

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
DORIPENEM POR ELETROFORESE CAPILAR E ESTUDO DA
ESTABILIDADE POR ELETROFORESE CAPILAR E ENSAIO MICROBIOLÓGICO**

Patricia Klitzke Paliosa

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2012

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
DORIPENEM POR ELETROFORESE CAPILAR E ESTUDO DA
ESTABILIDADE POR ELETROFORESE CAPILAR E ENSAIO MICROBIOLÓGICO**

Dissertação apresentada por
Patrícia Klitzke Paliosa para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23 de março de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Andrea Adams
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Paliosa, Patricia Klitzke
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO
DE DORIPENEM POR ELETROFORESE CAPILAR E ESTUDO DA
ESTABILIDADE POR ELETROFORESE CAPILAR E ENSAIO
MICROBIOLÓGICO / Patricia Klitzke Paliosa. -- 2012.
162 f.

Orientador: Martin Steppe.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Doripenem. 2. Carbapenema. 3. Eletroforese
Capilar. 4. Controle de Qualidade. 5. Ensaio
microbiológico. I. Steppe, Martin, orient. II. Título.

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 dissertação aos
meus pais Rejane e Marco,
e a minha dinda Joyce.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Martin Steppe pela orientação, dedicação e auxílio para que este trabalho fosse concluído.

Ao Andreas Mendez pelo auxílio em todas as etapas desta dissertação.

Ao Laboratório de Ensino e Controle de Qualidade por disponibilizar a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório pelo convívio e aprendizado, especialmente à Alini Lange, Amanda Barden, Fernanda Fuhr, Márcia Costa e Leticia Sfair.

À Amanda Barden, Camila Rigobello, Daiane Dias, Márcia Costa, Mariana Maurer e Mônica Duarte pela amizade.

Aos meus pais e minha dinda por todo amor, ensinamento, educação e dedicação prestada por todos estes anos.

Ao Max Kunrath pelo amor, amizade e companheirismo, extremamente importantes neste momento.

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para que mais esta etapa fosse concluída com sucesso.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
RESUMO	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 HISTÓRICO DAS CARBAPENEMAS.....	11
3.2 DORIPENEM PÓ SOLUÇÃO INJETÁVEL.....	15
3.2.1 Características do fármaco	15
3.2.2 Forma farmacêutica	16
3.2.3 Posologia.....	16
3.2.4 Preparo do fármaco para infusão	16
3.2.5 Indicações	16
3.2.6 Contra-indicações	17
3.2.7 Gravidez	17
3.2.8 Mecanismo de ação	17
3.2.9 Mecanismo de resistência	18
3.2.10 Farmacocinética	18
3.2.10.1 Distribuição e metabolismo	18
3.2.10.2 Eliminação	19
3.2.11 Farmacodinâmica	20
3.2.12 Interações	20
3.2.13 Toxicidade	21
3.2.14 Reações adversas	21
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	22
3.4 EFICÁCIA CLÍNICA	25
3.5 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE	27
3.5.1 Substituição em C-1	28
3.5.2 Substituição em C-2	28

3.5.3	Substituição em C-6	29
3.6	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA	30
3.6.1	Métodos analíticos para quantificação.....	30
3.6.2	Métodos analíticos para verificação da estabilidade	32
3.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	AMOSTRAS.....	41
4.1.1	Substância Química de Referência (SQR)	41
4.1.2	Amostra comercial	41
4.2	ANÁLISE QUALITATIVA.....	42
4.2.1	DETERMINAÇÃO DA FAIXA E PONTO DE FUSÃO	42
4.2.1.1	Material	42
4.2.1.2	Método	42
4.2.2	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	42
4.2.2.1	Material	42
4.2.2.2	Método.....	43
4.2.3	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV).....	43
4.2.3.1	Material	43
4.2.3.2	Método.....	44
4.2.4	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV).....	44
4.2.4.1	Material	44
4.2.4.2	Método	44
4.2.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	45
4.2.5.1	Material.....	45
4.2.5.2	Método	45
4.2.6	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	45
4.2.6.1	Material.....	45
4.2.6.2	Método	46
4.3	ANÁLISE QUANTITATIVA	47
4.3.1	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	47
4.3.1.1	Material.....	47
4.3.1.2	Método	48
4.3.1.3	Linearidade	48

4.3.1.3.1. Cálculos para a linearidade	48
4.3.1.4 Precisão	49
4.3.1.5 Exatidão	49
4.3.1.5.1 Cálculos para o teste de recuperação	50
4.3.2 ELETROFORESE CAPILAR (EC)	51
4.3.2.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	51
4.3.2.1.1 Material.....	51
4.3.2.1.2 Método.....	51
4.3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	55
4.3.3.1 Parâmetros analíticos.....	55
4.3.4 Especificidade	56
4.3.4.1 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada	56
4.3.5 Linearidade.....	57
4.3.5.1 Cálculos para a linearidade.....	57
4.3.6 Precisão	57
4.3.6.1 Cálculo para determinação de doripenem em amostras	58
4.3.7 Exatidão	59
4.3.7.1 Cálculos para o teste de recuperação	59
4.3.8 Robustez	60
4.3.9 Adequabilidade do sistema	62
4.4 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS	63
4.5 ENSAIO MICROBIOLÓGICO	63
4.5.1 Descrição do método.....	63
4.6 CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO QUÍMICA	64
4.6.1 Preparo das amostras para análise por EC e microbiológico.....	64
4.6.2 Degradação térmica	65
4.6.2.1 Descrição do método	65
4.6.3 Degradação por luz Ultravioleta-C	65
4.6.3.1 Descrição do método	65
4.6.4 Cálculos da cinética de degradação.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 ANÁLISE QUALITATIVA	69
5.1.1 DETERMINAÇÃO DA FAIXA E PONTO DE FUSÃO	69
5.1.1.1 Resultados.....	69

5.1.1.2 Discussão	69
5.1.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	70
5.1.2.1 Resultados.....	70
5.1.2.2 Discussão	71
5.1.3 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV).....	71
5.1.3.1 Resultados	71
5.1.3.2 Discussão	73
5.1.4 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)	74
5.1.4.1 Resultado.....	74
5.1.4.2 Discussão	76
5.1.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	77
5.1.5.1 Resultados	77
5.1.5.2 Discussão	79
5.1.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	80
5.1.6.1 Resultados.....	80
5.1.6.2 Discussão.....	82
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	83
5.2.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	83
5.2.1.1 Resultados	83
5.2.1.1.1 Linearidade	84
5.2.1.1.2 Precisão.....	84
5.2.1.1.3 Exatidão.....	85
5.2.1.2 Discussão	86
5.2.2 ELETROFORESE CAPILAR (EC)	87
5.2.2.1 Desenvolvimento do método	87
5.2.2.2 ESPECIFICIDADE	90
5.2.2.2.1 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada.....	90
5.2.2.3 LINEARIDADE	99
5.2.2.4 PRECISÃO.....	102
5.2.2.5 EXATIDÃO	103
5.2.2.6 ROBUSTEZ	104
5.2.2.7 Adequabilidade do sistema	106

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS MÉTODOS	107
5.4 CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO QUÍMICA	108
5.4.1 Degradação térmica	109
5.4.1.1 Resultados	109
5.4.1.1.1 Eletroforese capilar (EC)	109
5.4.1.1.2 Ensaio microbiológico (EM)	112
5.4.2 Fotoestabilidade	115
5.4.2.1 Resultados	115
5.4.2.1.1 Eletroforese capilar (EC)	115
5.4.2.1.2 Ensaio microbiológico (EM)	118
5.4.3 Discussão	120
6. CONCLUSÕES	121
7. REFERÊNCIAS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C _{max}	Concentração máxima
DHP-I	Dehidropeptidase-I
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EC	Eletroforese Capilar
ESBL	Betalactamase de espectro estendido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IV	Infravermelho
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente à metilina
PLP	Proteínas ligadoras de penicilina
RENAME	Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de MIC ₅₀ e MIC ₉₀ do doripenem frente a isolados clínicos.....	26
Tabela 2. Estabilidade das soluções de doripenem em soluções para perfusão.....	33
Tabela 3. Condições cromatográficas empregadas para análise de doripenem por CLAE.....	48
Tabela 4. Preparo das soluções para o teste de recuperação por CLAE.....	50
Tabela 5. Condições eletroforéticas empregadas para análise de doripenem por EC.....	54
Tabela 6. Preparo das soluções para o teste de recuperação por EC.....	59
Tabela 7. Alterações nas condições de análise por método eletroforético para verificação de robustez do método.....	60
Tabela 8. Variações experimentais para a avaliação da robustez do método desenvolvido por EC e sugerido pelo <i>software</i> Minitab 15.....	61
Tabela 9. Parâmetros da conformidade do sistema recomendados (ANVISA, 2003; ICH, 2005; USP 34, 2011).....	62
Tabela 10. Atribuição das principais bandas do espectro de IV do doripenem (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; PAVIA, 2001).....	73
Tabela 11. Resultados da absorvância e comprimento de onda nas soluções de doripenem	75
Tabela 12. Atribuições e relação dos deslocamentos químicos (ppm) do doripenem utilizado acetona deuterada como solvente.....	79
Tabela 13. Valores de R _f e R _x obtidos através da CCD.....	82
Tabela 14. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico por CLAE para doripenem pó para solução injetável.....	85
Tabela 15. Resultado do estudo de exatidão realizado através do método de adição do padrão por CLAE para doripenem pó para solução injetável.....	86
Tabela 16. Teor individual de doripenem frente a condições de degradação forçada.....	98

Tabela 17. Relação de área do doripenem obtidas por EC para determinação da curva padrão.....	100
Tabela 18. A análise estatística de variância das áreas absolutas obtidas para os dados da curva de doripenem por EC.....	101
Tabela 19. Valores experimentais obtidos através da determinação de doripenem pó por EC para avaliação da precisão.....	102
Tabela 20. Resultados do teste de recuperação por EC para determinação de doripenem pó em amostra.....	103
Tabela 21. Variações aplicadas ao método por EC na determinação de doripenem para avaliação da robustez do método e seu teor obtido (%)......	104
Tabela 22. Parâmetros aproximados de adequabilidade do sistema e o obtido experimentalmente para EC.....	106
Tabela 23. Teste <i>t</i> dos resultados obtidos na determinação de doripenem por CLAE, EC.....	106
Tabela 24. Estudo do tempo de degradação térmica (45 °C) da solução de doripenem e o teor residual do fármaco analisado por EC.....	109
Tabela 25. Estudo do tempo de degradação térmica (45 °C) da solução de doripenem e o teor residual do fármaco analisado por ensaio microbiológico..	113
Tabela 26. Estudo da cinética da estabilidade da solução de doripenem analisados por EC quando submetidos à luz UVC.....	115
Tabela 27. Estudo da cinética da estabilidade da solução de doripenem analisados pelo ensaio microbiológico quando submetidos à luz UVC.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura químicas representando (A),penicilina, (B) cefalosporina e (C) carbapenema.....	11
Figura 2. Estrutura química do imipenem, panipenem, biapenem, meropenem, ertapenem e doripenem (BUYNAK, 2006).....	12
Figura 3. Doripenem e o metabólito principal do seu metabolismo, denominado M1 (Adaptado de KEAM, 2008).....	19
Figura 4. Estrutura básica das carbapenemas.	27
Figura 5. Produtos formados pela degradação do doripenem. O M1 representa o rompimento do anel betalactamico, e o DP-5 a formação do dimero de duas moléculas de M1 (Adaptado de PSATHAS <i>et al.</i> , 2009; MICHALSKA <i>et al.</i> , 2011).....	34
Figura 6. Curva de aquecimento do doripenem analisada por DSC. Condições de análise: calorímetro exploratório diferencial modelo DSC-60, marca SHIMADZU, adaptado ao controlador de fluxo FC-60A, integrador TA 60WS e software TA 60 versão 2.0 com compensação de potencia, calibrado com índio e zinco.....	70
Figura 7. Espectro de absorção na região do infravermelho do doripenem.....	72
Figura 8. Solução de 1 mg/mL de doripenem. Solução aquosa (SA), metanólica (SM) e etanólica (SE).....	75
Figura 9. Espectro de ¹ H-RMN em acetona-d do doripenem obtido em equipamento Bruker DPX 400.....	77
Figura 10. Espectro de ¹³ C-RMN em acetona-d ₆ do doripenem obtido em equipamento Bruker DPX 400.....	78
Figura 11. Cromatogramas obtidos por CCD na análise das soluções de padrão de referência do doripenem (Dp), amostra de doripenem (Da), ampicilina (AMP) e cefalexina (CEF). Todos na concentração de 1 mg/mL com aplicação de cerca de 50 µL. (a) revelação com luz ultravioleta a 254 nm e (b) exposição a vapores de iodo.....	81

Figura 12. Cromatograma obtido pela reprodução da linearidade do método desenvolvido por Mantovani e colaboradores (2012) por CLAE para quantificação de doripenem. Condições cromatográficas: coluna C18, tampão fosfato monobásico 10 mM pH 4,8 e acetonitrila (96:04), fluxo 1 mL/minuto, 298 nm a 25 ± 1 °C.....	83
Figura 13. Representação gráfica da curva padrão de doripenem obtida por CLAE.....	84
Figura 14. Eletroferogramas obtidos através da análise por EC da (A) solução padrão de doripenem e da (B) solução amostra, preparadas e diluídas em água na concentração final de 200 µg/mL. Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C \pm 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	88
Figura 15. (A) Pureza do pico do cloridrato de procainamida. (B) Pureza do pico do doripenem. Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C + 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	89
Figura 16. (A) Eletroferograma do padrão interno e doripenem com comprimento de onda de 298 nm. (B) Eletroferograma do padrão interno e doripenem com comprimento de onda 300 nm. Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C + 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	90
Figura 17. Eletroferogramas obtidos através da análise por EC da solução padrão de doripenem e degradação térmica (45 °C) por 48 horas (30 % de degradação). Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C + 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	91

Figura 18. Eletroferogramas obtidos através da análise por EC da solução padrão de doripenem e degradação térmica (45 °C) por 48 horas (30 % de degradação). Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 214 nm, temperatura de análise 25 °C + 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL	92
Figura 19. Eletroferogramas obtidos através da análise por EC da solução padrão de doripenem e degradação alcalina em NaOH 0,01 M por 5 minutos (60 % de degradação). Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	93
Figura 20. Eletroferogramas obtidos através da análise por EC da solução padrão de doripenem e degradação ácida em HCl 0,01 M por 2 horas (22 % de degradação). Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	94
Figura 21. Eletroferogramas obtidos através da análise por EC da solução padrão de doripenem, peróxido de hidrogênio 3 % e degradação oxidativa por 15 minutos (30 % de degradação). Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	95
Figura 22. Eletroferograma da procainamida e doripenem; peróxido de hidrogênio 3 % (branco); e, degradação oxidativa de doripenem por 15 minutos (30 % de degradação) em um comprimento de onda de 214 nm. Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL	96
Figura 23. Eletroferograma da procainamida e doripenem; degradação em luz UVa por 24 horas (20 % de degradação). Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	96

Figura 24. Eletroferograma da procainamida e doripenem; degradação em luz UVC por 24 horas (50 % de degradação) Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 298 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	97
Figura 25. Eletroferograma da procainamida e doripenem; degradação em luz UVC por 24 horas (50 % de degradação) Condições eletroforéticas: eletrólito tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, tensão aplicada 15 kV, detecção UV 214 nm, temperatura de análise 25 °C ± 1 °C, procainamida como padrão interno na concentração de 200 µg/mL.....	98
Figura 26. Representação gráfica da curva padrão de doripenem obtida por EC.....	101
Figura 27. Gráfico de Pareto demonstrando os fatores de maior interferência no método desenvolvido por EC para quantificação de doripenem.....	105
Figura 28. Estudo da cinética de degradação pela temperatura (45 °C) por EC.	110
Figura 29. Curvas da cinética de degradação térmica da solução de doripenem por EC. (A) Curva concentração x tempo; (B) curva log da concentração x tempo; (C) e curva 1/concentração x tempo.....	111
Figura 30. Ensaio microbiológico para o estudo da cinética de degradação do doripenem – método de difusão em ágar-cilindros em placas. Análise reconstituída no (A) tempo zero onde o padrão de doripenem (P1, P2 e P3) e as amostras (A1, A2 e A3) apresentam concentração de 1, 2 e 4 µg/mL; e (B) degradação térmica durante 12 horas onde o padrão de doripenem P1, P2 e P3 apresenta concentração de 1, 2 e 4 µg/mL, respectivamente e as amostras (A1, A2 e A3) apresentam concentração de 2 µg/mL.....	112
Figura 31. Estudo da cinética de degradação pela temperatura (45 °C) pelo ensaio microbiológico.....	113
Figura 32. Curvas da cinética de degradação térmica da solução de doripenem por EM. (A) Curva concentração x tempo; (B) curva log da concentração x tempo; (C) e curva 1/concentração x tempo.....	114
Figura 33. Estudo da cinética de degradação de doripenem pela luz UVC pela EC.....	116

Figura 34. Curvas da cinética de degradação térmica da solução de doripenem por EC. (A) Curva concentração x tempo; (B) curva log da concentração x tempo; (C) e curva 1/concentração x tempo.....	117
Figura 35. Estudo da cinética da fotodegradação (UVC) por EM.....	118
Figura 36. Curvas da cinética de degradação térmica da solução de doripenem por EM. (A) Curva concentração x tempo; (B) curva log da concentração x tempo; (C) e curva 1/concentração x tempo.....	119

RESUMO

O doripenem é um antibiótico carbapenêmico de amplo espectro e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2007. Devido a sua recente comercialização, não está presente em códigos oficiais. Desta forma, esta dissertação teve como objetivo validar um método analítico para quantificação do Doripenem utilizando a eletroforese capilar (EC) como ferramenta analítica alternativa à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), além de desenvolver métodos físico-químicos para caracterizar a matéria prima e estudar a cinética de degradação do fármaco frente à temperatura e radiação por luz UVC. Diante dos resultados obtidos, verificou-se que métodos de caracterização como a cromatografia em camada delgada, espectrofotometria de infravermelho e ultravioleta e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear demonstraram ser satisfatórios para caracterização do fármaco, já os métodos como DSC e faixa de fusão não foram adequados. Para fins de comparação com a EC, realizou-se a covalidação do método de CLAE reportado na literatura, tendo sido obtido um fator de correlação de 0,9950, teor médio de 100,09 % e recuperação de 101,19 %. Para o desenvolvimento do método por EC foi utilizado capilar de sílica fundida de 40 cm efetivo com 50 µm de diâmetro interno, eletrólito tampão borato de sódio 100 mM em pH 8,0, tensão aplicada de 15 kV a 25 °C, comprimento de onda de 298 nm e, procainamida como padrão interno. O comprimento de onda 214 nm foi monitorado a presença de produtos de degradação. O método demonstrou ser específico, linear entre 25-250 µg/mL ($r=0,9995$), preciso (101,33 %), exato (101,86 %) e robusto. Conforme os resultados obtidos, os métodos por CLAE e EC demonstraram ser intercambiáveis, contudo, a EC apresenta vantagens como menor tempo de análise e pequena quantidade de resíduo gerado. Para o estudo da cinética de degradação por EC e ensaio microbiológico (EM), as condições verificadas foram temperatura (45 °C, por 24 horas) e luz UVC (por 12 horas). O teor final de doripenem obtido pela EC foi de 70,74 e 64,18 % para temperatura e UVC, respectivamente. Já a potência verificada pelo ensaio microbiológico foi de 42,77 e 21,95 % para temperatura e UVC, respectivamente.

Palavras-chave: doripenem, carbapenema, eletroforese capilar, controle de qualidade, ensaio microbiológico.

ABSTRACT

Validation of analytical method for measurement of doripenem by capillary electrophoresis and study of stability by capillary electrophoresis and microbiological assay

Doripenem is a carbapenemic antibiotic with a broad spectrum of action launched in 2005. Due to its recent commercialization, doripenem is not in official codes. So this dissertation aims to validate an analytical method to doripenem quantification using capillary electrophoresis (CE) as an alternative method to High Performance Liquid Chromatography (HPLC), besides to develop physic-chemical methods to characterize the material and to study the degradation kinetics of doripenem in UVC light and temperature (45 °C). The characterization methods as thin layer chromatography, infrared and ultraviolet spectroscopy and spectroscopy Nuclear Magnetic Resonance proved to be satisfactory. Melting point range and DSC were not adequate to identify doripenem. To compare HPLC and EC, HPLC method was covalidate according literature. The method demonstrated a correlation factor 0.9950, average content 100.09 % and recovery 101.19 %. For the development of CE method was employed 40 cm fused silica capillary in 50 µm inner, electrolyte 100 mM buffer sodium borate at pH 8.0, applied voltage 15 kV at 25 °C, wavelength 298 nm, and procainamide as internal standard. The method demonstrated to be linear between 25-250 µg/mL ($r=0.9995$), precise (101.33 %), accurate (101.86 %) and robust. Based on these results, the HPLC and CE methods are interchangeable. However, EC presents advantages such as reduced analysis time and small residue generated. To kinetic degradation study by CE and microbiological assay (MS) conditions as temperature (45 °C for 24 hours) and UVC light (12 hours) were tested. The final residual content for doripenem by EC was 70.74 % and 64.18 to UVC and temperature, respectively. The antimicrobial power checked by MS was 42.77 and 21.95% for temperature and UVC, respectively.

Keywords: Doripenem, carbapenems, capillary electrophoresis, quality control, microbiological assay.

1. INTRODUÇÃO

Durante anos, o uso frequente e inadequado das penicilinas resultaram na seleção de microrganismos resistentes a fármacos betalactâmicos. Desta forma, a partir da década de 70, as carbapenemas surgiram no mercado com a expectativa de contornar o problema da resistência microbiana (FUCHS e WANNMACHER, 2010).

Pertencentes a classe dos betalactâmicos, as carbapenemas foram desenvolvidas a partir da tienamicina, produto extraído do fungo *Streptomyces cattleya*, que devido à baixa estabilidade e alta toxicidade não foi empregada na prática clínica. Entretanto, com uma atividade antimicrobiana promissora, a indústria farmacêutica encontrou alternativas para a síntese de novos carbapenemas a partir da estrutura básica da tienamicina. Desta forma, modificações estruturais proporcionaram uma maior estabilidade e menor toxicidade nos outros fármacos sintetizados, tornando possível o seu uso na terapêutica (BLUMER, 1997; ZHANEL *et al.*, 2007). Desde então, diversos fármacos pertencentes a esta classe vem sendo desenvolvido, tais como imipenem, panipenem, biapenem, meropenem, ertapenem e doripenem.

O doripenem, conhecido inicialmente por S-4661, é a mais recente carbapenema de uso parenteral no mercado. Desenvolvido pela indústria farmacêutica japonesa Shionogi Co. Ltda, o fármaco apresenta, como todas as carbapenemas, um amplo espectro de ação, além de um diferencial na estrutura química que confere uma resistência maior frente à enzima renal responsável pela perda da atividade, a dehidropeptidase-I (DHP-I). Outras modificações aliaram ao doripenem a vantagem da eficácia frente às bactérias gram-positivas do imipenem, e gram-negativas do meropenem (FUCHS e WANNMACHER, 2010). Desta forma, doripenem tem sido considerado um fármaco promissor no combate a microrganismos resistentes a outros betalactâmicos já disponíveis no mercado.

Sintetizado em 2000, doripenem foi aprovado nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) apenas em 2007. No ano seguinte, teve seu uso

autorizado na Europa (HILAS *et al.*, 2008; KEAM, 2008). No Brasil, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluiu o fármaco na lista de antimicrobianos aprovados para o uso.

Doripenem é comercializado na forma farmacêutica pó estéril para solução injetável em frascos na forma de base anidra, que pode variar da coloração branca a amarelado. Não apresenta excipientes na sua formulação (EMEA, 2008).

Salienta-se que grande parte dos estudos e trabalhos de pesquisa tem focado o espectro de ação das carbapenemas com o objetivo de verificar e comprovar a superioridade de doripenem frente aos demais carbapenêmicos e aos demais betalactâmicos. Desta forma, a escassez de dados na área analítica qualitativas e quantitativas, reflete na pouca quantidade de dados para a área de controle de qualidade da indústria farmacêutica. Diante deste panorama, salienta-se a importância de pesquisas que colaborem para esta área.

Por se tratar de um novo fármaco no mercado, doripenem não consta em códigos oficiais. Em vista disso, este trabalho visa colaborar com o desenvolvimento de métodos analíticos destinados ao controle de qualidade de medicamentos comparando o método já validado por CLAE com o método novo desenvolvido por EC. Além de auxiliar na caracterização do fármaco e estudar de cinética de degradação e estabilidade do doripenem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar método analítico por EC para quantificação do doripenem na forma farmacêutica pó para solução injetável.

2.2 Objetivos específicos

✓ Caracterizar a substância química de referência do doripenem através de análises por Ponto de Fusão (PF), espectrofotometria no Infravermelho (IV) e no Ultravioleta (UV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

✓ Determinar os parâmetros experimentais para quantificação do doripenem através da técnica de eletroforese capilar (EC);

✓ Validar o método eletroforético segundo as guias de validação analítica;

✓ Covalidar o método analítico de CLAE desenvolvido por Mantovani e colaboradores (2012) a fim de comparar os resultados com os obtidos pelo método de EC proposto neste trabalho.

✓ Comparar os métodos de EC e CLAE em relação aos parâmetros de validação analítica;

✓ Estudar a estabilidade do fármaco quando submetido às condições de termo e fotodegradação, através do método eletroforético.

✓ Estudar a estabilidade do fármaco quando submetido às condições de termo e fotodegradação, através do ensaio microbiológico, previamente validado (Fuhr, 2011)

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DAS CARBAPENEMAS

Em 1928, Alexander Fleming detectou que o mofo que contaminara suas culturas apresentava atividade antimicrobiana. Surgiu assim, a penicilina que, a partir de 1941, passou a ser utilizada em pacientes gravemente infectados por estafilococos e estreptococos. Desde então, inúmeras manipulações semissintética e sintéticas deram origem ao extenso grupo das penicilinas, todas com anel betalactâmico como estrutura básica. Dentro deste grande grupo encontram-se as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicas e inibidores das betalactamases (FUCHS e WANNMACHER, 2010).

As carbapenemas apresentam estrutura química semelhante às penicilinas e cefalosporinas: um anel lactâmico fundido e um sistema de anéis de cinco membros. Diferenciam-se pela substituição do átomo de enxofre por um átomo de carbono na posição 1, denominado “carba”, e pela presença de uma insaturação entre os carbonos 2 e 3 do mesmo núcleo, denominado “penema” (Figura 1) (NORRBY, 1995; DALHOFF *et al.*, 2006).

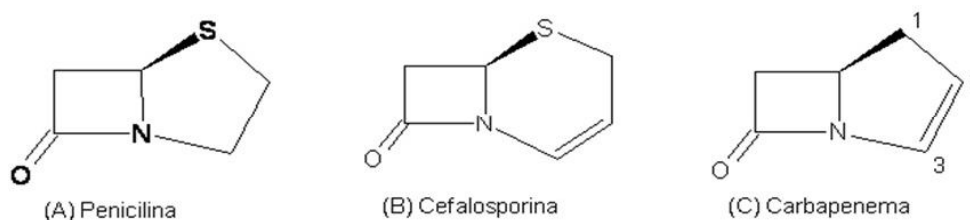


Figura 1. Estrutura químicas representando (A) penicilina, (B) cefalosporina e (C) carbapenema.

Em decorrência do uso frequente e inadequado dos antibióticos, muitos microrganismos adquiriram resistência aos betalactâmicos. No final da década de 1970, a tienamicina foi descoberta e isolada a partir do fungo *Streptomyces cattleya*. Devido ao alto potencial antimicrobiano, a tienamicina foi considerada um fármaco promissor no combate a resistência microbiana. Entretanto, por não oferecer estabilidade para o uso clínico e ser altamente tóxica, a estrutura básica da tienamicina passou por modificações estruturais que possibilitaram à indústria farmacêutica a síntese de novas carbapenemas com menor toxicidade e maior estabilidade (PROUS, 1988).

O primeiro antibiótico carbapenêmico comercializado foi o imipenem (1985), seguido do panipenem (1993), meropenem (1996), biapenem (2002), ertapenem (2002) e doripenem (2007), o último a ser lançado no mercado (LIVERMORE, 2009). A estrutura química destas carbapenemas de uso parenteral pode ser visualizada na Figura 2.

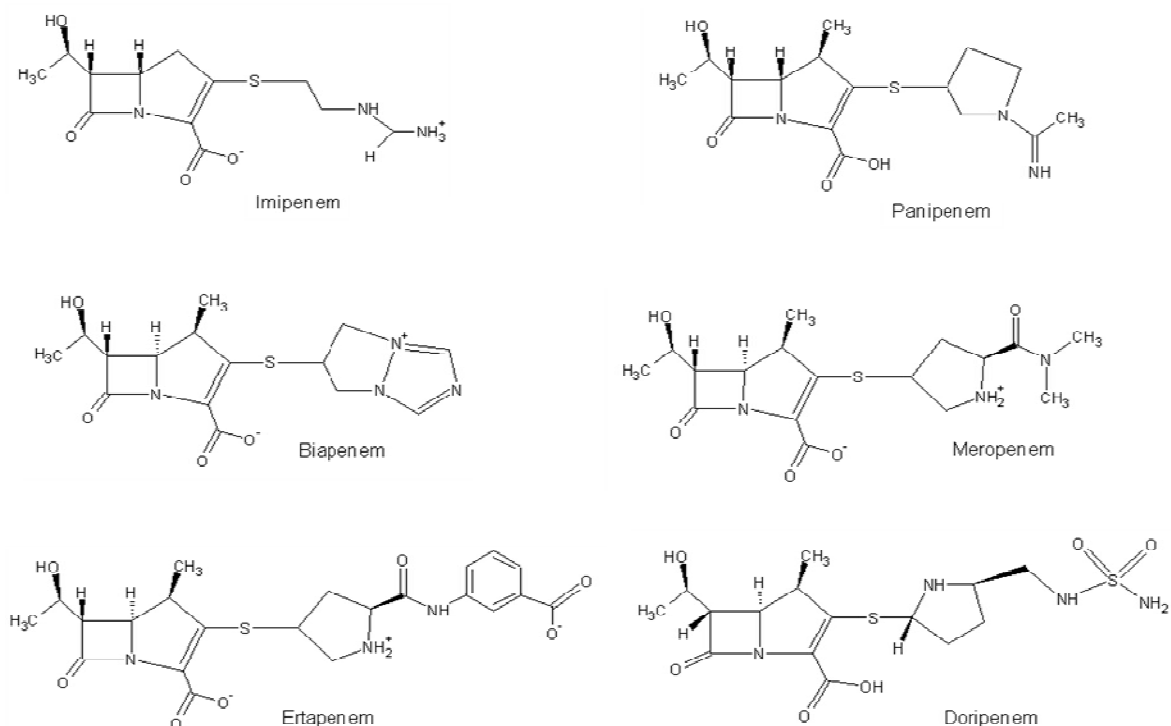


Figura 2: Estrutura química do imipenem, panipenem, biapenem, meropenem, ertapenem e doripenem (BUYNAK, 2006).

Salienta-se que os carbapenêmicos possuem amplo espectro de atividade *in vitro* que inclui a atividade contra bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e anaeróbias (ZHANEL *et al.*, 2007).

Atualmente, o imipenem continua sendo empregado como antimicrobiano de amplo espectro para tratamento das infecções hospitalares por bactéria gram-positivas (inclusive as não fermentadoras), cocos gram-positivos, exceto *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), *Enterococcus faecium*, anaeróbios (*Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Bacteróides fragillis*, *Prevotella sp.*, *Peptostreptococcus sp.*) (KEAM,, 2008). Por sofrer rápida degradação pela ação da enzima DHP-I, necessita da administração concomitante de um inibidor desta enzima, neste caso a cilastatina. No Brasil, o imipenem passou a fazer parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) em 2001 e, até hoje apresenta uso restrito hospitalar para infecções causadas por bactérias multi-resistentes (RENAME 2001, 2010).

Em 1993, com características semelhantes ao imipenem, a indústria japonesa Daiichi Sankyo Co. lançou o panipenem (Carbenin[®]). Este antimicrobiano também apresenta instabilidade frente à enzima DHP-I, necessitando da administração concomitante de um inibidor enzimático que, neste caso é utilizado o betamipron, também auxilia na redução da toxicidade do panipenem (SHIMADA, 1994).

Apenas em 1996 foi lançado no mercado a primeira carbapenema estável à enzima DHP-I, o meropenem. Esta evolução só foi possível graças a modificações estruturais que proporcionam maior estabilidade frente a esta enzima, sendo desnecessária a administração de um inibidor enzimático. Meropenem apresenta indicações semelhantes ao imipenem com a vantagem de possuir um menor potencial para desencadear crises convulsivas. Por isso, passou a ser empregado sem restrições para infecções do sistema nervoso central (ZHANEL *et al.*, 2007).

Biapenem foi lançado em 2002 como Omegacin[®] pela indústria japonesa Wyeth Lederle. Exibe uma atividade bacteriana contra uma gama de bactérias gram-positivas

(aeróbias e anaeróbias) e gram-negativas, incluindo espécies capazes de produzir betalactamases (PERRY e IBBOTSON, 2002).

O ertapenem, conhecido como Invanz[®] foi lançado pela indústria Merck Sharp & Dohme, em 2003 (LIVERMORE *et al.*, 2009). Apresenta o maior tempo de meia vida dos carbapenêmicos e, em vista disso, possui a vantagem de ser administrado apenas uma vez ao dia (HAMMOND, 2004). Demonstra atividade contra a maioria das bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e anaeróbios, mas não contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus*. Seu uso é restrito em infecções graves do trato respiratório inferior e sistema urinário, abrangendo também infecções complexas de pele e tecidos moles. Pode ser usado em infecções hospitalares por bactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) como *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli* e *Proteus sp.* (FUCHS e WANNMACHER, 2010).

Em 2005, doripenem foi lançado no Japão pela indústria Shionogi com o nome de Finibax[®]. Em 2007 foi aprovado pelo FDA passando a ser comercializado como Doribax[®] nos Estados Unidos, onde teve seu uso autorizado para o tratamento de pneumonia nosocomial, infecções intra-abdominais e trato gastrintestinal complicadas, incluindo pielonefrite aguda em adultos (PETERSON e DEPESTEL, 2009). No ano seguinte, a Europa também aprovou seu uso para pneumonia nosocomial, independentemente de estar ou não associada à ventilação mecânica (HILAS *et al.*, 2008). Em outubro de 2009, doripenem foi aprovado no Canadá para o tratamento de infecções intra-abdominais e trato urinário complicadas, pneumonia nosocomial e pneumonia associada à ventilação. No Brasil, em 2011, doripenem passou a integrar a lista de antimicrobianos permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

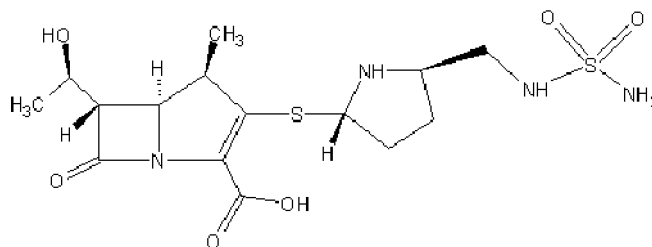
Devido a sua recente utilização na terapêutica, doripenem permanece ativo contra uma ampla variedade de microrganismos, além de manter a eficácia clínica contra microrganismos problemáticos. Sendo assim, a sua utilização na prática deve

obedecer determinadas regras para que sua eficácia seja mantida (WOLFF *et al.*, 2009).

3.2 DORIPENEM PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

3.2.1 Características do fármaco

- Nome comum: Doripenem monoidratado.
- Nome químico: Ácido (+)-(4R,5S,6S)-6-[(1R)-1-hidroxi-etil]-4-metil-7-oxo-3-[[[(3S,5S)-5-[(sulfamoilamino)metil]-3-pirrolidil-tio]-1-azabicyclo[3.2.0]hepta-2-eno-2-carboxílico.
- Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}N_4O_6S_2 \cdot H_2O$
- Massa molecular: 438,52 (420,51 em base anidra).
- Fórmula estrutural:



- Propriedades físico-químicas: pó branco a ligeiramente amarelado. É pouco solúvel em água e metanol e praticamente insolúvel em etanol. O pK_{a1} é de 2,8 e o pK_{a2} é de 7,9 (EMEA, 2008)

3.2.2 Forma farmacêutica

Doripenem é encontrado em frascos transparentes contendo 250 ou 500 mg de pó estéril liofilizado pronto para reconstituição. O medicamento não contém excipientes (EMEA, 2008).

3.2.3 Posologia

A dose de doripenem pó solução injetável é de 250 ou 500 mg a cada oito horas. O tratamento é contínuo e pode variar de cinco a 14 dias, dependendo do tipo da infecção, gravidade e resposta do paciente (EMEA, 2008).

3.2.4 Preparo do medicamento para infusão

Para o preparo da bolsa de infusão do antibiótico, o medicamento deve ser solubilizado em 10 mL de água estéril ou em soro fisiológico diretamente no frasco. Com o auxílio de uma seringa, a solução é transferida para a bolsa de infusão contendo 100 mL de solução salina ou dextrose 5%. A concentração da solução final da infusão é de 4,5 mg/mL.

3.2.5 Indicações

É indicado para o tratamento de infecções em adultos, tais como pneumonia nosocomial, infecções complicadas do trato urinário e intra-abdominal (ALVAREZ-LERMA *et al.*, 2009; EMEA, 2008; FUCHS e WANNMACHER, 2010; KEAM, 2008). Doripenem demonstra muitas semelhanças com outros carbapenêmicos, além de algumas diferenças importantes como maior potência contra *Pseudomonas aeruginosa*. Estas características sugerem que este fármaco possa ser útil no tratamento da

pneumonia nosocomial, comum em pacientes na unidade de terapia intensiva (ACBB, 2008).

3.2.6 Contra-Indicações

Recomenda-se o uso com cautela em pacientes com problemas renais, que poderão ter a dose reduzida. Não é indicado o uso em crianças menores de 18 anos devido à falta de informações sobre segurança e eficácia (EMEA, 2008).

3.2.7 Gravidez

Estudos de desenvolvimento embrionário/fetal, parto ou desenvolvimento pós-natal em modelo animal são considerados insuficientes. É desconhecido qualquer risco potencial no ser humano. Desta forma, não é aconselhável o uso de doripenem durante a gestação, exceto nos casos em que seja considerado absolutamente necessário (EMEA, 2008). Doripenem é classificado pelo FDA na categoria B para gestantes (prescrição com cautela) e não há estudos sobre a excreção no leite materno (CHAHINE *et al.*, 2010).

3.2.8 Mecanismo de ação

Doripenem exerce a sua atividade bactericida através da inibição da síntese da parede celular bacteriana, através da inativação de diversas proteínas ligadoras de penicilina (PLP). Apresenta alta afinidade pela PLP2 PLP1, e PLP4 de *S. aureus*, mas a sua afinidade com PLP2a é baixa, o que explica a sua atividade reduzida contra o MRSA. Na *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, liga-se na PLP2, que está envolvida na manutenção de uma forma esférica de células, bem como a PLP3 e PLP4. A afinidade de ligação de doripenem para PLP2 de *Pseudomonas aeruginosa* foi mais

forte do que documentada para a maioria das cefalosporinas (ACBB, 2008; ALVAREZ-LERMA *et al.*, 2009).

3.2.9 Mecanismo de resistência

Mecanismos de resistência bacteriana que afetam doripenem incluem a inativação do fármaco por enzimas que promovem a hidrólise da carbapenema, PLP mutante ou adquirida, diminuição da permeabilidade da membrana externa e efluxo ativo. Doripenem é estável à hidrólise pela maioria das betalactamases, incluindo as penicilinas e cefalosporinas produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (ACBB, 2008).

3.2.10 Farmacocinética

3.2.10.1 Distribuição e metabolismo

A concentração máxima (C_{max}) e área sob a curva no intervalo de zero a 8 horas (AUC_{0-8}) de doripenem foi verificada em voluntários saudáveis em todos os estudos e, após administração de 500 mg ao longo de aproximadamente 1 hora, a concentração máxima (C_{max}) e área sobre a curva correspondem a 23 e 36 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, respectivamente. Não foi observado acúmulo de doripenem após perfusões intravenosas múltiplas de 500 mg ou 1 g, administrados a intervalos de 8 horas, durante 7 a 10 dias, em voluntários com função renal normal (EMEA, 2008).

A ligação média de doripenem às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 8,1 %, e o volume de distribuição em estado estacionário é de cerca de 16,8 L. O fármaco penetra em vários líquidos e tecidos orgânicos, tecido uterino, líquido retroperitoneal, tecido prostático, tecido vesical e urina (EMEA, 2008). Não sofre

metabolismo mediado pelo citocromo P450 (CYP450) e apresenta um metabólito principal, microbiologicamente inativo, denominado M1 (Figura 3), formado pelo rompimento do anel betalactâmico promovido pela enzima renal, DHP-I (ACBB, 2008; KEAM, 2008).

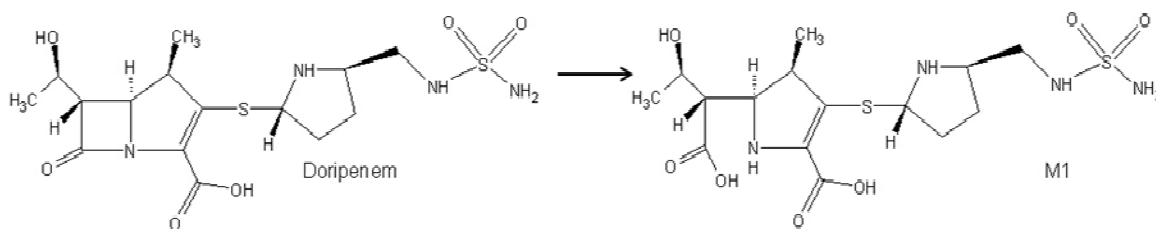


Figura 3. Doripenem e o metabólito principal do seu metabolismo, denominado M1 (Adaptado de KEAM, 2008).

3.2.10.2 Eliminação

A maior parte da eliminação do fármaco é renal, na forma inalterada. O fármaco sofre filtração glomerular, secreção tubular e reabsorção (KEAM, 2008). O tempo de meia-vida de eliminação média em jovens adultos saudáveis é de aproximadamente 1 hora, com uma depuração plasmática de 15,9 L/hora. A depuração renal média é de 10,3 L/hora. Em jovens adultos saudáveis tratados com dose única de 500 mg de doripenem, 71 e 15 % da dose foi recuperada na urina sob a forma de substância ativa inalterada e do metabólito de anel aberto (M1), respectivamente (EMEA, 2008; KEAM, 2008). Cirilo e colaboradores (2008) demonstram que doripenem é excretado exclusivamente através da urina (95,3 %) e predominantemente como fármaco na forma inalterada. As fezes correspondem a 0,72 % da excreção do fármaco. Devido à baixa recuperação fecal, a excreção biliar de doripenem em humano é insignificante.

3.2.11 Farmacodinâmica

O intervalo em que a concentração plasmática de doripenem excede a concentração inibitória mínima (MIC) do microrganismo infeccioso tem demonstrado a melhor correlação com a eficácia nos estudos pré-clínicos de farmacocinético-farmacodinâmica. As simulações de *Monte Carlo* utilizando resultados de susceptibilidade do agente patogênico de ensaios de fase III e dados de farmacocinética da população indicaram que o valor acima do MIC foi obtido em mais de 90 % dos doentes com pneumonia nosocomial, infecções complicadas das vias urinárias e infecções intra-abdominais complicadas para todos os graus de função renal (ACBB, 2008).

3.2.12 Interações

Estudos *in vitro* de hepatócitos e microssomas hepáticos humanos indicaram que doripenem não inibe ou induz as isoenzimas do citocromo P450. Portanto, não são esperadas alterações na depuração dos medicamentos que são metabolizados por esta via metabólica (ACBB, 2008). Entretanto, Chahine e colaboradores (2010) observaram que a co-administração de doripenem e ácido valpróico reduz significativamente os níveis séricos de ácido valpróico abaixo do espectro terapêutico, podendo desencadear crises em pacientes que sofrem de convulsão. O mecanismo desta alteração ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que haja interação através do metabolismo principal do ácido valpróico. Este tipo de interação foi também observado para outras carbapenemas como imipenem e meropenem (CHAHINE *et al.*, 2010). Outra interação foi observada entre probenecida e betalactâmicos. Como o doripenem é eliminado principalmente por filtração glomerular e secreção tubular, a administração concomitante com probenecida resulta na redução da depuração de doripenem (KEAM, 2008). Outras interações não são descartadas, principalmente de medicamentos eliminados por secreção tubular renal.

3.2.13 Toxicidade

Com base em estudos convencionais sobre segurança farmacológica e genotoxicidade, dados clínicos revelam que não há risco potencial para o uso humano. Não foi observada qualquer toxicidade reprodutiva nos estudos realizados em ratos e coelhos. Contudo, estes estudos apresentam uma relevância limitada devido a única administração por dia, o que resulta numa exposição inferior a 10% da duração da exposição diária nos animais. Doripenem não demonstrou ser mutagênico, nem alterar a parte reprodutiva, bem como não evidenciou hepatotoxicidade ou imunotoxicidade (EMEA, 2008).

3.2.14 Reações Adversas

As reações adversas são classificadas entre (EMEA, 2008):

- Muito freqüentes (>10 %): Dor de cabeça;
- Freqüentes (entre 1 e 10 %): Erupção cutânea, coceira ou urticária, diarreia, náuseas, reações cutâneas no local da perfusão intravenosa, infecções fúngicas (candidíases) na boca ou vagina, aumento do nível de algumas enzimas hepáticas;
- Pouco freqüentes (<1 %): Inflamação intestinal com diarreia, redução da contagem plaquetária, redução da contagem de glóbulos brancos, súbito inchaço dos lábios, face, garganta ou língua, exantema, dificuldade ao engolir ou respirar.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Diversos trabalhos científicos têm avaliado a atividade *in vitro* do doripenem frente a inúmeros patógenos a fim de demonstrar seu amplo espectro de ação como grande diferencial. Assim, estudos *in vitro* indicam que doripenem apresenta uma combinação da atividade intrínseca do meropenem contra patógenos gram-negativos com a atividade do imipenem contra patógenos gram-positivos (WALSH, 2007; SAHM, 2009). Também é notável o fato de sua atividade *in vitro* contra patógenos gram-negativos, em particular a potência contra *P. aeruginosa* (GOLDSTEIN e CITRON, 2009). Sahm (2009) mostrou que o MIC (*minimal inhibitory concentration*) para inibir 90% (MIC₉₀) de todos os isolados de *P. aeruginosa* foi de 4 µg/mL, ou seja, de 2 a 4 vezes menor do que os valores correspondentes MIC₉₀ de meropenem e imipenem. Desta forma, tais achados experimentais sugerem que doripenem representa uma opção valiosa quando é utilizado no tratamento de infecções graves.

Ge e colaboradores (2004) estudou diferentes bactérias com o objetivo de determinar o MIC₉₀. O resultado obtido para espécies de enterobactérias variou de 0,03 a 1 µg/mL, para estafilococos oxacilina sensíveis de 0,03 a 0,12 µg/mL, estafilococos resistentes à oxacilina de 4 a 32 µg/mL, estreptococos sensíveis à penicilina de 0,008 a 0,06 µg/mL e estreptococos resistentes à penicilina de 1 a 4 µg/mL. De modo geral, doripenem demonstrou atividade *in vitro* semelhante à do meropenem contra patógenos gram-negativos e ao do imipenem contra patógenos gram-positivos. Portanto, o fármaco alia as qualidades positivas do imipenem e meropenem, além de promover um aumento de atividade para ambos (GE *et al.*, 2004; WALSH, 2007).

Para enterobactérias, Jones e colaboradores (2004) encontraram um MIC₉₀ de 30 µg/L para doripenem, demonstrando ser de duas a 16 vezes mais potente que o imipenem e comparável ao ertapenem e meropenem. Todos os valores de MIC do doripenem contra bacilos entéricos foram menores que 4 µg/mL. Sendo assim, é sugerido que doripenem possa ser uma potente carbapenema com espectro

semelhante às outras comercializadas, mas com maior atividade quando testado contra algumas cepas bacilares não fermentadoras

Doripenem apresentou MIC₅₀ de 0,125 µg/mL e MIC₉₀ de 1 µg/mL em teste realizado por Credito e colaboradores (2008) contra 447 linhagens de anaeróbios. O fármaco apontou alta atividade bactericida quando comparado com outros carbapenêmicos, eliminando 99,9% das 11 cepas testadas após 48 h. O amplo espectro de atividade contra *Enterobacteriaceae* e bactérias gram-positivas não fermentadoras parece ser promissor em terapia única de infecções mistas aeróbica e em organismos anaeróbicos.

Os resultados obtidos por Bhavnani e colaboradores (2005), através da simulação de um modelo farmacocinético de uma população, demonstraram que a administração de 500 mg de doripenem por 1 h, a cada 8 h, é eficaz contra cepas bacterianas, apresentando MICs menores que 2 µg/mL. Em cepas menos sensíveis o autor sugere maior tempo de tratamento com infusões mais prolongadas.

De acordo com Goldstein e Citron (2009), doripenem apresenta atividade contra quase todos os gêneros e espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, bactérias anaeróbicas *in vitro*, incluindo as espécies do grupo *B. fragilis*. Embora a resistência seja possível, continua a ser relativamente rara. Além disso, doripenem foi considerado eficaz no modelo animal e no relato de estudos clínicos de mistura aeróbica/anaeróbia em infecções intra-abdominais complicadas.

Kaniga e colaboradores (2010) sugerem que as carbapenemas são mais ativas quando comparadas a outras classes de antibióticos para o tratamento de infecções causadas por cepas de *Enterobacteriaceae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e gêneros *Enterobacteriaceae* resistentes à ciprofloxacina. Doripenem demonstrou baixo MIC₉₀ para *enterobacteriaceae* resistentes à ciprofloxacina (0,5 µg/mL) e cepas ESBL (0,25 µg/mL). Também foi clinicamente eficaz nas infecções causadas por *Enterobacteriaceae*. Portanto, estes resultados indicam

que doripenem é uma importante opção terapêutica para o tratamento de graves infecções causadas por cepas ESBL e *Enterobacteriaceae* resistentes à ciprofloxacina.

Na erradicação de pseudomonas, o fármaco comprovou ser superior em relação ao meropenem. Em dois estudos clínicos realizados para infecção intra-abdominal complicada, doripenem curou 95 % e 76 % dos pacientes, respectivamente, enquanto meropenem apenas 79 % e 69 %. Salienta-se que doripenem foi aprovado nos Estados Unidos para uso no tratamento da pneumonia nosocomial, uma das infecções mais comuns em unidades de terapia intensiva sendo responsável por cerca de 15% de todas as infecções hospitalares (DRUG DEVELOPMENT, 2011).

Christiansen e colaboradores (2010) estudaram a atividade das carbapenemas imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem a fim de determinar a potência *in vitro* de cada fármaco. Foram coletadas 1.612 amostras de bactérias de oito países na região Ásia-Pacífico para a determinação da MIC dos carbapenemas. Doripenem mostrou atividade *in vitro* semelhante ou melhor quando comparado ao meropenem e pelo menos quatro vezes melhor ao imipenem contra *Enterobacteriaceae*.

Em estudos de fase III, doripenem demonstrou não ser inferior ao meropenem no tratamento de infecções do trato gastrointestinal complicado, bem como não inferior a levofloxacina no tratamento do trato urinário complicado, e não inferior ao imipenem e piperaciclina/tazobactam no tratamento contra pneumonia nosocomial (EMEA, 2008).

Devido aos crescentes desafios apresentados pelos microrganismos multi-fármacos resistentes e betalactamases de espectro estendido, os carbapenêmicos estão assumindo um importante papel no tratamento de infecções graves (NICOLAU, 2008). Por isso, Matthews e Lancaster (2009) salientam a importância de reservar o uso de doripenem para infecções de suspeita de bactérias multi-resistentes a fim de preservar sua eficácia.

3.4 EFICÁCIA CLÍNICA

Ao comparar a eficácia do imipenem e doripenem em pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica, o emprego de doripenem pode representar uma economia e um benefício clínico para os pacientes e hospitais (MERCHANT *et al.*, 2008). A prevalência da resistência adquirida pode variar geograficamente e com o tempo para espécies selecionadas, considerando-se desejável dispor de informações sobre a resistência, em especial quando se tratam infecções graves.

Dada a sua recente descoberta, doripenem tem sido estudado quanto à atividade antibacteriana e sua eficácia clínica. A Tabela 1 ilustra, de forma resumida, o espectro de ação do doripenem, bem como os valores de MIC frente aos microrganismos de isolados clínicos.

Tabela 1. Valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ do doripenem frente a isolados clínicos

Microrganismo	n	Intervalo (µg/mL)	MIC₅₀	MIC₉₀
Bactérias aeróbias Gram-Positivas				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	475	≤ 0,06-1	≤ 0,06	0,5
<i>Streptococcus intermedius</i>	86	≤ 0,015 – 0,12	0,03	0,03
<i>Streptococcus constellatus</i>	15	≤ 0,015 – 0,12	0,03	0,012
<i>Staphylococcus aureus (MSSA)</i>	759	≤ 0,06 – 2	≤ 0,06	≤ 0,06
Bactérias aeróbias Gram-Negativas				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3331	≤ 0,5 ≥ 8	≤ 2	≥ 8
<i>Enterobacter cloacae</i>	41	≤ 0,03-1	0,12	0,5
<i>Escherichia coli</i>	1008	≤ 0,06-0,25	0,06	≤ 0,06
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	191	≤ 0,015-1	≤ 0,10	≤ 0,20
<i>Haemophilus influenzae</i>	81	≤ 0,06-0,5	0,12	0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	125	≤ 0,06-1	0,12	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	522	≤ 0,06-8	0,5	4
Anaeróbias				
<i>Bacteroides fragilis</i>	116	0,25 – 16	0,5	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	44	0,12 – 2	0,5	1
<i>Bacteroides caccae</i>	46	0,12 – 8	0,25	0,5
<i>Bacteroides uniformis</i>	38	0,12 – 8	0,25	0,5
<i>Bacteroides vulgatus</i>	21	0,12 – 8	0,12	0,25
<i>Peptostreptococcus micros</i>	30	≤ 0,03 – 0,25	0,06	0,25

Fonte: EMEA, 2008

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos é extremamente variável entre regiões e origem hospitalar. Algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo, como é o caso do *S. aureus*, enquanto que outras mantêm em todos os países uma notável sensibilidade a

alguns fármacos. Dentre os microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos ao longo dos anos, destacam-se os estafilococos, as enterobactérias, a *P. aeruginosa*, o *Acinetobacter baumannii* e, mais recentemente, os hemófilos, gonococos, enterococos e pneumococos (TAVARES, 2000).

Diante deste panorama, a resistência entre as bactérias vem se tornando um problema na terapêutica anti-infecciosa. E, em vista disso, é motivo de grande preocupação entre os cientistas, os microbiologistas e profissionais da saúde.

3.5 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

Em todas as carbapenemas, o anel betalactâmico é necessário para sua atividade antibacteriana. Além disso, o anel biciclo fundido é uma das principais razões para a instabilidade desta classe (CIELECKA-PIONTEK e JELINSKA 2011; CIELECKA-PIONTEK *et al.* 2011).

O anel das carbapenemas é formado pela condensação azobiciclo de um anel betalactâmico e uma pirrolidina de 5 membros e insaturados. A posição 4 apresenta um átomo de nitrogênio e há ligação insaturada entre C2 e C3 (Figura 4).

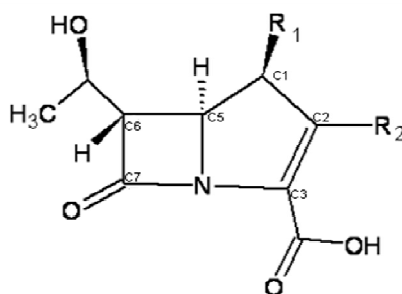


Figura 4. Estrutura básica das carbapenemas.

3.5.1 Substituições em C-1

Na tienamicina e no imipenem, a ausência de substituintes na posição C1 confere vulnerabilidade à ação da DHP-I, além de proporcionar nefrotoxicidade. Já o meropenem, ertapenem e doripenem apresentam uma metila (1- β -metil) no C1, responsável por uma maior estabilidade frente à degradação enzimática (MARTÍNEZ *et al.*, 2010; HAMMOND, 2004), além de proporcionar uma redução da produção de betalactamases de *P. aeruginosa* (KANAZAWA *et al.*, 1999).

3.5.2 Substituições em C-2

No imipenem (ver pag. 9), o C2 apresenta uma cadeia que apresenta boa atividade contra as bactérias gram-positivas. Já o meropenem é substituído por um grupo mais hidrofóbico que aumenta a atividade contra bactérias gram-negativas e diminui a atividade contra gram-positivos, além de estar diretamente relacionado a redução do efeito convulsionante. Já o ertapenem apresenta um radical carboxílico no C2 que, devido a ionização em pH fisiológico, fornece uma carga negativa e uma maior fixação na proteína, aumentando tempo de meia-vida de eliminação. Desta forma, é possível uma única administração diária. A baixa eficácia do ertapenem contra *P. aeruginosa* pode estar relacionado com a maior lipofilicidade e alto peso molecular que prejudicam a passagem do antibiótico através dos canais de porinas, pois o fármaco não atinge a concentração adequada no espaço periplasmático (MARTINEZ *et al.*, 1999). No doripenem, a cadeia lateral alia a atividade de meropenem e imipenem contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de ser responsável pela atividade contra bacilos gram-negativos não-fermentadores (MATTHEWS e LANCASTER, 2009). A sua menor basicidade, em comparação com outras carbapenemas, determina o aumento da atividade da molécula contra o *P. Aeruginosa*.

3.5.3 Substituições em C-6

A alta resistência das carbapenemas frente às betalactamases é atribuída à configuração *trans* do grupamento hidroxietil ligado ao anel betalactâmico (HAMMOND, 2004). Nas penicilinas e cefalosporinas, estes substituintes possuem a configuração *cis* (CRAIG, 1997).

De maneira geral, em relação a atividade contra *P. Aeruginosa*, a adição de um grupamento básico na posição 1 e 6 de uma carbapenema que já apresenta um grupamento básico na posição 2, dissocia a dependência dos canais D2 de porina para sua maior atividade (FUNG-TOMC *et al.*, 1995).

Em comparação ao maior peso molecular do ertapenem (475,51 Da), o imipenem, meropenem e doripenem (317,26, 437,51 e 420,51 Da, respectivamente), apresentam substituintes hidrofílicos e estrutura compacta que permite a rápida penetração nos canais de porinas. Esta diferença caracteriza e justifica o maior tempo de meia vida do ertapenem e a menor atividade frente a alguns microrganismos (KEAM, 2008).

Embora diversas alterações estruturais já tenham sido realizadas, ainda não foi possível melhorar a estabilidade das carbapenemas. Desta forma, esta classe ainda continua suscetível a degradação química sob a influência de diferentes fatores como temperatura, luz e oxidantes em soluções aquosas e em estado sólido (CIELECKA-PIONTEK e JELINSKA, 2010).

3.6 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA

3.6.1 Métodos analíticos para a quantificação

Dailly e colaboradores (2011) desenvolveram método por CLAE com detecção ultravioleta com o objetivo de determinar simultaneamente as concentrações de imipenem, doripenem, meropenem e ertapenem em plasma humano. Este método demonstrou-se específico, exato, preciso, sensível, rápido (7 minutos de análise), linear com limite de quantificação de 0,50 mg/L para todas as carbapenemas. A fase móvel utilizada para análise foi metanol e tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH = 7,0) com gradiente. A percentagem de metanol foi aumentada progressivamente a fim de diminuir o tempo de análise. A separação cromatográfica foi realizada à temperatura ambiente e a detecção UV em 295 nm.

Sutherland e Nicolau (2007) empregaram a CLAE e extração em fase sólida para o desenvolvimento de um método para análise do doripenem no soro humano e de rato. Para a análise foi utilizada coluna em fase reversa (C18) e detector UV em 295 nm. A fase móvel consistiu de metanol e tampão fosfato com vazão de 1,5 mL/min. O meropenem foi utilizado como padrão interno. A curva padrão foi linear num intervalo de 0,5-40 µg/mL. O teste demonstrou ser simples, reprodutível e preciso.

Ikeda e colaboradores (2008) desenvolveram método por CLAE a fim de quantificar o doripenem em plasma humano e fluido peritoneal. O fármaco foi estabilizado com a mistura imediata do plasma ou do líquido peritoneal com tampão 3-morfolino propano sulfônico (pH 7,0) 1 M. Doripenem e o padrão interno foram detectados em 300 nm. As curvas padrão para doripenem em plasma humano e fluido peritoneal apresentaram linearidade entre 0,05-100 µg/mL. Para o plasma, a precisão intra e interdias foi menor que 3,41%, e a recuperação entre 97,4 e 101,7%. Para o líquido peritoneal, a precisão intra e interdias foram inferiores a 2,98%, e a exatidão entre 94,4 e 103,9%. O limite de detecção foi de 0,02 µg/mL no plasma e no líquido

peritoneal. O teste foi aplicado à monitorização terapêutica de doripenem no plasma e no líquido peritoneal.

Um método espectrofotométrico por UV-derivada foi desenvolvido por Cielecka-Piontek e Jelinska (2010) para a determinação quantitativa de doripenem na forma farmacêutica injetável na presença de seus produtos de degradação empregando a primeira derivada. O comprimento de onda aplicado para dosar o doripenem e seus produtos foi 324 nm. O método foi linear na faixa de concentração $(0,42-11,30) \times 10^{-2}$ mg/L ($r=0,9981$). A recuperação de doripenem variou de 99,85 a 102,97 % em forma farmacêutica.

Grande parte dos métodos analíticos envolve determinação e quantificação de doripenem em fluido biológico, entretanto, poucos estudos apontam para a área do controle de qualidade de medicamentos. Sendo assim, Michalska e colaboradores (2011) utilizaram a eletroforese capilar de zona em solução livre empregando tampão de pH ácido para a separação de doripenem e seus produtos de degradação. O tampão utilizado para o monitoramento dos produtos de degradação foi fosfato de potássio 100 mM em pH 2,9 com a adição de 10 % de metanol. Para verificar os produtos de degradação formados, as soluções a 7,7 mg/mL de doripenem foram submetidas a diferentes temperaturas, meio ácido (0,1 M HCl), alcalino (0,1 M NaOH), oxidação (3% H₂O₂) e luz, por tempos determinados. Os autores observaram a formação de onze produtos de degradação oriundos de diferentes condições de degradação a 214 nm. Estes produtos de degradação apresentaram separação adequada pela técnica eletroforética, porém, não foram identificados. O comprimento de onda de 300 nm foi empregado para o monitoramento do fármaco, enquanto o de 230 e 214 nm para produtos de degradação e o metabólito M1, respectivamente. A aplicação de eletroforese capilar permitiu a separação rápida (20 minutos), simples e eficaz de doripenem de seus produtos de degradação, através de um método de detecção de absorção na região de ultravioleta. Quando comparado com o método para CLAE (60 minutos), a eletroforese apresentou maior rapidez de análise.

Outro trabalho que envolve controle de qualidade de fármacos é descrito por Mantovani e colaboradores (2012) que desenvolveram um estudo de estabilidade empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (CLAE-UV) para a determinação de doripenem. Também foi realizado um estudo de degradação térmica, oxidação, condições de stress ácidas e básicas. A separação cromatográfica foi obtida através de um sistema em fase reversa, comprimento de onda 298 nm, eluição isocrática a partir de tampão fosfato monobásico (pH 4,8) e acetonitrila (96:04). O tempo de retenção de doripenem foi de 7,35 minutos. Desta forma, o método desenvolvido demonstrou ser específico, linear de 5-50 µg/mL ($r = 0,999$), preciso, exato e robusto, ou seja, confiável para análises de rotina.

Diante da escassez da literatura em controle de qualidade do doripenem na forma de infusão, salienta-se a importância da busca constante de métodos analíticos confiáveis, visto que as análises realizadas são determinantes para a liberação ou rejeição de um produto farmacêutico na indústria.

3.6.2 Métodos analíticos para verificação da estabilidade

O doripenem é acondicionado em frascos de vidro e pode ser utilizado até dois anos após a fabricação. Segundo o fabricante, as soluções reconstituídas no frasco com água ou cloreto de sódio a 0,9 % podem ser mantidas até 1 hora nesta condição, desde que submetidas à temperatura inferior a 30 °C. A segunda diluição, realizada na bolsa para infusão, pode ser feita em cloreto de sódio 0,9 % ou dextrose 50 mg/mL (5%). A conservação na bolsa de infusão deverá ser à temperatura ambiente ou sob refrigeração seguindo as recomendações da bula, indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Estabilidade das soluções de doripenem em soluções para perfusão

Solução para perfusão	Solução armazenada a temperatura ambiente	Solução conservada sob refrigeração (4-8 °C)
Cloreto de sódio 9 mg/mL (0,9%) solução para injeção	12 h	72 h
Dextrose 50 mg/mL (5%) solução para injeção	4 h	24 h

Fonte: EMEA, 2008

A estabilidade do medicamento pode ser definida como a capacidade que uma determinada formulação possui em manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas durante um período determinado (O'DONNELL e BOKSER, 2006). Esta estabilidade depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades químicas e físicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedade dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

De modo geral, é adotada como norma que o produto que apresentar valor de doseamento menor que 90 % do teor declarado é considerado inadequado ao uso (RHODES, 2000). Para produtos que requerem reconstituição ou diluição, como no caso do doripenem, é obrigatória a comprovação da estabilidade pelo período especificado nas condições de armazenamento determinadas (BRASIL, 2005). Sendo assim, torna-se de fundamental importância a avaliação da estabilidade dos medicamentos, de forma a assegurar a identidade, eficácia, potência, segurança e a pureza até o momento de seu uso (NUDELMAN, 1975; MATTHEWS e LANCASTER, 2009).

Diante destas informações, Psathas e colaboradores (2008) testaram a estabilidade de doripenem em três lotes de medicamento com concentração de 50 mg/mL. O método por CLAE empregou uma coluna C18 e como fase móvel tampão fosfato 2 mM, pH 5,6 e acetonitrila (97:03 v/v). A análise foi monitorada com comprimento de onda de 300 nm e obteve um tempo de retenção de 15 minutos. Para a análise dos produtos relacionados (impurezas relativas) a fase móvel empregada foi 15 mM de tampão fosfato e acetonitrila (97:3 v/v) com gradiente e comprimento de onda de 230 nm. As amostras analisadas permaneceram inalteradas por até 60 minutos em condições de temperatura ambiente ou sob refrigeração antes da transferência para bolsas de infusão. Doripenem 5 mg/mL demonstrou ser estável por até 12 horas *in vitro* em solução de cloreto de sódio a 0,9 % em temperatura ambiente. Portanto, doripenem pode ser reconstituído, misturado em fluidos de perfusão, armazenado e, posteriormente, administrado a um paciente dentro de um período de tempo adequado para 4 horas de infusão. Foram detectados oito produtos de degradação formados, entre estes o dímero formado com moléculas do produto de degradação provenientes do rompimento do anel betalactâmico (DP-5) (Figura 5).

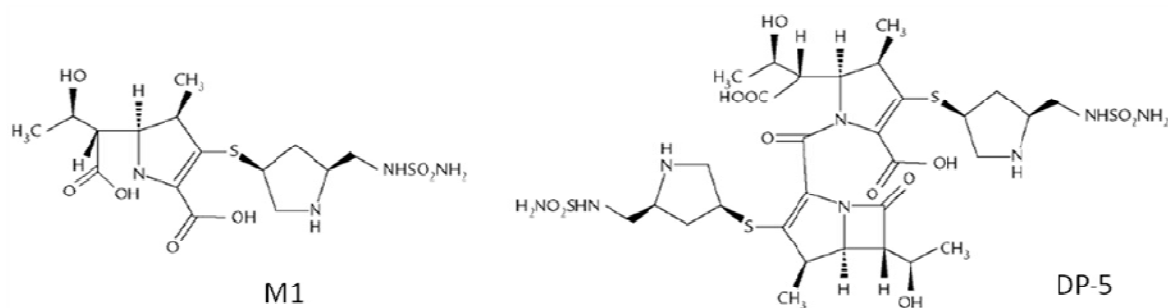


Figura 5: Produtos formados pela degradação do doripenem. O M1 representa o rompimento do anel betalactâmico, e o DP-5 a formação do dímero de duas moléculas de M1 (Adaptado de PSATHAS *et al.*, 2009; MICHALSKA *et al.*, 2011).

Keel e colaboradores (2011) testaram a estabilidade das carbapenemas imipenem, meropenem e doripenem por CLAE. Estas, quando submetidas a temperatura de 30 °C foram estáveis por 6, 12 e 16 h, respectivamente. Contudo, a estabilidade foi reduzida para 4, 8 e 12 h quando armazenadas a 35 °C e para 3, 6 e 8 h a 40 °C. Soluções de doripenem e meropenem tiveram alteração na coloração de incolor a ligeiramente amarelo, enquanto o imipenem variou de incolor a marrom. Mesmo assim, nenhuma precipitação ocasionada pela degradação foi observada nas suspensões avaliadas. O pH variou 4,26 a 5,28, 4,63 a 7,44 e 7,33 a 7,74 para doripenem, imipenem e meropenem, respectivamente.

O efeito catalítico de tampões (fosfato, acetato, borato, carbonato) também foi estudado como fator de interferência na degradação de doripenem em soluções aquosas no intervalo de pH 0,82 a 11,56 utilizando a concentração de 0,50 mol/L através do CLAE-UV. A catálise ácido-base geral foi observada em todos os tampões. De modo geral, a catálise ácido-base específica de doripenem envolve a degradação de moléculas e íons protonados de doripenem catalisada por íons de hidrogênio, a degradação espontânea de íons sob a influência de água, degradação de íons e de ânions catalisada por íons hidróxido. Doripenem demonstra maior estabilidade em pH em torno de 6,0 (CIELECKA-PIONTEK e JELINSKA, 2010).

Diante da recente utilização e importância do doripenem na terapêutica antimicrobiana, aliada à necessidade de controle de qualidade efetivo de preparações contendo este fármaco, salienta-se a necessidade do estudo de compreensão do processo de degradação frente a diferentes condições de instabilidade.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Desde o início da década de oitenta, os processos de validação têm sido desenvolvidos sob as orientações da regulamentação das Boas Práticas de Fabricação, servindo a órgãos como *Food and Drug Administration* (FDA) e à indústria farmacêutica.

A confiança no método analítico é assegurada através do processo de validação, o qual permite comprovar que o método utilizado é adequado para o fim pelo qual foi desenvolvido, ou seja, é capaz de prover resultados consistentes e com credibilidade (ICH, 2005; CAUSON, 1997; USP 34, 2011). O objetivo de uma validação é demonstrar que o método de análise de fármacos é apropriado à finalidade pretendida e deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Os parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação dos métodos de análise incluem a linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limites de detecção e quantificação e robustez (ICH, 2005; ANVISA, 2003; USP 34, 2011). A partir da determinação destes parâmetros analíticos é permitido o julgamento da confiabilidade do método em estudo (BRITAIN, 1998). A validação não infere que o método é livre de erros, mas confirma que é adequado para a proposta (MEHTA, 1997)

O ICH (2005) divide os métodos analíticos em três categorias contemplando os testes de identificação, testes de impurezas (teste quantitativo e teste limite) e os ensaios para determinação quantitativa, sejam para avaliação da potência (teor) do fármaco ou para a verificação do perfil de dissolução de amostras específicas. Para a validação de um método analítico devem ser analisados parâmetros como especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Salienta-se que é de responsabilidade do analista identificar os parâmetros que são relevantes para o desempenho do processo analítico e desenvolver protocolos próprios de validação, incluindo critérios de confiabilidade e o desenvolvimento de uma análise apropriada (ERMER, 2001).