A), da amostra oriunda da união das frações da coluna cromatográfica (B) e da amostra de meropenem reconstituído em água desionizada (50 mg/mL) e degradado a 45 $^{\circ}\text{C}$ por 36 horas (C). Detecção em 220 nm. Meropenem é detectado em torno de 8,0 minutos (A).

Padronizadas as condições para a cromatografia em coluna e para a cromatografia em camada delgada analítica, visando o produto PD1, partiu-se para a cromatografia em camada delgada preparativa. A Figura 48 ilustra uma placa cromatográfica do tipo preparativa, com detecção de dois produtos de degradação majoritários, separados adequadamente. Não sendo possível verificar nesta figura, se faz necessário descrever que o produto de detecção de R_f 0,62 (PD2), quando visualizado na placa, sem aplicação de luz ultravioleta para detecção, apresenta

uma coloração amarelada. O produto de degradação com Rf 0,71 somente é visualizado com a aplicação da luz ultravioleta a 254 nm. Este produto de maior Rf corresponde ao produto de degradação PD1. A revelação da placa em luz ultravioleta a 365 nm permite a detecção de outros produtos de degradação, porém com menor intensidade e de difícil resolução. Estes produtos parecem não interferir naqueles detectados a 254 nm.

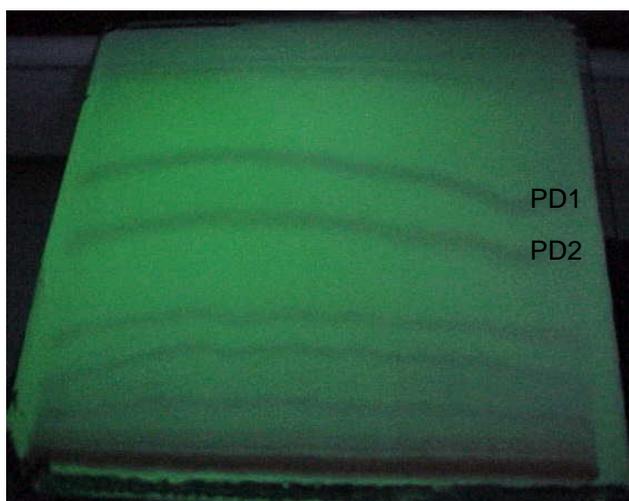


Figura 48 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada preparativa da amostra oriunda da união das frações da coluna cromatográfica. Sistema eluente: diclorometano:metanol, 95:05, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm. PD1: produto de degradação 1, Rf = 0,71; PD2: produto de degradação 2, Rf = 0,62.

Devido à detecção do produto de degradação PD2 na análise por CCD preparativa, algumas discussões podem ser levantadas. A não detecção clara na análise por CCD analítica no mesmo Rf pode ser atribuída ao fato de que a técnica preparativa possui maior eficiência de separação, dado o seu maior número de pratos teóricos. Uma outra explicação para a detecção de PD2 seria a maior quantidade de amostra aplicada nas placas preparativas, que propiciaria a detecção do produto em questão. Dada a reprodução dos resultados para os dois produtos de degradação, partiu-se para o seu isolamento.

O isolamento dos produtos PD1 e PD2 ocorreu de modo concomitante, já que são detectados na mesma corrida cromatográfica. Considerando a provável instabilidade dos produtos de degradação do meropenem, estudou-se minuciosamente como se faria o isolamento de modo que estes produtos fossem

processados rapidamente, evitando o contato demasiado com a sílica e com os solventes de extração. Decidiu-se por um isolamento rápido, contemplando a análise por CCD preparativa em dois dias, com raspagem das placas logo após a corrida. Os produtos da raspagem foram unidos em frascos erlenmeyers, de modo a evitar o acúmulo em um só, o que poderia prejudicar a eficiência de extração. No mesmo dia de término das análises por CCD preparativa, os produtos foram submetidos à extração e secagem conforme descrito no item 4.4.1.1.7.

Os produtos isolados foram analisados por CCD analítica para avaliação da pureza após o procedimento de extração (Figura 49). Os resultados da análise cromatográfica, com revelação em lâmpada UV a 254 nm, indicaram a possível pureza do produto PD1, ao contrário do produto PD2 que aparentava estar impuro. Na revelação a 365 nm, a mesma conclusão poderia ser tirada. A partir destas observações, algumas questões podem ser levantadas. O fato de PD2 estar impuro pode estar relacionado à degradação durante o seu isolamento. Outra possibilidade seria a presença de impurezas já na mancha raspada a partir da CCD preparativa.

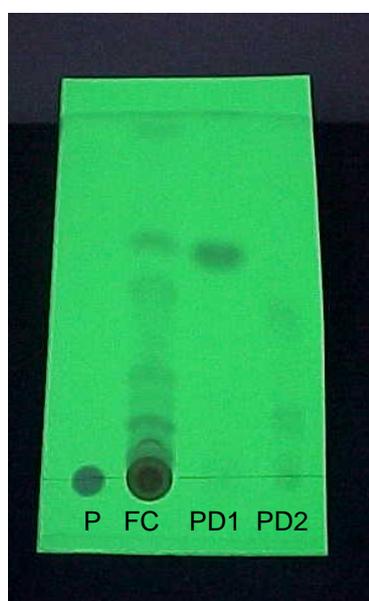


Figura 49 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada analítica dos produtos de degradação térmica do meropenem. Sistema eluente: diclorometano:metanol, 95:05, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm. P: meropenem SQR; FC: amostra oriunda da união das fracos da coluna cromatográfica; PD1: produto de degradação 1; PD2: produto de degradação 2.

Para a confirmação de que os produtos detectados são realmente oriundos da degradação do antibiótico em estudo, foram analisados alguns fatores que poderiam estar interferindo nos resultados. Uma avaliação importante é a interferência de possíveis contaminantes presentes na sílica utilizada para coluna cromatográfica e para CCD preparativa. As amostras representativas destes componentes foram obtidas aplicando-se as mesmas condições de análise, inclusive em termos de solvente, porém na ausência da amostra em estudo. A Figura 50 ilustra o cromatograma de análise dos produtos PD1 e PD2 junto às amostras dos possíveis interferentes. Os resultados indicam que o material utilizado durante o estudo de isolamento não interfere nos produtos PD1 e PD2.

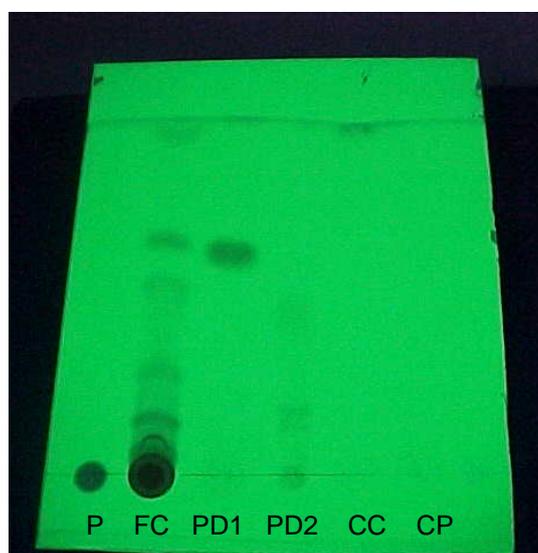


Figura 50 - Cromatograma representativo da análise por cromatografia em camada delgada analítica dos produtos de degradação térmica do meropenem e de possíveis interferentes do isolamento dos produtos. Sistema eluente: diclorometano:metanol, 95:05, v/v. Revelação: lâmpada UV a 254 nm. P: meropenem SQR; FC: amostra oriunda da união das fracos da coluna cromatográfica; PD1: produto de degradação 1; PD2: produto de degradação 2; CC: amostra branco obtida a partir da sílica da cromatografia em coluna; CP: amostra branco obtida a partir da sílica da cromatografia em camada delgada preparativa.

Embora os resultados obtidos por CCD fossem promissores, não poderiam ser conclusivos sem uma análise mais precisa dos produtos PD1 e PD2. O método cromatográfico por CLAE, com detector UV-PDA, foi então utilizado para confirmação das características de pureza dos produtos de degradação.

Na Figura 51, um cromatograma representativo da análise do produto PD1 por CLAE está anexado. É possível observar um pico cromatográfico na faixa de 19 minutos, aparentemente puro, embora com uma característica de maior largura de

pico. Cabe salientar que a amostra continha os solventes diclorometano e metanol, o que conferia outros picos na corrida cromatográfica, ditos em 13 minutos e em 37 minutos. Alguns sinais em torno de 3 minutos também podem ser atribuídos à mistura de solventes. A análise do produto PD1 ocorreu em comprimento de onda de 220 nm (Figura 51, B), o qual fornecia um maior pico de absorção, se comparado ao comprimento de onda de 298 nm (Figura 51, C), utilizado para a quantificação do meropenem por este método.

É importante mencionar que após as análises cromatográficas devidas, o resultado referente ao produto PD1 foi avaliado quanto à possibilidade de haver impurezas em outros comprimentos de onda de detecção. Para tal, procedeu-se a varredura da corrida cromatográfica na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm, não sendo detectada a presença de outros picos cromatográficos.

A partir do recurso de detecção por UV-PDA procedeu-se a análise da pureza do pico cromatográfico referente ao produto PD1. Os resultados indicaram que o pico apresenta característica de impuro, no entanto uma análise mais rigorosa desta função e dos seus objetivos não permite a conclusão definitiva de que o produto PD1 está impuro. Basta considerar que o método por CLAE utilizado foi desenvolvido para quantificação do meropenem (MENDEZ *et al.*, 2003), e não para o estudo de seus produtos de degradação, embora os resultados indiquem a capacidade da técnica para tal proposta. Além disso, os objetivos da análise de pureza estão relacionados à separação de impurezas do componente principal, no caso o fármaco, evitando que os resultados analíticos estejam incorretos pela presença de impurezas (WIBERG *et al.*, 2004).

Obviamente que um resultado de pureza do pico cromatográfico do produto PD1 seria bastante estimulante para a posterior identificação. Um fator que poderia estar interferindo no resultado de pureza de pico é a elevada concentração do produto PD1 nas análises cromatográficas, o que pode ser visto pela largura do pico e pela acentuada intensidade de absorção. A redução desta concentração poderia modificar o resultado. A detecção em comprimento de onda de 220 nm também pode ser decisiva, visto que os solventes presentes na fase móvel e na amostra poderiam estar absorvendo de modo residual e interferindo no resultado em questão.

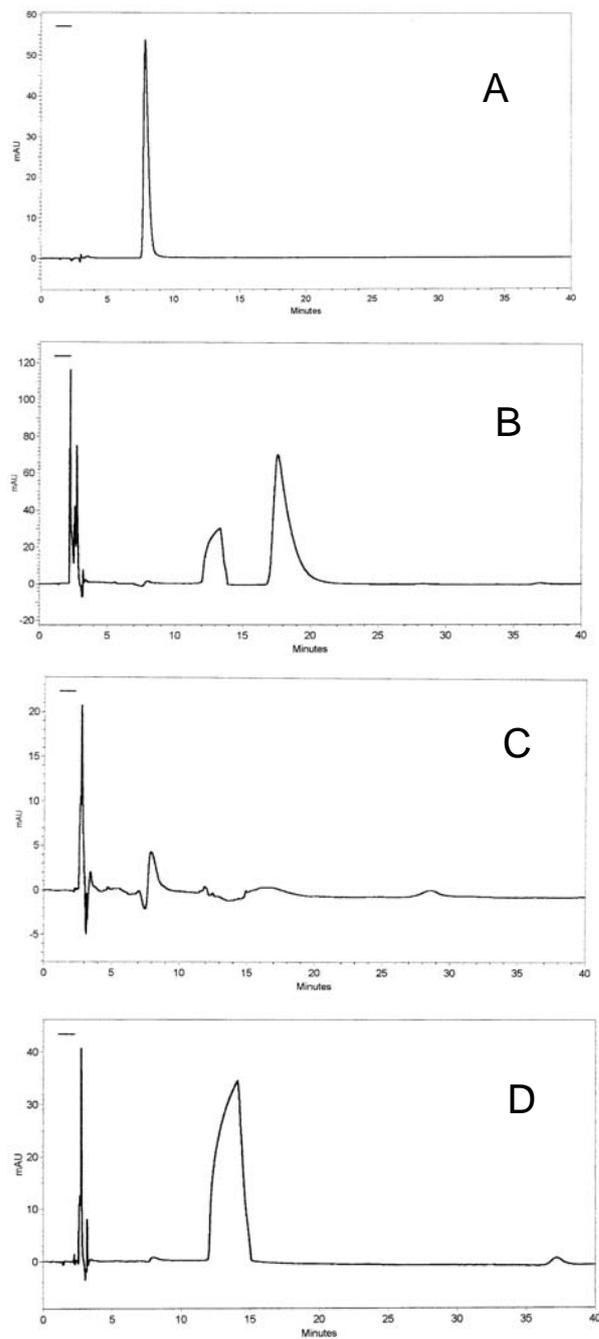


Figura 51 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 $\mu\text{g/mL}$ (A), do produto de degradação PD1 (B e C) e da mistura de solventes diclorometano:metanol (50:50, v/v) (D). Detecção em 220 nm (A, B e D), Detecção em 298 nm (C). Meropenem é detectado em torno de 8,0 minutos (A). Produto de degradação PD1 é detectado em torno de 19 minutos (B)

Uma avaliação mais aprofundada da análise por CLAE, com uso de detector UV-PDA, permite a obtenção do espectro de absorção na região do ultravioleta

referente ao pico cromatográfico desejado. O perfil de absorção no UV do produto PD1 difere do perfil de absorção do meropenem, indicando uma provável alteração estrutural do composto isolado em regiões de grupamento cromóforos importantes. Estes resultados estão demonstrados na Figura 52, junto aos cromatogramas de análise. O meropenem é detectado em torno de 8 minutos, e a análise espectral deste pico fornece um perfil de absorção no ultravioleta com máximo em 300 nm (Figura 52, A e A1). Já a análise do pico cromatográfico do produto de degradação PD1, detectado em torno de 19 minutos, fornece um espectro de absorção na região do ultravioleta com máximos de absorção em 265 nm e 220 nm (Figura 52, B e B1).

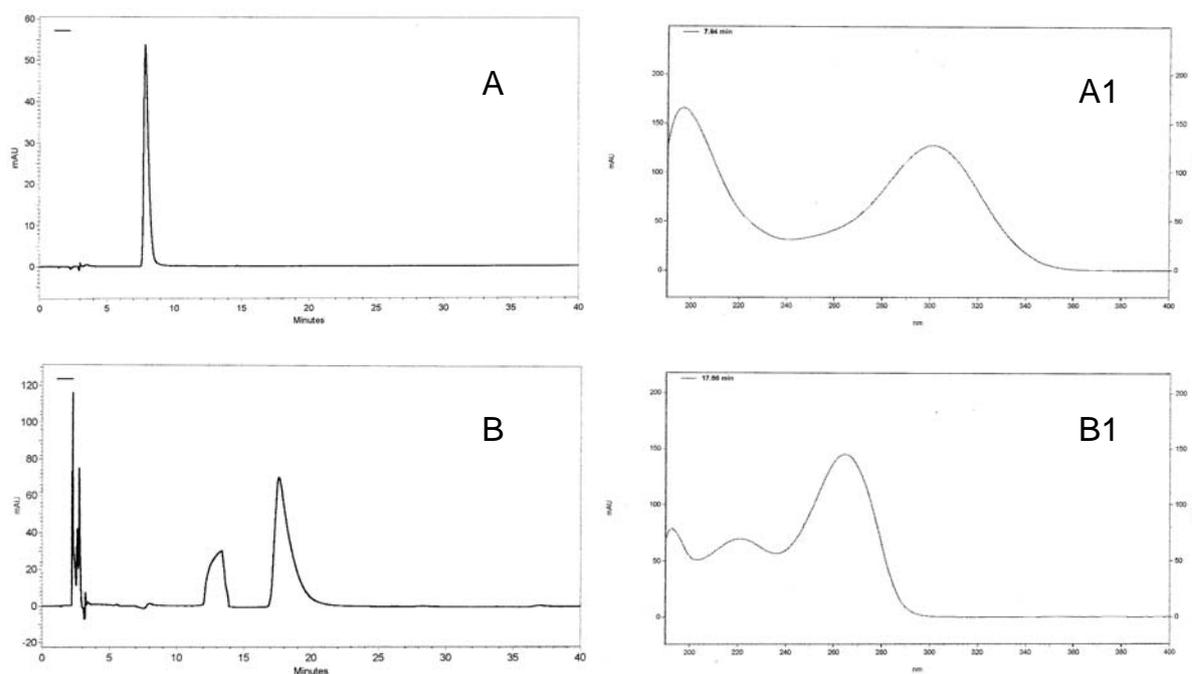


Figura 52 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE e espectros de absorção dos picos cromatográficos referente à análise do meropenem SQR a 100 $\mu\text{g/mL}$ (A) e do produto de degradação PD1 (B). Espectro de absorção no ultravioleta do meropenem detectado em 8 minutos (A1), espectro de absorção no ultravioleta do produto de degradação PD1 detectado em 19 minutos (B1). CLAE com detecção em 220 nm.

O estudo de avaliação da pureza dos produtos de degradação isolados contemplou também a análise do produto de degradação PD2. Embora os resultados de análise por CCD fossem indicativos de presença de impurezas na amostra referente ao produto isolado, efetuou-se uma avaliação mais aprofundada por CLAE.

Na Figura 53, representativa da análise cromatográfica por CLAE do produto de degradação PD2, é possível observar que a amostra avaliada está impura. Num primeiro momento, são verificados pequenos picos cromatográficos, pouco visíveis, porém, com a ampliação do cromatograma, o caráter impuro da amostra é confirmado. Na verdade, não é possível identificar o pico cromatográfico correspondente ao produto de degradação PD2, talvez devido a sua reduzida concentração na amostra de análise. Isto reflete a baixa concentração do produto na amostra degradada de meropenem e, em última instância, na placa preparativa de onde foi extraído.

Em se avaliando a totalidade dos resultados obtidos para isolamento de produtos de degradação térmica do meropenem, fica clara a possibilidade de identificação do produto de degradação PD1. Quanto ao produto de degradação PD2, a observação da presença de impurezas na amostra isolada, bem como da sua provável reduzida concentração, impossibilita um posterior estudo de identificação estrutural.

Levando em conta o objetivo de identificação do produto PD1, é importante destacar alguns aspectos relacionados ao rendimento de seu isolamento pelas técnicas cromatográficas empregadas. Para garantir uma quantidade adequada à análise com fins de elucidação estrutural, a separação cromatográfica por coluna e CCD preparativa foi efetuada diversas vezes, já que em cada seqüência de experimentos a quantidade final de produto isolado se aproximava de 1,5 mg, caracterizando um baixo rendimento. Portanto, além da possível perda durante a execução das técnicas, pode-se inferir que o produto é formado em pequena quantidade.

Terminado o trabalho de isolamento de produtos de decomposição térmica, partiu-se para a avaliação dos outros fatores de degradação promissores para um possível estudo de isolamento. Considerando os resultados prévios obtidos para a degradação do meropenem por catálise básica (item 4.2.2), na presença de hidróxido de sódio 0,1 M, escolheu-se por avaliar este fator de degradação quanto à formação de produtos de degradação passíveis de isolamento.

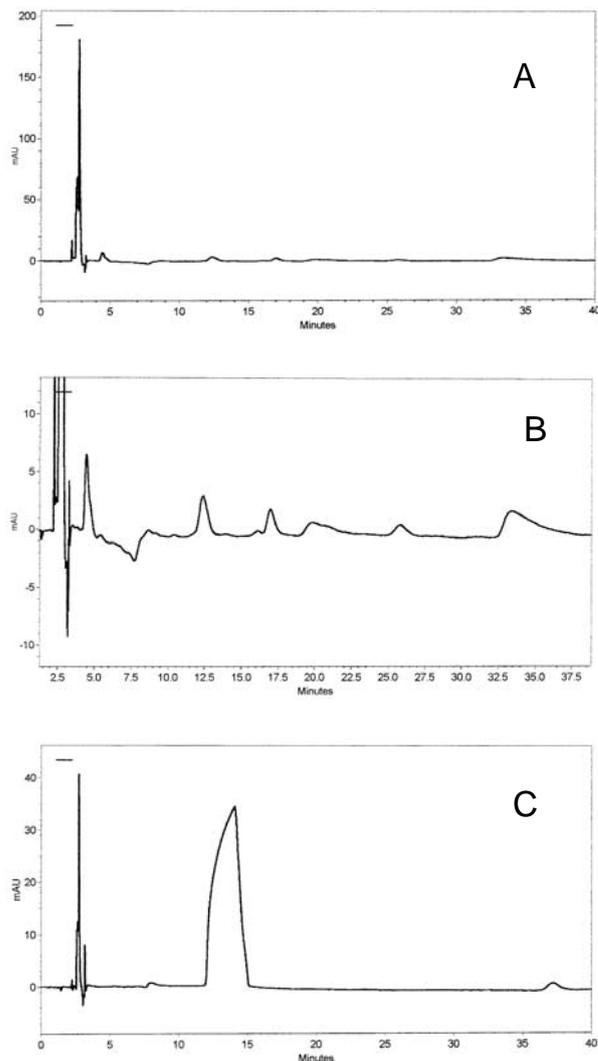


Figura 53 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do produto de degradação PD2 (A e B) e da mistura de solventes diclorometano:metanol (50:50, v/v) (C). Detecção em 220 nm. O cromatograma B se refere ao cromatograma A ampliado.

Como já relatado, a degradação do meropenem na presença de hidróxido de sódio 0,1 M é imediata, levando a formação de um único produto de degradação. Uma observação da literatura existente sobre isolamento de produtos de degradação de derivados carbapenêmicos permite a verificação de um trabalho voltado à determinação da estabilidade do ertapenem (SAJONZ *et al.*, 2006), em que é descrito que o tratamento com hidróxido de sódio leva a formação de um produto de degradação. Neste trabalho, a amostra degradada foi submetida diretamente à liofilização e identificação posterior.

Levando em conta que na degradação do meropenem, quando submetido à catálise básica na condição estudada, ocorre total decomposição da amostra e formação de um único produto de degradação, o isolamento deste produto não necessitaria de técnicas cromatográficas. Em outras palavras, o produto já estaria puro após a degradação do antibiótico.

A confirmação desta hipótese envolveu alguns experimentos de isolamento. Num primeiro momento, submeteu-se o antibiótico à degradação alcalina e analisou-se a amostra degradada por CLAE. Na Figura 54, estão representados os cromatogramas referentes à análise por CLAE da amostra degradada. É possível verificar a presença de um único produto de degradação em 3,5 minutos, com total decomposição do meropenem (Figura 54, B e C). O cromatograma do meropenem SQR destaca sua detecção em 8 minutos (Figura 54, A). Mais uma vez optou-se pela detecção em comprimento de onda de 220 nm devido a maior absorção dos produtos de degradação.

A partir da confirmação dos resultados obtidos preliminarmente, submeteu-se a amostra degradada à secagem para eliminação de seu conteúdo aquoso, devido à presença da solução de hidróxido de sódio. Após secagem, conforme item 4.4.1.2.1, a amostra foi dissolvida em água e analisada novamente por CLAE para análise de sua pureza.

A Figura 55 ilustra o cromatograma referente à análise do produto de degradação alcalina do meropenem (PD3). Neste momento, é possível observar que o produto PD3 parece estar puro na amostra analisada. Deste modo, realmente não se faz necessária a aplicação de técnicas complementares para o isolamento.

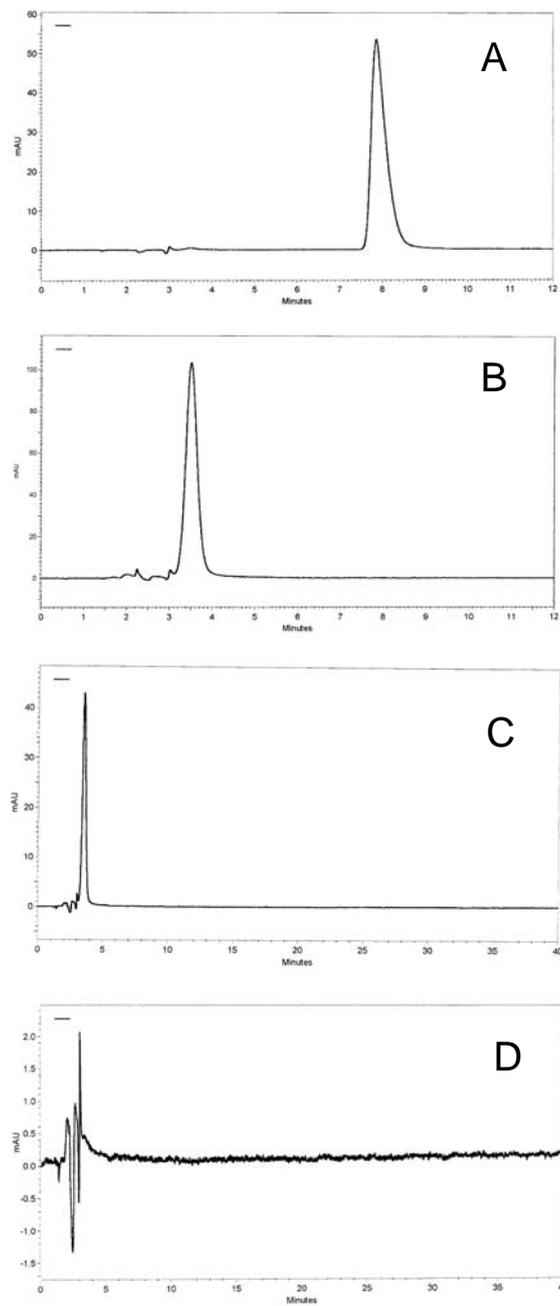


Figura 54 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do meropenem SQR a 100 µg/mL (A), da amostra de meropenem degradada na presença de hidróxido de sódio 0,1 M por 10 minutos (B e C) e da solução de hidróxido de sódio 0,1 M (D). Detecção em 220 nm. Meropenem é detectado em torno de 8,0 minutos (A). Produto de degradação é detectado em torno de 3,5 minutos (B e C).

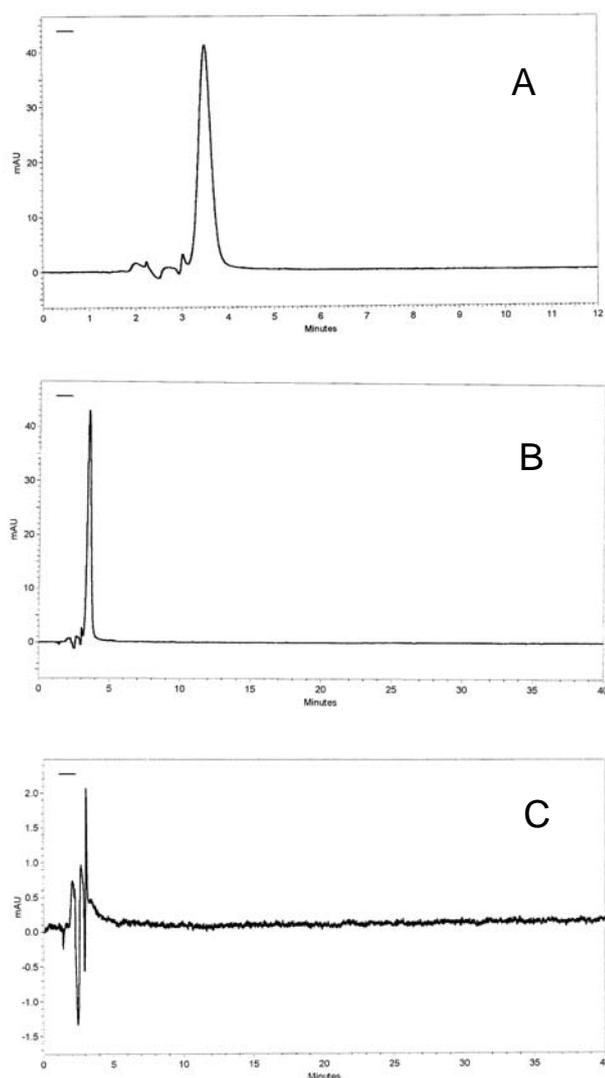


Figura 55 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE do produto de degradação PD3 (A e B) e da solução de hidróxido de sódio 0,1 M (C). Detecção em 220 nm. Produto de degradação é detectado em torno de 3,5 minutos.

Assim como para o produto de degradação térmica PD1, anteriormente descrito, a análise da pureza do pico cromatográfico forneceu resultados indicativos de pico impuro para o produto PD3. A mesma discussão pode ser levantada, de modo que este resultado não invalida a possibilidade do produto estar puro e poder ser identificado numa posterior etapa.

Passando a uma análise mais específica do pico cromatográfico do produto PD3, avaliou-se o seu perfil espectral na região do ultravioleta (Figura 56). A partir da comparação do espectro de absorção do produto PD3 com o espectro de

absorção do meropenem, pode-se prever que houve uma alteração estrutural brusca na estrutura molecular do fármaco, dada a mudança de um máximo de absorção 300 nm (Figura 56, A e A1) para um máximo de absorção de 200 nm (Figura 56, B e B1), com modificação brusca do perfil de absorção.

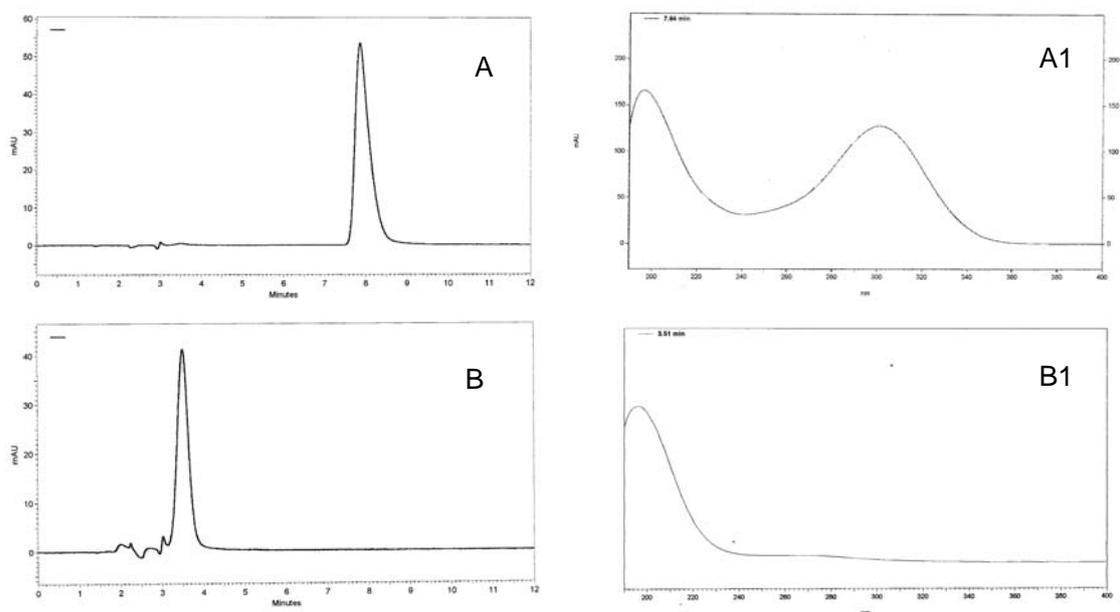


Figura 56 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE e espectros de absorção dos picos cromatográficos referente à análise do meropenem SQR a 100 $\mu\text{g/mL}$ (A) e do produto de degradação PD3 (B). Espectro de absorção no ultravioleta do meropenem detectado em 8 minutos (A1), espectro de absorção no ultravioleta do produto de degradação PD3 detectado em 3,5 minutos (B1). CLAE com detecção em 220 nm.

Tendo em vista que o espectro de absorção do produto de degradação pode se assemelhar ao espectro de alguns solventes, optou-se por proceder uma varredura dos picos cromatográficos referentes à análise do hidróxido de sódio 0,1 M. Os espectros visualizados indicaram absorção mínima na faixa de 200 a 400 nm, junto ao sinal de ruído.

Considerando o resultado preliminar de degradação do meropenem em meio ácido (HCl 0,1M) (item 4.2.2), e a formação de um produto de degradação majoritário em 3,5 minutos, efetuou-se uma comparação do perfil espectral dos produtos formados por catálise ácida (HCl 0,1 M) e por catálise básica (NaOH 0,1 M) para fins de discussão. A Figura 57 ilustra os cromatogramas obtidos a partir da análise das amostras degradadas por catálise ácida e básica, junto aos espectros de absorção obtidos na análise dos picos cromatográficos do produto de decomposição detectado em 3,5 minutos. A avaliação destes resultados permite inferir que nas

duas condições de degradação, em meio ácido e em meio alcalino, o produto de degradação formado pode ser o mesmo.

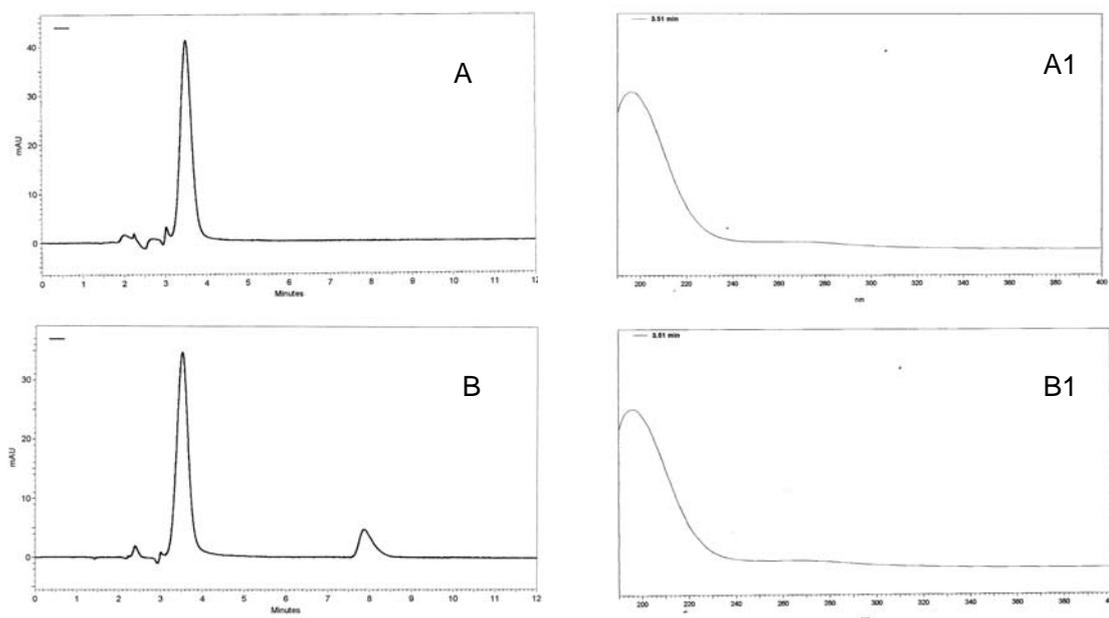


Figura 57 - Cromatogramas representativos da análise por CLAE e espectros de absorção dos picos cromatográficos referente à análise da amostra de meropenem submetido à degradação em meio básico (NaOH 0,1 M) por 10 minutos (A) e da amostra de meropenem submetido à degradação em meio ácido (HCl 0,1 M) por 60 minutos (B). Espectros de absorção no ultravioleta do produto de degradação detectado em 3,5 minutos (A1 e B1). CLAE com detecção em 220 nm.

Embora a catálise ácida resulte na formação provável do mesmo produto de degradação, a menor velocidade de degradação em comparação com a condição de catálise básica foi decisiva. Estes resultados estão apresentados no item 4.2.2. Na Figura 57, também é possível observar a presença do meropenem (tempo de retenção de 8 minutos) na amostra submetida à degradação ácida por 60 minutos (Figura 57, B), ao contrário da amostra submetida à degradação básica, que, após um tempo de 10 minutos, já apresentava a decomposição total do antibiótico (Figura 57, A).

Considerando o conjunto de resultados obtidos nesta etapa de isolamento e purificação dos produtos de degradação do meropenem, uma análise criteriosa da totalidade das informações pesquisadas indica a possibilidade real de identificação estrutural dos produtos de degradação PD1 e PD3.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

4.5.1 Metodologia

Para a identificação do meropenem SQR e dos produtos de degradação isolados foram empregadas as técnicas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de massas (MS).

4.5.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A aplicação da técnica de espectroscopia de RMN para o meropenem SQR contemplou a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , além dos espectros COSY, DEPT e HSQC. Foram analisadas duas amostras, fazendo uso de diferentes solventes, metanol deuterado e dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado, além de tetrametilsilano como referência interna. Cabe salientar que a obtenção do espectro DEPT ocorreu somente para a amostra dissolvida em metanol.

Para os produtos de degradação PD1 e PD3, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , além dos espectros COSY e HSQC. Utilizaram-se diferentes solventes, dependendo do produto de degradação. Na análise do produto PD1, utilizou-se DMSO deuterado, enquanto para o produto PD3, metanol deuterado. Tetrametilsilano foi utilizado como referência interna.

As análises foram efetuadas em espectrômetro Varian Inova (500 MHz), junto à Central Analítica do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os espectros de COSY (*Correlation Spectroscopy*) fornecem informações de correlação entre hidrogênios vizinhos. Os espectros DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) apresentam dados de acoplamento de carbono com hidrogênio. No presente trabalho, foram efetuadas as análises de DEPT 135° e DEPT 90°. O primeiro indica sinais referentes a CH_3 , CH_2 e CH , sendo que os sinais de CH_2 , no espectro, aparecem para baixo. O DEPT 90° indica sinais somente referentes a CH . Quanto aos espectros de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), os mesmos apresentam dados de correlação entre o carbono

e o(s) hidrogênio(s) a ele ligado(s) (GÜNTER, 1995; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

4.5.1.2 Espectroscopia de massas (MS)

Na análise por MS empregou-se a técnica de injeção direta, com ionização através de eletronebulização positiva (ESI⁺) – ionização eletrospray. Em alguns casos, além dos espectros de MS, foram obtidos espectros de MS-MS, para fragmentação do íon molecular. Em se tratando de eletronebulização positiva, os picos apresentados nos espectros se referem ao peso molecular adicionado da massa de um íon hidrogênio.

O equipamento utilizado foi o espectrômetro de massas Micromass Quattro, com software MassLinx 3.5 (Micromass Ltda.). Esta etapa foi desenvolvida junto ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

Para a análise do meropenem SQR, as condições padronizadas foram as seguintes: Fluxo de gás nitrogênio - 347 L/h; capilaridade do cone - 3,2 kV; voltagem do cone - 35 V; temperatura da fonte - 130 °C; temperatura de dessolvatação - 250 °C. Os espectros foram traçados variando m/z de 50 a 600 ou de 50 a 1200.

Para a análise dos produtos de degradação PD1 e PD3, as condições padronizadas foram as seguintes: Fluxo de gás nitrogênio - 356 L/h; capilaridade do cone - 2,96 kV; voltagem do cone - 43 V; temperatura da fonte - 130 °C; temperatura de dessolvatação - 250 °C. Neste caso, os espectros foram traçados variando m/z de 100 a 800.

No momento da injeção, as amostras foram diluídas em mistura de acetonitrila:água (60:40, v/v) (Tedia) adicionada de ácido fórmico 0,05% (Fluka). A concentração final para injeção variou entre diferentes concentrações: 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL.

Cabe salientar que os espectros de massas foram obtidos como representações do tipo centróide e do tipo espectro contínuo.

4.5.2 Resultados e Discussão

Os estudos de estabilidade não devem se limitar à detecção de produtos de degradação, pelo contrário. Segundo CARSTENSEN (2000), quando estes produtos são detectados, outras informações complementares devem ser obtidas, dentre elas o mecanismo de formação, incluindo a ordem de reação, e a identidade e estrutura química.

Os potenciais produtos de degradação e as rotas de decomposição envolvidas podem ser mais bem determinados a partir de estudos de degradação forçada (REYNOLDS *et al.*, 2002; KLICK *et al.*, 2005). De acordo com o ICH (2003), o ensaio por estresse pode auxiliar na identificação dos principais produtos de degradação. Aliás, a elucidação estrutural dos mesmos está entre os objetivos que justificam o desenvolvimento destes estudos (REYNOLDS *et al.*, 2002).

A identificação dos produtos de degradação pode ser realizada pela metodologia convencional de isolamento e de determinação estrutural por técnicas espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e espectrofotometria na região do infravermelho. No entanto, quando muitos produtos são formados, uma alternativa mais rápida é o uso das técnicas de cromatografia líquida acoplada à detecção por espectrometria de massas (LC-MS) ou por ressonância magnética nuclear (LC-RMN) (BAKSHI e SING, 2002).

No presente trabalho, algumas referências foram estudadas (GÜNTER, 1995; BARKER, 1999; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000) para um melhor entendimento das técnicas espectroscópicas de identificação por RMN e espectroscopia de massas. O entendimento dos parâmetros envolvidos nestas análises, bem como das variáveis que podem estar relacionadas, é fundamental para a melhor interpretação dos resultados finais.

A identificação do meropenem SQR se fez necessária em virtude da inexistência de dados na literatura referentes à análise por RMN ^{13}C , inclusive em trabalhos voltados ao estudo da síntese deste derivado (SUNAGAWA *et al.*, 1990; COULTON e HUNT, 1996; PRASHAD *et al.*, 1998). A análise por RMN ^1H teve a intenção de confirmar os dados já descritos na literatura referentes a esta avaliação (NISHIMURA *et al.*, 1998). Embora de grande valor, estes resultados devem ser

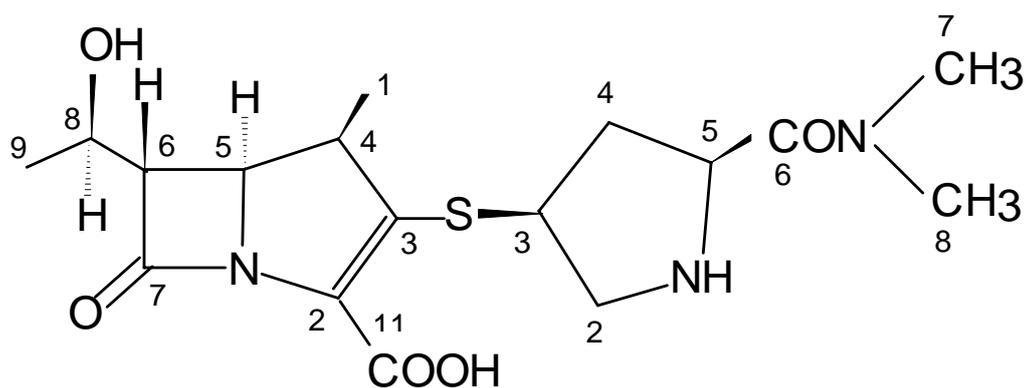
completados com a obtenção do espectro de RMN ^{13}C , visto que, para a identificação dos produtos de degradação, estas informações são fundamentais.

Num primeiro momento, a escolha do solvente para a realização das análises foi fundamental, considerando os indicativos de solubilidade dos produtos de degradação, observados durante a etapa de isolamento dos mesmos. O produto PD1 apresentou característica de menor polaridade que o meropenem, optando-se por utilizar o DMSO como solvente, de modo a garantir sua dissolução. No caso do produto de degradação PD3, o mesmo apresentou uma característica de maior polaridade que o meropenem, sendo facilmente dissolvido em metanol. Assim, objetivando a interpretação correta dos espectros através de estudo comparativo, efetuou-se a análise do meropenem SQR nos dois solventes de dissolução dos produtos de degradação.

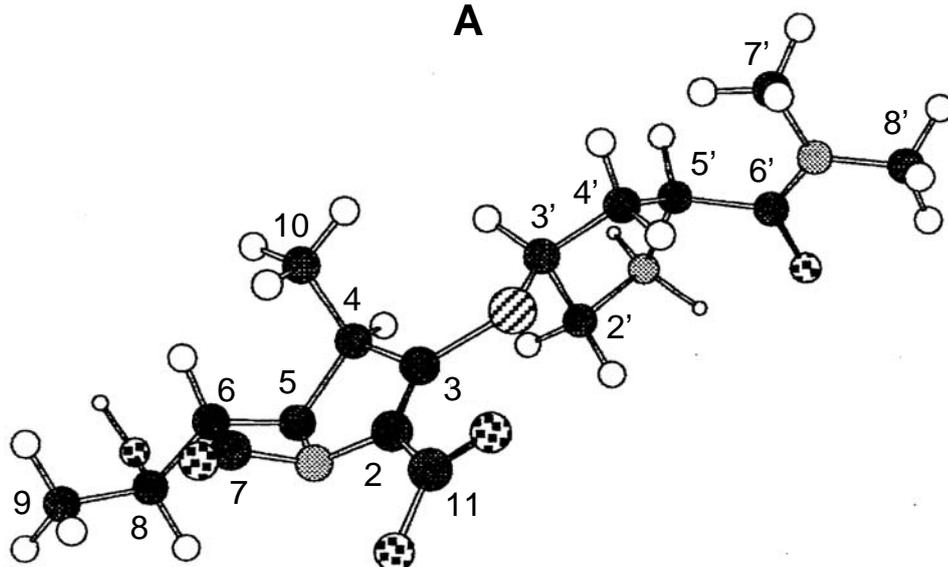
A Figura 58 apresenta a estrutura do meropenem SQR com a identificação dos carbonos. Objetivando a melhor organização dos dados a serem apresentados, os resultados obtidos na análise de cada amostra estão apresentados separadamente. A interpretação dos espectros obtidos por RMN e espectroscopia de massas foram realizadas com auxílio de bibliografia específica, contendo tabelas e estruturas características, além de dados gerais das técnicas aplicadas (BREITMAIER, 1993; PRETSCH *et al.*, 2000; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

4.5.2.1 Meropenem SQR em metanol deuterado

Uma primeira análise dos resultados de espectroscopia de RMN do meropenem SQR foi realizada avaliando-se os espectros de RMN ^1H e de correlação COSY. Neste trabalho, não foram abordadas as constantes de acoplamento (J), já que os dados de RMN ^1H estão relatados na literatura (NISHIMURA *et al.*, 1998). A análise dos espectros obtidos confirma estes dados, inclusive quanto à configuração proposta para os hidrogênios presentes na molécula (Figura 58). Além disso, a obtenção de espectros de correlação permite a identificação estrutural sem a necessidade dos valores de J.



A



B

Figura 58 - Estrutura química do meropenem (A). Estrutura cristalográfica do meropenem obtida por análise em raio-x (B) (NISHIMURA *et al.*, 1998).

A Figura 59 apresenta o espectro de RMN ^1H do meropenem SQR. A estrutura química também é ilustrada, permitindo a melhor compreensão dos resultados. O espectro COSY está ilustrado na Figura 60. Uma apresentação diferenciada destes espectros está contida no Anexo 2. Os dados de atribuição dos espectros de RMN ^1H e COSY estão relacionados na Tabela 13, com descrição dos valores de deslocamentos químicos (δ), da multiplicidade, do número de hidrogênios dos sinais observados e da correlação entre hidrogênios vizinhos.

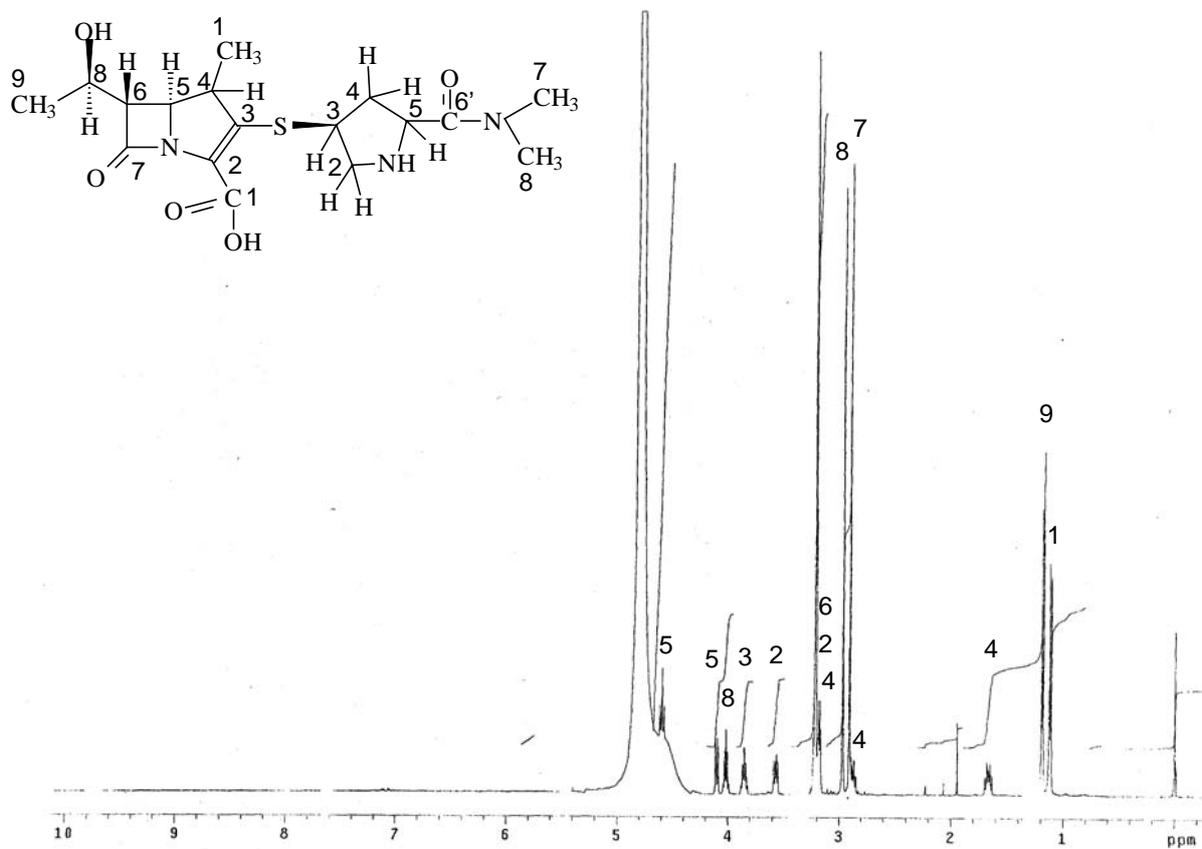


Figura 59 - Espectro de RMN ¹H do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

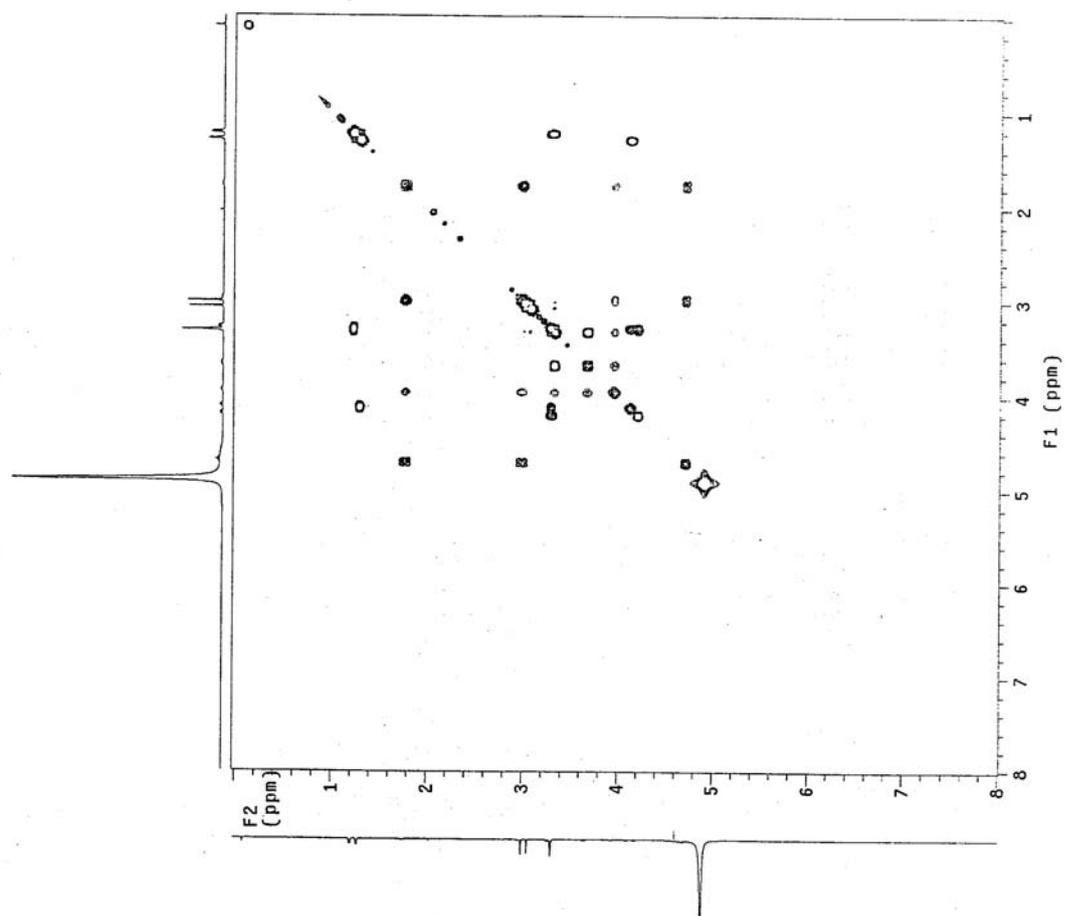


Figura 60 - Espectro de correlação COSY do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Tabela 13 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H , correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o meropenem SQR, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Multiplicidade*	Correlação por COSY (ppm)	Número de hidrogênios	Atribuição
1,11	d	3,18	3	10
1,18	d	4,01	3	9
1,66	m	2,87; 3,84; 4,60	1	4'
2,87	m	1,66; 3,84; 4,60	1	4'
2,90	s	-	3	7'
2,96	s	-	3	8'
3,18	m	1,11; 4,10	1	4
3,20	m	3,56; 3,84	1	2'
3,21	m	4,01; 4,10	1	6
3,56	dd	3,20; 3,84	1	2'
3,84	m	1,66; 2,87; 3,20; 3,56	1	3'
4,01	m	1,18; 3,21	1	8
4,10	dd	3,18; 3,21	1	5
4,60	t	1,66; 2,87	1	5'

* s = singlete, d = dublete, t = tripleto, dd = duplo dublete, m = multiplete

A partir da observação e descrição dos sinais no espectro de RMN ^1H , verifica-se a presença de dois dubletos em 1,11 e 1,18 ppm, referentes aos hidrogênios dos grupamentos metila (CH_3) nas posições 10 e 9, respectivamente. Os hidrogênios da posição 9 correlacionam com o hidrogênio do grupamento CH na posição 8, o que confirma o dublete observado. Os hidrogênios da posição 10 correlacionam com o hidrogênio do grupamento CH na posição 4, gerando também um dublete.

Em 1,66 ppm, observa-se um multiplete referente a um dos hidrogênios na posição 4', de grupamento CH_2 . Embora sejam hidrogênios do mesmo grupamento, fica clara a diferença de vizinhança entre eles. O outro hidrogênio desta posição apresenta um sinal em 2,87 ppm, portanto apresenta-se mais desblindado,

provavelmente por estar mais próximo do grupamento NH do anel pirrolidínico e do grupamento carbonila (C=O) na posição 6'. Tanto em 1,66 ppm como em 2,87 ppm, são observados multipletos, dada a vizinhança dos hidrogênios relatados. No espectro COSY, é observada a correlação com os hidrogênios das posições 3', 5' e 4'. Esta correlação com 4' confirma haver diferença entre os dois hidrogênios citados.

Em 2,90 e 2,96 ppm, são observados singletos, indicando que os hidrogênios a que se referem estes sinais não possuem hidrogênios vizinhos. De fato, são os grupamentos metila nas posições 7' e 8', respectivamente, estando mais desblindados pela influência do grupamento amida da cadeia lateral do meropenem. Na região de 3,20 ppm, mais especificamente em 3,18, 3,20 e 3,21 ppm, os sinais se apresentam muito próximos, impedindo uma exata definição numa primeira visualização. Porém, uma análise conjunta com outros espectros, como COSY e DEPT, permite a maior definição da identidade dos respectivos sinais. O hidrogênio referente ao sinal em 3,18 ppm correlaciona com os hidrogênios dos sinais em 1,11 e 4,10 ppm, referentes aos hidrogênios de grupamento metila na posição 10 e ao hidrogênio de grupamento CH na posição 5. Esta correlação confirma que aquele sinal observado se refere ao hidrogênio na posição 4, que sofre um efeito de desblindagem devido à proximidade com a ligação dupla entre a posição 2 e 3, com o átomo de enxofre ligado na posição 3 e com o oxigênio do grupamento ácido carboxílico.

Quanto ao sinal em 3,20 ppm, o mesmo se refere a um hidrogênio de grupamento CH₂ na posição 2'. Em 3,21 ppm, pode-se dizer que o sinal se refere ao hidrogênio na posição 6, de grupamento CH, desblindado pela proximidade com o grupamento carbonila da ligação β-lactama e com a hidroxila (O-H) ligada ao carbono na posição 8. A análise do COSY confirma a identidade visto que indica correlação com os hidrogênios referentes aos sinais em 4,01 e 4,10 ppm, de grupamento CH na posição 8 e 5, respectivamente. Em 3,56 ppm, há um sinal referente ao outro hidrogênio na posição 2', de grupamento CH₂, o que indica ser provavelmente o hidrogênio mais próximo do grupamento NH₂ do mesmo anel. É observada por COSY a correlação com o outro hidrogênio do mesmo grupamento e com o hidrogênio do grupamento CH vizinho, referentes aos sinais em 3,20 e 3,84

ppm, respectivamente. Estes dois hidrogênios vizinhos propiciam um sinal duplo dubleto.

Quanto ao sinal em 3,84 ppm, o hidrogênio apresenta-se bastante desblindado, provavelmente por sua proximidade com o enxofre presente na molécula. A análise no espectro COSY indica a correlação com quatro diferentes hidrogênios, referentes aos sinais em 1,66, 2,87, 3,20 e 3,56 ppm, sendo os dois primeiros do grupamento CH₂ em 4' e os dois últimos do grupamento CH₂ em 2'. O multipletto observado confirma a vizinhança. O sinal em 4,01 ppm se refere ao hidrogênio do grupamento CH na posição 8, próximo à hidroxila alcoólica e à carbonila da ligação β-lactama. Em 4,10 ppm, observa-se um sinal de hidrogênio desblindado, em campo baixo, referente ao grupamento CH na posição 5. Esta identidade é confirmada pela correlação com os hidrogênios de grupamento CH, referentes aos sinais em 3,18 e 3,21 ppm, e pela multiplicidade do sinal, um duplo dubleto. Por fim, o tripleto em 4,60 ppm se refere ao hidrogênio do grupamento CH na posição 5', vizinho aos dois hidrogênios na posição 4'. No espectro COSY, é observada a correlação com 1,66 e 2,87 ppm, sinais referentes aos relatados vizinhos. No espectro de RMN ¹H, também é possível verificar a presença de sinais referentes ao solvente de análise, em 3,22 e 4,80 ppm.

Na Figura 61 está apresentado o espectro de RMN ¹³C do meropenem SQR. O espectro DEPT está ilustrado na Figura 62. Quanto ao espectro HSQC, o mesmo está apresentado na Figura 63. Os dados de atribuição dos espectros de RMN ¹³C, DEPT e HSQC estão relacionados na Tabela 14, com descrição dos valores de deslocamentos químicos (δ), da correlação com os hidrogênios ligados e do acoplamento indicado pelo DEPT.

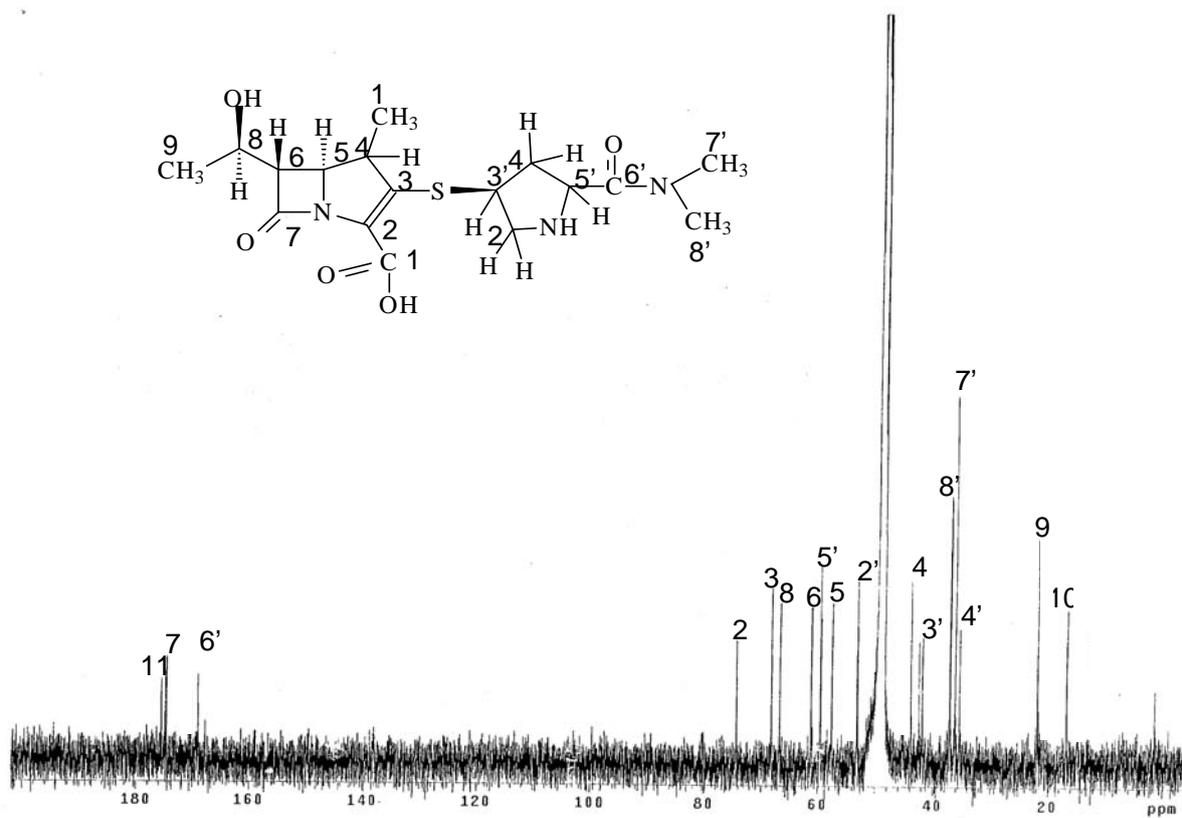


Figura 61 - Espectro de RMN ¹³C do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

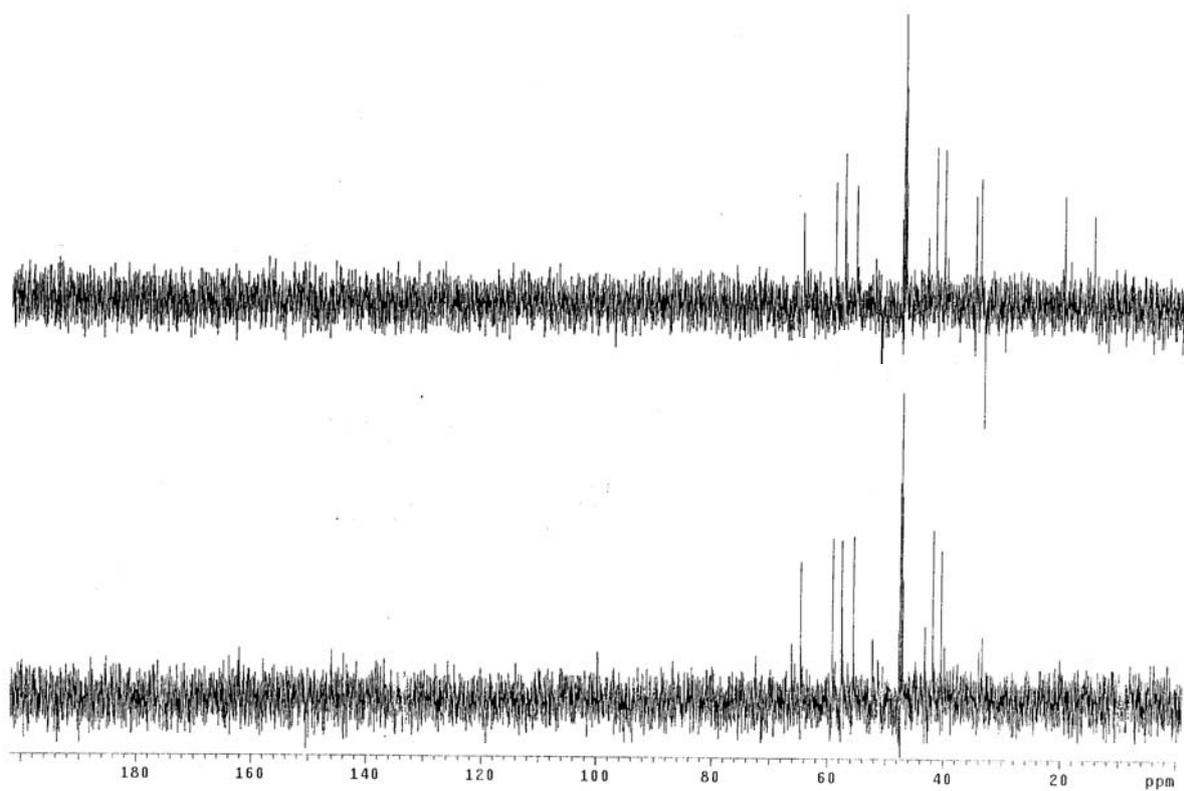


Figura 62 - Espectro DEPT do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

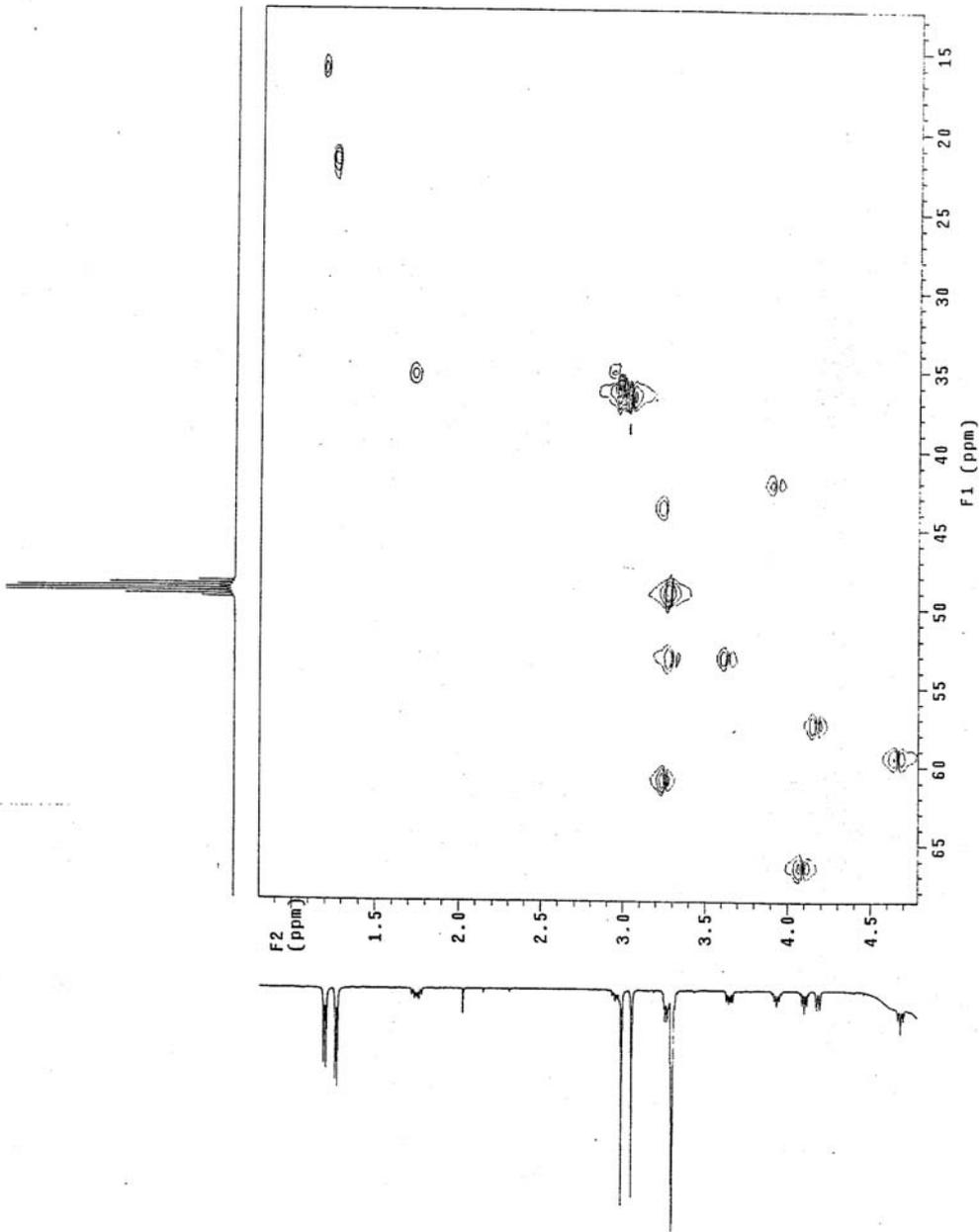


Figura 63 - Espectro HSQC do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Tabela 14 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C , dados de espectro DEPT, correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o meropenem SQR, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	DEPT	Correlação por HSQC (ppm)	Atribuição
16,76	CH ₃	1,11	10
21,85	CH ₃	1,18	9
35,42	CH ₂	1,66; 2,87	4'
36,21	CH ₃	2,90	7'
37,03	CH ₃	2,96	8'
42,44	CH	3,84	3'
43,84	CH	3,18	4
53,09	CH ₂	3,20; 3,56	2'
57,55	CH	4,10	5
59,60	CH	4,60	5'
61,18	CH	3,21	6
66,67	CH	4,01	8
68,13	-	-	3
74,30	-	-	2
168,85	-	-	6'
174,75	-	-	7
175,46	-	-	11

A atribuição dos sinais para identificação dos carbonos do meropenem foi efetuada com a avaliação conjunta dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT e HSQC. Num primeiro momento, foram relacionados todos os sinais de carbono, com posterior identificação, pelo espectro DEPT, em grupamentos CH₃, CH₂, CH ou C. Esta primeira definição auxilia em muito a identificação. A partir disso, foram analisadas as correlações com os hidrogênios aos quais os carbonos poderiam estar ligados.

Os dois primeiros sinais em 16,76 e 21,85 ppm se referem a carbonos de grupamento metila, com maior blindagem. É observada uma correlação destes carbonos com os hidrogênios referentes aos sinais do espectro de RMN ^1H em 1,11 e 1,18 ppm, das posições 10 e 9, respectivamente. É importante mencionar que os

efeitos de grupamentos vizinhos sobre os sinais obtidos são os mesmos como relatado para a análise dos hidrogênios.

Em 35,42 ppm, é observado um sinal referente a carbono de CH₂, o qual se correlaciona com os hidrogênios referentes aos sinais em 1,66 e 2,87 ppm, identificados como sendo os da posição 4'. Quanto aos sinais em 36,20 e 37,06 ppm, referentes a carbonos mais desblindados, o espectro HSQC indica a correlação com os hidrogênios referentes aos sinais em 2,90 e 2,96 ppm, das posições 7' e 8', respectivamente. Para os sinais em 42,44 e 43,84 ppm, os mesmos se referem a carbonos de grupamento CH, os quais se correlacionam com os sinais em 3,84 e 3,18 ppm, das posições 3' e 4, respectivamente.

A avaliação do DEPT esclarece melhor as indefinições na região de 3,20 ppm para o espectro de RMN ¹H, dada a possibilidade de diferenciação entre CH e CH₂. Em 53,09 ppm, é observado um sinal referente a carbono de CH₂. Este carbono se correlaciona com os hidrogênios referentes a sinais em 3,20 e 3,56 ppm, da posição 2'. Para os carbonos indicados nos sinais em 57,55 e 59,60 ppm, identificados como componentes de grupamento CH, é observada a correlação com hidrogênios referentes a sinais em 4,10 e 4,60 ppm, das posições 5 e 5', respectivamente. Os resultados de HSQC também confirmam a identidade dos carbonos de grupamento CH, em 61,18 e 66,67 ppm, referentes à posição 6 e 8.

Alguns sinais observados por RMN ¹³C não são verificados no espectro DEPT, o que indica serem referentes a carbonos quaternários. Para a definição da identidade destes carbonos, foram pesquisadas as influências de grupamentos vizinhos semelhantes aos presentes no meropenem. Uma primeira definição pode ser dada aos sinais dos carbonos das posições 2 e 3, unidos por uma ligação dupla. Pode-se afirmar que o carbono 2 é influenciado pelo grupamento carboxila da posição 11 e pelo nitrogênio do grupamento β-lactama, sofrendo um efeito de desblindagem. Comparando com algumas cefalosporinas, que possuem ligação dupla semelhante (BRANCH *et al.*, 1986), é possível propor que o sinal em 74,30 ppm se refere ao carbono 2. Quanto ao outro carbono da ligação dupla, na posição 3, o mesmo é indicado pelo sinal em 68,16 ppm, tendo influência do enxofre ao qual está ligado. Um maior efeito de desblindagem poderia ser esperado para estes

carbonos quaternários, porém outros sinais factíveis com esta proposta não foram observados.

Os sinais em 168,85 e 174,75 ppm se referem a carbonos de grupo carbonila na posição 6' e 7, respectivamente. A bibliografia consultada (PRETSCH *et al.*, 2000; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000) indica que a ciclização pode favorecer uma desblindagem, como visto para a carbonila da ligação β -lactama em comparação com a carbonila do grupo amida da cadeia lateral do meropenem. Por fim, o sinal em 175,46 ppm se refere ao carbono na posição 11, estando em região característica de carbonilas de grupo ácido carboxílico. Neste caso, é observada a maior desblindagem em relação aos outros carbonos quaternários da molécula. Quanto ao solvente de análise, o sinal de carbono é visualizado em 50 ppm.

Para complementar os dados de identificação, o meropenem SQR foi analisado por espectrometria de massas. A Figura 64 ilustra algumas das possíveis fragmentações que podem ocorrer na molécula do meropenem, com descrição das massas dos respectivos fragmentos. Os espectros obtidos por MS estão ilustrados nas Figuras 65 e 66, diferenciando-se em termos de concentração da solução de análise. Estão apresentados como representações tipo centróide e/ou tipo espectro contínuo.

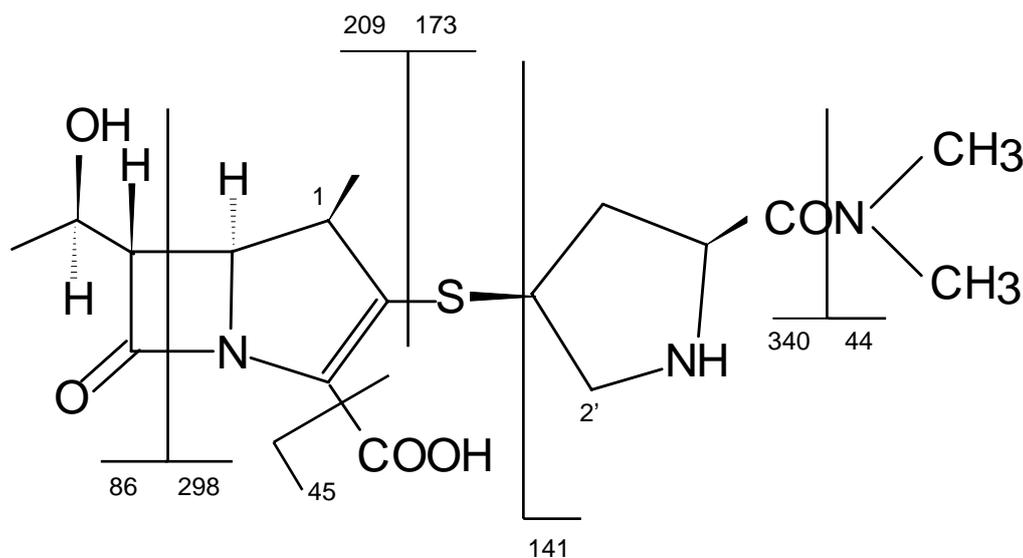


Figura 64 - Ilustração das prováveis fragmentações do meropenem na análise por espectrometria de massas. As massas moleculares dos fragmentos estão apresentadas junto à ilustração dos locais das fragmentações.

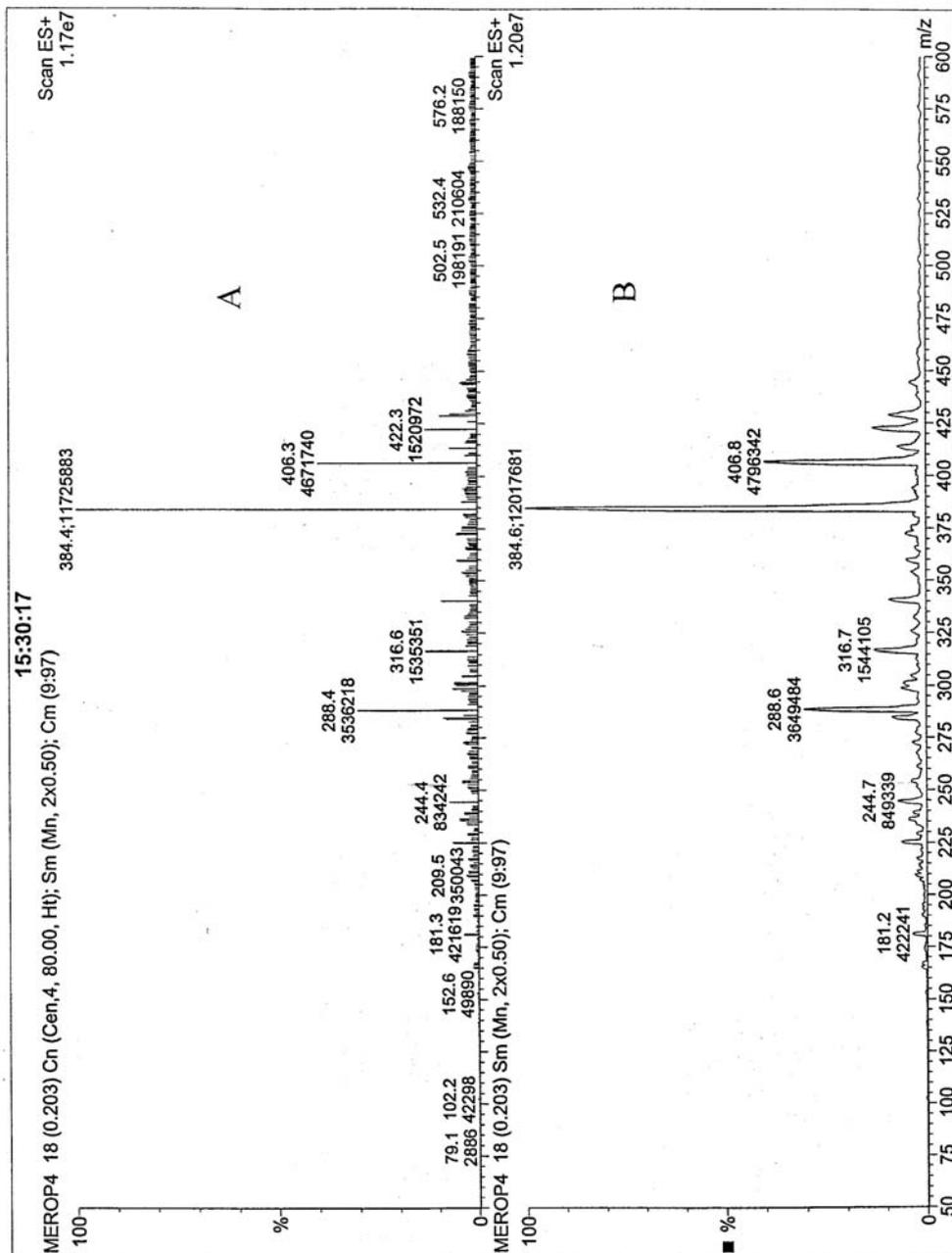


Figura 65 - Espectro de massas do meropenem SQR (1,0 µg/mL), obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray, em equipamento espectrômetro de massas Micromass Quattro. Condições de análise: Fluxo de gás nitrogênio - 347 L/h; capilaridade do cone - 3,2 kV; voltagem do cone - 35 V; temperatura da fonte - 130 °C; temperatura de dessolvatação - 250 °C. (A) Espectro centróide; (B) Espectro contínuo.

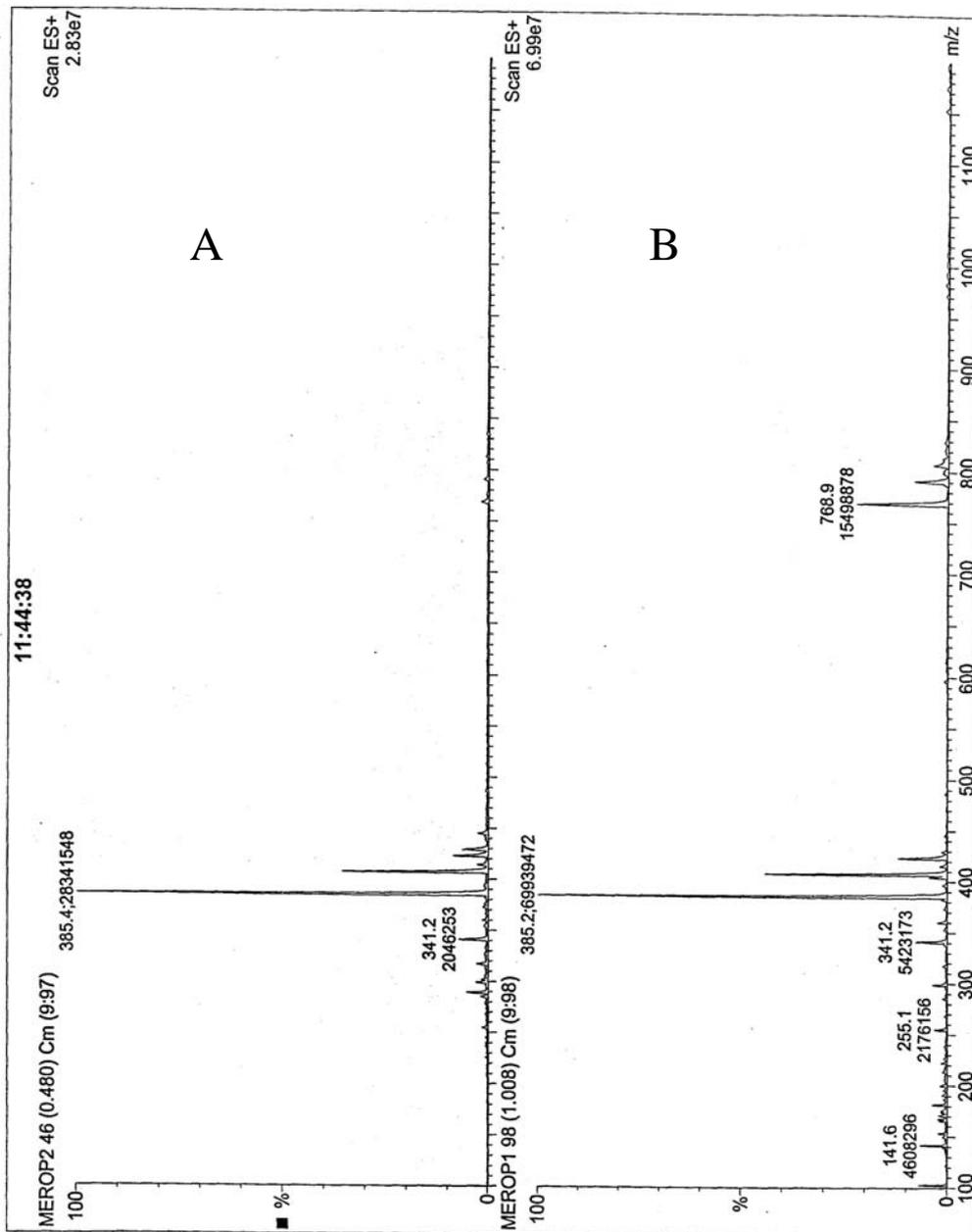


Figura 66 - Espectro de massas do meropenem SQR (A: 2,0 µg/mL; B: 10,0 µg/mL), obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray, em equipamento espectrômetro de massas Micromass Quattro. Condições de análise: Fluxo de gás nitrogênio - 347 L/h; capilaridade do cone - 3,2 kV; voltagem do cone - 35 V; temperatura da fonte - 130 °C; temperatura de dessolvatação - 250 °C.

Na Figura 65, é possível observar o pico mais intenso em m/z de 384, indicativo da massa molecular $[M + H^+]$ do meropenem SQR. Alguns fragmentos podem ser observados, estando de acordo com o ilustrado na Figura 64. A perda de parte da cadeia lateral, mantido o átomo de enxofre, origina um fragmento em m/z de 244. O fragmento de menor intensidade em m/z 209 pode ser oriundo da perda de toda a cadeia lateral do meropenem.

Na Figura 66, os espectros de massas foi obtido a partir da análise do meropenem em maiores concentrações (2,0 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$). Na maior concentração (Figura 66, B), verifica-se um pico em m/z de 768, provavelmente referente ao meropenem dimerizado. Esta reação de dimerização pode ser resultante da própria técnica espectroscópica, ou apresenta-se como uma reação passível de ocorrer para o fármaco em solução, como relatado por CAI e HU (2005). Também é possível observar um fragmento em m/z de 341, o qual pode se referir à perda do grupamento carboxila (COO^-) ou à perda de $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$ oriundo da fragmentação da ligação amídica.

A Figura 67 apresenta o espectro MS-MS resultante da fragmentação do íon molecular em m/z 384, observado no espectro MS. Os resultados indicam a presença de fragmentos característicos, também ilustrados na Figura 64. O pico em m/z 340, já mencionado como oriundo de uma possível perda do grupamento carboxila (COO^-) ou de perda de $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$ por fragmentação da ligação amídica, é novamente observado. O fragmento em m/z de 298 corresponde à perda de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ por rompimento da ligação β -lactama. Esta fragmentação é relatada por NIESSEN (1998) como de ocorrência para derivados β -lactâmicos. O pico mais intenso em m/z 141 é relativo à perda de parte da cadeia lateral do meropenem, com exceção do átomo de enxofre.

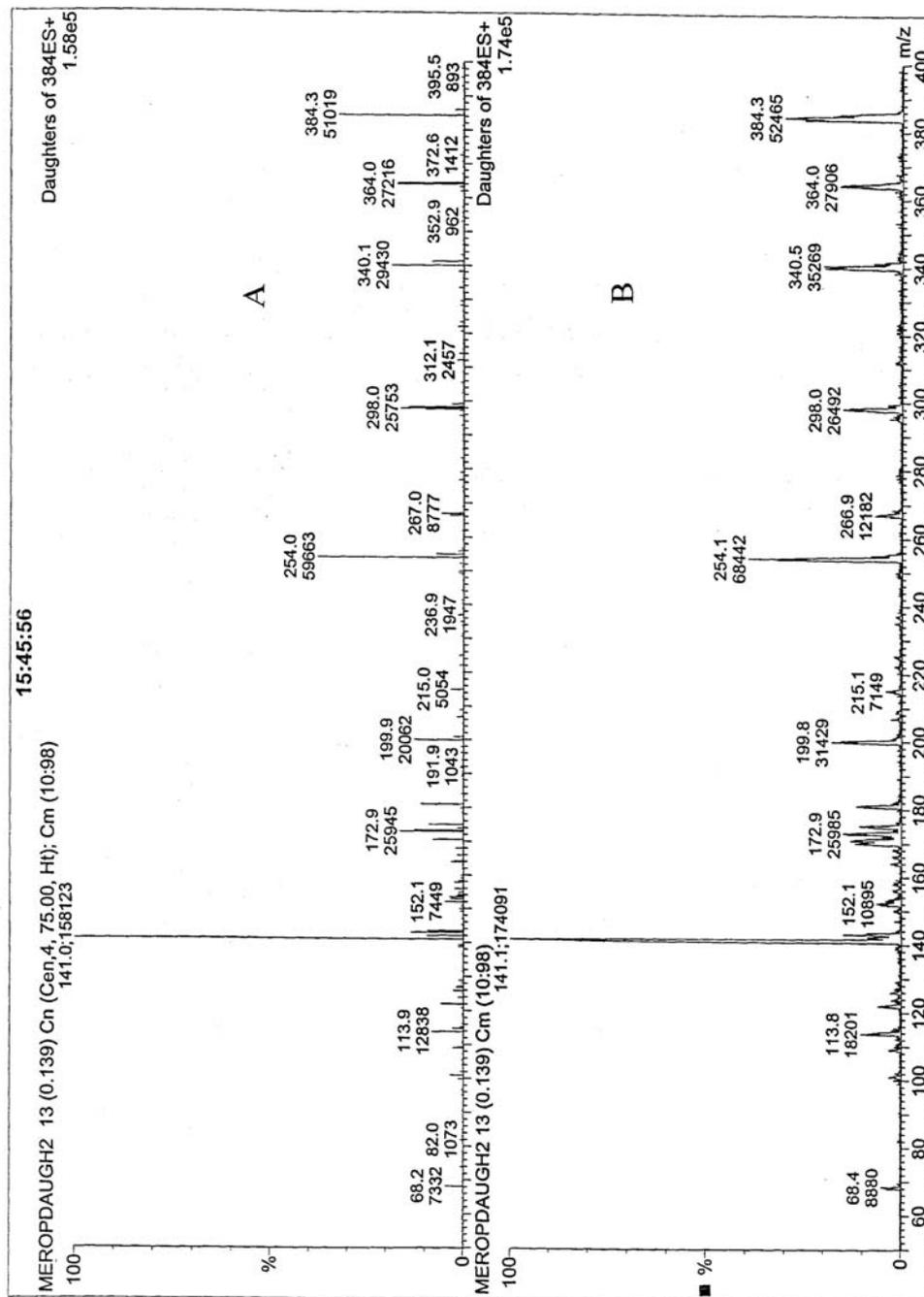


Figura 67 - Espectro de massas (MS-MS) do meropenem SQR (1,0 µg/mL), obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray, em equipamento espectrômetro de massas Micromass Quattro. Condições de análise: Fluxo de gás nitrogênio - 347 L/h; capilaridade do cone - 3,2 kV; voltagem do cone - 35 V; temperatura da fonte - 130 °C; temperatura de dessolvatação - 250 °C. (A) Espectro centróide; (B) Espectro contínuo.

4.5.2.2 Meropenem SQR em DMSO deuterado

Os espectros obtidos por RMN a partir da análise do meropenem SQR em DMSO apresentaram-se relativamente semelhantes àqueles referentes à análise do antibiótico em metanol. Esta semelhança diz respeito aos efeitos dos grupamentos vizinhos sobre os sinais espectrais. Por outro lado, pode-se destacar o deslocamento de alguns sinais, o que é esperado considerando-se a troca de solvente. Os espectros também forneceram sinais de menor resolução e com possíveis interferentes, o que tornou mais trabalhosa a interpretação dos mesmos.

Sendo a mesma molécula, não se faz necessária uma nova discussão em torno dos sinais obtidos. Porém, é importante mencionar que a multiplicidade de alguns sinais apresenta-se diferente entre os espectros, o que pode ser justificado principalmente pela mudança de solvente e pelas condições de análise. A referida diferença de multiplicidade diz respeito principalmente à grande quantidade de multipletos obtidos a partir da análise em DMSO, embora todos eles possam ser justificados por efeitos de vizinhança.

Na Figura 68, é apresentado o espectro de RMN ^1H do meropenem SQR em DMSO, junto a sua estrutura química. O espectro COSY está ilustrado na Figura 69. Estes resultados também são apresentados no Anexo 3. Os dados de atribuição dos espectros de RMN ^1H e COSY estão relacionados na Tabela 15, com descrição dos valores de deslocamentos químicos (δ), da multiplicidade, do número de hidrogênios dos sinais observados e da correlação entre hidrogênios vizinhos.

A observação dos espectros permite destacar a existência de um sinal em 4,20 ppm, o qual pode ser atribuído à presença de água de solvatação junto ao grupamento carboxílico, gerando um efeito de deslocamento de prótons. Uma possibilidade menos remota é que este sinal se refira ao hidrogênio do grupamento NH do anel pirrolidínico. Em teoria, este hidrogênio deve sair em região mais desblindada. Os sinais de solvente são observados em 2,50 ppm para o DMSO e 3,40 ppm para a água presente.

Tabela 15 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H , correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o meropenem SQR, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Multiplicidade*	Correlação por COSY (ppm)	Número de hidrogênios	Atribuição
0,82	d	2,25	3	10
1,10	d	4,00	3	9
1,24	m	2,40	1	4'
2,25	m	0,82	1	4
2,40	m	1,24; 3,80	1	4'
2,65	m	3,85; 4,00	1	6
2,85	s	-	3	7'
2,90	m	-	1	2'
2,95	s	-	3	8'
3,05	m	3,90	1	2'
3,80	m	2,40	1	5'
3,85	m	2,65	1	5
3,90	m	3,05	1	3'
4,00	m	2,65; 1,10	1	8

* s = singleto, d = dubleto, m = multipleteo

SpinWorks 2.5: Central Analitica Am0765 DMSO/tri_res out10cangCOSY

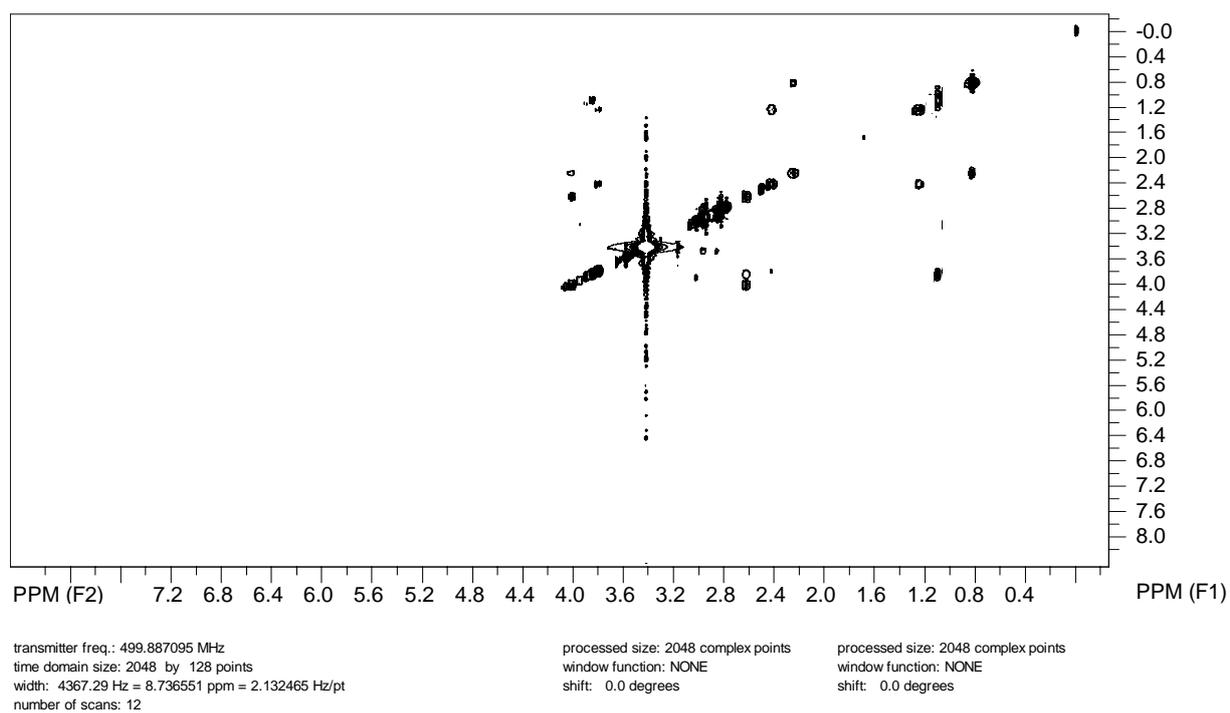


Figura 69 - Espectro de correlação COSY do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

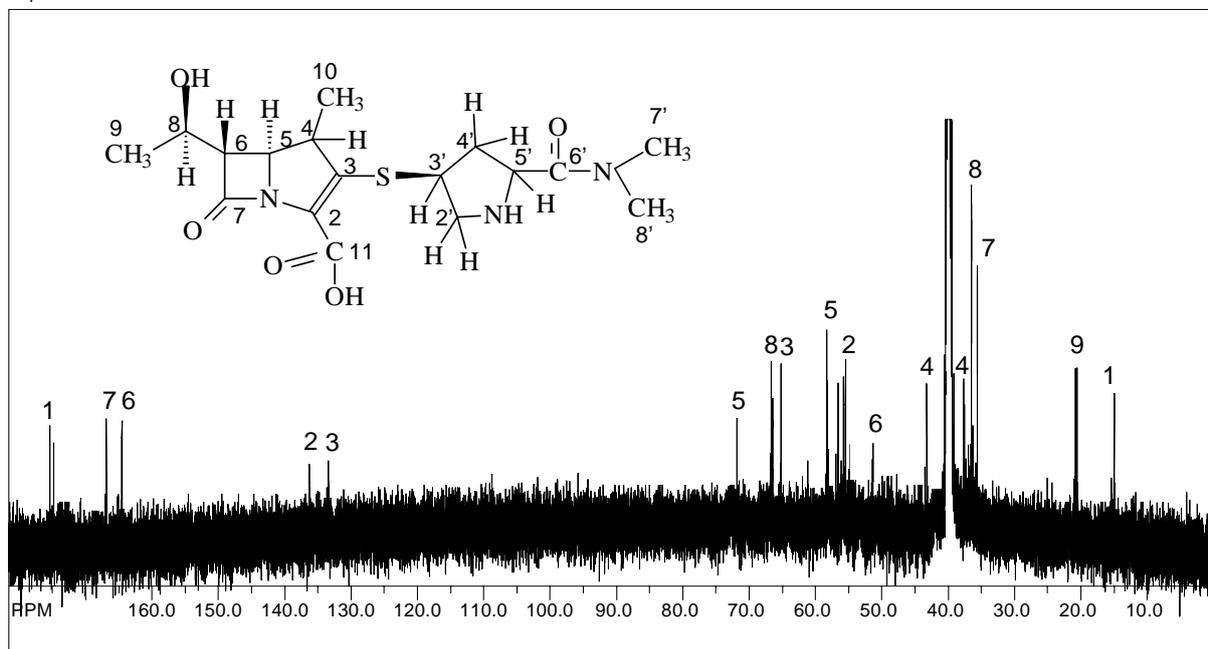
Quanto aos resultados de identificação dos carbonos, os espectros de RMN ^{13}C e HSQC estão apresentados nas Figuras 70 e 71, respectivamente. Os dados espectrais foram avaliados conjuntamente e estão descritos na Tabela 16, a qual apresenta os valores de deslocamentos químicos (δ) e de correlação com os hidrogênios.

Ao contrário da amostra analisada em metanol, os dados de identificação não incluíram a obtenção do espectro DEPT. Desse modo, a definição dos grupamentos ocorreu através do estudo detalhado dos espectros obtidos, bem como da comparação com os resultados obtidos para a amostra de meropenem SQR primeiramente analisada. Para o solvente DMSO, o sinal de carbono pode ser observado em 40 ppm.

Tabela 16 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C , correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o meropenem SQR, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Correlação por HSQC (ppm)	Atribuição
14,61	0,82	10
20,20	1,10	9
35,18	2,85	7'
36,13	2,95	8'
37,28	1,24; 2,40	4'
44,70	2,25	4
52,95	2,65	6
55,37	2,90; 3,05	2'
57,48	3,80	5'
65,10	-	3'
66,22	3,85	5
72,26	4,00	8
132,99	-	3
135,82	-	2
164,44	-	6'
167,39	-	7
174,41	-	11

SpinWorks 2.5: Central analitica AM0765 dms0 set29canC



transmitter freq.: 125.709349 MHz
time domain size: 65536 points
width: 33955.86 Hz = 270.114017 ppm = 0.518125 Hz/pt
number of scans: 20000

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura 70 - Espectro de RMN ¹³C do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Am0765 DMSO/tri_res out10cangHSQC

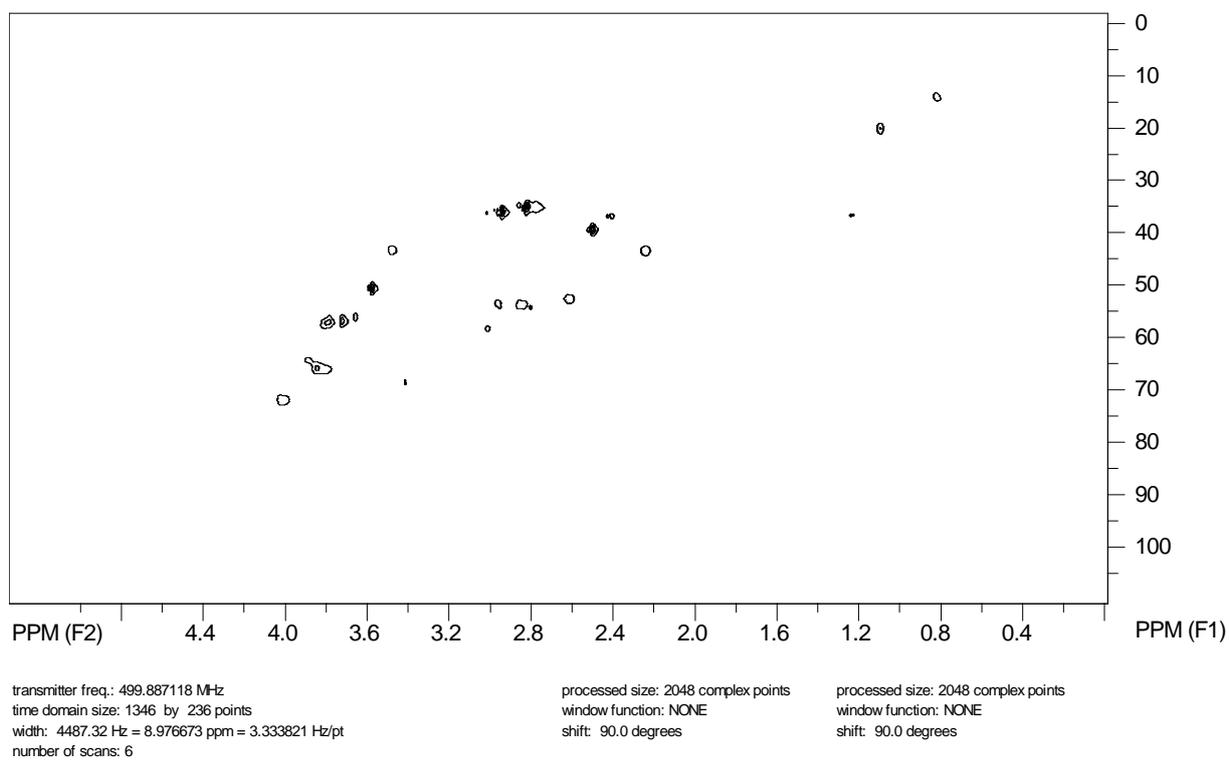


Figura 71 - Espectro HSQC do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

4.5.2.3 Produto de degradação PD1

Considerando que o produto PD1 foi analisado em solvente DMSO, a sua identificação espectral foi realizada comparativamente ao meropenem SQR analisado no mesmo solvente. A estrutura proposta para este produto está apresentada na Figura 72, com denominação química ácido 3-(1H-pirrol-3-il-tio)-4-metil-5H-pirrol-carboxílico.

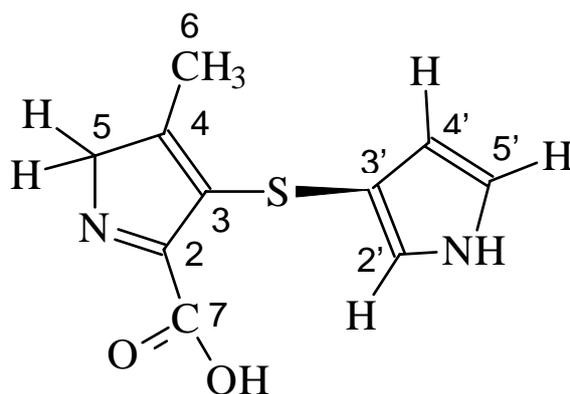


Figura 72 - Estrutura química proposta para o produto de degradação PD1.

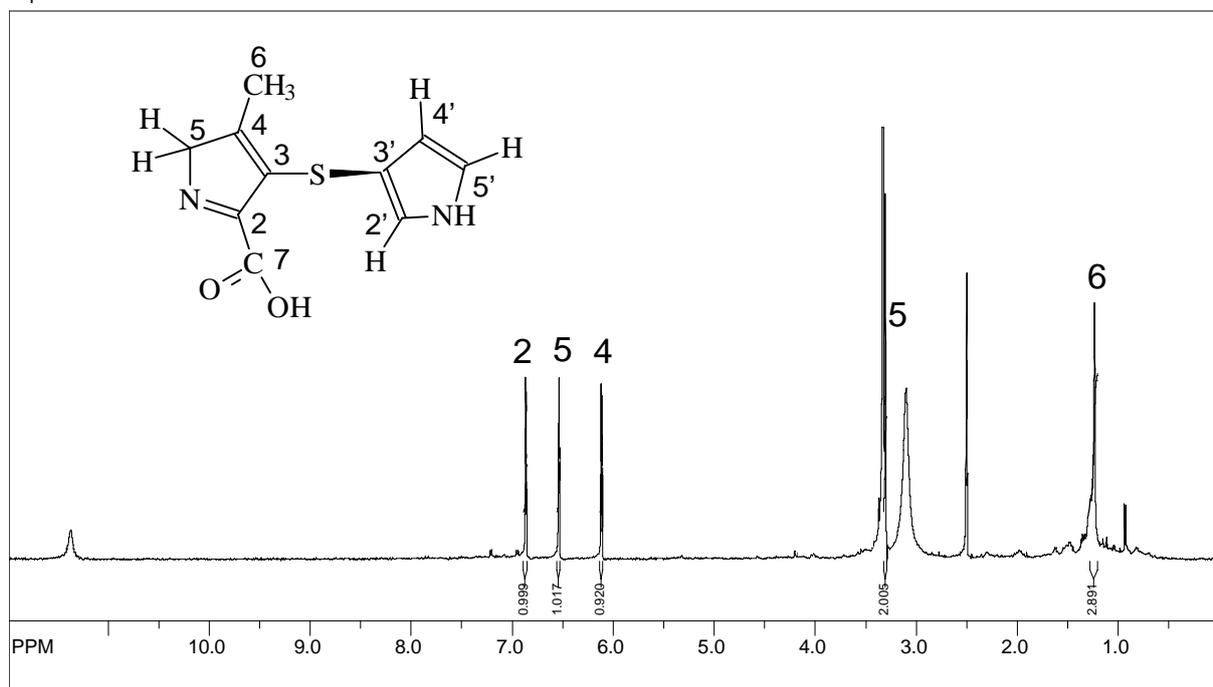
Os espectros de RMN ^1H e COSY do produto em discussão estão ilustrados nas Figuras 73 e 74, respectivamente. Uma apresentação diferenciada destes espectros pode ser visualizada no Anexo 4. Os dados de atribuição dos espectros estão relacionados na Tabela 17.

Tabela 17 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H , correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o produto de degradação PD1, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Multiplicidade*	Correlação por COSY (ppm)	Número de hidrogênios	Atribuição
1,23	s	-	3	6
3,30	s	-	2	5
6,11	m	6,53	1	4'
6,53	m	6,11	1	5'
6,86	m	-	1	2'

* s = singleto, m = multipleteo

SpinWorks 2.5: Central Analitica CA-140/06 DMSO/bbsw set01canH1



transmitter freq.: 499.887538 MHz
time domain size: 65536 points
width: 10000.00 Hz = 20.004500 ppm = 0.152588 Hz/pt
number of scans: 16

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura 73 - Espectro de RMN ^1H do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica CA-140/06 DMSO/tri_res set01cangCOSY

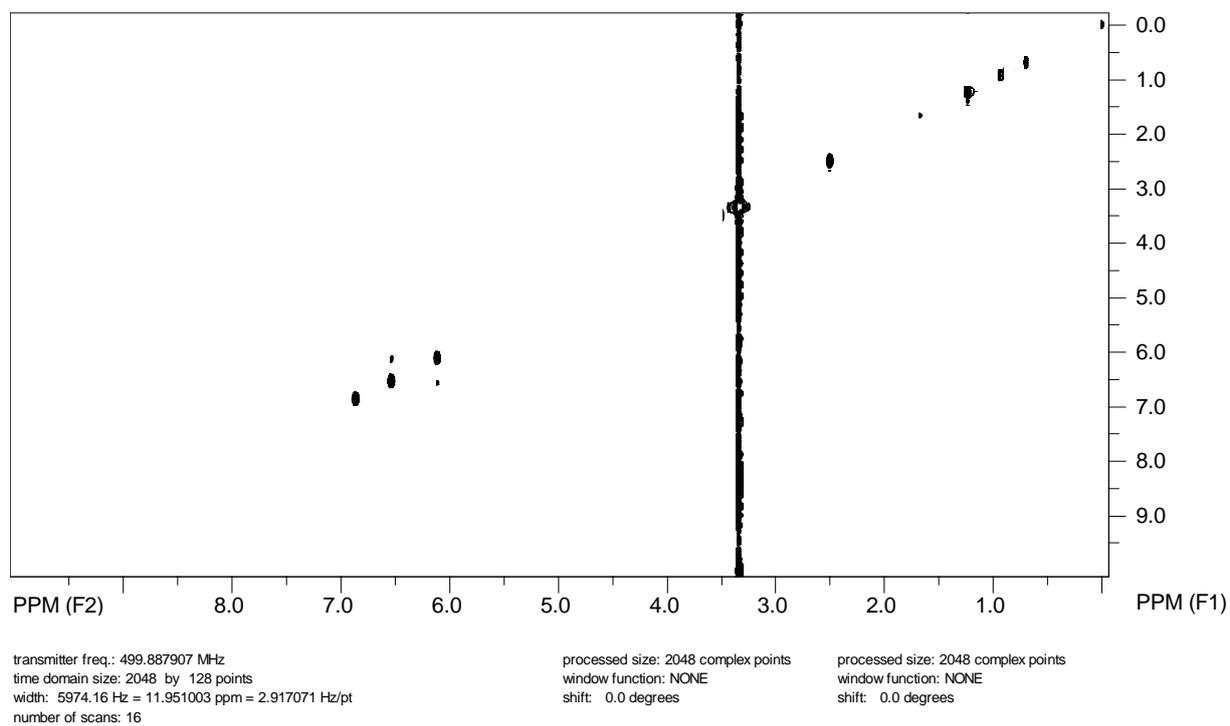


Figura 74 - Espectro de correlação COSY do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

A análise do espectro de RMN ^1H propicia uma primeira atribuição ao sinal em 1,23 ppm. Por ser um singlete, com integração para três hidrogênios, o mesmo pode corresponder aos hidrogênios da metila na posição 6. Outro sinal de hidrogênios somente está presente em 3,30 ppm. Mais uma vez apresenta-se como singlete, integrando para dois hidrogênios, o que indica ser da posição 5. Este sinal é detectado muito próximo ao sinal característico da água do solvente (3,32 ppm). O sinal do DMSO é visualizado em 2,50 ppm.

Avaliando comparativamente com os espectros de meropenem SQR, fica claro que houve uma grande redução do número de sinais na região de 2,0 a 4,0 ppm. Entretanto, para o produto PD1, pode-se verificar o surgimento de sinais na região de 6,0 a 7,0 ppm, característica de grupamentos aromáticos. Isto sugere a aromatização do anel presente na cadeia lateral do meropenem. Os sinais em 6,11, 6,53 e 6,86 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios das posições 4', 5' e 2', respectivamente. O espectro COSY indica haver uma correlação entre os hidrogênios 4' e 5'.

Neste momento, é importante destacar que a proposta de aromatização da cadeia lateral se deve à ausência dos sinais dos hidrogênios daquela cadeia, mais especificamente do anel pirrolidínico. Além disso, os sinais de hidrogênios das metilas ligadas ao grupamento amídico também estão ausentes, o que reforça a idéia de alteração da estrutura original da cadeia lateral do meropenem. Por outro lado, a modificação do anel β -lactâmico também foi considerada em virtude dos sinais característicos do mesmo, os quais também estão ausentes nos espectros em avaliação.

Dois sinais adicionais podem ser visualizados nos espectros de RMN ^1H . Em 3,10 ppm, o sinal pode se referir à presença de água de solvatação junto ao grupamento ácido carboxílico, gerando um efeito adicional de deslocamento de prótons, como o observado para o meropenem SQR em DMSO. O sinal em 11,40 ppm é característico do hidrogênio de grupamento ácido carboxílico.

Para a identificação dos carbonos, os espectros de RMN ^{13}C e HSQC, apresentados nas Figuras 75 e 76, respectivamente, foram avaliados simultaneamente. Os dados de atribuição estão relacionados na Tabela 18, com

descrição dos valores de deslocamentos químicos (δ) e da correlação com os hidrogênios ligados.

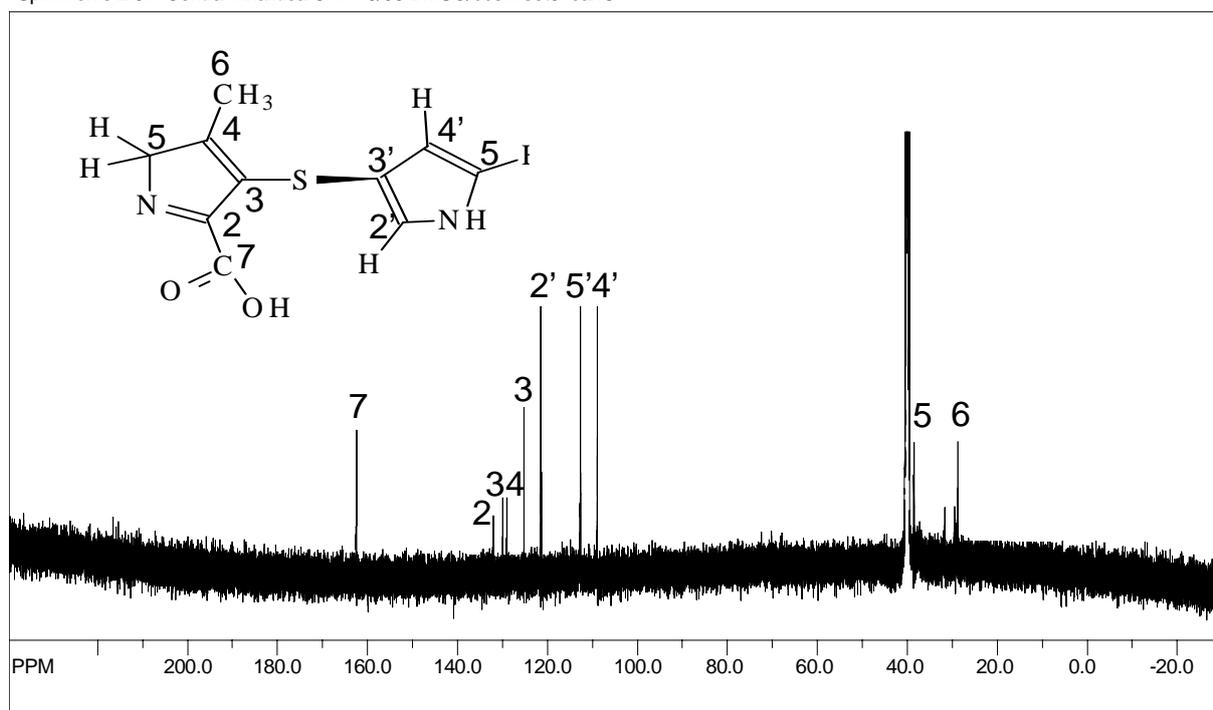
Tabela 18 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C , correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para produto de degradação PD1, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Correlação por HSQC (ppm)	Atribuição
28,95	-	6
38,05	-	5
108,47	112,22	4'
112,22	108,47	5'
120,96	-	2'
124,69	-	3'
128,63	-	4
129,48	-	3
131,57	-	2
163,18	-	7

A partir do espectro de correlação, é possível constatar que o sinal em 28,95 ppm se refere ao carbono da posição 6. O sinal em 38,05 ppm pode ser atribuído ao carbono da posição 5, embora não seja possível observar uma clara correlação pelo HSQC, talvez prejudicada pela proximidade com o sinal do solvente, em 40,0 ppm.

Os sinais na região de 110-120 ppm pertencem a carbonos do anel aromático presente na molécula analisada. Em 108,47, 112,22 e 120,96 ppm, podem ser identificados os carbonos das posições 4', 5' e 2', conforme indicado pelo espectro HSQC. O sinal em 124,69 ppm pode ser atribuído ao carbono quaternário da posição 3'.

SpinWorks 2.5: Central Analitica CA-140/06 DMSO/bbsw set01canC1



transmitter freq.: 125.709349 MHz
time domain size: 65536 points
width: 33955.86 Hz = 270.114017 ppm = 0.518125 Hz/pt
number of scans: 5000

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura 75 - Espectro de RMN ^{13}C do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica CA-140/06 DMSO/tri_res set01canHSQC

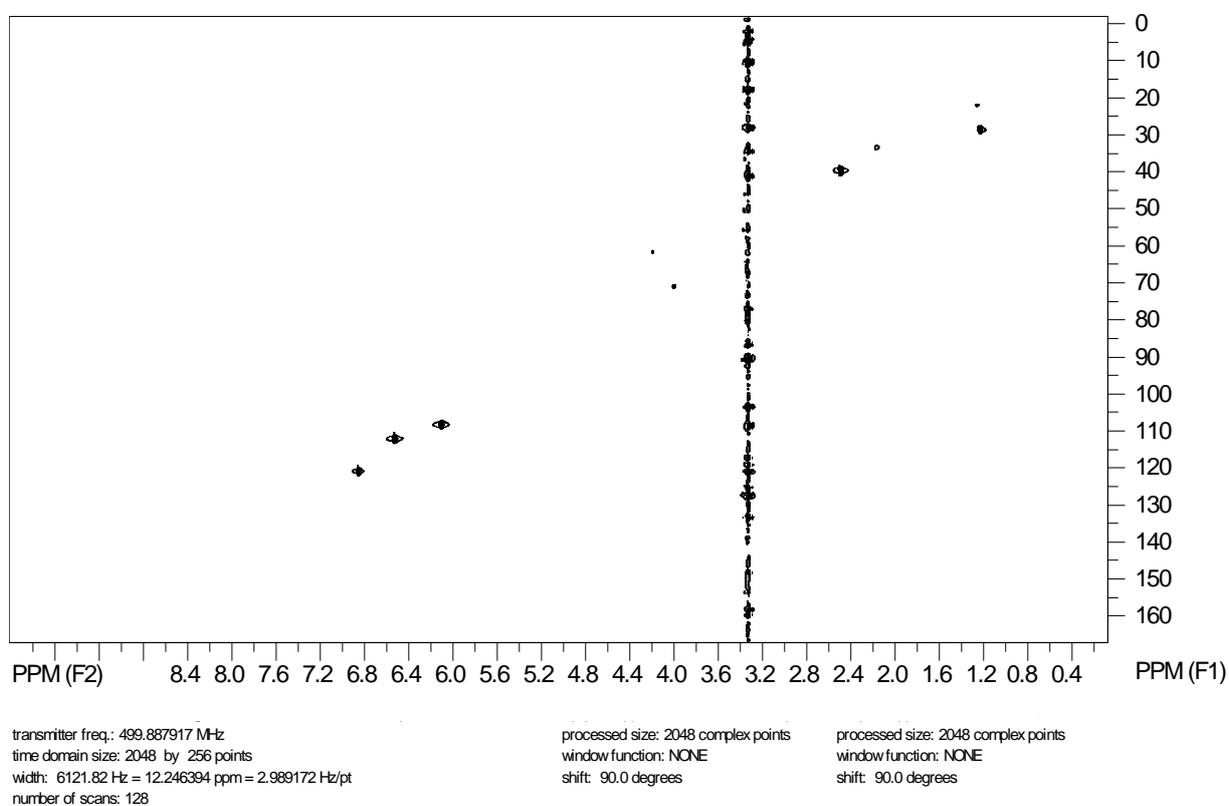


Figura 76 - Espectro HSQC do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Os outros carbonos quaternários são atribuídos de acordo com dados ilustrados em bibliografia específica. Para os carbonos da posição 3 e 4, são atribuídos os sinais em 129,48 e 128,63 ppm, respectivamente. Em 131,57 ppm, é possível observar outro sinal de carbono quaternário, neste caso atribuído para a posição 2. Por fim, o sinal em 163,18 ppm pode se referir ao carbono do grupamento carboxila na posição 7. Embora, em regra, os carbonos deste tipo de grupamento apresentem sinais em região acima de 170 ppm, o deslocamento deste sinal pode ser justificado pela presença da ligação dupla entre o átomo de nitrogênio da posição 1 e o carbono da posição 2.

Objetivando a complementação dos dados de identificação do produto PD1, foram desenvolvidos experimentos para análise por espectrometria de massas. Inúmeras condições foram testadas, porém a técnica não se apresentou adequada para a determinação deste produto, impedindo a obtenção de espectros viáveis de interpretação. Assim sendo, a identificação do produto PD1 se baseou nos resultados obtidos por espectroscopia de RMN.

Considerando a proposta de estrutura para o produto de degradação PD1, torna-se possível a proposição de uma rota de degradação que justifique a obtenção do produto em discussão, embora seja importante destacar que o completo entendimento das reações envolvidas não é objetivo deste trabalho. A Figura 77 ilustra a seqüência de degradações que poderiam justificar a formação do produto PD1. Obviamente que a seqüência das reações de decomposição poderia ser outra, ou ocorrer num mesmo momento.

A degradação inicial, referente à hidrólise do anel β -lactâmico, é relatada na literatura para os derivados β -lactâmicos, incluindo as próprias carbapenemas (ALMARSSON *et al.*, 2000; SAJONZ *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2002; CAI e HU, 2005; SAJONZ *et al.*, 2006). Não se pode esquecer que as condições de degradação utilizadas para as amostras, meio aquoso e calor (40° C), são consideradas drásticas para esta classe de antibióticos, tendo em vista a sensibilidade do anel β -lactâmico na presença de água (SOLOMONS e FRYHLE, 2000; O'DONNELL e BOKSER, 2006) ou vestígios de umidade (NUDELMAN, 1975).

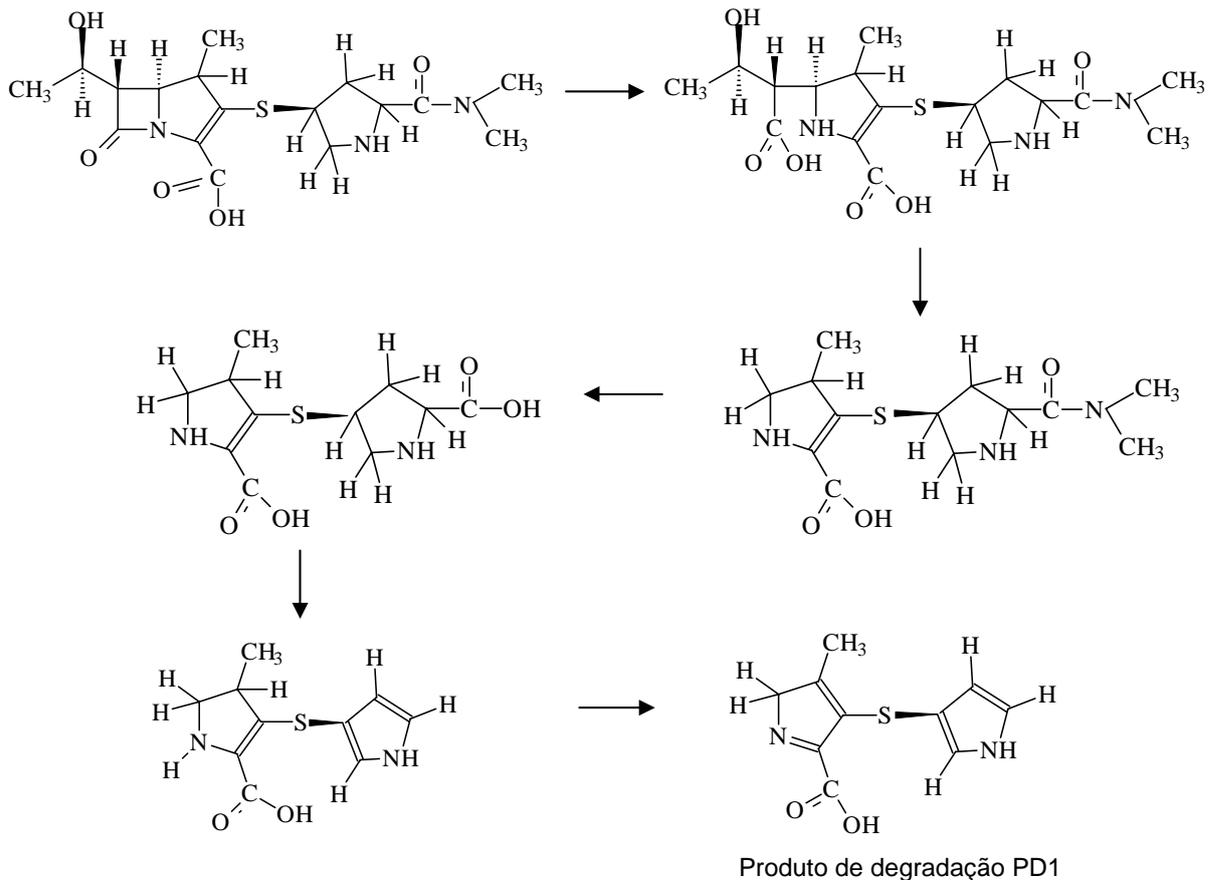


Figura 77 - Proposição da rota de degradação do meropenem para formação do produto de degradação PD1.

A partir desta primeira hidrólise e formação de grupamento carboxílico, poderia-se propor a decomposição da molécula por meio de descarboxilação, reação esta também relatada na literatura como passível de ocorrer para estes derivados estruturais (BRANCH *et al.*, 1986). Esta descarboxilação levaria à formação de uma cadeia lateral alcoólica que dificilmente seria rompida do anel carbapenêmico. Considerando que nos espectros de RMN não são encontrados os sinais de hidrogênios para este intermediário, propõe-se a perda total da cadeia lateral alcoólica sem prévia descarboxilação da mesma.

Esta proposição torna mais viável a quebra de uma cadeia carbonada de difícil eliminação. Tal reação pode ser justificada pela condição de degradação utilizada. Considerando a presença de carbonato de sódio na amostra comercial de meropenem, o meio de degradação tem característica básica, como observado nos

valores de pH obtidos nos ensaios de seleção dos fatores de degradação do estudo (item 4.2.2). O meio alcalinizado propicia a ionização dos grupamentos carboxila e alcoólico constituintes da cadeia lateral em discussão. Esta ionização pode levar à formação de um ânion enolato, e, por fim, ao rompimento desta cadeia, favorecido pelo calor. A representação desta proposta está ilustrada na Figura 78.

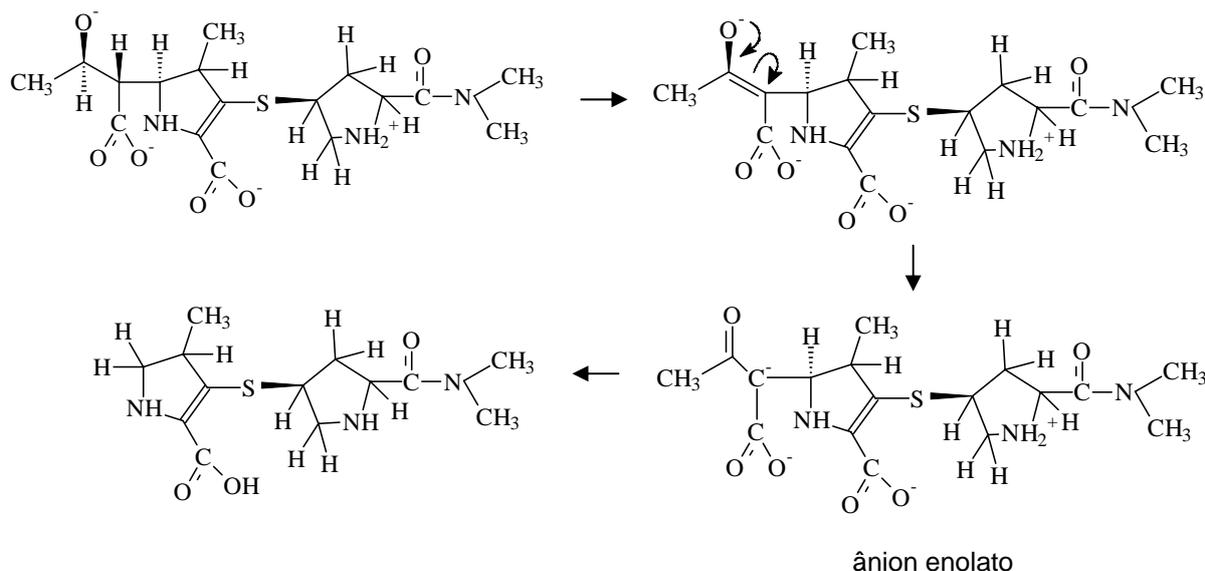


Figura 78 - Proposição da rota de eliminação da cadeia lateral alcoólica para formação do produto de degradação PD1.

Partindo-se para a discussão da modificação estrutural na cadeia lateral (ligada ao carbono 3) do meropenem, deve-se considerar a possibilidade de hidrólise do grupamento amídico ligado ao anel pirrolidínico, com posterior descarboxilação do grupamento resultante. Estas reações poderiam ocorrer num primeiro momento, porém a perda total da cadeia ligada ao anel não pode ser descartada. Desse modo, esta decomposição levaria, em última instância, à aromatização e formação de um anel pirrólico.

Por fim, a estrutura proposta apresenta um deslocamento da ligação dupla do anel carbapenêmico. A possível formação de uma nova ligação dupla, junto ao nitrogênio deste anel, reação relatada por alguns autores (ALMARSSON *et al.*, 2000; FASOLI e FRAU, 2005), justifica o deslocamento da ligação dupla original. Esta

reação poderia levar ao rompimento da cadeia lateral ligada ao enxofre, porém a constatação da presença da mesma descarta esta hipótese.

4.5.2.4 Produto de degradação PD3

Ao contrário do produto PD1, a aplicação da técnica por espectrometria de massas para a análise do produto PD3 apresentou resultados factíveis de interpretação, auxiliando na sua identificação. Uma primeira avaliação do espectro de massas (Figura 79) deste produto indica a presença de um pico mais intenso em m/z de 468, indicativo de massa molecular.

Na avaliação dos espectros de RMN, os resultados indicam uma possível semelhança estrutural do produto em análise com o meropenem, visto que a maioria dos sinais observados é reproduzida nos espectros deste antibiótico. Além disso, a massa molecular observada no espectro de massas é maior que a massa do meropenem, estando de acordo com esta hipótese. A estrutura proposta para o produto PD3 está apresentada na Figura 80, sendo denominado quimicamente 3-(5-dimetilcarbamilpirrolidin-3-il-tio)-4-metil-5-(2-propil-alcóxido de sódio)-4,5-dihidro-1H-pirrol-5-(1)-2-dicarboxilato de sódio.

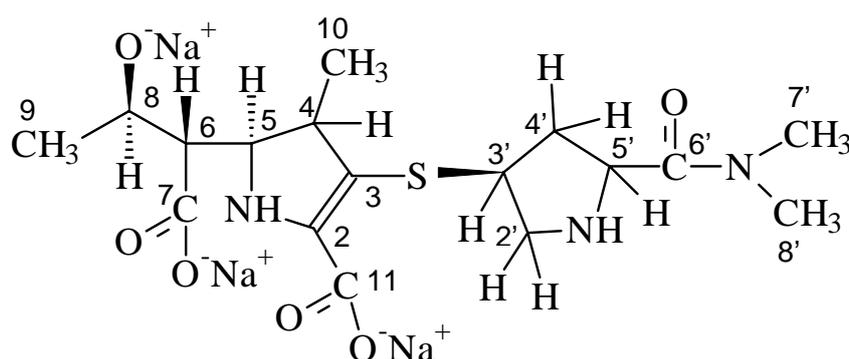


Figura 80 - Estrutura química proposta para o produto de degradação PD3.

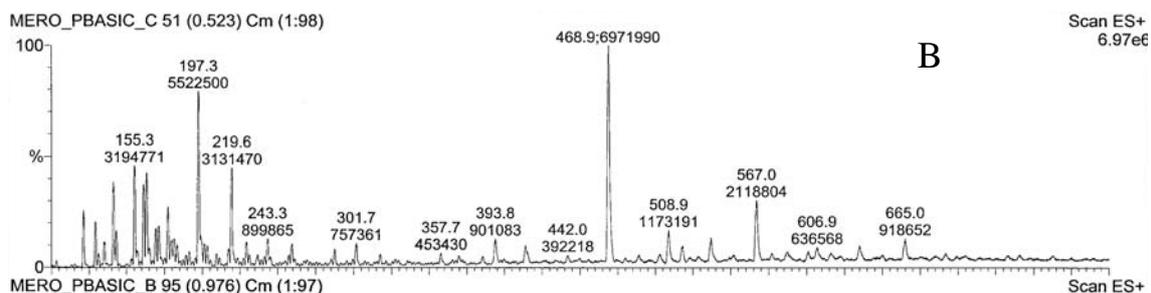
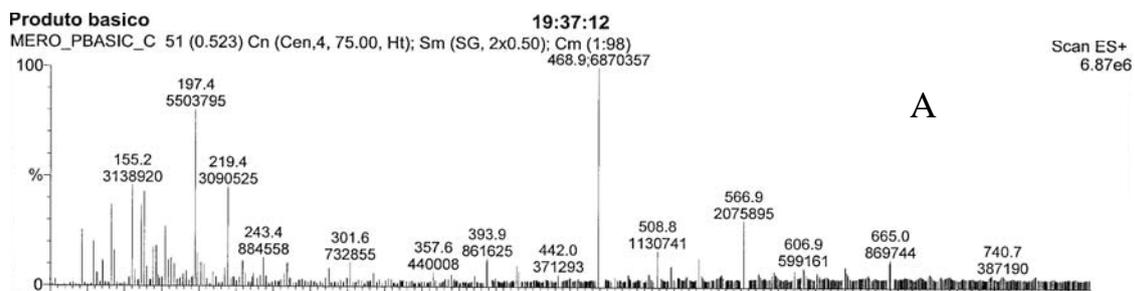


Figura 79 - Espectro de massas do produto de degradação PD3 (5,0 µg/mL), obtido através do sistema espectrometria de massas – ionização electrospray, em equipamento espectrômetro de massas Micromass Quattro. Condições de análise: Fluxo de gás nitrogênio - 356 L/h; capilaridade do cone - 2,96 kV; voltagem do cone - 43 V; temperatura da fonte - 130 °C; temperatura de dessolvatação - 250 °C. (A) Espectro centróide; (B) Espectro contínuo.

Os espectros de RMN ^1H e COSY do produto PD3 estão apresentados nas Figuras 81 e 82, respectivamente, bem como no Anexo 5. Os dados de atribuição destes espectros estão relacionados na Tabela 19.

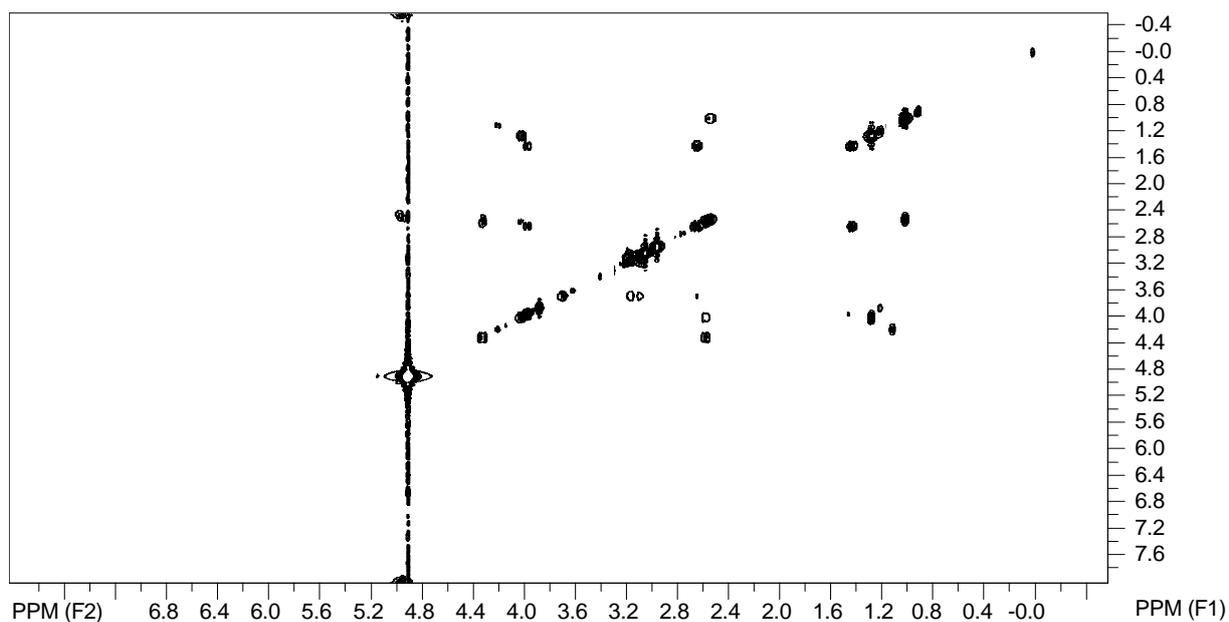
Com relação à identificação dos carbonos, os espectros de RMN ^{13}C e HSQC foram avaliados simultaneamente. Os mesmos estão apresentados nas Figuras 83 e 84, respectivamente. O espectro de correlação também é apresentado no Anexo 6. Os dados de atribuição dos referidos espectros estão relacionados na Tabela 20, com descrição dos valores de deslocamentos químicos (δ) e da correlação com os hidrogênios ligados.

Tabela 19 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H , correlação por COSY, número de hidrogênios, multiplicidade e atribuição dos hidrogênios para o produto de degradação PD3, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Multiplicidade*	Correlação por COSY (ppm)	Número de hidrogênios	Atribuição
1,05	d	2,51	3	10
1,26	d	4,02	3	9
1,43	m	2,62; 3,94	1	4'
2,51	m	1,05; 4,32	1	4
2,55	m	4,02; 4,32	1	6
2,62	m	1,43; 3,67	1	4'
2,94	s	-	3	7'
3,04	s	-	3	8'
3,09	m	3,67	1	2'
3,18	m	3,67	1	2'
3,67	m	2,62; 3,09; 3,18	1	3'
3,94	m	1,43	1	5'
4,02	m	1,26; 2,55		8
4,32	m	2,51; 2,55	1	5

* s = singleto, d = dubleto, m = multipleteo

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22cangCOSY3



transmitter freq.: 499.886502 MHz
time domain size: 2048 by 128 points
width: 4296.92 Hz = 8.595785 ppm = 2.098104 Hz/pt
number of scans: 8

processed size: 2048 complex points
window function: NONE
shift: 0.0 degrees

processed size: 2048 complex points
window function: NONE
shift: 0.0 degrees

Figura 82 - Espectro de correlação COSY do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22cangC3

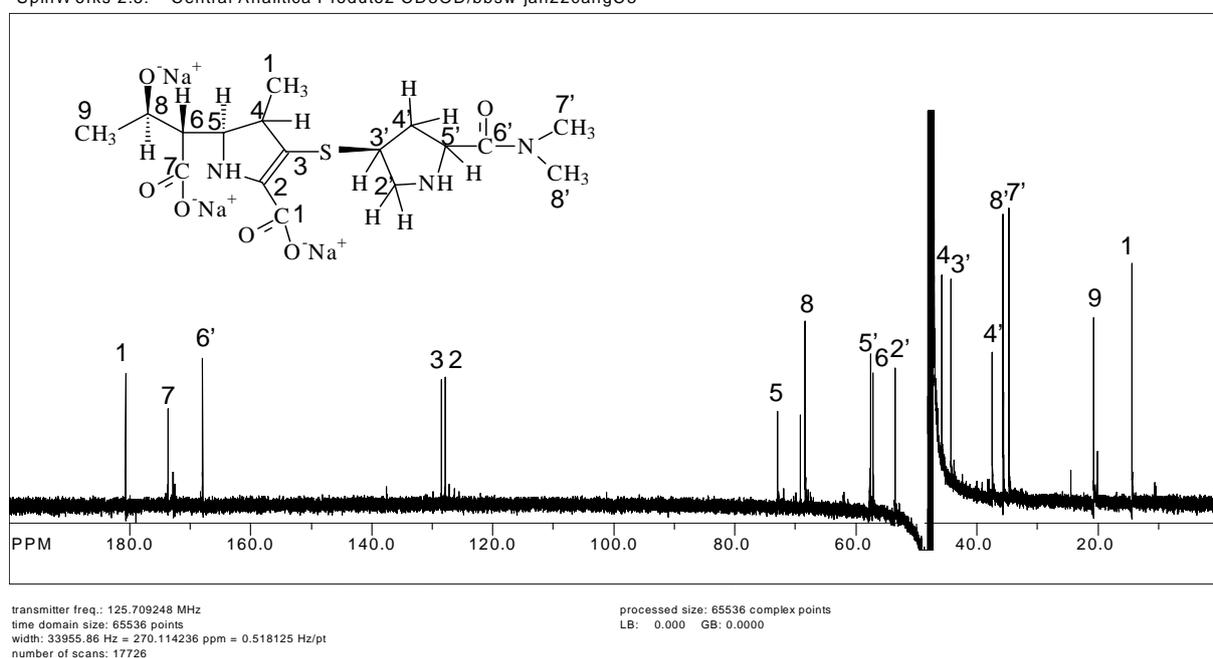


Figura 83 - Espectro de RMN ¹³C do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22cangHSQC3

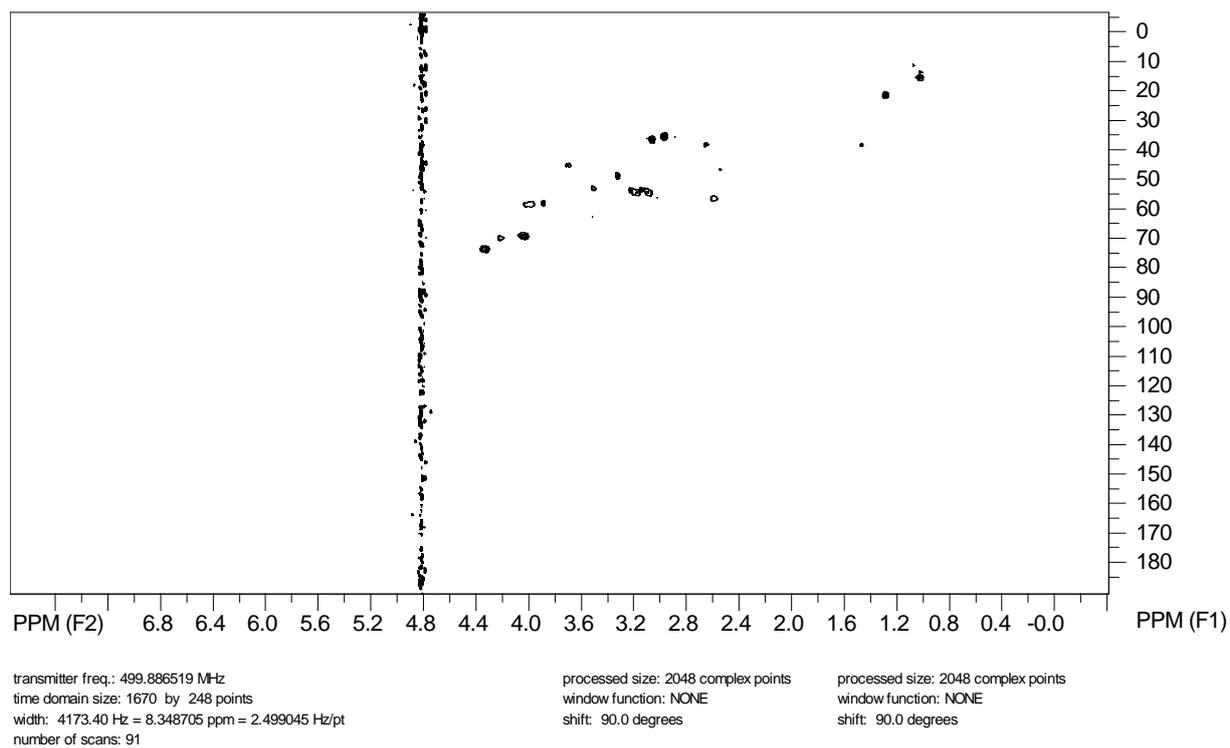


Figura 84 - Espectro HSQC do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Tabela 20 - Relação dos valores de deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C , correlação por HSQC e atribuição dos carbonos para o produto de degradação PD3, obtidos em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) (ppm)	Correlação por HSQC (ppm)	Atribuição
15,75	1,05	10
22,09	1,26	9
36,09	2,94	7'
37,05	3,04	8'
38,82	1,43; 2,62	4'
45,66	3,67	3'
47,18	2,51	4
54,90	3,09; 3,18	2'
57,11	2,55	6
58,91	3,94	5'
69,75	4,02	8
74,30	4,32	5
129,21	-	2
129,91	-	3
169,30	-	6'
175,04	-	7
180,33	-	11

Tendo em vista a semelhança estrutural entre o produto PD3 e o meropenem, as mesmas considerações discutidas quando da interpretação dos espectros do fármaco podem ser aplicadas para o produto em questão. Pequenas diferenças em termos de multiplicidade e resolução dos sinais são aceitas, visto que se trata de uma outra amostra, em contato direto com o agente de degradação, além do que as condições de análise podem apresentar pequenas variações.

Neste sentido, é possível que as pequenas diferenças estruturais propostas para o produto de degradação, em especial a ionização de grupamentos característicos, resultem em modificações espectrais, principalmente em deslocamento de sinais. No caso específico do espectro RMN ^{13}C , os carbonos quaternários correspondentes aos grupamentos ânion carboxilato, principal

modificação estrutural da molécula, sofrem um deslocamento para região mais desblindada, quando comparado com grupamentos carboxílicos, de característica não ionizada.

Avaliando a estrutura do produto PD3, as modificações estruturais propostas são plenamente possíveis, principalmente se for considerado que o produto está em contato direto com meio básico, responsável por sua formação. Assim como para o produto PD1, a molécula de meropenem novamente sofre uma abertura de anel β -lactâmico, numa reação de hidrólise típica desta classe de antibióticos, como já mencionado. Para este produto, a presença de meio alcalino resulta também na ionização dos grupamentos carboxílicos da molécula, além da hidroxila etanólica. Esta última reação, também observada para os intermediários de decomposição do produto PD1, se torna viável em meio com característica fortemente básica, como ocorrido para o produto em discussão.

Algumas das reações de degradação envolvidas na formação do produto PD1 poderiam também ocorrer para o produto PD3, principalmente se forem consideradas algumas hipóteses sugeridas. A hidrólise do grupamento amídico e a perda da cadeia lateral alcoólica seriam viáveis na presença do meio alcalino aquoso, no entanto a justificativa para a ausência destas reações pode estar na temperatura utilizada, 25 °C.

Uma outra possibilidade de formação de produto de degradação na condição estudada seria a hidrólise do anel β -lactâmico, porém a manutenção dos grupamentos acima citados em seu estado não ionizado. Tal situação seria viável caso o produto formado não estivesse em contato direto com a amostra, mas sim obtido a partir do seu isolamento da condição de degradação. Em verdade, este tipo de degradação é característica de derivados β -lactâmicos, já sendo relatada na literatura para o meropenem (TAKEUCHI *et al.*, 1995; BALLARD *et al.*, 1996; CAI e HU, 2005).

4.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE

Os experimentos relativos à avaliação da citotoxicidade foram realizados junto ao Laboratório de Imunogenética, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.6.1 Metodologia

4.6.1.1 Preparo das amostras

As amostras ensaiadas foram preparadas no dia do experimento. O teste envolveu a avaliação do potencial citotóxico das amostras de meropenem SQR, meropenem pó para solução injetável degradado (pó degradado), meropenem solução reconstituída degradada e produto de degradação PD3 isolado. O produto de degradação PD1 não foi avaliado devido à reduzida quantidade obtida a partir do isolamento.

As amostras de pó degradado foram obtidas a partir de decomposição térmica a 90 °C por 90 dias, conforme descrito no item 4.3.1.1. Para a solução reconstituída degradada, as amostras foram expostas à decomposição térmica a 45 °C por 36 horas, e depois submetidas à secagem, de acordo com o item 4.4.1.1.1. O produto PD3 foi isolado segundo o item 4.4.1.2.1.

Considerando a presença de possíveis interferentes nas amostras ensaiadas, procedeu-se a preparação de brancos de análise, no caso soluções de carbonato de sódio (Quimex) e hidróxido de sódio (Quimex). O primeiro está presente nas amostras degradadas, e o segundo no produto PD3.

Para o ensaio, as amostras a serem avaliadas foram preparadas, em capela de fluxo laminar vertical, nas concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL, em meio RPMI 1640 (Sigma) acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0,2% (p/v) de bicarbonato de sódio e 0,006 % (p/v) de garamicina. Depois de prontas, foram filtradas em filtro GV Millex polietileno de 13 mm de diâmetro e 0,22 µm de diâmetro de poro (Millipore).

4.6.1.2 Separação das células mononucleares

As células mononucleares foram obtidas a partir de sangue venoso periférico (20 mL) de três indivíduos saudáveis, com idade entre 20 e 40 anos. As amostras de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas e transferidas, individualmente, para tubo cônico Falcon, no qual foram adicionados 15 mL de meio Hank's (Sigma), gerando uma mistura final em proporção 4:3, respectivamente. Cabe salientar que toda manipulação foi efetuada em capela de fluxo laminar vertical.

Para separar as células mononucleares dos outros componentes sangüíneos, foram adicionados 15 mL de meio Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) em outro tubo cônico Falcon. Este meio propicia a separação por gradiente de densidade. A este tubo, acrescentou-se cuidadosamente o sangue venoso processado anteriormente. Esta adição é feita pelas paredes, vagarosamente, de modo que o sangue permaneça na superfície e que não ocorra a mistura com o meio. Submeteu-se então à centrifugação em centrífuga Sorvall® RT6000B, ajustada para condições de velocidade de rotação de 1200 rpm, tempo de 30 minutos e temperatura ambiente.

Após a centrifugação, as células mononucleares foram retiradas cuidadosamente e adicionadas em tubo cônico Falcon. Procedeu-se a lavagem com meio Hank's, seguida de centrifugação em centrífuga Fanem® modelo 206-R, ajustada a 1000 rpm, tempo de 10 minutos e temperatura ambiente. Esta centrifugação resultou na sedimentação das células, levando à ressuspensão em meio Hank's.

As células mononucleares separadas foram então submetidas à contagem em Câmara de Neubauer com aumento de 40x em microscópio óptico. Para tal, fez-se uma mistura em proporção 1:1 com corante azul de tripan 0,2 % (p/v). Durante a contagem, o meio contendo as células foi submetido a uma nova centrifugação. A partir da estimativa do total de células, efetuou-se a ressuspensão das mesmas em meio RPMI 1640 na concentração de 10^6 células por mL.

4.6.1.3 Teste de citotoxicidade

As culturas de células foram preparadas em microplacas de fundo plano com 96 poços, em capela de fluxo laminar vertical. As células mononucleares, preparadas conforme item 4.6.1.2, foram distribuídas nas placas em quantidade de 100 µL por poço (10^5 células por poço). Sobre as células, foram adicionadas as amostras, preparadas conforme o item 4.6.1.1, em alíquotas de 100 µL por poço, totalizando um volume final de 200 µL. Assim, as concentrações finais das amostras na placa, foram de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. Foram ensaiadas em triplicata para cada concentração de análise.

As culturas foram então incubadas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar, por períodos de 24, 48 e 72 horas. Neste momento, é importante destacar que foram preparadas placas individuais para cada tempo de incubação. Após este tempo, partiu-se para a determinação da viabilidade celular. Para tal, foram retiradas alíquotas de 150 µL de cada poço, as quais foram misturadas com 100 µL de tampão fosfato (PBS) e 3 µL de iodeto de propídeo. As amostras foram então analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson), com auxílio do programa CellQuest. O processamento dos dados para obtenção dos resultados finais de viabilidade celular (%) foi efetuado no programa WinMDI 2.8.

Os dados de viabilidade celular foram tratados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), seguida de Teste de Tukey. Utilizou-se o programa estatístico Sigma Stat 2.3.

4.6.2 Resultados e Discussão

A avaliação da toxicidade é descrita como uma etapa obrigatória para o registro e comercialização de fármacos e medicamentos, devendo seguir recomendações específicas dos órgãos reguladores. A detecção do potencial tóxico das amostras em teste se faz pela aplicação de ensaios *in vitro* e *in vivo*, clínicos e não clínicos, capazes de identificar possíveis riscos relevantes em humanos (ICH, 1995; ICH, 1995a; SNYDER e GREEN, 2001; SNYDER *et al.*, 2006).

É sabido que os riscos de toxicidade também provêm de possíveis impurezas presentes junto ao fármaco ou à preparação farmacêutica. A avaliação destas impurezas é contemplada pelo ICH, o qual descreve a necessidade de estudos voltados à sua identificação e à determinação da segurança dos fármacos e medicamentos que as contêm (ICH, 2006; ICH, 2006a).

A classificação de impurezas inclui aquelas oriundas da síntese química de um fármaco, ou formadas a partir da reação deste com os excipientes ou o material de acondicionamento da preparação farmacêutica. Neste último caso, a impureza pode ser definida como produto de degradação. Em verdade, os produtos detectados em estudo de estabilidade de um novo produto, efetuado nas condições de armazenamento recomendadas, também devem ser avaliados quanto aos parâmetros de identificação e segurança, acima citados (ICH, 2006; ICH, 2006a).

A caracterização estrutural e a avaliação da segurança biológica das impurezas ou produtos de degradação dos medicamentos são dependentes das quantidades relativas presentes na formulação. Em outras palavras, os ensaios são recomendados quando estas impurezas estão presentes num limite mínimo em relação à dose diária indicada para a preparação farmacêutica (ICH, 2006; ICH, 2006a).

Aplicando à preparação de meropenem estudada neste trabalho, a dose máxima diária recomendada é variável, dependendo do caso. No entanto, ultrapassa 2,0 g. De acordo com o ICH (2006), se a dose máxima diária está acima do valor citado, a identificação da impureza ou produto de degradação deve ser efetuada quando estão presentes em concentração mínima de 0,10 % em relação àquela dose. Para a avaliação da segurança biológica, através de testes de toxicidade, a concentração mínima deve ser de 0,15%.

Considerando os dados de estabilidade do antibiótico meropenem obtidos a partir dos ensaios desenvolvidos no presente trabalho, algumas observações podem ser discutidas. Os resultados de degradação por catálise básica, descritos nos itens 4.2.2 e 4.4.2, indicaram a decomposição total do fármaco e formação de um único produto de degradação. Assim, seguindo a normatização citada anteriormente, a identificação do produto, já efetuada, e a avaliação biológica da preparação devem

ser realizadas. Obviamente que as condições de degradação utilizadas são extremamente drásticas, o que acaba por levar à formação de produtos de degradação em grande quantidade.

Quanto aos resultados de decomposição térmica, apresentados no item 4.3.2, observou-se uma acentuada degradação nos maiores tempos de exposição da amostra reconstituída e do pó para solução injetável. Considerando uma redução de teor do fármaco a valores inferiores a 25 %, para as duas amostras, a avaliação das mesmas quanto à identificação de produtos e determinação de segurança biológica também pode ser efetuada, embora as concentrações destes produtos nas amostras não tenham sido determinadas e as condições utilizadas para degradação também tenham sido drásticas.

A partir da decisão de desenvolver ensaios voltados à avaliação da toxicidade das amostras de meropenem submetidas à decomposição, alguns trabalhos específicos desta área foram pesquisados. Embora o potencial tóxico das substâncias possa afetar diferentes sistemas do organismo humano, alguns testes específicos podem ser destacados, dentre eles a determinação da imunotoxicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade. Estes ensaios envolvem técnicas diferenciadas, objetivos distintos e parâmetros de análise específicos, podendo também resultar em efeitos de citotoxicidade (ICH, 1995; ICH, 1995a; ICH, 2005; SNYDER *et al.*, 2006).

Os ensaios de imunotoxicidade são aplicados basicamente para fármacos cuja ação terapêutica envolve a modulação do sistema imune. No entanto, aqueles fármacos que não afetam diretamente este sistema, mas podem causar imunotoxicidade, com efeitos de imunossupressão ou aumento da atividade imune, também devem ser testados (ICH, 2005).

Considerando os efeitos dos agentes antibacterianos na ação fagocítica de células imunes, ensaios de imunotoxicidade são desenvolvidos com o propósito de investigar a influência dos antibióticos na imunomodulação (LABRO, 1998). O meropenem, assim como os agentes β -lactâmicos em geral, apresenta efeitos imunomodulatórios significativos, com conseqüências diretas às atividades

fagocíticas bactericidas de células do sistema imune (MATERA *et al.*, 1995; HERRERA-INSÚA *et al.*, 1997; NOVELLI *et al.*, 2000).

No trabalho de HERRERA-INSÚA e colaboradores (1997), é destacada a capacidade dos derivados carbapenêmicos meropenem e imipenem em estimular a atividade fagocitária de leucócitos polimorfonucleares, resultando em um acréscimo de atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Em estudo similar, o aumento da fagocitose por células polimorfonucleares foi observado após uma pré-exposição de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas ao meropenem, o que confirmou a possível existência do chamado efeito pós-antibiótico na ação deste derivado (NOVELLI *et al.*, 2000).

Apesar da existência de trabalhos abordando a avaliação dos efeitos imunomodulatórios do meropenem, são poucos os que relatam a citotoxicidade deste antibiótico frente às células ensaiadas. Em estudo direcionado à determinação do efeito dos derivados meropenem e imipenem em células polimorfonucleares e NK (“Natural Killer”), a citotoxicidade destes antibióticos foi avaliada, e os resultados foram indicativos de manutenção da viabilidade celular nas condições testadas (CORNACCHIONE *et al.*, 2000).

A aplicação dos testes de toxicidade, no presente trabalho, vem de encontro à relatada importância de se determinar o potencial tóxico das preparações farmacêuticas e das impurezas ou produtos de degradação (ICH, 2006), e à possibilidade de complementar as informações de estabilidade do meropenem. A escolha pelo ensaio de citotoxicidade frente a células mononucleares ocorreu pela viabilidade de desenvolvimento da técnica e pelos dados da literatura que descrevem a influência deste fármaco no sistema imune.

Além disso, considerando que o meropenem apresenta um efeito imunomodulador, a possível semelhança estrutural entre os produtos de degradação e o antibiótico pode justificar este tipo de ensaio, estando de acordo com as recomendações do ICH (2005). Não menos importante, a possibilidade de formação de produtos de degradação tóxicos *in vitro*, que podem ser tóxicos *in vivo*, torna necessário o desenvolvimento destes ensaios, mesmo que de forma preliminar.

Algumas condições do ensaio de citotoxicidade desenvolvido foram escolhidas a partir da revisão dos trabalhos da literatura. No estudo de CORNACCHIONE e colaboradores (2000), foram testadas diferentes concentrações do antibiótico, variando de 0,1 µg/mL a 4,0 mg/mL. Nas maiores concentrações, de 2,0 e 4,0 mg/mL, é descrito um efeito inibitório sobre a fagocitose de células polimorfonucleares. Apesar da ausência de efeito citotóxico, estas concentrações foram tomadas como ponto de partida para definição desta condição de ensaio.

Após alguns ensaios preliminares, as concentrações finais das amostras em teste foram de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, sendo ensaiadas por períodos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade estão apresentados na Tabela 21. Também são ilustrados na Figura 85 na forma de representações gráficas relacionando as diferentes doses e a viabilidade celular observada nos respectivos tempos de incubação. Junto aos gráficos, são apresentados alguns resultados provenientes da análise estatística realizada. Considerando o número excessivo de amostras e de fatores que influenciam nesta análise, somente algumas diferenças estatísticas são abordadas.

A avaliação inicial dos dados indica que após um tempo de incubação de 24 horas, as amostras ensaiadas não apresentaram citotoxicidade, já que os percentuais de viabilidade celular se mantiveram altos, acima de 90 %, semelhantes ao controle. Uma redução de viabilidade celular foi verificada somente para o pó degradado na maior concentração, de 2,0 mg/mL, cuja percentagem de células viáveis foi de 59,83 %.

Embora a literatura pesquisada não descreva um valor referência para redução de células viáveis que indique citotoxicidade, alguns dados do ICH (1995) aplicados a ensaios de genotoxicidade citam como níveis desejados de toxicidade uma redução do número de células a 50 % ou 80 %, dependendo do objetivo. Para o ensaio de citotoxicidade desenvolvido no presente estudo, foram consideradas citotóxicas as amostras que provocarem uma redução de viabilidade celular para níveis inferiores a 50%.

A partir desta definição, pode-se considerar que todas as amostras ensaiadas não apresentam toxicidade celular para o período de 24 horas de incubação.

Levando isto a uma discussão mais aprofundada, é possível levantar a hipótese de que, num ensaio *in vivo*, estas amostras também não apresentarão potencial tóxico, já que, além das concentrações teciduais serem provavelmente menores que as trabalhadas, o teste *in vitro* é drástico do ponto de vista de concentração de amostra e contato celular direto. Outro ponto que reforça isso é que os testes *in vivo* incluem fatores biológicos de absorção, distribuição e excreção, o que não é contemplado nos ensaios *in vitro*, porém é relevante para o uso humano (ICH, 1995).

Os resultados obtidos a partir de tempos maiores de incubação indicam que as amostras degradadas e o produto de degradação PD3 apresentam citotoxicidade *in vitro*, dependendo da dose. Para o tempo de 48 horas, na dose de 1,0 mg/mL, as amostras de pó degradado, solução reconstituída e produto PD3 ocasionaram uma redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle e aos tratamentos com meropenem SQR, carbonato de sódio e hidróxido de sódio. O mesmo efeito é observado para a dose de 2,0 mg/mL. Também para este período de incubação, é verificada uma diferença significativa entre as doses utilizadas nos tratamentos com as amostras degradadas e o produto de degradação isolado.

Cabe salientar que em todos os ensaios as amostras de carbonato de sódio e hidróxido de sódio mantiveram a viabilidade celular acima de 80 %, demonstrando a possível ausência de efeito destes compostos no teste das outras amostras.

Para as análises efetuadas após 72 horas de incubação, os resultados foram indicativos de acentuada citotoxicidade das amostras degradadas e do produto isolado para as concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL. O mesmo efeito é observado para o meropenem SQR na concentração de 2,0 mg/mL.

Embora as amostras degradadas e o produto de degradação isolado tenham apresentado um maior potencial tóxico nos tempos de incubação superiores a 24 horas, é difícil afirmar que este perfil poderia ser observado *in vivo*. Esta questão é levantada em virtude de aspectos biofarmacêuticos que estão presentes em ensaios *in vivo*, principalmente a fase de eliminação de fármacos e metabólitos. Apesar disso, os resultados observados para o teste *in vitro*, nos tempos de 48 e 72 horas, realmente indicam a citotoxicidade das amostras, pois o controle do ensaio manteve o mesmo perfil nos períodos estudados.

Tabela 21 - Resultados de viabilidade de células mononucleares (%) obtidos a partir do teste de citotoxicidade *in vitro* do meropenem, amostras degradadas e produto de degradação PD3. Análise efetuada pela técnica de citometria de fluxo.

Concentração (mg/mL)	Viabilidade celular (%) ± desvio padrão (Tempo de incubação – 24 h)						
	Meropenem SQR	Pó degradado	Sol. reconstituída degradada	Produto PD3	Carbonato de sódio	Hidróxido de sódio	Controle
0,5	98,40 ± 0,61	98,16 ± 0,28	98,15 ± 0,45	98,25 ± 0,38	97,75 ± 0,85	97,34 ± 1,96	98,38 ± 0,53
1,0	98,47 ± 0,56	96,80 ± 1,12	98,09 ± 0,27	97,34 ± 1,01	96,84 ± 0,76	97,76 ± 1,92	
2,0	97,71 ± 0,81	59,83 ± 6,67	95,06 ± 2,07	84,82 ± 10,73	95,04 ± 0,90	97,50 ± 2,03	
Concentração (mg/mL)	Viabilidade celular (%) ± desvio padrão (Tempo de incubação – 48 h)						
	Meropenem SQR	Pó degradado	Sol. reconstituída degradada	Produto PD3	Carbonato de sódio	Hidróxido de sódio	Controle
0,5	96,79 ± 0,50	94,45 ± 0,88	95,62 ± 0,97	89,89 ± 5,07	94,78 ± 1,43	94,01 ± 1,75	96,74 ± 0,64
1,0	95,91 ± 0,68	41,17 ± 12,22	69,32 ± 9,77	16,72 ± 7,42	93,47 ± 1,92	93,23 ± 0,39	
2,0	83,23 ± 11,29	4,04 ± 2,47	20,55 ± 3,00	3,69 ± 1,19	88,79 ± 2,34	93,26 ± 0,47	
Concentração (mg/mL)	Viabilidade celular (%) ± desvio padrão (Tempo de incubação – 72 h)						
	Meropenem SQR	Pó degradado	Sol. reconstituída degradada	Produto PD3	Carbonato de sódio	Hidróxido de sódio	Controle
0,5	92,51 ± 2,64	75,47 ± 6,70	84,22 ± 7,01	19,98 ± 6,69	93,86 ± 1,79	95,81 ± 2,20	95,01 ± 0,92
1,0	63,98 ± 15,26	8,41 ± 2,18	26,82 ± 6,94	3,60 ± 2,08	89,98 ± 3,23	91,36 ± 1,41	
2,0	14,33 ± 1,92	1,62 ± 0,45	4,40 ± 2,16	2,63 ± 1,36	82,16 ± 2,70	92,62 ± 0,64	

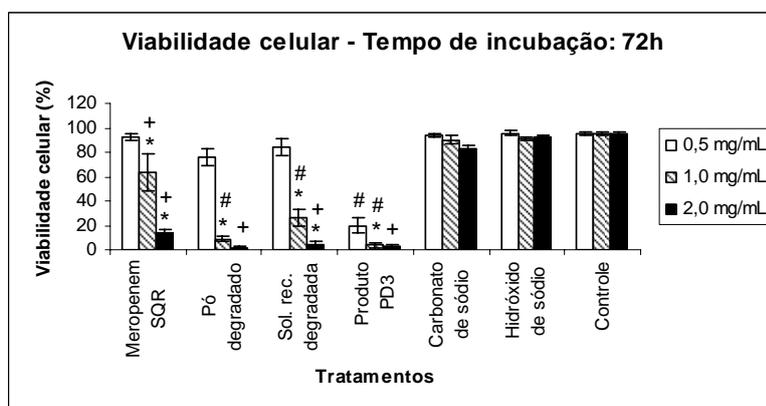
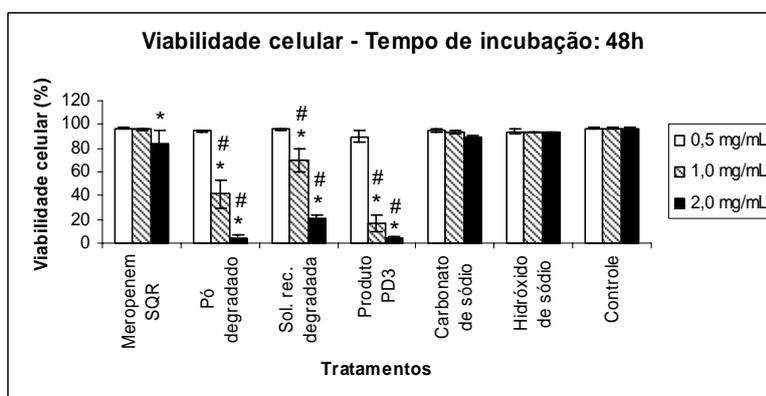
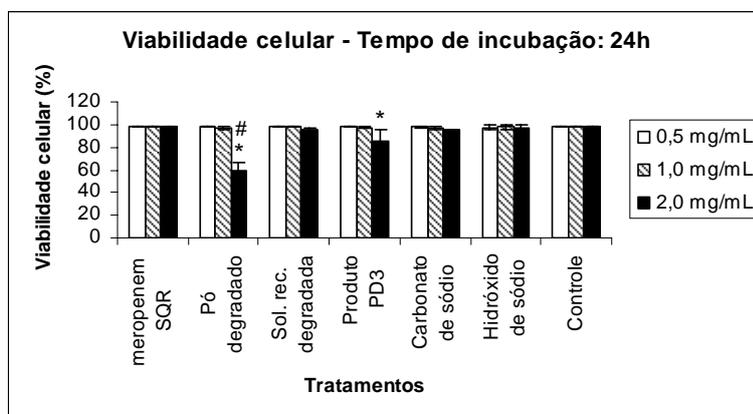


Figura 85 - Resultados de viabilidade celular (%) obtidos a partir do teste de citotoxicidade *in vitro* do meropenem, amostras degradadas e produto de degradação PD3. Análise efetuada pela técnica de citometria de fluxo. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre valores detectadas por ANOVA (três vias) seguida pelo teste de Tukey.

* Diferença significativa em relação às doses menores do mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Diferença significativa em relação ao controle e aos tratamentos com meropenem SQR, carbonato de sódio e hidróxido de sódio, na mesma dose ($p < 0,05$).

+ Diferença significativa em relação ao controle e aos tratamentos com carbonato de sódio e hidróxido de sódio, na mesma dose ($p < 0,05$).

Levando em conta que a viabilidade celular foi determinada pela técnica de citometria de fluxo, a Figura 86 ilustra o gráfico obtido a partir deste tipo de análise. Este gráfico faz uma relação entre a intensidade de fluorescência (FL2) e a granulosidade (complexidade – SSC). Os parâmetros de tamanho e granulosidade permitem a identificação do tipo celular em análise. Para melhor compreensão, é importante destacar que as células rompidas têm um aumento da intensidade de fluorescência emitida quando comparado com a fluorescência basal de células viáveis. Este acréscimo de fluorescência é ocasionado pela incorporação do corante iodeto de propídeo.

A Figura 86 permite a visualização dos resultados para os tratamentos com meropenem SQR e produto PD3 em concentração de 1,0 mg/mL, após 48 horas de incubação, além do controle do ensaio. São ilustrados os resultados de análise das células de um indivíduo. A emissão de fluorescência em maior intensidade ocorre para as células submetidas ao tratamento com o produto de degradação, confirmando o resultado de citotoxicidade observado para esta condição.

O estudo de avaliação da citotoxicidade das amostras degradadas do meropenem e do produto de degradação PD3 permitiu a complementação do estudo de estabilidade proposto. Os resultados gerais, embora preliminares, indicam uma possível citotoxicidade *in vitro* das amostras oriundas da degradação térmica e da catálise básica, em concentrações altas e em tempos a partir de 48 horas. Mesmo sabendo da drasticidade das condições do ensaio, os dados finais são indicativos da necessidade de atenção para a degradação deste antibiótico. Além disso, estudos mais aprofundados nesta área podem ser desenvolvidos para melhor esclarecimento do potencial tóxico das amostras degradadas do meropenem.

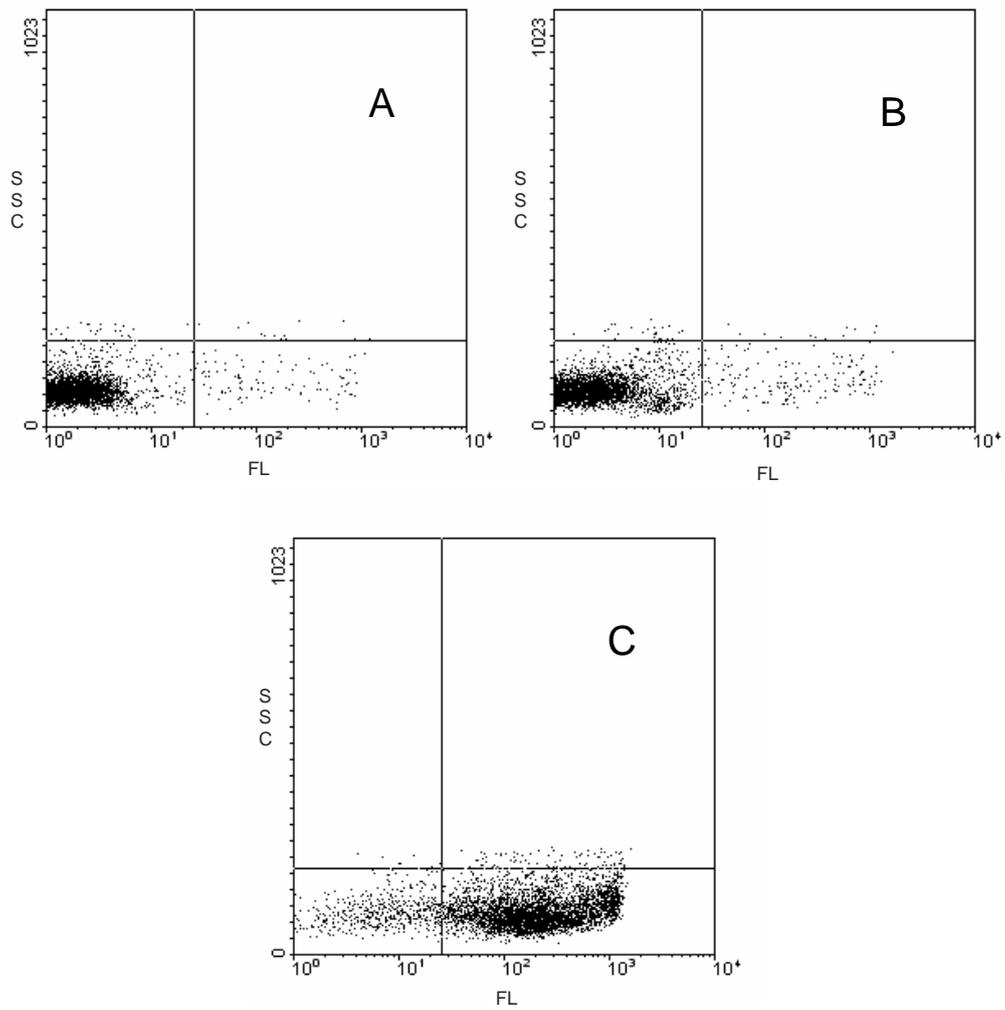


Figura 86 - Representações gráficas obtidas a partir da análise por citometria de fluxo de células mononucleares submetidas ao teste de citotoxicidade *in vitro*, após período de incubação de 48 horas. FL: intensidade de fluorescência; SSC: granulicidade (complexidade). A: controle; B: meropenem SQR a 1,0 mg/mL; C: produto de degradação PD3 a 1,0 mg/mL.

5. CONCLUSÕES

- ✓ As amostras de meropenem pó para solução injetável e de meropenem produto reconstituído sofreram uma acentuada decomposição em condições de degradação forçada pelos fatores temperatura, meio ácido (HCl 0,1 M) e meio básico (NaOH 0,1 M);
- ✓ As amostras de meropenem pó para solução injetável e de meropenem produto reconstituído apresentaram degradação térmica seguindo uma cinética química de decomposição de primeira ordem;
- ✓ O método por cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a análise qualitativa e quantitativa do meropenem após exposição a condições de degradação forçada frente aos fatores temperatura, meio ácido (HCl 0,1 M) e meio básico (NaOH 0,1 M). Através deste método foi possível detectar produtos de degradação majoritários nas amostras ensaiadas.
- ✓ O método por cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a análise qualitativa e quantitativa do meropenem nos ensaios de determinação da cinética química de decomposição térmica. Através deste método foi possível detectar produtos de degradação majoritários nas amostras analisadas.
- ✓ O ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas permitiu a determinação da cinética química de decomposição térmica do meropenem;
- ✓ No estudo de cinética química de decomposição térmica do meropenem pó para solução injetável e do meropenem produto reconstituído, a comparação dos resultados de análise quantitativa obtidos pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e de ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros permitiu a detecção de ausência de atividade antimicrobiana dos produtos de degradação presentes nas amostras degradadas;
- ✓ O estudo de degradação forçada pelo fator temperatura permitiu o isolamento de um produto de degradação majoritário (PD1) através das técnicas cromatográficas cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada analítica, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência;

- ✓ O estudo de degradação forçada pelo fator meio básico (NaOH 0,1 M) permitiu a detecção de um único produto de degradação (PD3) nas amostras submetidas à decomposição;
- ✓ O estudo de degradação forçada pelo fator meio ácido (HCl 0,1 M) permitiu a detecção de um único produto de degradação nas amostras submetidas à decomposição, de provável semelhança estrutural com o produto de degradação PD3;
- ✓ O meropenem SQR foi identificado através das técnicas de espectroscopia de RMN e de espectroscopia de massas;
- ✓ O produto de degradação PD1 foi identificado através da técnica de espectroscopia de RMN. A estrutura proposta é denominada quimicamente ácido 3-(1H-pirrol-3-il-tio)-4-metil-5H-pirrol-carboxílico;
- ✓ O produto de degradação PD3, formado a partir da decomposição do meropenem em meio básico (NaOH 0,1 M), foi identificado através das técnicas de espectroscopia de RMN e de espectroscopia de massas. A estrutura proposta é denominada quimicamente 3-(5-dimetilcarbamilpirrolidin-3-il-tio)-4-metil-5-(2-propil-alcóxido de sódio)-4,5-dihidro-1H-pirrol-5-(1)-2-dicarboxilato de sódio;
- ✓ A identificação dos produtos de degradação permitiu a proposição de rotas de decomposição formadas por uma seqüência de reações passíveis de ocorrer durante a degradação do meropenem nas condições ensaiadas;
- ✓ As amostras de meropenem pó para solução injetável e meropenem produto reconstituído, submetidas à decomposição térmica, e o produto de degradação oriundo de catálise básica apresentaram efeito citotóxico *in vitro* frente a células mononucleares, após 48 horas de incubação e em concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL.

6. REFERÊNCIAS

AKOVA, M.; AKAN, H.; KORTEN, V.; BIBEROGLU, K.; HAYRAN, M.; ÜNAL, S.; KARS, A.; KANSU, E. Comparison of meropenem with amikacin plus ceftazidime in the empirical treatment of febrile neutropenia: a prospective randomised multicentre trial in patients without previous prophylactic antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 13, p. 15-19, 1999.

ALDRIDGE, K. Ertapenem (MK-0826), a new carbapenem: comparative in vitro activity against clinically significant anaerobes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 44, p. 181-186, 2002.

ALMARSSON, Ö.; SEBURG, R. A.; GODSHALL, E. W.; TSAI E. W.; KAUFMAN, M. J. Solid-state chemistry of a novel carbapenem with a releasable sidechain. **Tetrahedron**, [S.I.], v. 56, p. 6887-6885, 2000.

AL-MESHAL, M. A.; RAMADAN, M. A.; LOTFI, K. M.; SHIBL. A. M. Determination of meropenem in plasma by high-performance liquid chromatography and a microbiological method. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, [S.I.], v. 20, n. 3, p. 159-163, 1995.

ARRIETA, A. Use of meropenem in the treatment of serious infections in children: review of the current literature. **Clinical Infectious Diseases**, [S.I.], v. 24, supl. 2, p. S207-S212, 1997.

ASBEL, L. E.; LEVISON, M. E. Cephalosporins, Carbapenems and Monobactams. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 14, n. 2, p. 435-447, 2000.

ASTRAZENECA. Meronem. Macclesfield, 2004. 1 f. Bula.

BAERTSCHI, S. W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 758-767, 2006.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BALLARD, P.; STAFFORD, L. E.; LAW, B. The development and performance of a radioimmunoassay for the analysis of ZM 213,689, the major metabolite of meropenem-a carbapenem antibiotic-in plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 14, p. 409-417, 1996.

BANSAL, A. K. Product development issues of powders for injection. **Pharmaceutical Technology**, Iselin, p. 122-132, March, 2002.

BARKER, J. (Ed.). **Mass Spectrometry**. 2 ed. Chinchester: John Wiley & Sons Ltd., 1999.

BASÁEZ, L.; VANÝSEK, P. Transport studies of β -lactam antibiotics and their degradation products across electrified water/oil interface. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 19, p. 183-192, 1999.

BASOLI, A.; MELI, E. Z.; MAZZOCHI, P.; SPERANZA, V. Imipenem/cilastatin (1.5 g daily) versus meropenem (3.0 g daily) in patients with intra-abdominal infectious: results of a prospective, randomized, multicentre trial. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 29, supl. 5, p. 503-508, 1997.

BIOCHIMICO. Mepenox. Rio de Janeiro, 2005. 1 f. Bula.

BLUMER, J. L. Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 8, p. 73-92, 1997.

BOMPADRE, S.; FERRANTE, L.; DE MARTINIS, M.; LEONE, L. Determination of meropenem in serum by high-performance liquid chromatography with column switching. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 812, p. 249-253, 1998.

BRADLEY, J. S. Meropenem: a new, extremely broad spectrum beta-lactam antibiotic for serious infections in pediatrics. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 16, p. 263-268, 1997.

BRADLEY, J. S.; GARAU, J.; LODE, H.; ROLSTON, K. V. I.; WILSON, S. E.; QUINN, J. P. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 11, p. 93-100, 1999.

BRANCH, S. K.; CASY, A. F.; LIPCZYNSKI, A.; OMINDE, M. A. Carbon-13 NMR of β -lactam antibiotics and related compounds. **Magnetic Resonance in Chemistry**, [S.l.], v. 24, p. 465-479, 1986.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, através de revogação da RE - nº 398 publicada no D.O.U 16 nov. 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1993. 265 p.

BUYNAK, J. Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, p. 930-940, 2006.

CAI, S.; HU, C. Chromatographic determination of polymerized impurities in meropenem. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 585-589, 2005.

CARSTENSEN, J. T. Solution kinetics. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. cap. 2, p. 19-55.

_____. Kinetic pH profiles. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000a. cap. 3, p. 57-111.

_____. Solid state stability. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000b. cap. 6, p. 145-189.

CHANG, Y. L.; CHOU, M. H.; LIN, M. F.; CHEN, C. F.; TSAI, T. H. Determination and pharmacokinetic study of meropenem in rat bile using on-line microdialysis and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 961, p. 119-124, 2002.

CORNACCHIONE, P.; SCARINGI, L.; CAPODICASA, E.; FETTUCCIARI, K.; ROSATI, E.; SABATINI, R.; BENEDETTI, C.; MARCONI, P.; ROSSI, R.; DEL FAVERO, A. In vitro effects of meropenem and imipenem/cilastatin on some functions of human natural effector cells. **Chemotherapy**, [S.I.], v. 46, p. 135-142, 2000.

COULTON, S.; HUNT, E. Recent advances in the chemistry and biology of carbapenem antibiotics. **Progress in Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 33, p. 99-145, 1996.

DALHOFF, A.; JANJIC, N.; ECHOLS, R. Redefining penems. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, p. 1085-1095, 2006.

DARRINGTON, R. T.; JIAO, J. Rapid and accurate prediction of degradant formation rates in pharmaceutical formulations using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 93, n. 4, p. 838-846, 2004.

DARVILLE, T. Imipenem and Meropenem. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, [S.I.], v. 10, n. 1, p. 38-44, January, 1999.

DRUG THERAPY REVIEW. Meropenem (Meronem, Zeneca). **Intensive and Critical Care Nursing**, [S.I.], v. 11, p. 298-299, 1995.

DUPUIS, A.; MINET, P.; COUET, W.; COURTOIS, P.; BOUQUET, S. Rapid and sensitive determination of meropenem in rat plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, [S.I.], v. 21, n.16, p. 2549-2560, 1998.

EHRlich, M.; DASCHNER, F. D.; KÜMMERER, K. Rapid antibiotic drug monitoring: meropenem and ceftazidime determination in serum and bronchial secretions by high-performance liquid chromatography-integrated sample preparation. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 751, p.357-363, 2001.

ELKHAILI, H.; NIEDERGANG, S.; POMPEI, S.; LINGER, L.; LEVEQUE, D.; JEHL, F. High-performance liquid chromatographic assay for meropenem in serum. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 686, p. 19-26, 1996.

EUROFARMA. Meropenem. São Paulo, 2004. 1 f. Bula.

FASOLI, H. J.; FRAU, J. Theoretical study of the alkaline hydrolysis of tricyclic carbapenem. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 88, p. 774-781, 2005.

FARINA, A.; PORRÀ, R.; COTICHINI, V.; DOLDO, A. Stability of reconstituted solutions ceftazidime for injections: na HPLC and CE approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 20, p. 521-530, 1999.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry – Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products**. U.S. Department of Health and Human Services, 2003.

FRANCESCHINI, N.; SEGATORE, B.; PERILLI, M.; VESSILLIER, S.; FRANCHINO, L.; AMICOSANTE, G. Meropenem stability to β -lactamase hydrolysis and comparative *in vitro* activity against several β -lactamase-producing Gram-negative strains. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, p. 395-398, 2002.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. **Drug Resistance Updates**, [S.l.], v. 5, p. 181-191, 2002.

GIL-ALEGRE, M. E.; BERNABEU, J. A.; CAMACHO, M. A.; TORRES-SUAREZ, A. I. Statistical evaluation for stability studies under stress storage conditions. **II Farmaco**. Pavia, v. 56, p. 877-883, 2001.

GRANT, E. M.; ZHONG, M.; AMBROSE, P. G.; NICOLAU, D. P.; NIGHTINGALE, C. H.; QUINTILIANI, R. Stability of meropenem in a portable infusion device in a cold pouch. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S.l.], v. 57, p. 992-995, 2000.

GOOSSENS, H.; GRABEIN, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC program in Europe and United States (1997-2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 53, p. 257-264, 2005.

GÜNTER, H. **NMR spectroscopy: basic principles, concepts, and applications in chemistry**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1995.

HELLINGER, W. C.; BREWER, N. S. Carbapenems and Monobactams: Imipenem, Meropenem and Aztreonam. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 74, p. 420-434, 1999.

HERRERA-INSÚA, I.; PÉREZ, P.; MARTÍNEZ, P.; GÓMEZ-LUZ, M. L.; PRIETO, J. Meropenem-induced alteration of the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the bactericidal activity of human polymorphonuclear leucocytes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 39, p. 223-228, 1997.

HONG, D. D.; SHAH, M. Development and validation of HPLC stability-indicating assays. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. cap. 11, p. 329-384.

HURST, M.; LAMB, H. M. Meropenem: A review of its use in patients in intensive care. **Drugs**, Sydney, v. 59, n. 3, p. 653-680, 2000.

HILALI, A.; JIMÉNEZ, J. C.; CALLEJÓN, M.; BELLO, M. A.; GUIRAÚM, A. Electrochemical study of imipenem's primary metabolite at the mercury electrode voltammetric determination in urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 38, p. 768-775, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Guidance of specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals S2A**. Current Step 4 version. ICH Steering Committee, 1995.

_____. **Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals S1A**. Current Step 4 version. ICH Steering Committee, 1995a.

_____. **Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**. Current Step 4 version. ICH Steering Committee, 2003.

_____. **Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals S8**. Current Step 4 version. ICH Steering Committee, 2005.

_____. **Impurities in new drug products Q3B (R2)**. Current Step 4 version. ICH Steering Committee, 2006.

_____. **Impurities in new drug substances Q3A (R2)**. Current Step 4 version. ICH Steering Committee, 2006a.

IP, M.; AU, C.; CHEUNG, S. W.; CHAN, C. Y.; CHENG, A. F. B. A rapid high-performance liquid chromatography assay for cefepime, ceftazidime and meropenem. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 42, p. 121-123, 1998.

ISENBERG, H. D.; ALPERSTEIN, P.; FRANCE, K. In vitro activity of ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin, alone and in combination with β -lactams, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 33, p. 81-86, 1999.

ITO, N.; SUZUKI, M.; KUSAI, A.; TAKAIAMA, K. Effect of initial concentration of panipenem in aqueous solution. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S.I.], v. 53, n. 3, p. 323-327, 2005.

_____. Isomerization kinetics of panipenem in aqueous solution. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S.I.], v. 53, n. 5, p. 537-540, 2005a.

JARURATANASIRIKUL, S.; SRIWIRIJAN, S. Stability of meropenem in normal saline solution after storage at room temperature. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 34, n. 3, p. 627-629, 2003.

KIFFER, C. R. V.; SAMPAIO, J. L. M.; SINTO, S.; OPLUSTIL, C. P.; KOGA, P. C. M.; ARRUDA, A. C.; TURNER, P. J.; MENDES, C. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 52, p. 317-322, 2005.

KITAHASHI, T.; FURUTA, I. Determination of meropenem by capillary electrophoresis using direct injection of serum. **Journal of Chromatographic Science**, Nilles, v. 43, p. 430-433, September 2005.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; DE GRIEND, C. S.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, Iselin, p. 48-66, February, 2005.

KNAPP, K. M.; ENGLISH, K. Carbapenems. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, [S.I.], v. 12, n. 3, p. 175-185, July, 2001.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S.I.], v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

KUTI, J. L.; NIGHTINGALE, C. H.; KNAUFT, R. F.; NICOLAU, D. P. Pharmacokinetic properties and stability of continuous-infusion meropenem in adults with cystic fibrosis. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 26, n. 4, p. 493-501, 2004.

LABRO, M. Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 10, p. 11-21, 1998.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulben Kian, 2001. v. 2, cap. 26, p. 1277-1355.

LEVÊQUE, D.; GALLION-RENAULT, C.; MONTEIL, H.; JEHL, F. Analysis of recent antimicrobial agents in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, p. 163-172, 1998.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting?. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 489-495, 2000.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. cap. III, p. 45-56.

LOWE, M. N.; LAMB, H. M. Meropenem: an update review of its use in the management of intra-abdominal infections. **Drugs**, Sydney, v. 60, n. 3, p. 619-646, 2000.

MANDELL, G. L.; PETRI, W. A. Fármacos antimicrobianos. In: GILMAN, A. G. (Ed). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. cap. 45, p. 790-811.

MARTIN, A. Kinetics. In:_____. **Physical Pharmacy**. 4. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1993. cap. 12, p. 284-317.

MASTERTON, R. G.; TURNER, P. J. Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997-2002). **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 27, p. 69-72, 2006.

MATERA, G.; BERLINGHIERI, M. C.; FOCÀ, A. Meropenem: effects on human leukocyte functions and interleukin release. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 5, p. 129-133, 1995.

MATSUMOTO, T.; MURATANI, T. Newer carbapenems for urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 24S, p. S35-S38, 2004.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S.l.], v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.

MCQUADE, M. S.; NOSTRAND, V. V.; SCHARITER, J.; KANIKE, J. D.; FORSYTH, R. J. Stability and compatibility of reconstituted ertapenem with commonly used i.v. infusion and coinfusion solutions. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S.l.], v. 61, p. 38-45, jan. 2004.

MENDEZ, A. S. L. **Validação de metodologia de análise para antibiótico carbapenêmico**. 2003. 140p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

MOLOUGHNEY, J. G.; THOMAS, J. D.; TONEY, J. H. Novel IMP-1 metallo- β -lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, p. 65-71, 2005.

MOON, Y. S. K.; CHUNG, K. C.; GILL, M. A. Pharmacokinetics of meropenem in animals, healthy volunteers and patients. **Clinical Infectious Diseases**, [S.l.], v. 24, supl. 2, p. S249-S255, 1997.

MOUTON, J. W.; VAN DEN ANKER, J. N. Meropenem clinical pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 28, n. 4, p. 275-286, 1995.

MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.; NAGEL, F. Capillary zone electrophoresis determination of meropenem in biological media using a high sensitivity cell. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 20, p. 899-903, 1999.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda., 2003. cap. 4, p. 29, cap. 10, p. 145, cap. 11, p.149.

NIESSEN, W. M. A.; Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 812, p. 53-75, 1998.

NISHIMURA, T.; IGARASHI, J.; SASAKI, A.; SUNAGAWA, M. Structural comparison of 1 β -methylcarbapenem, carbapenem and penem: NMR studies and theoretical calculations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 6, p. 367-375, 1998.

NORRBY, S. R. Carbapenems. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 79, n. 4, p. 745-759, 1995.

NOVELLI, A.; FALLANI, S.; CASSETTA, M. I.; CONTI, S.; MAZZEI, T. Postantibiotic leukocyte enhancement of meropenem against Gram-positive and Gram-negative strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, p. 3174-3176, 2000.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. 1. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1975, 187p.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of pharmaceutical products. In: TROY, D. B. (Ed). **REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY**. 21th ed. Philadelphia: The university of the sciences, 2006. cap. 52, p. 1025-1036.

ONG, C. T.; TESSIER, P. R.; CHONGHUA, L.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D. P. Comparative in vivo efficacy of meropenem, imipenem, and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* expressing MexA-MexB-OprM efflux pumps. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 57, p. 153-161, 2007.

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

PARFITT, K. (Ed). **MARTINDALE: The complete drug reference**. 32. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. p. 224.

PATEL, P. R. Compatibility of meropenem with commonly used injectable drugs. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S.I.], v. 53, p. 2853-2855, dec. 1996.

PATEL, P. R.; COOK, S. E. Stability of meropenem in intravenous solution. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S.I.], v. 54, p. 412-420, feb. 1997.

PATERSON, D. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, [S.I.], v. 119, n. 6A, p. S20-S28, 2006.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N. A review of in vitro activity of meropenem and comparative antimicrobial agents tested against 30245 aerobic and anaerobic pathogens isolated world wide. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York , v. 28, p. 157-163, 1997.

PRASHAD, A. S.; VLAHOS, N.; FABIO, P.; FEIGELSON, G. B. A highly refined version of the α -keto ester based carbapenem synthesis: the total synthesis of meropenem. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 39, p. 7035-7038, 1998.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds: tables of spectral data**. Berlin: Springer, 2000. 421 p.

PROUS, J. R. SM-7338. **Drugs of the future**, Barcelona, v. 13, n. 6, p. 534-535, 1988.

PUERTO, A. S.; FERNÁNDEZ, J. G.; DEL CASTILLO, J. D. L.; PINO, M. J. S.; ANGULO, G. P. In vitro activity of β -lactam and non- β -lactam antibiotics in extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 54, p. 135-139, 2006.

QUÍMICA HALLER. Meroxil. Rio de Janeiro, 2005. 1 f. Bula.

RATJEN, F. Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 17, p. 93-96, 2001.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, J. D.; MOTTO, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, Iselin, p. 48-56, February, 2002.

RICE, L. B. Do we really need new anti-infective drugs?. **Current Opinion in Pharmacology**, London, v. 3, p. 459-463, 2003.

RHODES, C. T. Introductory overview. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. cap. 1, p. 1-18.

RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N., SADER, H. S.; FRITSCHKE, T. R. Antimicrobial resistance rates and clonality results from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme: report of year five (2003). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York , v. 49, p. 273-281, 2004.

ROBATEL, C.; BUCLIN, T.; ECKERT, P.; SCHALLER, M. D.; BIOLLAZ, J.; DECOSTERD, L. A. Determination of meropenem in plasma and filtrate-dialysate from patients under continuous veno-venous haemodiafiltration by SPE-LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 29, p. 17-33, 2002.

ROVATTI, L.; GARZOTTI, M.; CASAZZA, A.; HAMDAN, M. Investigation of potential degradation products of a newly synthesised β -lactam antibiotic by multi-stage liquid

chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 819, p. 133-142, 1998.

SAJONZ, P.; NATISHAN, T. K.; WU, Y.; WILLIAMS, J. M.; PIPIK, B.; DIMICHELE, L.; NOVAK, T.; PITZENBERGER, S.; DUBOST, D.; ALMARSSON, Ö. Preparation, isolation, and characterization of dimeric degradation products of the 1 β -methylcarbapenem antibiotic, ertapenem. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, [S.I.], v. 24, n.19, p. 2999-3015, 2001.

SAJONZ, P.; WU, Y.; NATISHAN, T. K.; MCGACHY, N. T.; DETORA, D. Challenges in the analytical method development and validation for an unstable active pharmaceutical ingredient. **Journal of Chromatographic Science**, Nilles, v. 44, p. 132-140, March 2006.

SAJONZ, P.; VAILAYA, A.; SUDAH, O.; MCPHERSON, L.; CAPODANNO, V.; NATISHAN, T. K.; HELMY, R.; ANTIA, F. D. Development a gradient elution preparative high performance liquid chromatography method for the recovery of the antibiotic ertapenem from crystallization process streams. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1126, n. 1-2, p. 365-372, 2006a.

SCHAUMANN, R.; ACKERMANN, G.; PLESS, B.; CLAROS, M. C.; GOLDSTEIN, E. J. C.; RODLOFF, A. C. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against obligately anaerobic bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 16, p. 225-232, 2000.

SHAMSIPUR, M.; TALEBPOUR, Z.; BIJANZADEH, H. R.; TABATABEI, S. Monitoring of ampicillin and its related substances by NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 30, p. 1075-1085, 2002.

SHAN-YING, C.; CHANG-QIN, H.; MING-ZHE, X. Chromatographic determination of high-molecular weight impurities in amoxicillin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 31, p. 589-596, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SMITH, G. B.; DEZENY, G. C.; DOUGLAS, A. W. Stability and kinetics of degradation of imipenem in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.I.], v. 79, n. 8, p. 732-740, 1990.

SMITH, D. L.; BAUER, S. M.; NICOLAU, D. P. Stability of meropenem in polyvinyl chloride bags and an elastomeric infusion device. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S.I.], v. 61, p. 1682-1685, 2004.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, [S.I.], v. 488, p. 151-169, 2001.

SNYDER, R. D.; EWING, D.; HENDRY, L. B. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in *in vitro* cytogenetics assays. **Mutation Research**, [S.I.], v. 609, p. 47-59, 2006.

SOLBERG, C. O.; SJURSEN, H. Safety and efficacy of meropenem in patients with septicaemia: a randomised comparison with ceftazidime, alone or combined with amikacin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 36, supl. A, p. 157-166, 1995.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000, v. 2, cap. 18, p. 113.

SUNAGAWA, M.; MATSUMURA, H.; INOUE, T.; FUKASAWA, M.; KATO, M. A novel carbapenem antibiotic, SM-7338 structure-activity relationships. **The Journal of Antibiotics**, [S.l.], v. XLIII, n. 5, p. 519-532, 1990.

SWANSON, D. J.; DEANGELIS, C.; SMITH, I. L.; ACHENTAG, J. J. Degradation kinetics of imipenem in normal saline and in human serum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 29, n. 5, p. 936-937, 1986.

TAKEUCHI, Y.; TAKEBAYASHI, Y.; SUNAGAWA, M.; ISOBE, Y.; HAMAZUME, Y.; UEMURA, A.; NOGUCHI, T. The stability of a novel carbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338), in a solid state formulation for injection. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v. 41, n. 11, p. 1998-2002, 1993.

TAKEUCHI, Y.; SUNAGAWA, M.; ISOBE, Y.; HAMAZUME, Y.; NOGUCHI, T. Stability of a 1 β -methylcarbapenem antibiotic, Meropenem (SM-7338) in aqueous solution. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v. 43, n. 4, p. 689-692, 1995.

TANIGUCHI, S.; HAMASE, K.; KINOSHITA, A.; ZAITSU, K. Simple and rapid analytical method for carbapenems using capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 727, p. 219-225, 1999.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 12. ed. New Jersey: Merck & Co., 1996. p. 1006-1007.

TRISSEL, L. A. **HANDBOOK ON INJECTABLE DRUGS**. 12. ed. Houston: American Society of health-system pharmacists, 2003. p. 899-904.

TURNER, P. J. Susceptibility of meropenem and comparators tested against 30634 enterobacteriaceae isolated in the MYSTIC programme (1997-2003). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 50, p. 291-293, 2004.

_____. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997-2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 51, p. 281-289, 2005.

USP 29. **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 29th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

USP DI. **DRUG INFORMATION FOR THE HEALTH CARE PROFESSIONAL**. 21. ed. Rockville: Micromedex THOMSON healthcare, 2001. v. 1, p. 2010-2013.

WATANABE, A.; TOKUE, Y.; KIKUCHE, T.; GOMI, K.; AOKI, S.; SATOH, S.; FUJIMURA, S. Antibacterial activity of carbapenems against clinically isolated respiratory bacterial pathogens in Japan between 2003 and 2004. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 26, p. 420-423, 2005.

WIBERG, K.; ANDERSSON, M.; HAGMAN, A.; JACOBSSON, S. P. Peak purity determination with principal component analysis of high-performance liquid chromatography-diode array detection data. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1029, p. 13-20, 2004.

WIGENT, R. J. Chemical Kinetics. In: TROY, D. B. (Ed). **REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY**. 21th ed. Philadelphia: The university of the sciences, 2006. cap. 19, p. 266-280.

WISEMAN, L. R.; WAGSTAFF, A. J.; BROGDEN, R. N.; BRYSON, H. M. Meropenem: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic, properties and clinical efficacy. **Drugs**, Sydney, v. 50, n. 1, p. 73-101, 1995.

ZAJAC, M.; CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A. Stability of ertapenem in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, p. 445-449, 2007.

ZANETTI, G.; HARBARTH, S. J.; TRAMPUZ, A.; GANEO, M.; MOSIMANN, F.; CHAUTEMPS, R.; MOREL, P.; LEW, D.; ZIMMERLI, W.; LANGE, J.; GLAUSER, M. Meropenem (1.5 g/day) is as effective as imipenem/cilastatin (2 g/day) for the treatment of moderately severe intra-abdominal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v. 11, p. 107-113, 1999.

ZHANG, J.; MUSSON, D. G.; BIRK, K. L.; CAIRNS, A. M.; FISHER, A. L.; NEWAY, W.; ROGERS, J. D. Direct-injection HPLC assay for the determination of a new carbapenem antibiotic in human plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 755-770, 2002.

ZHAO, Z.; QIN, X.; REED, R. A. Identification by LC/MS of degradates of a novel carbapenem antibiotic in an aqueous matrix. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 29, p. 173-181, 2002.



Short communication

Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample

Andreas S.L. Mendez^{a,*}, Jean Dalomo^b, Martin Steppe^{a,b}, Elfrides E.S. Schapoval^{a,b}^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^b Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 19 December 2005; received in revised form 7 February 2006; accepted 7 February 2006

Available online 14 March 2006

Abstract

The stability of broad-spectrum antibiotic meropenem was studied in order to investigate the kinetics of degradation of this drug in powder for injection and reconstituted sample. Carbapenem was submitted to conditions of accelerated thermal decomposition. Degradation of meropenem was adequately modeled by specific equations for order rate kinetics. The analyses of the degraded samples were performed by high-performance liquid chromatographic (HPLC) method and microbiological assay. At higher temperatures, the decomposition reactions of meropenem in powder for injection could be described by first-order kinetics. The higher rate of degradation was observed in meropenem reconstituted in 0.9% sodium chloride, and the thermal decomposition obeyed also first-order kinetics. The results obtained confirm the reliability of chromatographic method for determining the kinetics run of meropenem in the presence of its degradation products. The present study reveals the thermal lability of the drug, especially as reconstituted sample. Thus, appropriate thermal protection is recommended during the storage and handling.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Meropenem; Stability; Kinetics of degradation; HPLC; Microbiological assay; Powder for injection; Reconstituted sample

1. Introduction

Meropenem (Fig. 1) is a parenteral carbapenem antibiotic with a very broad spectrum of antibacterial activity against the majority of gram-positive and gram-negative pathogens [1,2]. This antibiotic is stable to ring opening by human renal dehydropeptidase I (DHP-I) and consequently does not require concomitant administration of a DHP-I inhibitor. Meropenem has shown clinical efficacy in the treatment of a wide range of serious infections such as intra-abdominal infections, urinary tract infections and lower respiratory tract infections [3,4].

Literature survey reveals several analytical methods reported for the quantitative estimation of meropenem in pharmaceutical dosage form, including high-performance liquid chromatography (HPLC) [5–7], ultraviolet spectrophotometry [6] and microbiological assay [8]. The quantitation of meropenem in the presence of its degradation products has been studied. Recently, in preliminary forced thermal testing, a liquid chromatographic

method and a microbiological assay were performed for quantitative determination of this antibiotic in reconstituted sample submitted to thermal degradation [8]. In another work, a chromatographic method for determination of polymerized impurities in meropenem was proposed [9]. The separation of these impurities was carried out by gel filtration chromatography. Some investigators have reported the stability of meropenem under various conditions [10–12]. Patel and Cook [10] studied the stability of meropenem in 0.9% sodium chloride injection. The stability of commonly used meropenem concentrations in both PVC containers and a frequently used elastomeric infusion device was determined in a recent study [11]. In a solid state formulation for injection, meropenem was found to be stable at room temperature [13]. However, the formulation must be prepared under a controlled relative humidity of less than 40%.

Considering the few publications concerning kinetic studies of meropenem, the purpose of this paper was to establish the effect of temperature on the decomposition of this antibiotic in powder for injection and reconstituted sample, to determine the kinetics of degradation describing the concentration changes of meropenem as a function of time, and to determine the kinetics run parameters. The analysis of the degraded samples was

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33165214; fax: +55 51 33165378.
E-mail address: aslmufgrs@yahoo.com.br (A.S.L. Mendez).

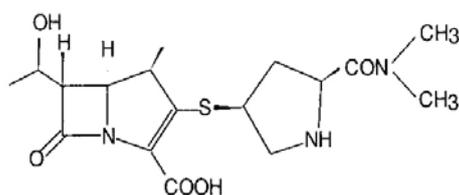


Fig. 1. The chemical structure of meropenem.

performed by stability-indicating HPLC method [6] and microbiological assay [8], developed and validated in our laboratory in compliance with ICH guidelines.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Meropenem reference standard was kindly supplied by Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd. (Osaka, Japan) and AstraZeneca (São Paulo, Brazil). Pharmaceutical dosage form (Meronem[®]) containing meropenem was obtained commercially and was claimed to contain 500 mg (as anhydrous base) of the drug and 104 mg of the anhydrous sodium carbonate as excipient. Acetonitrile for chromatography LiChrosolv[®], potassium dihydrogenphosphate p.a., orthophosphoric acid p.a., Grove Randall number 11 agar and Grove Randall number 1 agar were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride was obtained from Quimibrás (Rio de Janeiro, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q[®] UF-Plus apparatus (Millipore). Ultrapure water was used to prepare all solutions for the HPLC method and distilled water was used to prepare all solutions for the microbiological assay.

2.2. Instrumentation and analytical conditions

2.2.1. Thermal degradation

Stress studies under thermal conditions were performed using a dry air oven De Leo[®] (São Paulo, Brazil). Susceptibility of the drug in powder for injection to dry heat was studied by exposing to 70, 80 and 90 °C. For reconstituted sample, meropenem was dissolved in 0.9% sodium chloride and the solution was heated at 25, 35 and 45 °C.

2.2.2. HPLC method

The HPLC method was performed as described in an earlier publication [6].

2.2.3. Microbiological assay

Microbiological assay, applying the cylinder-plate method, was performed as described in an earlier publication [8].

2.3. Decomposition studies

Accelerated thermal degradation study was performed by heating the commercial sample of meropenem (500 mg) at 70, 80

and 90 °C for 335, 295 and 95 days, respectively. At time intervals, aliquots of degraded samples (three aliquots for each time) were diluted in ultrapure water at concentration of 50 µg/ml and analyzed by HPLC method. All solutions were injected in triplicate.

For reconstituted sample, commercial samples of meropenem (500 mg) were reconstituted in 10 ml of 0.9% sodium chloride and stored at 25, 35 and 45 °C for a period of 36 h. Aliquots were withdrawn at suitable time intervals (three aliquots for each time) and subjected to HPLC analysis at concentration of 50 µg/ml. All solutions were also injected in triplicate.

The decomposition rate of meropenem was also evaluated by microbiological assay. Aliquots of degraded samples (one aliquot for each time) were diluted in distilled water at concentrations of 6.0 and 10 µg/ml which were assayed against solutions of reference standard and sample at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0 µg/ml (linearity range). This assay was carried out only with meropenem stored at 90 and 45 °C. For each aliquot of degraded sample, the assay was performed using five plates.

2.4. Kinetic calculations

The degradation rate kinetics were determined by plotting log of concentration of drug remaining versus time (first-order process). The kinetic parameters such as apparent order degradation rate constant (*k*), half-life (*t*_{1/2}) and *t*₉₀ (i.e. time where 90% of original concentration of the drug is left unchanged) were obtained from the slopes of the straight lines at each temperature. Each experiment was done in triplicate (analysis by HPLC method) and average values were taken for the analysis.

3. Results and discussion

In this study, thermal stability of meropenem was carried out through employment of stress conditions. The thermal degradation profile of meropenem was studied at different temperatures for different time periods. For reconstituted sample, the drug was found to degrade extensively after reconstitution in saline solution. Almost 80% drug degradation was observed on exposure to heating at 45 °C for 36 h. A yellowish color developed thereupon exposure of the meropenem reconstituted sample at heat. Fig. 2 shows the changes observed during degradation of the reconstituted drug in comparison with the initial sample. Three degradation product peaks at around 3.0 and 17.0 min were seen, especially at 220 nm.

On exposure of meropenem to dry heat in solid state (powder for injection), this drug was found to be stable. In this work, the experiments were carried out using commercial samples, in sealed glass vials, protected from humidity. Thus, significant degradation was verified only at higher temperatures and long storage time. The extent of degradation was much lesser than in solution. At 70 °C, only 8% of the drug degraded after exposing for 115 days. It was observed that around 75% of the drug degraded on heating for 95 days at 90 °C but there was no corresponding formation of degradation products. Very small degradation product peaks at around 3.0 min were seen, especially at 220 nm (Fig. 2).

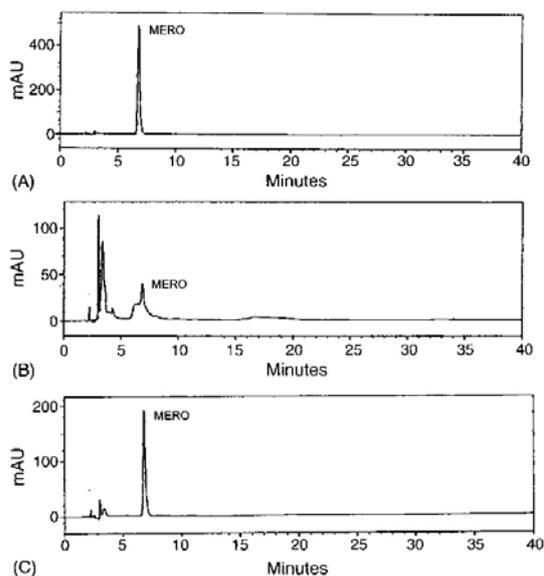


Fig. 2. Chromatograms showing decomposition of meropenem (MERO) in reconstituted sample and powder for injection (detection at 220 nm). Key: (A) meropenem control; (B) meropenem reconstituted sample exposed at 45 °C for 36 h; (C) meropenem powder for injection exposed at 90 °C for 95 days.

The plots of log of concentration of drug remaining versus time obtained in the course of the kinetic studies are shown in Fig. 3. At the selected temperatures the degradation process of meropenem can be described by apparent first-order kinetic. For

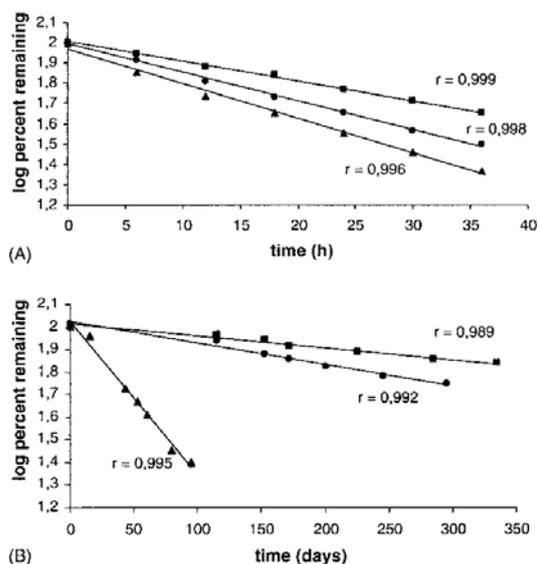


Fig. 3. First-order plots for the degradation of meropenem in reconstituted sample (A) and powder for injection (B) at various temperatures. Key: (■) 25 °C, (●) 35 °C and (▲) 45 °C for reconstituted sample (A); (■) 70 °C, (●) 80 °C and (▲) 90 °C for powder for injection (B).

Table 1

Degradation rate constant (k), half-life ($t_{1/2}$) and t_{90} for meropenem in reconstituted sample and powder for injection submitted to thermal degradation, and determined by HPLC

Temperature (°C)	Reconstituted sample		
	K_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	t_{90} (h)
25	0.022	31.24	4.78
35	0.035	19.64	3.00
45	0.046	15.11	2.31
Temperature (°C)	Powder for injection		
	K_{obs} ($days^{-1}$)	$t_{1/2}$ (days)	t_{90} (days)
70	0.0011	630	96
80	0.0020	340	52
90	0.0137	51	8

reconstituted sample, strict straight-line behaviour (correlation coefficient, $r > 0.99$) was obtained for all the three temperatures. Similar kinetic data was obtained for meropenem powder for injection. The correlation coefficients (r) observed for storage at 70, 80 and 90 °C were 0.989, 0.992 and 0.995, respectively. The kinetic model for first-order degradation process was confirmed. From the slopes of the straight lines it was possible to calculate the apparent first-order degradation rate constant k , $t_{1/2}$ and t_{90} at each temperature (Table 1). For reconstituted sample, the rate constant increased from 0.022 h^{-1} at 25 °C to 0.046 h^{-1} at 45 °C. At 25 °C, the following kinetic parameters were obtained: $t_{1/2}$ 31.24 h and t_{90} 4.78 h.

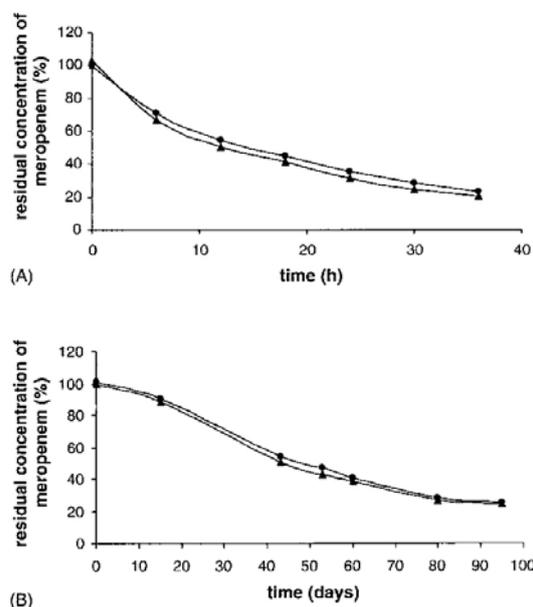


Fig. 4. Comparative degradation profile of meropenem in reconstituted sample (A) and powder for injection (B) at 45 and 90 °C, respectively. Key: (●) analysis by HPLC method; (▲) analysis by microbiological assay.

The content of remaining meropenem was simultaneously determined by microbiological assay. This assay was carried out for reconstituted sample and powder for injection stored at 45 and 90 °C, respectively. Thermal degradation profile was observed by measurements of the zone diameters of the growth inhibition. Fig. 4 shows the similarity of decomposition profiles obtained by the HPLC method and microbiological assay. From these results, it can be concluded that the degradation products are inactive, suggesting cleavage of the beta-lactam ring of meropenem. The kinetic determination by microbiological assay indicated that the decomposition of meropenem proceeds according to a first-order reaction model, confirming the results described from chromatographic analysis.

4. Conclusions

The above results showed reliability of HPLC method and microbiological assay for thermal decomposition kinetic study of meropenem. Degradation of this antibiotic during thermal processing is found to follow first-order reaction kinetics. The kinetic parameters of degradation rate constant, $t_{1/2}$ and t_{90} can be predicted. In this study, extensive thermal decomposition was observed for meropenem in saline solution. Consequently, an appropriate thermal protection is recommended during the storage and handling of this antibiotic after reconstitution.

Acknowledgements

The authors are grateful to Sumitomo Pharmaceuticals (Osaka, Japan) and AstraZeneca (São Paulo, Brazil) for providing the meropenem referend standard. Authors are also thankful to LCQFar, LEPCQ and CNPq program.

References

- [1] M.A. Pfaller, R.N. Jones, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (1997) 157–163.
- [2] J.L. Blumer, *Int. J. Antimicrob. Agents* 8 (1997) 73–92.
- [3] L.R. Wiseman, A.J. Wagstaff, R.N. Brogden, H.M. Bryson, *Drugs* 50 (1995) 73–101.
- [4] J.S. Bradley, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16 (1997) 263–268.
- [5] Y. Özkan, I. Küçükgül, S.A. Özkan, H.Y. Aboul-Eneim, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 263–266.
- [6] A.S.L. Mendez, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 947–954.
- [7] The United States Pharmacopoeia, 28 ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2005, pp. 1218–1219.
- [8] A.S.L. Mendez, V. Weisheimer, T. Oppe, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 649–653.
- [9] S.-Y. Cai, C.-Q. Hu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 585–589.
- [10] P.R. Patel, S.E. Cook, *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 54 (1997) 412–421.
- [11] D.L. Smith, S.M. Bauer, D.P. Nicolau, *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 61 (2004) 1682–1685.
- [12] S. Jaruratanasirikul, S. Sriwiriyan, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34 (2003) 627–629.
- [13] Y. Takeuchi, Y. Takebayashi, M. Sunagawa, Y. Isobe, Y. Hamazume, A. Uemura, T. Noguchi, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 1998–2002.

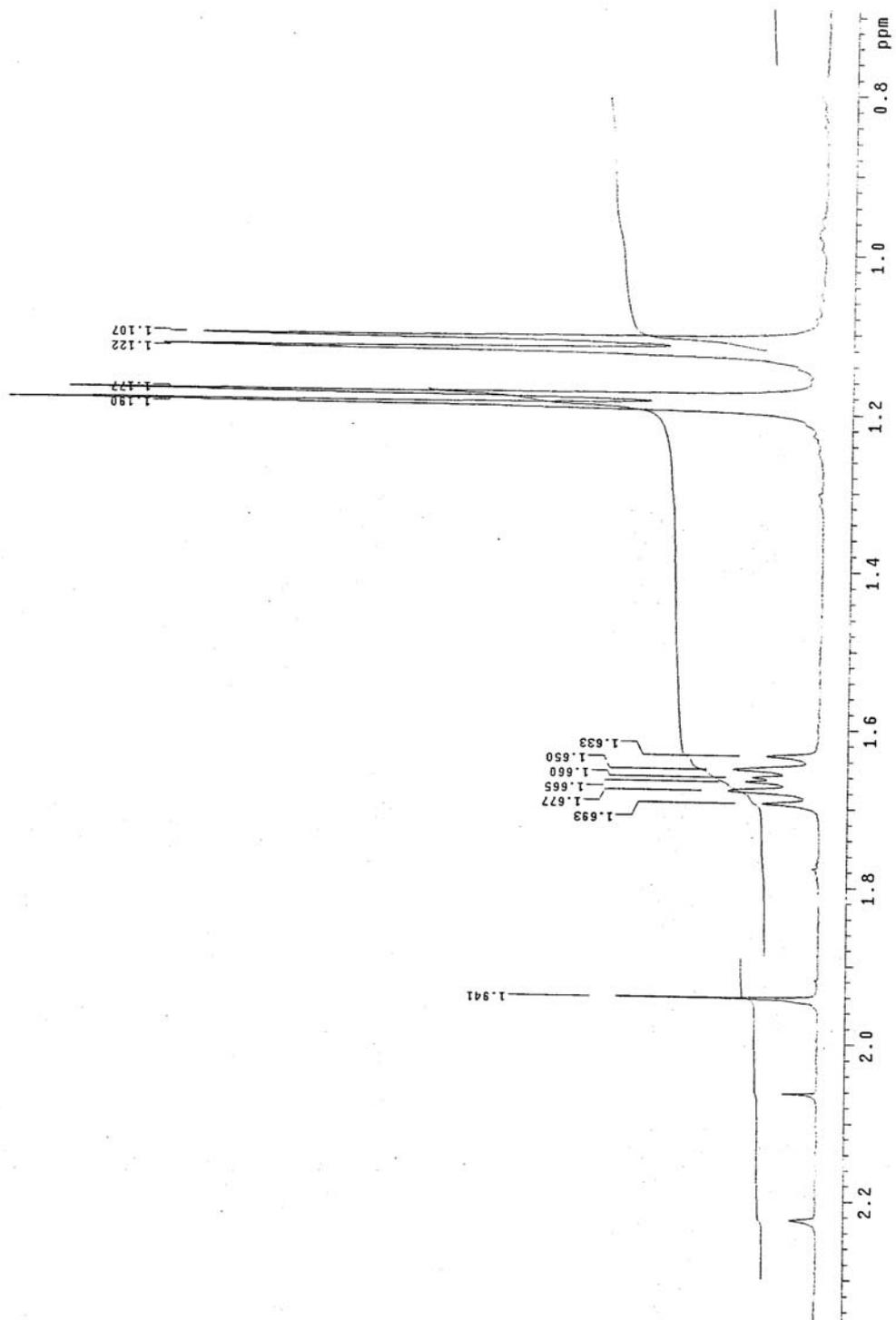


Figura A2-1 - Espectro ampliado de RMN ^1H do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

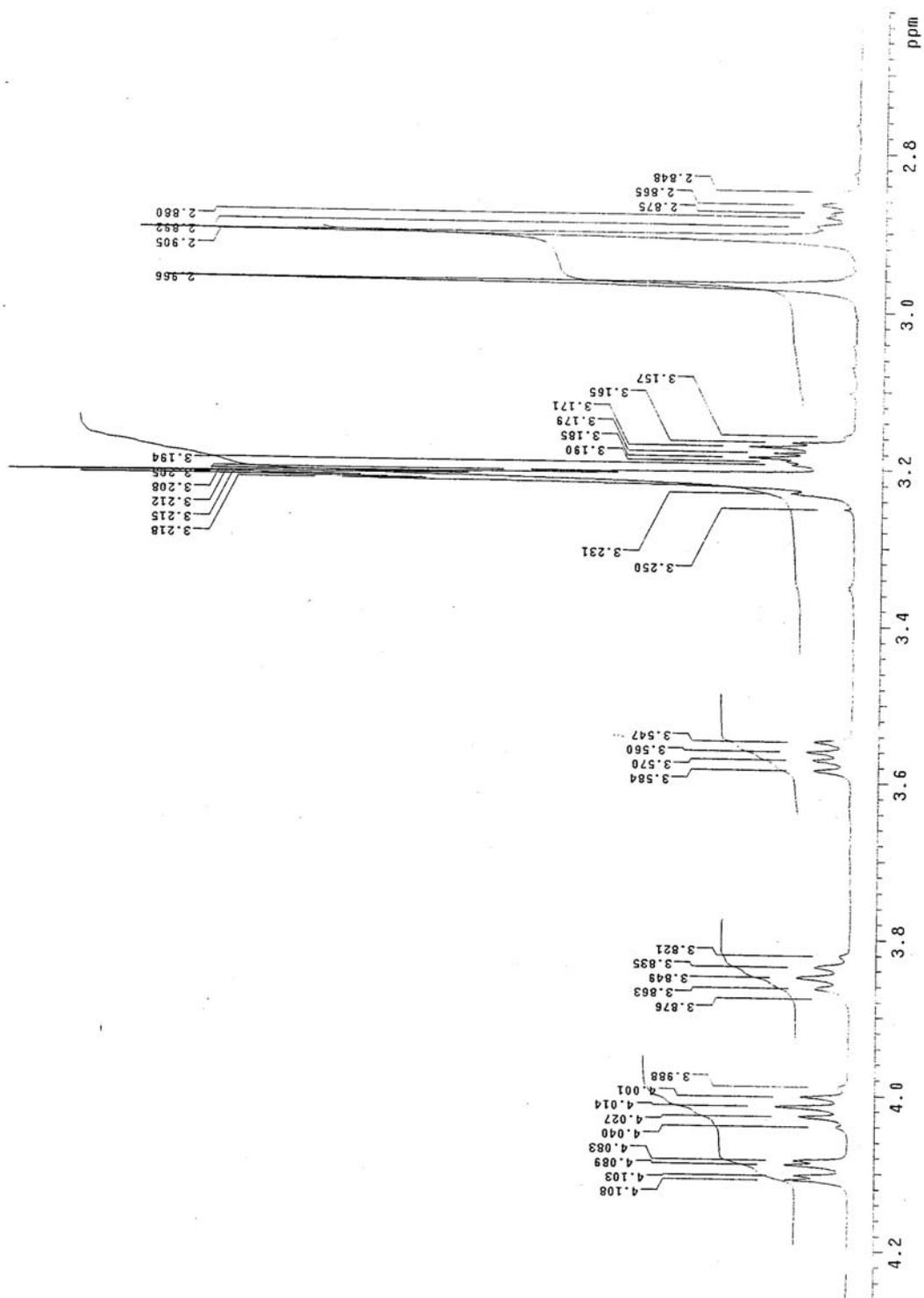


Figura A2-2 - Espectro ampliado de RMN ^1H do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

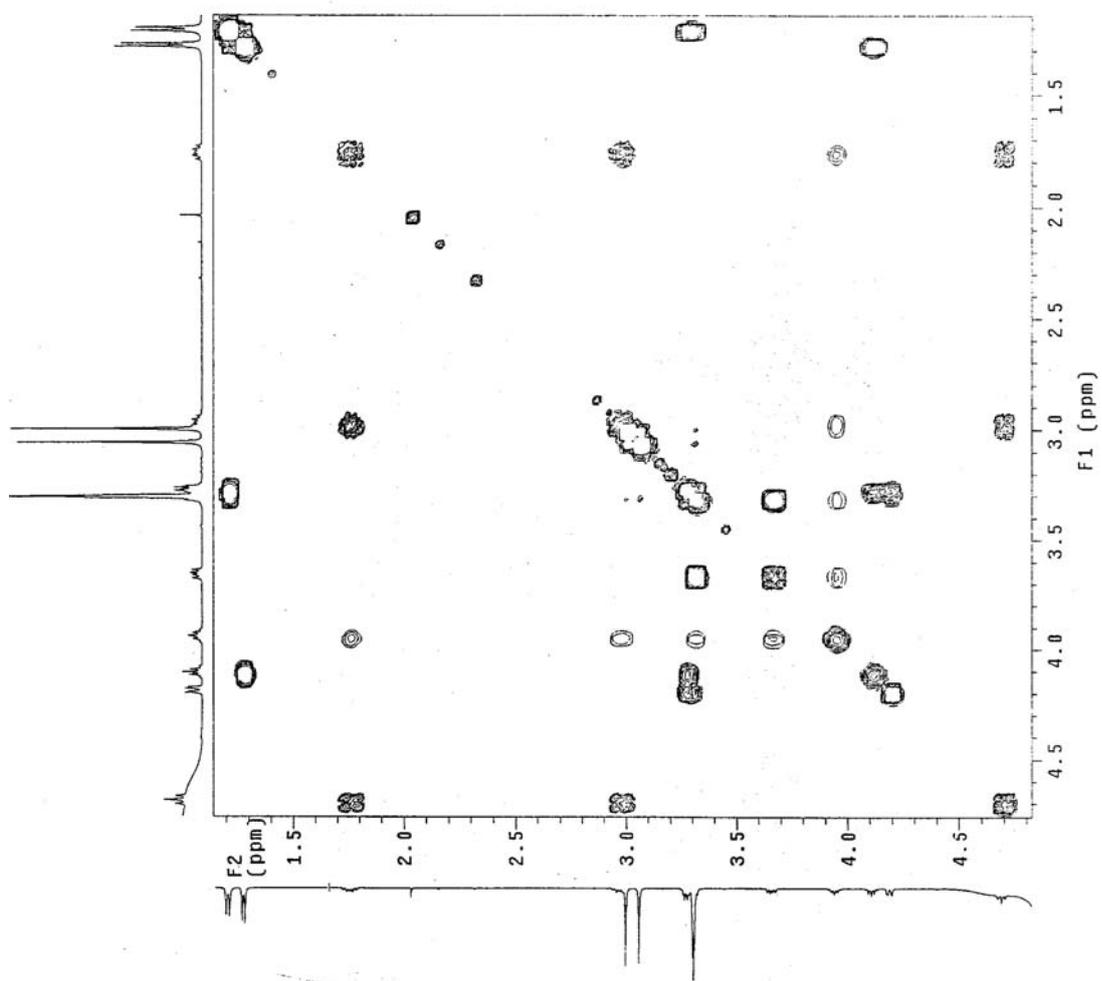
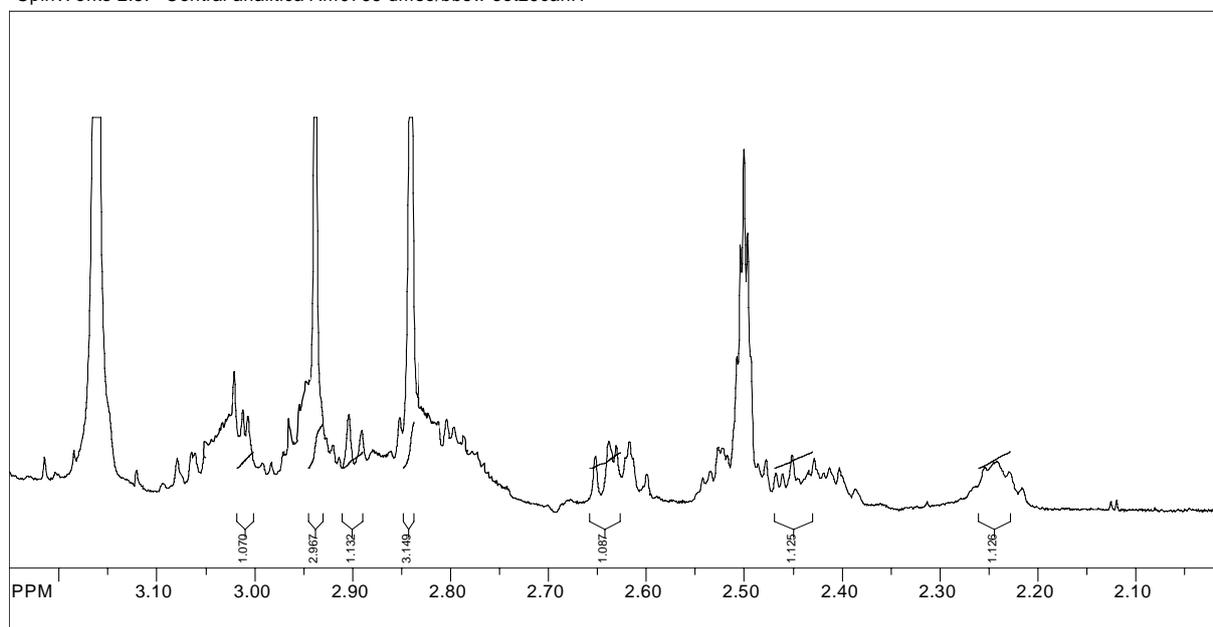


Figura A2-3 - Espectro ampliado de correlação COSY do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central analitica Am0765 dms0/bbsw set29canH



transmitter freq.: 499.887538 MHz
time domain size: 65536 points
width: 10000.00 Hz = 20.004500 ppm = 0.152588 Hz/pt
number of scans: 36

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura A3-1 - Espectro ampliado de RMN ^1H do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Am0765 DMSO/tri_res out10cangCOSY

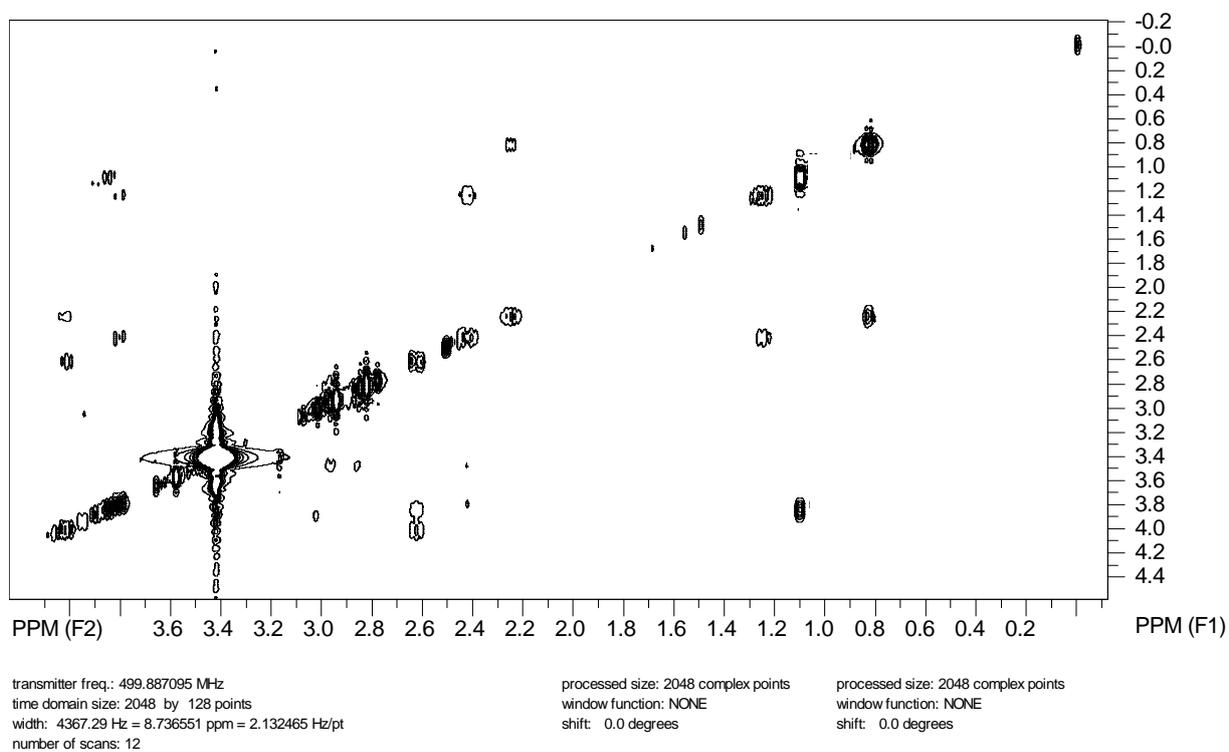


Figura A3-2 - Espectro ampliado de correlação COSY do meropenem SQR obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

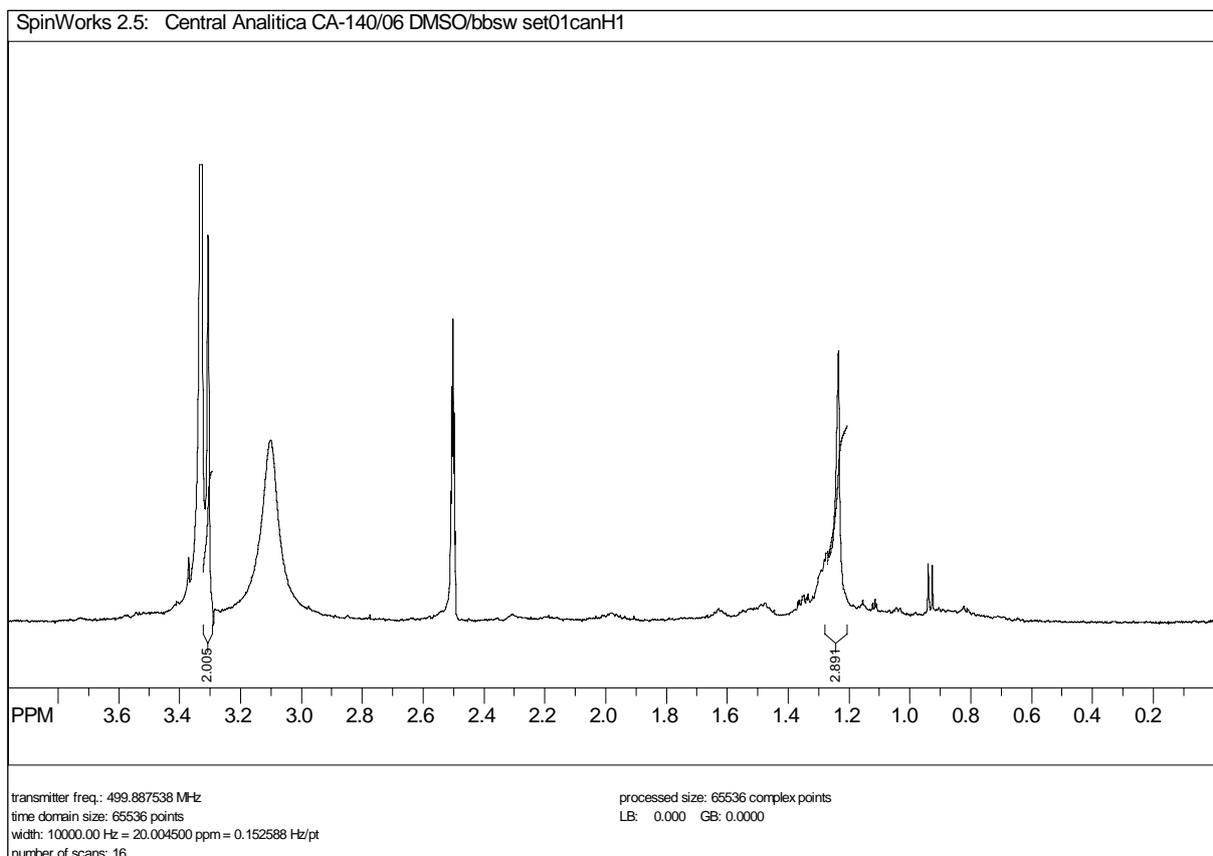
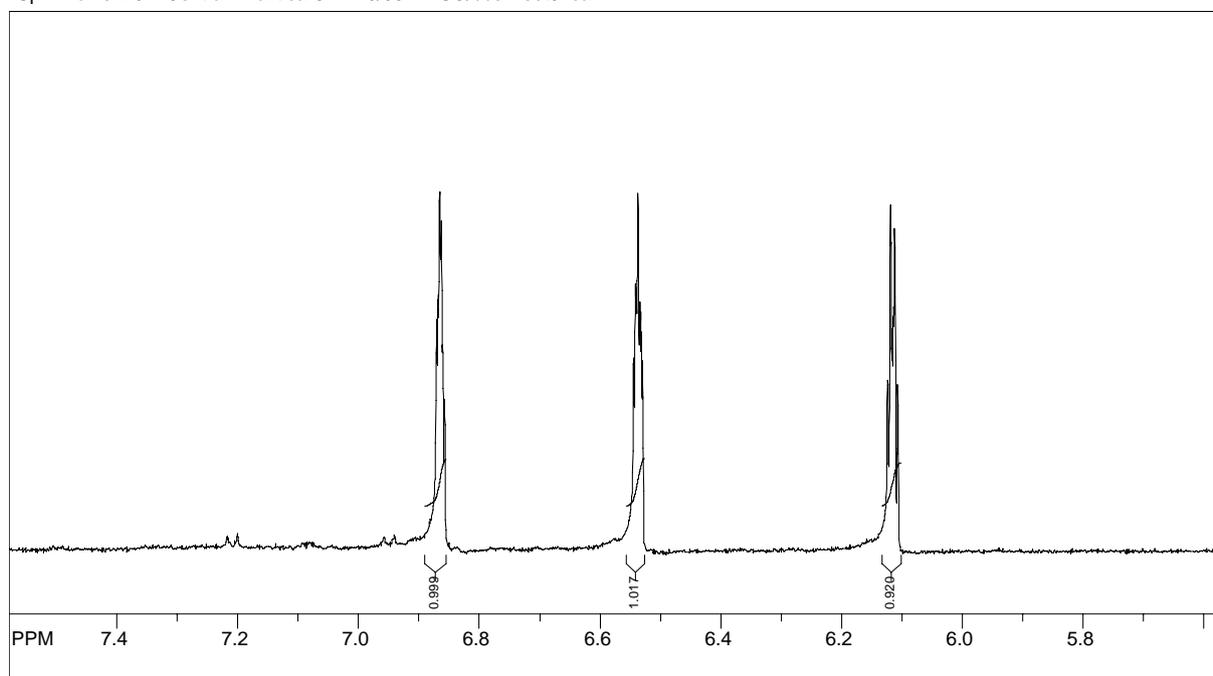


Figura A4-1 - Espectro ampliado de RMN ^1H do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica CA-140/06 DMSO/bbsw set01canH1



transmitter freq.: 499.887538 MHz
time domain size: 65536 points
width: 10000.00 Hz = 20.004500 ppm = 0.152588 Hz/pt
number of scans: 16

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura A4-2 - Espectro ampliado de RMN ^1H do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica CA-140/06 DMSO/tri_res set01cangCOSY

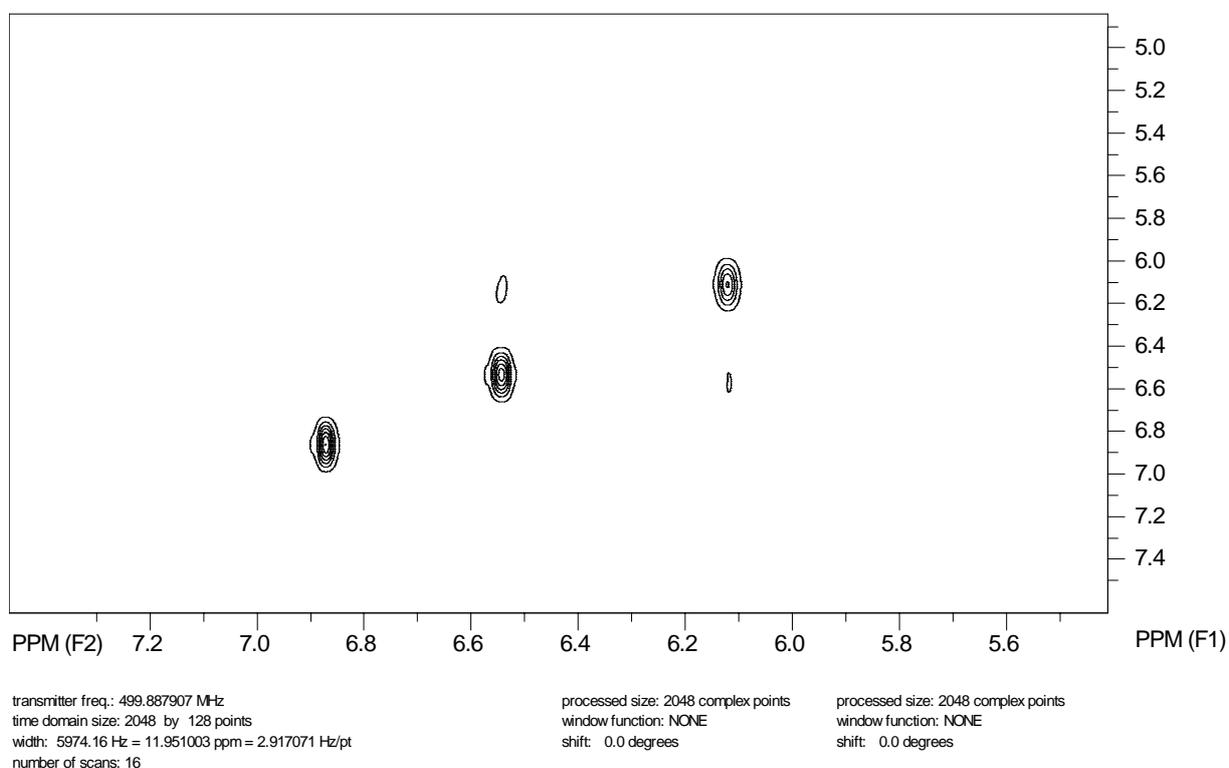
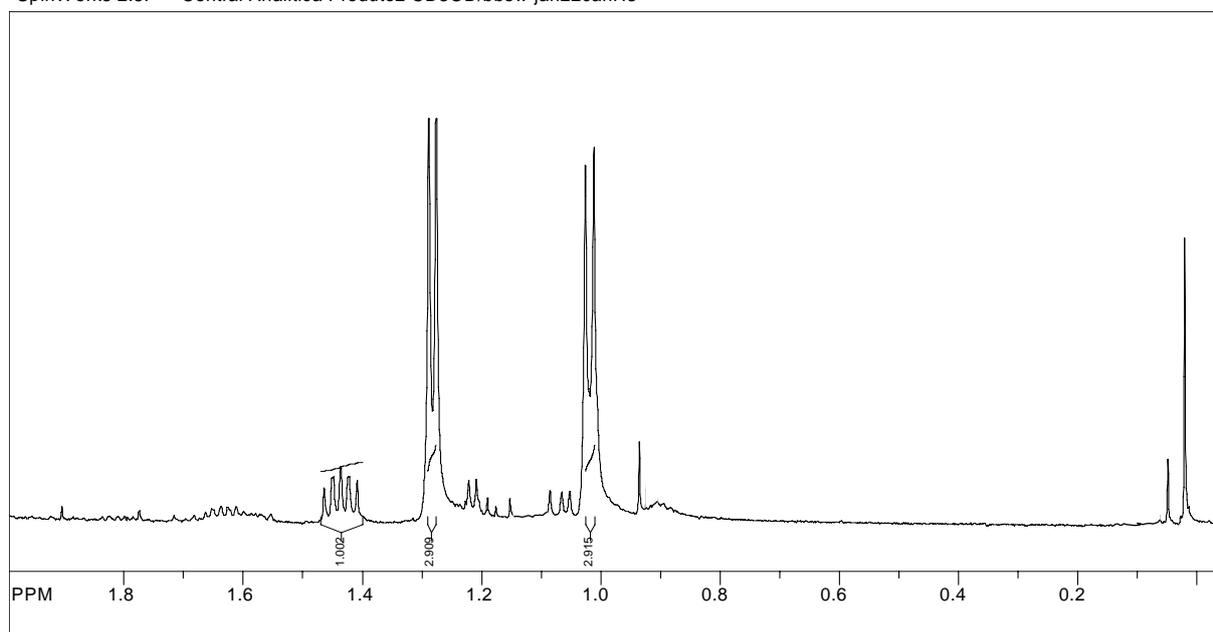


Figura A4-3 - Espectro ampliado de correlação COSY do produto de degradação PD1 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando DMSO deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22canH3

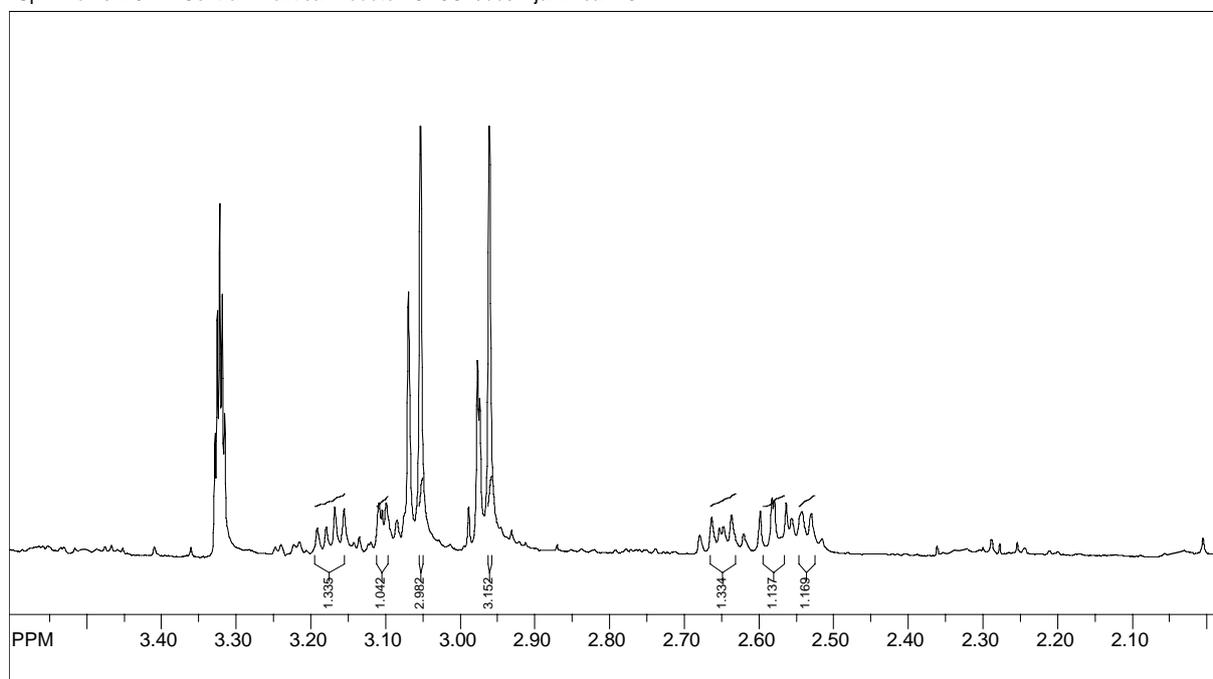


transmitter freq.: 499.887133 MHz
time domain size: 65536 points
width: 10000.00 Hz = 20.004516 ppm = 0.152588 Hz/pt
number of scans: 16

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura A5-1 - Espectro ampliado de RMN ^1H do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22canH3

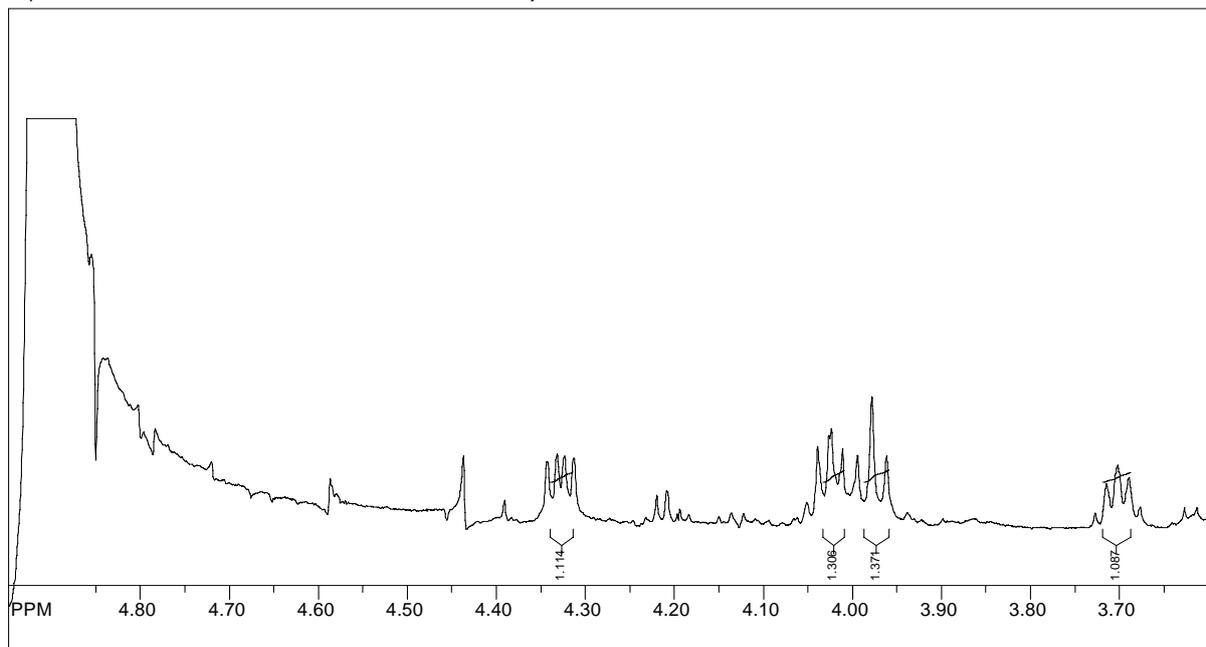


transmitter freq.: 499.887133 MHz
time domain size: 65536 points
width: 10000.00 Hz = 20.004516 ppm = 0.152588 Hz/pt
number of scans: 16

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura A5-2 - Espectro ampliado de RMN ¹H do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22canH3



transmitter freq.: 499.887133 MHz
time domain size: 65536 points
width: 10000.00 Hz = 20.004516 ppm = 0.152588 Hz/pt
number of scans: 16

processed size: 65536 complex points
LB: 0.000 GB: 0.0000

Figura A5-3 - Espectro ampliado de RMN ^1H do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22cangCOSY3

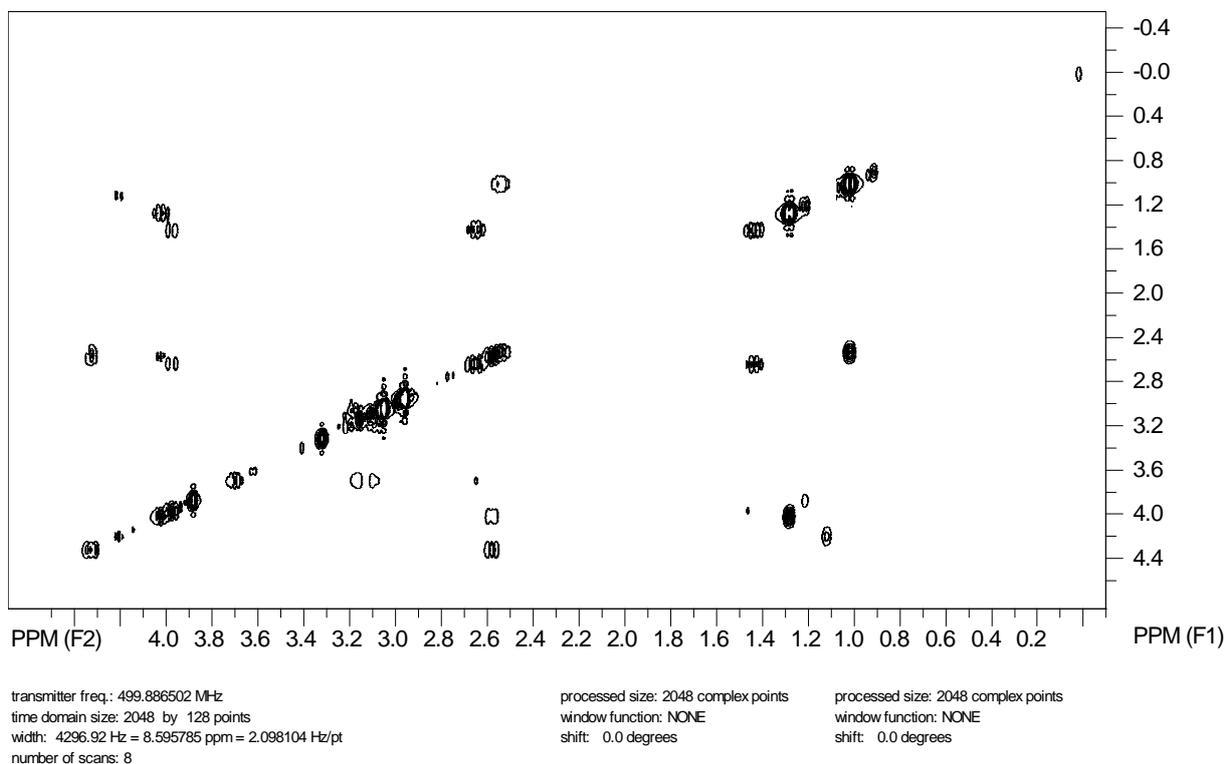


Figura A5-4 - Espectro ampliado de correlação COSY do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

SpinWorks 2.5: Central Analitica Produto2 CD3OD/bbsw jan22cangHSQC3

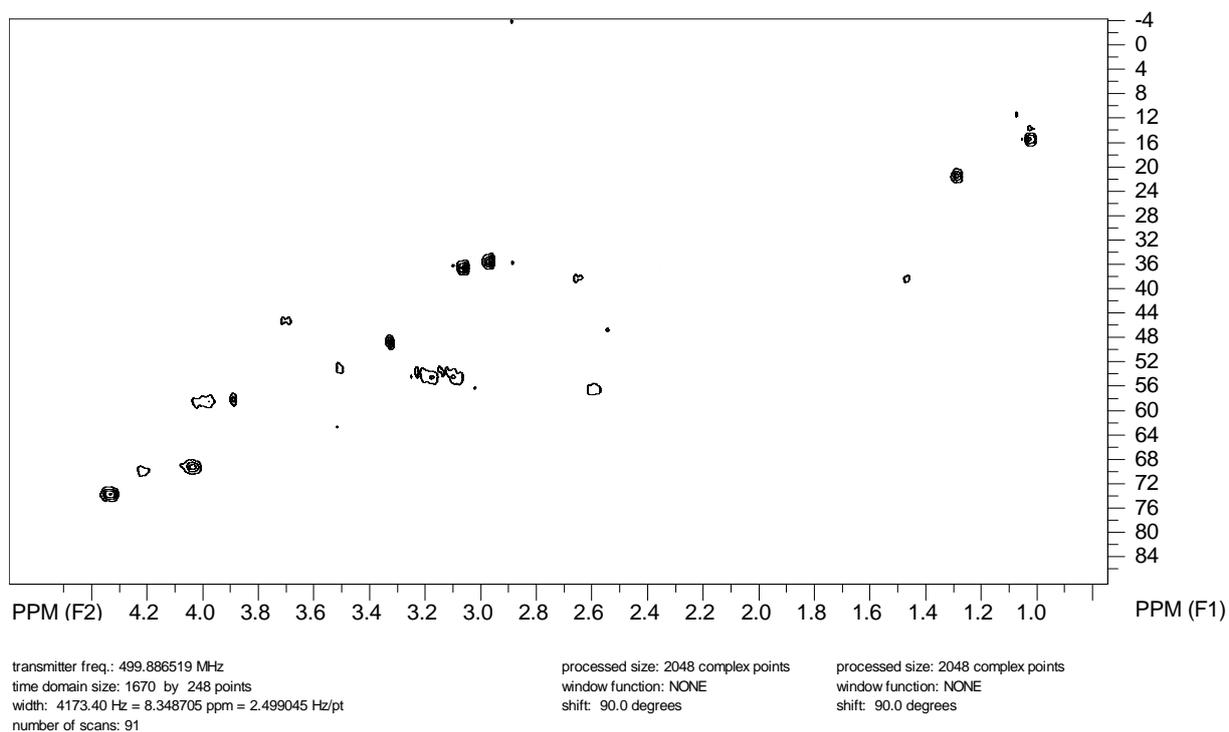


Figura A-6-1 - Espectro ampliado HSQC do produto de degradação PD3 obtido em espectrômetro INOVA (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

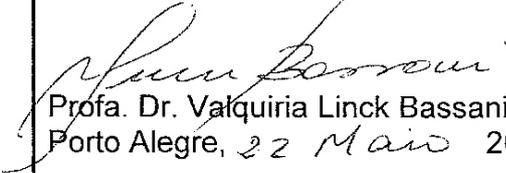
Título: Estudo de Estabilidade do Antibiótico Meropenem

Doutorando: ANDREAS SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ

PARECER

O trabalho apresenta mérito científico, sendo de significativo relevância para o avanço do conhecimento sobre antimicrobianos carbapenêmicos, em especial para a compreensão de sua estabilidade e produtos de degradação.

Em suma, o trabalho responde amplamente aos quesitos de qualidade e de mérito científico de uma tese de doutorado. Sou de parecer favorável à concessão do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas a Andreas Sebastian Loureiro Mendez.


Prof. Dr. Valquíria Linck Bassani
Porto Alegre, 22 Maio 2007.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Estudo de Estabilidade do Antibiótico Meropenem

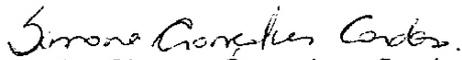
Doutorando: ANDREAS SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ

P A R E C E R

A tese apresentada pelo doutorando abordou o estudo de estabilidade do antibiótico meropenem, tema de grande relevância para fármacos da classe dos antibióticos carbapenêmicos.

O trabalho, com ampla revisão da literatura, foi bem delineado e executado, permitindo que os objetivos fossem atingidos, havendo coerência entre estes, os resultados e as conclusões. Os resultados obtidos foram adequadamente apresentados, analisados e discutidos, com base em literatura atualizada, evidenciando habilidade por parte do aluno. Destaca-se o isolamento e identificação de dois produtos de degradação, e a realização dos estudos de citotoxicidade. A qualidade do trabalho pode também ser atestada pela publicação, de parte dos resultados, em periódico Qualis Internacional.

Com base no exposto, o parecer é favorável à aprovação da tese e a concessão do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas a Andréas Sebastian Loureiro Mendez.


Profª. Dr. Simone Gonçalves Cardoso
Porto Alegre, 22 de maio de 2007.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Estudo de Estabilidade do Antibiótico Meroponem

Doutorando: ANDREAS SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ

P A R E C E R

A tese apresentada pelo doutorando representa uma importante contribuição no estudo de estabilidade de formas farmacêuticas contendo derivados carbapenêmicos.

Os referenciais teóricos apresentados são atuais, de relevância científica e são empregados adequadamente na revisão bibliográfica e discussão dos resultados no decorrer do trabalho. O planejamento experimental é adequado e coerente quanto aos objetivos propostos.

Cabe destacar que é possível verificar capacidade desenvolvida para avaliação da literatura, proposição e execução de atividades de pesquisa. É importante ressaltar o domínio de metodologias relacionadas ao planejamento e execução de estudo de estabilidade e determinação de cinética de degradação, bem como de técnicas de extração, isolamento e identificação de produtos de degradação e, adequada seleção e aplicação de técnicas analíticas.

Os resultados obtidos são consistentes com os objetivos propostos e as conclusões apresentadas.

Considerando todos estes aspectos, sou de parecer favorável à aprovação do trabalho de doutorado e a concessão do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas ao doutorando.


Prof. Dr. Kellen Cristhina Borges de Souza
Porto Alegre, 22 de maio de 2007.

BIOGRAFIA

1. PÓS-GRADUAÇÃO

Nível: Doutorado

Local: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: Março de 2004 a Maio de 2007

Nível: Mestrado

Local: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: Março de 2001 a Março de 2003

2. GRADUAÇÃO

Curso: Farmácia

Ênfase - Farmácia Industrial

Local: Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: Graduação regular - 1996 a 2000

Ênfase - 2001 a 2003

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.1 Trabalhos resumidos em eventos

- "Cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da estabilidade do antibiótico meropenem em meio ácido e em meio básico".
II SIMCRO, 2006
- "Cromatografia líquida de alta eficiência para separação dos produtos de degradação do antibiótico meropenem".
X COLACRO, 2004
- "HPLC method for the determination of meropenem in powder for injection: A stability-indicating assay"
VII PHARMATECH - IV ENECQ, 2003

3.2 Artigos publicados ou submetidos em periódicos

- Study of thermal and alkaline degradation of meropenem: structure elucidation of degradation products and cytotoxicity *in vitro* assay.
MENDEZ, A. S. L.; CHAGASTELLES, P.; NARDI, N. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.
Artigo submetido ao periódico **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** em 18/05/2007.
- Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample.
MENDEZ, A. S. L.; DALOMO, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Amsterdam, v. 41, p. 1363-1366, 2006.
- Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form.
MENDEZ, A. S. L.; WEISHEIMER, V.; OPPE, T. P.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Amsterdam, v. 37, p. 649-653, 2005.
- Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form.
MENDEZ, A. S. L.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 33, p. 947-954, 2003.