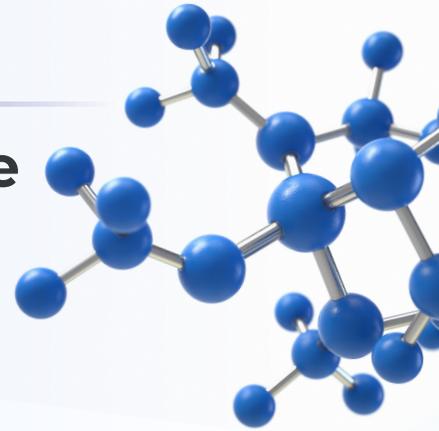




NOTA DE APLICAÇÃO

Predição *in silico* dos Produtos de Degradação da cefalexina com o *software* Degradation Plot



Alany I. Ribeiro^a; Dayvson J. Palmeira^a; Irwin A. P. Linares^a; Carlos E. Matos dos Santos^a; Rodrigo S. Martins^b; Eder Lorenzato Jr.^b; Angelica Abido^c; Gustavo P. da Silva^c; Lillian F. S. Nascimento^c; Diogo dos Santos Alves^d; Jefferson Luiz Fonseca da Silva^e; Marcelo Luís Wilde^f; Jardel A. Moreira^g e Diana L. L. B. Costa^g

^aAlttox LTDA; ^bAlthaia S. A. Indústria Farmacêutica; ^cApsen Farmacêutica; ^dBrainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A; ^eEPHAR - Instituto de Excelência Farmacêutica; ^fEurofarma Laboratórios e ^gHypera Pharma

Como reduzir tempo e custo, obtendo interpretabilidade nos estudos de degradação, através da Avaliação Teórica Prévia e a Análise Crítica do perfil de degradação exigidas no contexto das revisões da RDC 53/2015 e do Guia 04/2015.

Resumo

Esta nota de aplicação descreve uma avaliação *in silico* abrangente dos produtos de degradação da cefalexina, utilizando o **Módulo A - Produtos de degradação** do *software* **Degradation Plot**. A partir dessa ferramenta computacional foi possível identificar os grupos funcionais da cefalexina que são suscetíveis à degradação, assim como a prever as principais vias de degradação e os

produtos de degradação potenciais a serem formados em condições de estresse. Ademais, a avaliação *in silico* pode fornecer informações relevantes para definir e justificar os parâmetros de degradação (*endpoints*), que poderiam ser usados no delineamento experimental do Estudo de Degradação Forçada, em conformidade com a RDC 53/2015, Guia 04/2015 e suas vindouras atualizações.



Panorama da Avaliação Teórica nos Estudos de Degradação

O estudo de degradação é uma peça fundamental nas documentações do medicamento e do IFA, e faz parte dos requisitos para garantir a segurança e eficácia do produto.

De acordo com a RDC 53/2015¹ e com o Guia 04/2015², entende-se o estudo do perfil de degradação potencial como uma avaliação crítica, que pode ou não conter a parte experimental (Estudo de Degradação Forçada), e é indispensável para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (MIE).

Além disso, uma das principais mudanças previstas nas revisões da RDC 53/2015 e do Guia 04/2015, será a obrigatoriedade de realizar a **Avaliação Teórica Prévia** dos produtos de degradação (PDs), antes de iniciar os estudos experimentais.

É na Avaliação Teórica Prévia que deverão ser reunidas informações sobre as prováveis rotas de degradação do IFA, por meio de pesquisas bibliográficas, conhecimentos aprofundados de química orgânica e análises preditivas realizadas em *softwares* (análises *in silico*).

A etapa de Avaliação Teórica Prévia tem o intuito de reunir o conhecimento necessário sobre o IFA ou medicamento, para embasar justificativas técnicas, assim como direcionar o delineamento experimental do Estudo de Degradação Forçada, quando aplicável.



DegradationPlotTM
Prediction of degradation products and pathways

Nesse sentido, Degradation Plot - o **primeiro software** brasileiro de predição de produtos e vias de degradação - desenvolvido em uma **colaboração entre a Alttox e a Eurofarma**, pode ser um poderoso aliado e fornecer soluções na hora de conduzir a Avaliação Teórica Prévia e no planejamento e interpretação do delineamento experimental.





Degradation Plot se destaca por possuir três módulos integrados:

- ✓ **Módulo A** - Produtos de degradação;
- ✓ **Módulo B** - Incompatibilidade IFA-excipientes;
- ✓ **Módulo C** - Predição dos tempos de retenção.

Com o auxílio dos três módulos é possível:

- ✓ Identificar grupos funcionais do fármaco mais suscetíveis à degradação;
- ✓ Prever os PDs teóricos, considerando as reações mais comuns para os grupos funcionais presentes na molécula;
- ✓ Identificar quais dos PDs previstos já estão descritos na literatura (quando aplicável);
- ✓ Acessar referências bibliográficas para os PDs descritos na literatura, por meio do banco de dados *Pubchem* (quando aplicável);
- ✓ Identificar vias de degradação mais prováveis para o IFA;

- ✓ Identificar os excipientes que devem ser evitados por potencial de interação com o fármaco;
- ✓ Predizer os produtos da interação do fármaco com impurezas potenciais presentes nos excipientes;
- ✓ Predizer o tempo de retenção para os PDs de interesse;

As informações obtidas a partir de Degradation Plot servem, portanto, como ponto de partida para a elaboração do relatório de predição das degradações do IFA isolado e do IFA no medicamento.

O conhecimento, antes da etapa analítica, das condições de degradação as quais o produto é mais suscetível e quais as impurezas poderão ser formadas após a degradação forçada, auxilia os analistas/pesquisadores no **planejamento dos experimentos** com uma visão futura. Em consequência, o trabalho na bancada torna-se mais ágil e assertivo, uma vez que **para cada condição testada** já se tem a **“expectativa” do que será ou não formado** como produto de degradação.

Isso é evidenciado em dois momentos:



- i. Quando o resultado experimental concorda com o estudo de predição, deixando o estudo bem simples de se justificar, inclusive no caso de condições nas quais a molécula é estável e;
- ii. Quando o resultado experimental diverge do resultado predito, pois permite ao analista questionar se o planejamento experimental foi realizado de forma adequada ou se alguma informação importante foi negligenciada.

Nesta nota de aplicação, o foco foi explorar os benefícios da análise *in silico* pelo Módulo A - Produtos de degradação do software Degradation Plot, que conta com uma vasta biblioteca de mecanismos reacionais descritos na literatura, enriquecida pelo conhecimento de profissionais renomados, como Steven Baertschi, um dos maiores especialistas do mundo na temática de produtos de degradação.

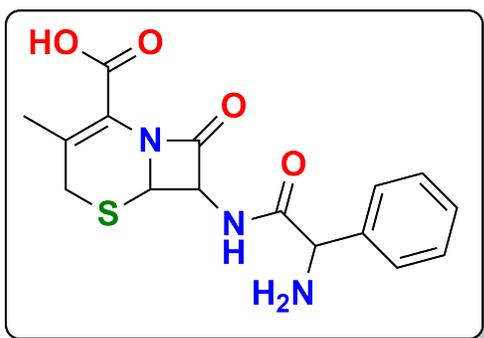


Figura 1. Estrutura molecular do IFA cefalexina.

A seguir é apresentado um estudo de caso sobre a degradação teórica do fármaco cefalexina.

Estudo de caso: Degradação da cefalexina

Desafios na Predição de Degradação da cefalexina

A cefalexina é um antibiótico pertencente à classe das cefalosporinas, usada no tratamento de diversas infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, entre outras. De maneira geral, a atividade farmacológica destes compostos está relacionada, sobretudo, à natureza dos grupos funcionais ao redor do anel beta-lactâmico presente nesse tipo de molécula³. A estrutura molecular da cefalexina é apresentada na Figura 1.

Por ser altamente funcionalizada, é possível inferir que a cefalexina seja facilmente passível de degradação em diferentes condições de estresse, e que levará à formação de vários PDs.

A predição de degradação da cefalexina demandaria uma pesquisa minuciosa na literatura sobre os grupos funcionais presentes na



molécula e os possíveis mecanismos reacionais que envolvem a degradação desse ativo.

Considerando que a RDC 53/2015 e o Guia 04/2015 mencionam as vias de degradação, mas não fornecem detalhes sobre a padronização dessas condições (ex: reagente, concentração, tempo e temperatura de exposição), justificado pelo perfil único de cada fármaco, realizar o delineamento experimental da cefalexina a partir de uma revisão da literatura pode se tornar um processo extremamente trabalhoso e demorado.

Otimizando a Avaliação Teórica dos Produtos de Degradação

Para realizar a predição de degradação utilizando Degradation Plot, basta inserir a estrutura do IFA, neste caso da cefalexina, e escolher os filtros de probabilidade das reações e os tipos de reações desejadas (Figura 2).

Com uma interface intuitiva, em questão de

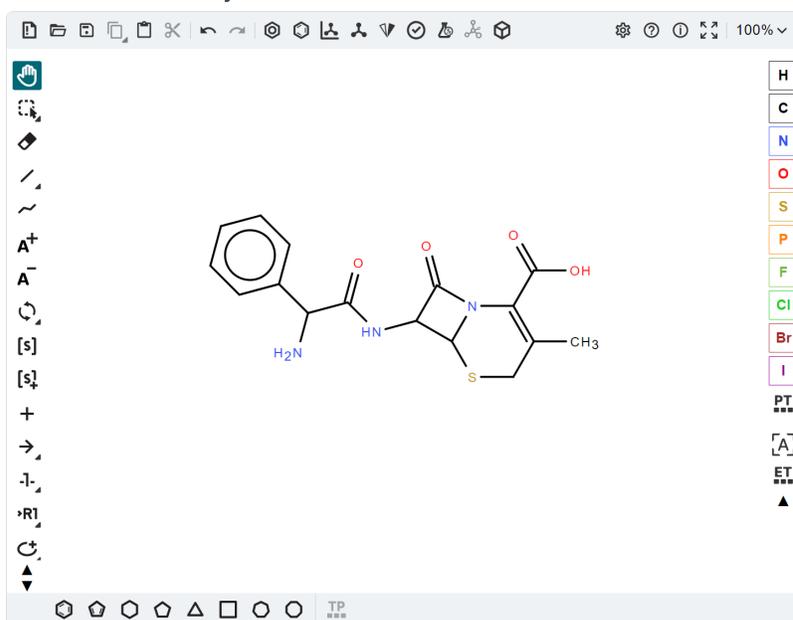
minutos Degradation Plot é capaz de gerar um relatório completo, reunindo todas as informações necessárias para auxiliar nos estudos de forma mais eficiente, eliminando a necessidade de realizar uma busca exaustiva na literatura.

Conforme apresentado na Figura 3, Degradation Plot identifica (realçados em verde) todos os fragmentos do IFA



DegradationPlot

Insert the structure of your molecule



Molecule name *

Cefalexina

CAS number

15686-71-2

Minimum reaction likelihood: * ?

Any likelihood

Reactions types: ?

Any reaction

Generate incompatibility study

* - mandatory fields

SEND

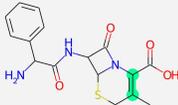
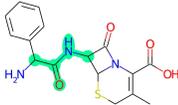
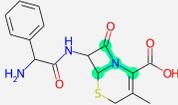
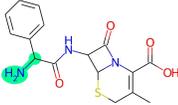
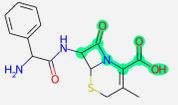
CLEAR

Figura 2. Tela inicial do software Degradation Plot.



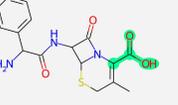
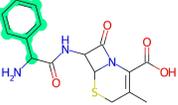
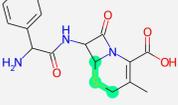
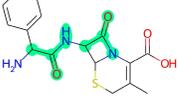
Model 1 - Map of fragments susceptible to degradation

The result below refers to the groups susceptible to degradation reaction found in our knowledge-based, including the name and brief information about each labile group.

Molecule	Susceptible Fragments	Conditions and degradation pathways
	alkene	Alkenes are susceptible to polymerization. Beside that they also are susceptible to oxidative reactions in presence of molecular oxygen.
	secondary amide	Amides are subject to acid catalyzed hydrolysis
	tertiary amide	Amides are subject to acid or base-catalyzed hydrolysis.
	primary amine	Aliphatic amines are subject to simple acid and base-catalyzed hydrolysis to the resulting hydroxyl compound or elimination to form a double bond. When amines are unprotonated, they are nucleophilic, more easily oxidized. Primary and secondary amines are nucleophilic and will react readily with electrophiles such as aldehydes.
	carboxylic acid (decarboxylation)	Carboxylic acid under acidic or basic catalysis can go under decarboxylation.

AlttoxLab • Av. Dr. Vital Brasil - n. 305 • 803 • PC 05503-001 • Butantã • São Paulo - BR - Phone: +55 (11) 3777 4820 | alttox.com.br

3

Molecule	Susceptible Fragments	Conditions and degradation pathways
	enamine	Enamines can go under hydrolysis to produce the corresponding ketone. Enamines are susceptible to reactivity with singlet oxygen (formed through the photosensitization of molecular oxygen).
	carboxylic acid	The carboxylic acid is susceptible to esterification reactions when an alcohol is present, and in the presence of peroxides to form peracids.
	benzyl	Benzyl groups are stable to most conditions but are susceptible to autoxidation and oxidation by molecular oxygen.
	thioether	Thioethers can be hydrolyzed via acid-catalysis to the corresponding thiol, but are reasonably stable to neutral and basic conditions. Thioethers are susceptible to oxidation (both peroxide and radical mediated) to sulfoxides and sulfones.
	Carbonyl compounds	Variations of this functional group can be oxidized following Baeyer-Villiger reactions for ester formation or ring growth by lactone formation.

AlttoxLab • Av. Dr. Vital Brasil - n. 305 • 803 • PC 05503-001 • Butantã • São Paulo - BR - Phone: +55 (11) 3777 4820 | alttox.com.br

4

Figura 3. Mapa dos fragmentos mais suscetíveis à degradação, gerado por Degradation Plot.

que são suscetíveis à degradação, apresentando um resumo das condições de estresse e vias de degradação mais reativas para cada grupo funcional.

A partir das informações fornecidas por Degradation Plot, constata-se que a cefalexina de fato apresenta vários

grupos suscetíveis à degradação, que estão sujeitos a reações de descarboxilação oxidativa, hidrólises ácida/básica, auto-oxidação, entre outras.

Ainda, para o melhor entendimento de cada reação, o relatório conta com um descritivo reacional detalhado



(Figura 4), pelo qual o módulo oferece resumos da literatura, com as respectivas referências, sobre a suscetibilidade dos grupos funcionais presentes na molécula, nas condições de estresse indicadas.

Do Teórico ao Experimental: Informações para auxiliar na escolha dos Parâmetros de Degradação (Endpoints)

Todas as informações teóricas geradas por Degradation Plot são reunidas em dados estatísticos para facilitar a visualização e compreensão de quais vias de degradação estão associadas a condições de estresse mais brandas ou

mais severas. Conforme demonstrado no gráfico da Figura 5, extraído do report gerado por Degradation Plot, existe uma prevalência de PDs preditos de segunda ordem (*Degradation Step 2*, 230 estruturas) quando comparada à quantidade predita de PDs de primeira ordem (*Degradation Step 1*, 16 estruturas).

Na análise de suscetibilidade de degradação dos grupos funcionais, destacam-se dois grupos da cefalexina, a amina primária e o tioéter (Figura 6), cada um deles envolvido em mais de 30 reações de degradação, cujos PDs são majoritariamente de segunda ordem.

Details about fragments susceptible to degradation

Secondary amide and Tertiary amide

Amides are subject to acid or base-catalyzed hydrolysis to form a carboxylic acid and an amine. Amides are more stable than their corresponding esters since -NHR is a poorer leaving group than -OR for esters. Therefore, water alone is not sufficient to hydrolyze most amides at a significant rate.^{1,17}

Primary amine

Amines are a very common functional group in pharmaceuticals and are prone to a variety of degradation reactions. Amines can be primary, secondary, or tertiary, aryl or alkyl. Aliphatic amines are subject to simple acid and base-catalyzed hydrolysis to the resulting hydroxyl compound or elimination to form a double bond. In either case, ammonia is eliminated from the API. When amines are unprotonated (i.e., in the neutral "free base" form), they are nucleophilic, more easily oxidized, and more volatile. Primary and secondary amines are nucleophilic and will react readily with electrophiles such as aldehydes (as present in excipients such as glucose, lactose, etc.) to undergo the first steps of the Maillard reaction. Amines may also react with trace levels of formaldehyde (or other aldehydes adventitiously present) to form hemiaminals with the potential for dehydration to imines and/or cross-linking with other amines or nucleophiles.^{18,32}

Thioether

Thioethers are susceptible to oxidation (both peroxide and radical mediated) to sulfoxides and sulfones. Sulfoxides are chiral, and the formation of a sulfoxide from a thioether introduces a new chiral center into the molecule. Thioether hydrolyzed via acid-catalysis to the corresponding alcohol or thiol.^{39,39}

Carbonyl compounds

Carbonyls and derivatives can undergo a Baeyer-Villiger oxidation reaction to form an ester starting from a ketone or a lactone from a cyclic ketone, using peroxyacids or peroxides as the oxidizing agent. Carbonyls next to carboxylic acids (in beta position) can undergo intramolecular reactions of decarboxylation of the acid group. The Oxygen (O-H) of the carboxylic acid group can attack the hydrogen of the beta carbon leading to the formation of a double bond and obtaining the α,β -unsaturated system. In the specific case of the pyrazolidine dione, the alpha hydrogen between the two carbonyls is acidic enough to be abstracted by oxidation, leading to the formation of the respective hydroxide, which can come into equilibrium with the ring opening reaction leading to the formation of aldehyde and ketone.⁴⁰⁻⁴⁴

Alkene

Olefins are compounds that contain one or more double bonds and can undergo a number of reactions that can be observed when subjected to stress testing conditions. When subjected to oxidation conditions, olefins (especially those that are conjugated with additional double bonds or that have heteroatoms in an allylic position) can undergo epoxidation and dihydroxy addition reactions. Epoxidation followed by SN2 reaction resulting in anti-hydroxylation can occur by treatment with hydrogen peroxide and formic acid, common excipient impurities in drug product formulations. Olefins are susceptible to isomerization, migration, photo-oxidation and cycloaddition reactions. In particular, some olefin containing APIs can dimerize with another molecule of API to form a [2+2] cycloaddition product under photo conditions. The olefin bond is susceptible to E(trans)-Z(cis) isomerization as well as oxidation.⁴⁵⁻⁵⁷

Carboxylic acid (decarboxylation)

Some carboxylic acids are susceptible to decarboxylation with acid or base catalysis.⁵⁸⁻⁶²

Enamine

Acid-catalyzed hydrolysis of enamines (last step of the Stork enamine reaction) involves conversion to an iminium ion which undergoes hydrolysis to the ketone. The iminium ion undergoes hydrolysis quite readily since there is a contributing resonance form with a positive charge on the carbon. Enamines have an electron rich double bond that is susceptible to reactivity with singlet oxygen (formed through the photosensitization of ground state molecular oxygen).⁶³⁻⁶⁵

Carboxylic acid

The electrophilic carbonyl of a carboxylic acid can undergo nucleophilic attack to form esters, amides, thioesters, etc. In the case of attack by an alcohol, the reaction product is an ester, and the reaction is called an esterification reaction. This can occur as an artifact reaction when acid/base hydrolysis reactions are performed using an alcohol co-solvent system such as methanol. Esters of the API parent compound can also be observed as process related impurities, especially when alcohol solvents are used in the recrystallization step. Carboxylic acids are not prone to oxidative degradation, in the other hand peroxides can add to carboxylic acids to form unstable peracids, which are good oxidants that promote further oxidations similar to that of hydrogen peroxide. Some carboxylic acids can decarboxylate if a carbonyl group is beta to a carboxylic acid, acid or base-catalyzed decarboxylation. In cases of thermal conditions, a decarboxylation reaction can occur followed by the formation of a dimer-ester.⁶⁶

Benzyl

Benzyl groups are stable to most conditions but are susceptible to autoxidation. The free radical process of autoxidation consists of a chain sequence involving three distinct types of reactions: initiation, propagation and termination. The initiation step produces a free radical to begin the chain reaction. Termination of the autoxidation chain process occurs as peroxy radicals react with other radicals to yield non-radical products. Oxidations can be catalyzed by peroxide containing forming excipients (e.g., PEGs, Tween 80 / Polysorbates, Povidone, etc.). These excipients contain polymeric chains of polyethylene units (-O-CH₂-CH₂-O-) and this ether based functional group is prone to radical catalyzed oxidation. These reactive radical intermediates can catalyze oxidative degradation. This susceptibility of benzyl groups to autoxidation is due to the low bond dissociation enthalpy of the benzylic hydrogen; abstraction of the benzylic hydrogen results in a benzylic radical (a pi delocalized radical), stabilized by resonance into the phenyl ring. Such resonance delocalization could also be provided by other aryl groups or by extended conjugation, and therefore any sp³ hybridized methine (-CH-), methylene (-CH₂-), and even methyl (-CH₃) group attached to an aryl group or to a group with extended conjugation, provides a favorable site for autoxidation to occur. If the benzylic site is chiral and has a labile hydrogen, epimerization reactions may also occur via radical catalyzed mechanism, especially if the benzylic group is involved in a photodegradation pathway (e.g., the benzyl group is photoexcited via exposure to light). If the degradation chemistry is performed in an aqueous environment, hydroxyl addition can also occur. Additionally, chiral benzylic alcohols are likely to undergo racemization reactions under acidic conditions via a cationic intermediate. Due to the low bond dissociation energy of the benzylic C-H bond and ease of radical formation, another reaction to keep in mind is potential dimerization of two molecules of the API at the benzylic center. Compounds with a benzylic amine are particularly susceptible to hydrolysis and to radical initiated oxidation conditions. These compounds readily convert to the corresponding imine, which subsequently undergo hydrolysis to the primary amine and aldehyde derivatives.⁶⁷⁻⁷⁵

Figura 4. Descritivo detalhado dos fragmentos suscetíveis à degradação, gerado por Degradation Plot.



Considerando a facilidade com que os fragmentos amina primária e tioéter são passíveis de gerar produtos de degradação secundários, a escolha dos parâmetros de degradação

(*endpoints*) deve demandar uma atenção especial, sobretudo nas condições oxidativa e de hidrólise.

A utilização de soluções de ácidos e bases, assim como de agentes oxidantes menos concentrados e tempos de exposição menores, pode ser uma boa estratégia no planejamento dos primeiros experimentos do estudo de degradação forçada.

No que diz respeito às vias de degradação, o gráfico gerado por Degradation Plot (Figura 7) indica uma maior porcentagem de formação de PDs únicos pelas vias oxidativa e de hidrólise.

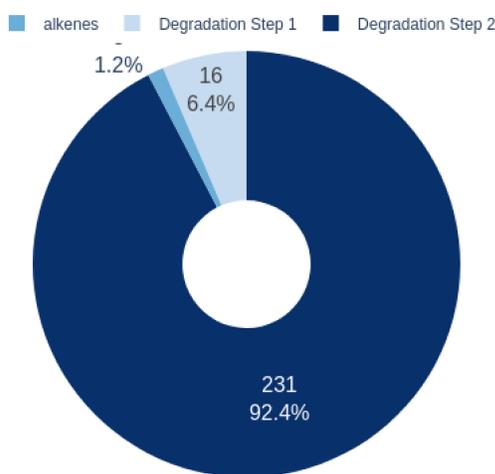


Figura 5. Quantidade prevista de produtos em função das etapas de degradação (primeira e segunda ordens).

O número de PDs únicos previstos

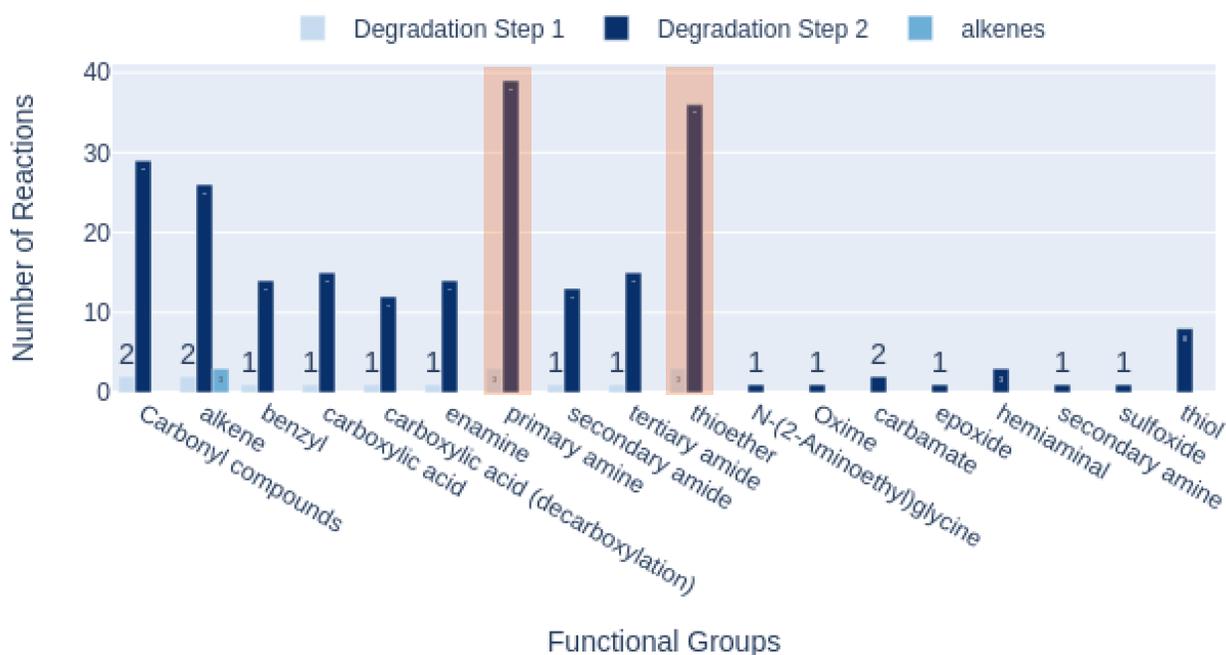


Figura 6. Número de reações previstas em função dos grupos funcionais presentes na molécula.



para cada condição de degradação é importante no momento de avaliar os resultados dos experimentos do estudo de degradação forçada.

Por exemplo, se experimentalmente não for observada degradação da cefalexina em uma condição específica de hidrólise, poderia-se inferir que os grupos presentes na molécula são resistentes a essa condição, principalmente se não houver evidências que indiquem o contrário.

Por outro lado, ao considerar que a predição *in silico* indica a hidrólise como a segunda condição que mais gera produtos de degradação, fica evidente que os parâmetros de degradação escolhidos foram muito brandos e que devem ser revistos.

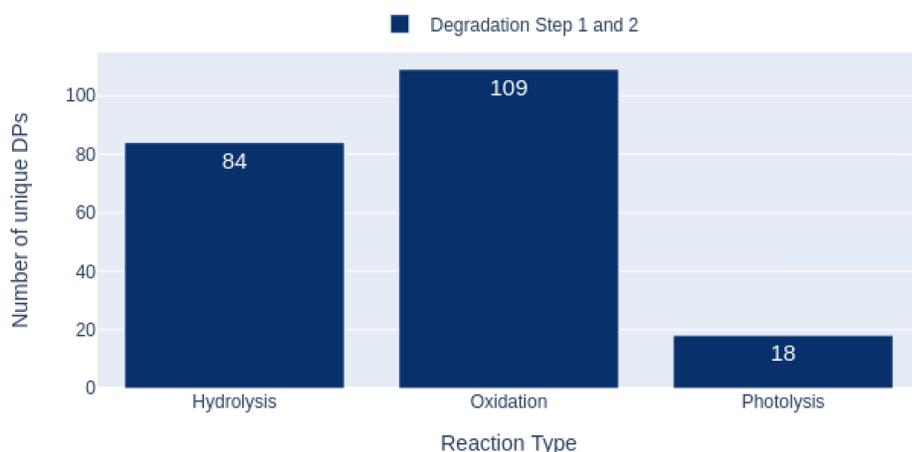


Figura 7. Número de produtos de degradação únicos em função dos tipos de reações para todas as etapas de degradação (primeira e segunda ordens).

Quais Produtos de Degradação esperar no Estudo de Degradação Forçada?

Tendo em vista o alto número de produtos de degradação que podem ser gerados para a cefalexina, totalizando 249 produtos preditos a partir de 17 grupos funcionais diferentes, o Módulo A - Produtos de degradação apresenta uma lista com a classificação da probabilidade de formação de todos esses produtos preditos, que variam de raros (verde), esperados (amarelo) até os mais prováveis (vermelho). Alguns exemplos dos produtos de degradação preditos e as respectivas classificações estão demonstrados na [Figura 8](#).

Nota-se que as estruturas **DP-1-2** e **DP-1-3** são classificadas como produ-

tos de degradação prováveis de serem formados, seguidas por **DP-1-1** e **DP-1-5** considerados produtos de degradação esperados e **DP-1-4**, como produto de degradação raro.



A lista apresenta as estruturas químicas, com as informações de massa exata, fórmula molecular, condição de degradação e quais estruturas são potencialmente esperadas.

Quando Degradation Plot identifica moléculas que já foram reportadas na literatura, *links* de direcionamento ao site *PubChem* são disponibilizados abaixo das estruturas (azul, Figura 8), para que se possa acessar as informações disponíveis.

O produto de degradação predito **DP-1-2**, por exemplo, possui duas estruturas relacionadas que foram efetivamente relatadas como produtos de degradação da cefalexina:

*2-Amino-2-phenylacetic acid*⁴, Impureza A da Farmacopeia Europeia (EP) e *7-amino-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid*⁵, Impureza B da Farmacopeia Britânica (BP) (Figura 9).

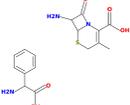
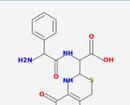
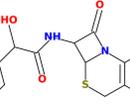
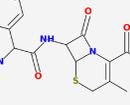
Product	Name	Mass	Formula	Condition	Reaction Likelihood
 <chem>CC12CSC3C(NC(=O)C(N)C(=O)C4=CC=CC=C4)C(=O)N3C1(C(=O)O)O2</chem>	DP-1-1	363.08889	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅ S	Oxidation	Expected
 <chem>CC1=C(C(=O)O)N2C(=O)C(NC(=O)C(N)C(=O)C2)C1</chem>	DP-1-2	214.04121 151.06333	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S C ₈ H ₉ NO ₂	Hydrolysis	Probable
 <chem>CC1=C(C(=O)O)NC(C(NC(=O)C(N)C(=O)C2=CC=CC=C2)C(=O)O)SC1</chem>	DP-1-3	365.10454	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	Hydrolysis	Probable
 <chem>CC1=C(C(=O)O)N2C(=O)C(NC(=O)C(N)C(=O)C3=CC=CC=C3)C2SC1</chem>	DP-1-4	348.07799	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	Hydrolysis	Rare
 <chem>CC1=C(C(=O)O)N2C(=O)C(NC(=O)C(N)C(=O)C3=CC=CC=C3)C2SC1</chem>	DP-1-5	361.07324	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₅ S	Oxidation	Expected

Figura 8. Exemplo de algumas estruturas de produtos de degradação preditos, contendo as informações de massa exata, fórmula molecular, condição de degradação e probabilidade da reação.

Adicionalmente, a partir dos links para o *Pubchem* disponibilizados por Degradation Plot, foi possível encontrar facilmente dados na literatura sobre um estudo de degradação forçada da cefalexina⁶.

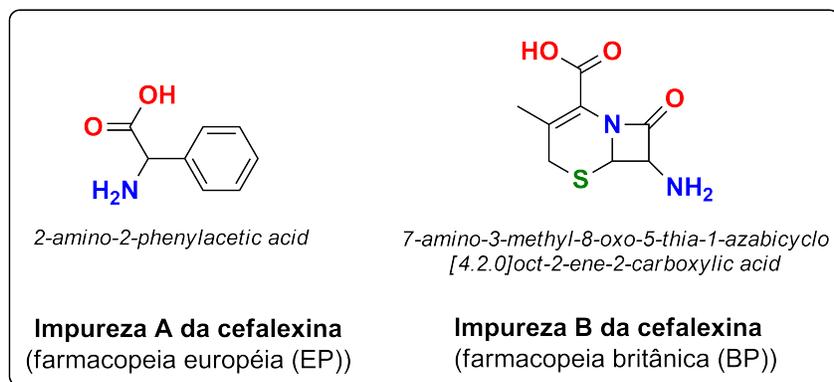


Figura 9. Estruturas previstas por Degradation Plot e que são descritas como produtos de degradação da cefalexina pelas farmacopeias europeia (EP) e britânica (BP).

O artigo de Von Ahn e colaboradores, mostrou que as impurezas A e B são formadas a partir da via de hidrólise ácida. Contudo, os produtos majoritários foram obtidos a partir da

abertura do anel beta-lactâmico, corroborando os dados da literatura sobre a susceptibilidade do anel via reações de hidrólise catalisada por ácido e base. Um exemplo dessa labilidade é o produto de degradação **DP-1-3** previsto por Degradation Plot, e descrito na literatura. Sua instabilidade o leva a se decompor, gerando PDs secundários (Figura 10).

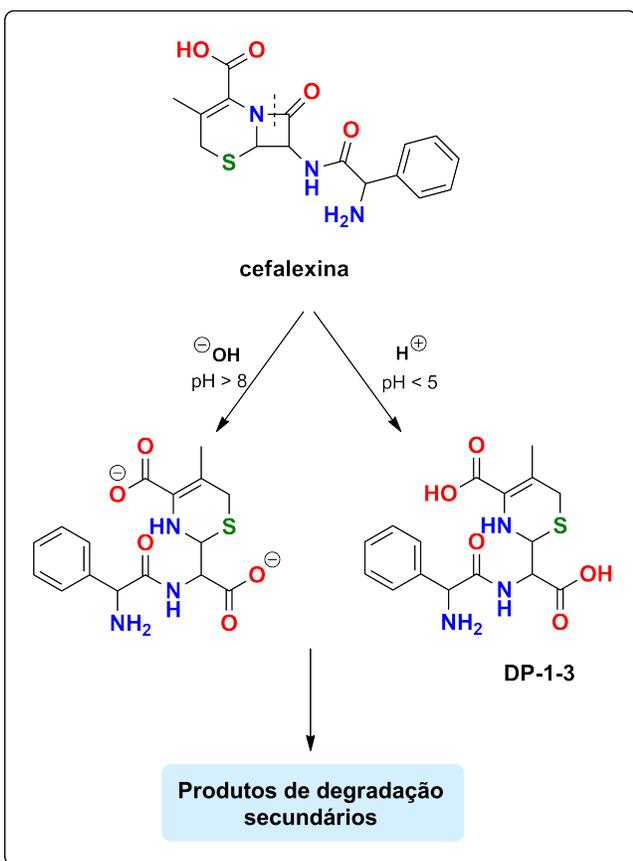


Figura 10. Produtos das degradações hidrolíticas da cefalexina.

A reunião dessas informações permite ter acesso não somente aos produtos de degradação teóricos, mas também ao direcionamento das condições de estresse pelas quais essas estruturas são formadas e, em alguns casos, sugestões de métodos indicativos de estabilidade. Além disso, a partir da observação dos mecanismos de reação propostos é possível justificar desvios de balanço de massas nos casos em que ocorrer perda ou ganho de grupo cromóforo.



Implicações das Predições de Degradação *in silico* para o Desenvolvimento de Métodos Indicativos de Estabilidade

Marcelo Luís Wilde

Eurofarma Laboratórios

O desenvolvimento de metodologias cromatográficas baseadas em conhecimento prévio (*knowledge based method development*) pode auxiliar em uma abordagem mais assertiva no que tange o desenvolvimento de métodos que atendam a RDC 53/2015 e a RDC 318/2019. Predições *in silico* de produtos de degradação (PDs) geradas pelo Degradation Plot podem ser utilizadas como um guia prévio auxiliando na escolha de:

- i. Colunas cromatográficas mais apropriadas ao tipo de analito;
- ii. Fases móveis compatíveis;
- iii. Comprimento de onda mais adequado para detectar todos os produtos de degradação gerados.

Não obstante, o Módulo C de Degradation Plot é uma ferramenta que auxilia de forma assertiva na identificação e caracterização de impurezas acima da especificação em estudos de estabilidade acelerada e prolongada. Essa ferramenta pode ser utilizada para um *screening* inicial relacionando à probabilidade estrutural e tempo de retenção preditos para os diferentes PDs, frente ao tempo de retenção da impureza alvo de qualificação.

Outro ponto relevante acerca de Degradation Plot é o fato das predições *in silico* combinarem valores de massa exata (m/z) com as estruturas preditas, auxiliando na racionalização de dados experimentais gerados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, para elucidação e identificação estruturais mais eficazes.

As predições *in silico* geradas por Degradation Plot podem auxiliar e, até mesmo, antever o comportamento do produto acabado frente a condições de estabilidade prévia e acelerada, auxiliando na escolha de embalagens mais adequadas, e evitando a exposição do produto acabado a condições que possam levar à formação de PDs tais como evitando exposição a luz, umidade, etc.



Diogo dos Santos Alves

Brainfarma Industria Química e Farmacêutica S/A

Os estudos *in silico* de degradação desempenham um papel crucial no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (MIE) para medicamentos.

Eles oferecem informações valiosas sobre possíveis rotas de degradação e produtos resultantes, levando em consideração diversos fatores. Essas ferramentas são vantajosas, reduzindo consideravelmente o tempo e os recursos necessários para estudos de degradação ao prever e selecionar condições de estresse relevantes. Elas também ajudam a identificar as vias de degradação mais importantes para o analito alvo, otimizando o desenvolvimento do método.

Embora forneçam uma visão ampla do produto, essas ferramentas não dispensam a interpretação crítica do analista durante o estudo de degradação *in silico*. É fundamental que o analista valide as conclusões do *software* por meio de teorias ou experimentos, considerando o perfil real do ingrediente ativo ou medicamento.

Além disso, a previsibilidade da formação de produtos de degradação

requer uma análise humana, considerando aspectos como impedimento estérico e análise estrutural que podem não ser contemplados pelas ferramentas *in silico*.

A avaliação *in silico* pode apresentar variações de grupos funcionais que podem alterar a absorvidade e detecção das impurezas. Assim, a capacidade preditiva das simulações contribui para visualizar os grupos cromóforos, o que afeta diretamente a detecção nos espectros UV-Vis. Isso resulta em uma melhor identificação das impurezas formadas, além de fornecer alternativas para atender aos requisitos regulatórios em investigações e esclarecimentos estruturais necessários, como em análises de espectrometria de massas.

Uma impureza desconhecida que porventura possa estar acima dos limites de especificação no produto final, pode ter sido predita *in silico* e facilmente será elucidada. O delineamento experimental baseado nessas ferramentas também prevê a otimização do processo, e conceitos de QbD e DoE podem ser aplicados, facilitando tanto no desenvolvimento do MIE quanto nas possíveis identificações de impurezas formadas.

As rotas de degradação identificadas



nos estudos *in silico* são cruciais para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.

No caso da cefalexina, por exemplo, as vias principais - hidrólise e oxidação - serão priorizadas no início do processo. Mesmo que outras condições precisem ser avaliadas, o foco inicial estará nessas vias, onde a degradação é mais provável, orientando as primeiras etapas do desenvolvimento deste método.

Após o desenvolvimento do método, o analista deve comparar os dados obtidos *in silico* com resultados experimentais, identificando semelhanças, diferenças e possíveis discrepâncias. A validação dos resultados *in silico* por meio de experimentação real é fundamental para garantir a confiabilidade das previsões futuras.

Portanto, as ferramentas *in silico* oferecem vantagens no desenvolvimento de métodos de estabilidade, mas não deixam de demandar a avaliação crítica do executor.

Uma abordagem equilibrada entre dados *in silico* e experimentais é essencial para um desenvolvimento eficaz de métodos de estabilidade especialmente frente a RDC nº 53/2015 e Guia nº 4/2015 e suas revisões.

Jefferson Luiz Fonseca da Silva **EPHAR - Instituto de Excelência** **Farmacêutica**

O objetivo principal do estudo de degradação forçada é a obtenção do método indicativo de estabilidade. Uma vez que a etapa de exposição às condições de degradação produz as impurezas esperadas de acordo os argumentos citados nesta nota de aplicação e o método utilizado for capaz de “enxergar” quaisquer que sejam elas (impurezas conhecidas ou desconhecidas), tem-se então um método indicativo de estabilidade que precisa ainda ser posteriormente validado.

No caso da cefalexina, este estudo demonstrou que, como a maioria das cefalosporinas, ela é extremamente suscetível à degradação, destacando-se as reações de hidrólise e oxidação. Um mínimo contato com solução aquosa já é capaz de produzir a abertura do anel beta-lactâmico. Portanto, o método tem que ser não apenas seletivo, mas capaz de detectar essas impurezas a nível de limite de quantificação, com exatidão e precisão adequados. Esse conhecimento também pode influenciar na escolha do material de embalagem e das condições de estocagem do medicamento.



Rodrigo S. Martins e Eder Lorenzato Jr.

Althaia S.A. Indústria Farmacêutica

Além de auxiliar na elaboração de um protocolo de estudo de degradação, a avaliação teórica de possíveis produtos de degradação é importante para o desenvolvimento de métodos analíticos. Tomando como exemplo o caso da cefalexina, uma vez que, o software Degradation Plot demonstrou que esse IFA é sensível à hidrólise, sendo esta a principal via de degradação deste insumo, diluentes e fase móvel com alta porcentagem de água ou que possuam valores de pH extremos, devem ser evitados a fim de não favorecer degradação do IFA.

A predição de produtos de degradação além de auxiliar na elaboração do protocolo de degradação forçada, na parte experimental, fornece informações importantes relacionadas aos grupos cromóforos dos produtos de degradação potenciais e como essas moléculas podem impactar no cálculo de balanço de massas, devido à degradação ou alteração desses grupos cromóforos.

Um exemplo disso, é a formação dos produtos de degradação **DP-1-2**, no qual o IFA cefalexina sofre um processo de hidrólise gerando dois

produtos, os quais possuem diferenças nos grupos cromóforos em relação ao IFA e podem impactar no cálculo de balanço de massas (Figura 8).

O mesmo caso se aplica ao produto de degradação **DP-1-1**, um produto formado devido a oxidação do grupo funcional alceno a um epóxido (Figura 8). Esta modificação pode alterar a absorção do produto de degradação formado no espectro de UV, quando comparado ao IFA.

Ainda em relação à cefalexina, a predição de produtos de degradação auxilia nas estratégias de identificação de impurezas no estudo de estabilidade. Uma vez que uma impureza desconhecida atinge o limite de identificação, conforme preconizado na RDC 53/2015, esta impureza deverá ter a sua estrutura elucidada, seja pela confirmação estrutural utilizando técnicas analíticas como Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou através de comparação com um padrão caracterizado.

Uma outra alternativa seria pela proposta de um mecanismo de degradação que leve a uma estrutura confirmada com uma técnica espectroscópica de caracterização (EM, RMN ou infravermelho).



Por exemplo, impurezas da cefalexina oriundas do estresse oxidativo, como **DP-1-1** e **DP-1-5** (Figura 8), podem ser identificadas via sua correlação entre o mecanismo de formação da impureza proposto por Degradation Plot e sua massa molecular a partir de amostras analisadas por HPLC-MS, sem a necessidade de compra de padrão ou outras técnicas de elucidação estrutural.

Um último ponto em relação à importância de realizar um estudo teórico prévio de prováveis produtos de degradação, é no sentido de prevenir a formação de produtos de degradação ao longo da vida útil do produto. Neste caso, durante o desenvolvimento do produto e a depender da via de degradação do ativo, é possível utilizar um material de embalagem que é mais impermeável à umidade, que possua propriedades fotoprotetivas ou, ainda, evitar um processo de compressão por via úmida, entre outros exemplos.

Além disso, a predição teórica prévia também auxilia na identificação de possíveis produtos de degradação com alerta estrutural para genotoxicidade via análise *in silico*, de modo a orientar e estabelecer pontos de atenção relacionados a essas impurezas.

Angelica Abido, Gustavo P. da Silva e Lillian F. S. Nascimento **Apsen Farmacêutica**

Em virtude das diversas reações químicas que podem acontecer envolvendo a molécula da cefalexina, considerando as abordagens *in silico*, bem como o conhecimento da reatividade dos grupos funcionais, destacam-se aquelas envolvendo tanto grupos nucleofílicos (por exemplo, amina primária e tioéter, Figura 6), quanto grupos eletrofílicos (por exemplo, anel beta-lactâmico e amida secundária, Figura 3).

Neste contexto, tratando-se de processos oxidativos, sejam eles de natureza polar ou radicalar, o grupo funcional tioéter representa um alvo bem característico, pois devido aos pares de elétrons livres do átomo de enxofre e sua elevada polarizabilidade, o torna um sítio propenso a reagir com espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, a substância química peróxido de hidrogênio, conduzindo a formação da nova ligação química S=O.

No que tange as reações de hidrólise, o anel beta-lactâmico representa um potencial alvo molecular para ter sua ruptura por agentes nucleofílicos (por exemplo, molécula de água – catálise



ácida ou íon hidroxila – catálise básica). Tal labilidade química é pertinente à tensão anelar existente neste anel heterocíclico de quatro membros, tornando-o apto a ser aberto quando na presença de condições ácidas ou básicas.

Complementarmente, em vista da existência conjunta de grupos nucleofílico e eletrofílico na molécula da cefalexina, o arranjo atômico estrutural destes grupos permite a ocorrência da reação intramolecular entre os grupos amina primária (nucleófilo) e anel beta-lactâmico (eletrófilo), favorecendo a ruptura do anel heterocíclico de quatro membros, para o surgimento de um novo sistema heterocíclico do tipo piperazinona.

Além disso, a presença da amida secundária na molécula da cefalexina, também representa um potencial sítio de reatividade em condições hidrolíticas ácidas e básicas, pois como trata-se de um sítio eletrofílico decorrente da eletrofilicidade do Csp^2 da ligação $C=O$, os ambientes catalíticos podem auxiliar a reação de hidrólise deste grupo.

Jardel A. Moreira e Diana L. L. B. Costa

Hypera Pharma

O relatório do software contendo a avaliação da reatividade dos grupos funcionais presentes na molécula e suas possíveis vias de degradação, possibilita direcionar os estudos de degradação de maneira mais assertiva, principalmente com relação a condições oxidativas onde se pode ter produtos de degradação gerados, por exemplo, por ataque nucleofílico e/ou autoxidação.

Uma exemplificação disso é que o estudo de estresse usando peróxido é um bom modelo para predição de produtos de degradação gerados por ataque nucleofílico, porém não é um bom modelo para prever reações por autoxidação. Enquanto um estudo de estresse utilizando um iniciador radicalar é mais adequado para prever perfil de degradação mais realístico gerado por autoxidação. Através do *software* é possível realizar essa distinção e, além disso, possibilita a obtenção de um perfil de impurezas predito mais completo, o qual contemple de forma abrangente todas as eventuais vias de degradação.

Adicionalmente, a predição teórica da reatividade dos grupos funcionais



presentes no IFA pode orientar também no desenvolvimento da formulação do fármaco, de forma a evitar o uso de excipientes que tenham características químicas ou contaminantes que possam causar a formação de produtos de degradação indesejáveis. Neste contexto, o estudo teórico disponibilizado pelo *software* pode mitigar a necessidade de estudos de qualificação de impurezas no produto final, minimizando eventuais intercorrências e trazendo um ganho de tempo para a empresa.

Um conhecimento prévio das propriedades físicas e químicas dos possíveis produtos de degradação de uma formulação é de grande valia para traçar estratégias assertivas acerca do desenvolvimento analítico, tanto relacionados a desafios cromatográficos, como no preparo de amostras. Informações estruturais dos produtos de degradação mais prováveis, bem como suas propriedades, tais como pK_a e $\log P$, auxiliam na escolha da fase estacionária e da fase móvel adequadas para otimizar o tempo de análise nas diferentes condições de estresse.

Deste modo o tempo gasto com desenvolvimento analítico pode ser consideravelmente reduzido, pois o escopo da susceptibilidade das degradações foi avaliado previamente.

Conclusão

A ferramenta *in silico* Degradation Plot é uma poderosa aliada para reduzir custos, otimizar o tempo nos estudos de degradação de fármacos e direcionar as investigações trazendo uma compreensão mais ampla do espaço químico reacional, incompatibilidades, vias de degradação do fármaco e estruturas dos PDs que podem ser teoricamente possíveis, tendo como resultado maior interpretabilidade, constituída na Avaliação Teórica Prévia e análise crítica do perfil de degradação geralmente exigida pelo órgão regulador.

Através do estudo de caso envolvendo a cefalexina e usando o Módulo A - Produtos de degradação, é possível inferir que o DegradationPlot fornece informações teóricas indispensáveis do ponto de vista regulatório, identificando grupos funcionais suscetíveis à degradação, vias de formação dos produtos de degradação e suas probabilidades, além de auxiliar no delineamento dos ensaios experimentais ou interpretação de eventuais achados obtidos na parte prática dos estudos de degradação forçada.

Todas essas vantagens permitem evitar desperdícios, reduzir o tempo necessário para a realização da



Avaliação Teórica Prévia e Estudos de Degradação Forçada, além de auxiliar na identificação de moléculas para posterior avaliação toxicológica, evitando exigências relacionadas à falta de análise crítica ou de informações teóricas que suportem os dados da parte prática submetidos aos órgãos reguladores.

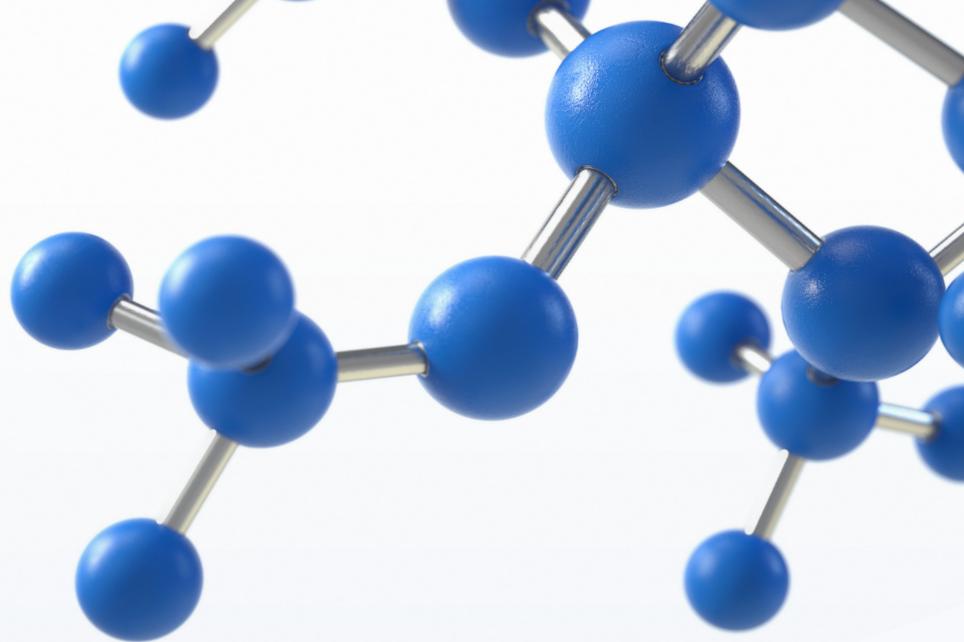
Embora nem todos os produtos de degradação teóricos sejam formados no mundo real na forma de PDs potenciais (em condições de stress) ou reais (em condições de estabilidade longa duração), dependendo da formulação específica, da ativação ou inativação de vias de degradação, contribuição de excipientes no produto específico (ex: antioxidantes, estabilizantes, absorventes, etc.), a abordagem de Avaliação Teórica Prévia e análise crítica do perfil de degradação fornecem uma base sólida para que a parte prática seja conduzida com sucesso. O *software* permite ainda modular as condições de stress, de maneira a gerar PDs mais prováveis, aqueles já foram relatados na literatura, e filtrando os demais PDs de menor probabilidade de formação.

É importante salientar que nem sempre há dados publicados sobre a degradação de fármacos, e isso não significa que aquele fármaco não é

suscetível aos *endpoints* de degradação e que não formará produtos de degradação em condições de stress ou estabilidade de longa duração. O analista/pesquisador experiente já deve ter ouvido o famoso axioma de que “ausência de evidência não é evidência de ausência”. Assim, os *softwares* ou o conhecimento em química orgânica são essenciais para ir além dos *gaps* de literatura. De forma mais assertiva e eficiente, essa abordagem é essencial para garantir conformidade regulatória no que diz respeito a Avaliação Teórica Prévia e a Análise Crítica do perfil de degradação exigida no contexto das revisões da RDC 53/2015 e do Guia 04/2015.

Referências

- ¹ Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015.
- ² Guia nº 4 de 04 de dezembro de 2015. Guia para a obtenção, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.
- ³ CEPHALEXIN – *DrugBank Online*. Disponível em <https://go.drugbank.com/drugs/DB00567>.
- ⁴ 2-Amino-2-phenylacetic acid. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Amino-2-phenylacetic-acid>.
- ⁵ 7-Amino-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1883>.
- ⁶ VON AHN, A.; DALLEGRAVE, A.; DOS SANTOS, J.H.Z. *Chromatographia* **2022**, 85, 263–279. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10337-022-04134-2>.



Este conteúdo foi útil?

Compartilhe!

Precisa de algo relacionado a este tema?

Fale conosco!



Av. Dr. Vital Brasil, 305, conj. 803, Butantã, São Paulo, SP.

Email: atendimento@alttox.com.br

Telefone: +55 (11) 3777-4820

www.alttox.com.br