

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FÁBIO DE SOUZA BARBOSA

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA, ESTUDO CINÉTICO E PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO DO ANTIBIÓTICO DORIPENEM**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Uruguaiiana
2015**

FÁBIO DE SOUZA BARBOSA

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA, ESTUDO CINÉTICO E PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO DO ANTIBIÓTICO DORIPENEM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

FÁBIO DE SOUZA BARBOSA

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA, ESTABILIDADE CINÉTICA E PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO DO ANTIBIÓTICO DORIPENEM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Dissertação defendida e aprovada em 17 de 7 de 2015

Banca examinadora

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
(orientador)
(UFRGS)

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim
(UNIPAMPA)

Profa. Dr. Nadia Maria Volpato
(UFRGS)

**Uruguaiana
2015**

Agradecimentos

À minha família, meu pai Júlio Cesar, minha mãe Flávia Regina e a minha irmã Luciane.

Ao Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez pela orientação desde a graduação que contribuiu muito para meu desenvolvimento, e pelo exemplo profissional.

Aos colegas José Pedro, Luiz Batista e Everson Fialho, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do LDCQ, Hemerson Rosa, Willian Almeida, Gabriela Forest e Natana Beker pela amizade e pelas longas tardes de conversas.

Aos professores do PPGCF-UNIPAMPA, especialmente aos do laboratório LDCQ.

Ao Prof. Dr. Clésio Paim pelo auxílio no desenvolvimento da robustez do método, e ao Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula pela ajuda com a nomenclatura das moléculas.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

DETERMINAÇÃO ANALÍTICA, ESTUDO CINÉTICO E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ANTIBIÓTICO DORIPENEM

O doripenem é um antibiótico β -lactâmico de amplo espectro de ação. Pertencente ao grupo das carbapenemas, caracteriza-se por apresentar elevada potência e atividade frente à cepas Gram-negativas, produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e β -lactamases ampC. Apesar de sua grande importância clínica, os antibióticos carbapenêmicos não apresentam boa estabilidade quando em solução, o que é demonstrado em diversos trabalhos descritos na literatura científica. Para o doripenem, há vários trabalhos descritos na literatura que ressaltam sua importância clínica e sua atividade antibiótica. Porém, nota-se a escassez de trabalhos que enfoquem sua estabilidade físico-química, seus produtos e suas rotas de decomposição. O presente trabalho tem como objetivo a validação de um método analítico indicativo de estabilidade por ultra fast liquid chromatography (UFLC), e a avaliação da estabilidade do doripenem em solução, quando submetido a estresse térmico, oxidativo, fotólise e hidrólise em meio ácido e meio alcalino, e determinação da cinética química de decomposição. Para proposição da estrutura química dos produtos de degradação, foram realizadas análises por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS). O método cromatográfico descrito neste trabalho demonstrou-se adequado para determinação do doripenem na forma de pó para solução injetável, possuindo performance indicativa de estabilidade. A faixa linear do método foi de 5,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$, sem desvios de linearidade, sendo estatisticamente comprovada por meio de ANOVA. Com o auxílio do desenho experimental de Plackett–Burman, o método demonstrou-se robusto frente a uma série de fatores. O estudo de degradação forçada demonstrou a susceptibilidade do doripenem a diversos fatores de degradação, com acentuada instabilidade frente à hidrólise ácida e alcalina, observando-se degradação aproximada de 60% do seu teor em apenas 2 minutos sob condições alcalinas. A decomposição oxidativa do fármaco seguiu uma cinética de segunda ordem, com constante de velocidade de reação de 0,000086 e $0,00010\%^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, quando submetido à degradação em H_2O_2 a 3 e 10%, respectivamente. A decomposição térmica apresentou uma energia de ativação de

aproximadamente 15 Kcal/mol, valor característico de reações de hidrólise. E na análise cromatográfica com detecção por espectrometria de massas, observou-se que os principais produtos de degradação formados sob condições de termólise e oxidação, apresentam massas moleculares semelhantes, sendo possível a proposição da estrutura química dos mesmos.

Palavras-chave: Doripenem, Validação, UFLC, LC-MS, Estabilidade, Cinética de Degradação, Produtos de Degradação.

ABSTRACT

ANALYTICAL DETERMINATION, DECOMPOSITION KINETICS AND DEGRADATION PRODUCTS OF DORIPENEM

Doripenem is a β -lactam antibiotic with a broad spectrum of antimicrobial activity, including gram-negative strains, and producers of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and ampC β -lactamases ampC. Despite its great clinical importance, carbapenems do not show good stability when incorporated as solution, as reported in several studies. In reference to doripenem, several works have describing its clinical use, efficacy data and cases of resistance. However, few works mention the drug stability, in terms of degradation products and routes of decomposition. The present work aimed to develop and validate a stability-indicating method by ultra-fast liquid chromatograph (UFLC) for doripenem in powder for injection, purposing an evaluation of stability of reconstituted solution using stress conditions of heat, oxidation, acid hydrolysis, alkaline hydrolysis and photolysis. The chemical kinetic of decomposition was also assayed for thermal and oxidative degradation. For identification of degradation products, the degraded samples where submitted to analysis by LC-MS. The chromatographic method described here proved to be stability-indicating and suitable for the determination of doripenem in drug formulation. The method linearity was performed in the range of 5 to 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, whose correlation coefficient (r) was 0.9999. The robustness testing, assayed against a variety of factors, allowed verifying that the method accept small variations in routine analysis. The forced degradation demonstrated the susceptibility of doripenem to several decomposition factors, being intense the instability to acidic and alkaline hydrolysis. In basic media, the drug residual content was approximately 40% in 2 minutes. At oxidative decomposition, the drug follows second-order kinetics, with a rate reaction of 0.000086 and 0.00010 $\%^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively for H_2O_2 at 3.0 and 10.0 %. The thermal decomposition showed an activation energy of 15 kcal mol^{-1} , a characteristic value for hydrolysis reactions. The analysis by LC-MS revealed that the major degradation products formed under oxidizing conditions and thermolysis present molecular weight (411, 427, 437, 634, 650 and 664). The stability of doripenem must be carefully observed, mainly after reconstitution and storage in adverse conditions of temperature.

Keywords: Doripenem, Validation, UFLC, LC-MS, Stability, Kinetics of Degradation, Degradation Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da penicilina (A), cefalosporina (B) e carbapenema (C) (Fonte: KNAPP et al., 2001).....	21
Figura 2- Principais carbapenemas disponíveis no mercado (Fonte: MARTÍNES et al., 2010).	22
Figura 3- Estrutura química do doripenem (Fonte: ORTHO-MCNEIL JANSSEN PHARMACEUTICALS, 2009).....	23
Figura 4- Principais impurezas relacionadas ao doripenem: A) doripenem; B) “impureza 1” e C) “impureza 2” (Fonte: REDDY et al., 2014).....	28
Figura 5- Rota de degradação do imipenem para formação de seu derivado dimérico (Fonte: SMITH et al., 1990).....	29
Figura 6- Rota de degradação térmica do meropenem (Fonte: MENDEZ et al., 2007).	30
Figura 7- Produto de decomposição oriundo da degradação alcalina do meropenem (Fonte: MENDEZ et al., 2007).....	31
Figura 8- Produtos de degradação do ertapenem formados pela: quebra do anel β -lactâmico (A), dimerização (B), etanóis do anel β -lactâmico (C) e quebra da cadeia lateral (D) (Fonte: SANJONZ et al., 2006).....	32
Figura 9- Produto de degradação gerado pela dimerização do doripenem (Fonte: PSATHAS et al., 2008).....	33
Figura 10- Influência da concentração de acetonitrila na análise do doripenem por CLAE. Cromatogramas ilustrativos de análise com fase móvel contendo 6% de acetonitrila (A), 4% de acetonitrila (B) e 2% de acetonitrila (C). Análises realizadas com vazão de 0,2 mL/min.	47
Figura 11- Cromatograma demonstrativo da análise de SQR de doripenem (A) e amostra comercial de doripenem (B). Com fase móvel composta por ácido fosfórico 0,01% (pH 3,8):acetonitrila (98:02, v/v) com vazão de 0,4 mL/min e detecção em 298 nm.	48
Figura 12- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado durante 24 horas a 35 °C. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.....	50
Figura 13- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado em peróxido de hidrogênio a 3% durante 40 minutos. Análise realizada para avaliação	

da especificidade do método proposto por UFLC. *Pico referente à fenacetina, estabilizante presente no produto.	51
Figura 14- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado em ácido clorídrico 0,1 mol/L durante 10 minutos. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.	51
Figura 15- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado em hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 2 minutos. Análise realizada para a avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.	52
Figura 16- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem submetido à decomposição sob radiação sob radiação UV-A durante 6 horas. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.	52
Figura 17- Representação gráfica da curva padrão, construída através plotagem das médias das áreas obtidas versus a concentração de doripenem.....	53
Figura 18- Representação gráfica para reação de zero ordem, após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio à 3 e à 10%, em diferentes tempos de reação. Quantificação por CLAE. (▲) H ₂ O ₂ à 3%; (■) H ₂ O ₂ à 10%.....	69
Figura 19- Representação gráfica para uma reação de primeira ordem, após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio à 3 e à 10%, em diferentes tempos de reação. Plotagem do log da concentração residual de doripenem versus o tempo. Quantificação por CLAE. (▲) H ₂ O ₂ à 3%; (■) H ₂ O ₂ à 10%.	70
Figura 20- Representação gráfica para uma reação de segunda ordem, após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio à 3 e à 10%, em diferentes tempos de reação. Plotagem de 1 / concentração residual de doripenem versus tempo. Quantificação por CLAE. (▲) H ₂ O ₂ à 3%; (■) H ₂ O ₂ à 10%	70
Figura 21- Cromatograma ilustrativo da análise das amostras de doripenem submetidas à degradação oxidativa. A) doripenem degradado com peróxido de hidrogênio a 3% durante 75 minutos. B) doripenem SQR. * Pico referente à fenacetina, estabilizante presente no produto.	72
Figura 22- Representação gráfica para plotagem de cinética de decomposição térmica do doripenem seguindo primeira ordem, plotagem do log da concentração residual de doripenem x tempo (Fonte: Barbosa 2012).	74
Figura 23- Efeito da temperatura sobre a fração do número total de moléculas com energia igual ou superior a energia de ativação (Fonte: RUSSEL, 1994).	75

Figura 24- Representação de gráfico de Arrhenius obtido em estudo de degradação térmica do antibiótico doripenem.....	76
Figura 25- Cromatograma demonstrativo da degradação térmica do doripenem. (A) amostra degradada à 35 °C por 72 horas; (B) doripenem SQR.....	77
Figura 26- Estrutura química do doripenem e espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem sem degradação.....	78
Figura 27- Estrutura molecular do produto de degradação de <i>m/z</i> 437, formado a partir do rompimento do anel β-lactâmico e da oxidação da cadeia alcoólica do doripenem. E espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação oxidativa.....	79
Figura 28- Estrutura molecular do produto de decomposição de <i>m/z</i> 411 (4R,5R)-5-((R)-carboxy(hydroxy)methyl)-4-methyl-3-(((5S)-5((sulfamoylamino) methyl)pyrrolidin-3-yl)thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid formado a partir da hidrólise do anel β-lactâmico e alterações na cadeia lateral alcoólica. (A) espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação oxidativa e (B) espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação térmica.....	80
Figura 29- - Estrutura molecular do produto de decomposição de <i>m/z</i> 427 (5R)-5-((S)-1-carboxy-2,2-dihydroxyethyl)-3-(((5S)-5 ((sulfamoylamino) methyl) pyrrolidin-3-yl)thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid formado a partir da hidrólise do anel β-lactâmico e alterações na cadeia lateral alcoólica. (A) espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação oxidativa e (B) espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação térmica.....	81
Figura 30- Produto dimérico do doripenem formado através da condensação dos anéis β-lactâmicos (Fonte: REDDY et al., 2014).....	82
Figura 31- Estrutura molecular do produto de decomposição de <i>m/z</i> 664, formado a partir de quebras no dímero do doripenem. E espectro de massas da amostra de doripenem submetida a estresse térmico.....	82
Figura 32- Estrutura molecular do produto de decomposição de <i>m/z</i> 650, formado a partir de quebras no dímero do doripenem. E espectro de massas da amostra de doripenem submetida a estresse térmico.....	83

Figura 33- Estrutura molecular do produto de decomposição de m/z 634, formado a partir de quebras no dímero do doripenem. E espectro de massas da amostra de doripenem submetida a estresse térmico.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tempo necessário para atingir concentração menor que 90% da concentração inicial (adaptado de KEEL et al., 2011).....	32
Tabela 2- Valores de pH e vazões testadas para o desenvolvimento de método por UFLC.....	39
Tabela 3- Preparo das soluções para o teste de exatidão pelo método de recuperação de padrão, aplicado ao método cromatográfico por CLAE técnica fast para determinação de doripenem.....	42
Tabela 4- Fatores e níveis avaliados no teste de robustez para desenvolvimento de método por UFLC.....	43
Tabela 5- Desenho experimental de Plackett–Burman para determinação da robustez no desenvolvimento do método por UFLC.	44
Tabela 6- Valores de adequabilidade de sistema para as condições testadas no desenvolvimento do método cromatográfico.....	46
Tabela 7- Valores de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e valores recomendados para método por CLAE (FDA, 1994; SHABIR, 2003).....	49
Tabela 8- Áreas obtidas para obtenção da curva padrão na faixa de análise de 5,0 a 40,0 µg/mL, durante o desenvolvimento de método por UFLC para determinação do doripenem em pó para solução injetável.....	53
Tabela 9- Análise de variância dos resultados obtidos para linearidade do método por UFLC para determinação do doripenem em pó para solução injetável.....	54
Tabela 10- Resultados obtidos através do ensaio de precisão por UFLC para determinação de doripenem pó para solução injetável.	55
Tabela 11- Resultados obtidos através do ensaio de exatidão aplicado ao desenvolvimento de método por UFLC para determinação de doripenem pó para solução injetável.....	55
Tabela 12- Resultados dos efeitos e valores de t calculado para cada fator analisado no teste de robustez para o método por UFLC. Para determinação do doripenem em pó para solução injetável.....	56
Tabela 13- Teores obtidos no ensaio de robustez através do desenho experimental de Plackett–Burman aplicado ao desenvolvimento do método por UFLC para determinação de doripenem em pó para solução injetável.	56

Tabela 14- Teor residual do doripenem após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio à 3 e à 10%, em diferentes tempos de reação. Quantificação por CLAE.	67
Tabela 15- Valores de teor residual, logaritmo do teor residual e 1/ teor residual de doripenem, depois de submetido à degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio a 3% e a 10% em diferentes tempos.....	68
Tabela 16- Valores de coeficiente de correlação para as ordens de reação referentes à degradação oxidativa do doripenem.	69
Tabela 17- valores de velocidade de degradação do doripenem, obtidos segundo cinética oxidativa de segunda ordem.	71
Tabela 18- Valores de teor residual de doripenem para as amostras submetidas à degradação térmica a 25 °C, 35 °C e 45 °C. Dados analíticos obtidos através de metodologia por CLAE-UV (adaptado de BARBOSA 2012).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de Variância

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD -- Diode Array Detector

DPH-1 – Deidropeptidase-1

DPR – Desvio Padrão Relativo

EMA -- European Medicines Agency

FDA – Food and Drug Administration

GL – Graus de liberdade

LC-MS – Cromatógrafo a líquido acoplado a espectrômetro de massas

m/z – Relação massa/carga

PBP -- Penicillin-Binding Proteins

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SQR – Substância Química de Referência

UFLC – Ultra Fast Liquid Chromatograph

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 CARBAPENEMAS	21
3.2 DORIPENEM - ASPECTOS GERAIS	22
3.2.1 Características físico-químicas	23
3.2.2 Mecanismos de ação	24
3.2.3 Indicações	24
3.2.4 Atividade antimicrobiana	24
3.3 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA	25
3.4 ESTABILIDADE DE CARBAPENEMAS	28
CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR UFLC	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR).....	37
2.2 SOLVENTES E REAGENTES	37
2.3 EQUIPAMENTOS	37
2.4 METODOLOGIA	38
2.4.1 Desenvolvimento do método analítico	38

2.4.1.1 Preparo da amostras	38
2.4.1.2 Condições cromatográficas testadas	38
2.4.2 Validação do método analítico	39
2.4.2.1 Especificidade.....	39
2.4.2.2 Linearidade.....	41
2.4.2.3 Precisão	41
2.4.2.4 Exatidão	42
2.4.2.5 Robustez	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	45
3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	49
3.2.1 Especificidade	49
3.2.2 Linearidade	52
3.2.3 Precisão	54
3.2.4 Exatidão	55
3.2.5 Robustez	55
4 CONCLUSÕES	58
CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E TÉRMICA DO ANTIBIÓTICO DORIPENEM, CINÉTICA E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	59
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAIS E MÉTODOS	62
2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA	62
2.2 SOLVENTES E REAGENTES	62

2.3 EQUIPAMENTOS	62
2.4 METODOLOGIA	63
2.4.1 Cinética de degradação oxidativa	63
2.4.1.1 Preparo das amostras	63
2.4.1.2 Quantificação das amostras	63
2.4.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos	64
2.4.2 Estabilidade térmica	64
2.4.3 Análise por LC-MS	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO OXIDATIVA	66
3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA	72
3.3 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR LC-MS	77
4 CONCLUSÕES	86
Referências bibliográficas	87
Anexo 1.....	91

1 INTRODUÇÃO

As carbapenemas são os antibióticos β -lactâmicos dotados de maior espectro de ação e resistência a enzimas β -lactamases. O primeiro representante da classe das carbapenemas foi a tienamicina, isolada a partir do fungo *Streptomyces cattley* em 1979. A tienamicina já apresentava boa atividade antimicrobiana, porém, era instável quimicamente e potencialmente nefrotóxica. Em 1985 foi aprovado o primeiro derivado carbapenêmico para terapêutica, o imipenem. Este surgiu como uma nova e eficaz alternativa no tratamento de infecções hospitalares graves. A partir do imipenem outros derivados carbapenêmicos entraram no mercado como o meropenem em 1993 e o ertapenem em 2001 (BIRNBAUM et al., 1985; MARTÍNES et al., 2010).

O doripenem foi inicialmente aprovado para uso em 2005 no Japão, sob o nome de Finibax[®]. Em 2007 o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso clínico do doripenem (Doribax[®]) nos Estados Unidos, sendo indicado para o tratamento de infecções nosocomiais mistas no trato urinário, infecções intra-abdominais e pneumonias associadas ou não ao uso de ventilação mecânica. Este antibiótico caracteriza-se por apresentar amplo espectro de ação, com atividade comparável ao imipenem em Gram-positivos, e comparável ao meropenem em Gram-negativos. Entre os derivados carbapenêmicos, o doripenem destaca-se pela sua elevada atividade frente a microrganismos problemáticos, resistentes a outros medicamentos, como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (EMEA, 2008; SAHM, 2009). Estudos *in vitro* demonstram que o doripenem apresenta significativa atividade contra estreptococos, estafilococos sensíveis à meticilina, *Enterobacteriaceae* (incluindo cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., e *Bacteróides fragilis* (PATERSON et al., 2009).

Apesar da elevada importância clínica, as carbapenemas não apresentam boa estabilidade em solução. Esta instabilidade é descrita em alguns artigos publicados na literatura (MENDEZ et al., 2007; SANJONZ et al., 2006; SMITH et al., 1990; SWANSON et al., 1986). A principal via de decomposição observada envolve o rompimento do anel β -lactâmico e a formação de dímeros, o que é favorecido pelo aumento da temperatura ou pela exposição a agentes catalíticos como ácidos ou básicos. Devido à necessidade de reconstituição para a administração e os períodos

de infusões que podem levar até quatro horas, tornam-se importantes os estudos acerca da estabilidade desta classe de medicamentos.

Sabendo que a degradação de um produto farmacêutico acarreta em sérias consequências, comprometendo sua qualidade, eficácia e segurança, é de suma importância estudar os aspectos de decomposição dos fármacos, de modo a orientar as melhores condições de manipulação e armazenamento dos mesmos, bem como o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas com performance indicativa de estabilidade, que proporcionem análises seguras das amostras oriundas de estudos de estabilidade.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento e validação de um método analítico indicativo de estabilidade por ultra fast liquid chromatography (UFLC) e a avaliação da estabilidade química do doripenem sob diferentes condições de estresse, com a obtenção de dados cinéticos, e a sugestão dos prováveis produtos majoritários de degradação por LC-MS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetiva o desenvolvimento e validação de um método analítico indicativo de estabilidade por UFLC, e a avaliação da estabilidade do antibiótico doripenem, com a determinação dos parâmetros cinéticos e a sugestão dos produtos de degradação majoritários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver e validar um método de análise por UFLC para quantificação do doripenem em produto farmacêutico;
- ✓ Avaliar a estabilidade do antibiótico doripenem, submetendo-o a estresse térmico, oxidativo, à hidrólise em meio ácido e alcalino e à fotólise.
- ✓ Traçar o perfil de decomposição cinética do doripenem quando submetido à termólise e oxidação;
- ✓ Propor os produtos de degradação do doripenem por LC-MS;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARBAPENEMAS

As carbapenemas constituem uma importante classe de antibióticos utilizados na terapêutica. Seu amplo espectro de ação e elevada potência tornam esta classe fundamental para o tratamento de infecções nosocomiais graves, principalmente geradas por bactérias gram-negativas multirresistentes (MARTÍNES et al., 2010). Estruturalmente são semelhantes às cefalosporinas e penicilinas (Figura 1), das quais diferem por apresentar a substituição de um átomo de enxofre por um carbono na posição 1, e uma insaturação entre os carbonos 2 e 3 no anel de cinco membros (KNAPP et al., 2001; MATTHEWS et al., 2010).

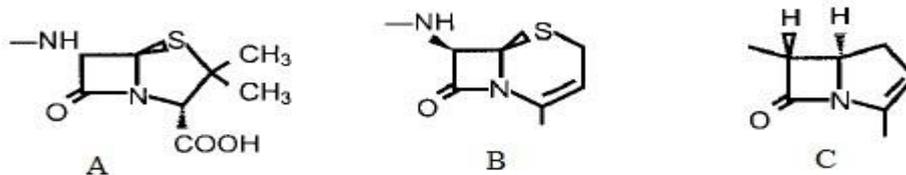


Figura 1- Estrutura molecular da penicilina (A), cefalosporina (B) e carbapenema (C) (Fonte: KNAPP et al., 2001).

A estrutura básica das carbapenemas é formada por um anel azabíciclo, obtido através da condensação de um anel β -lactâmico com um anel pirrolidínico de cinco membros que possui a substituição de um átomo de enxofre por um carbono na posição 1 (por isso a determinação “carba”), e uma insaturação entre os carbonos 2 e 3 (por isso a determinação “penema”). Também apresentam na posição 6 um radical hidroxietil na conformação *trans*, o que confere estabilidade frente a β -lactamases, e um ácido carboxílico na posição 3 importante para a atividade do anel β -lactâmico (KNAPP et al., 2001; MARTÍNES et al., 2010).

Os principais antibióticos carbapenêmicos disponíveis comercialmente são o imipenem (Primaxin[®]), meropenem (Merrem[®]), ertapenem (Invanz[®]) e doripenem (Doribax[®]), representados na Figura 2. Destes, o imipenem apresenta alta suscetibilidade à hidrólise pela enzima renal deidropeptidase I (DHP-I). Devido a isso é administrado na proporção 1:1 com a cilastatina sódica, que age inibindo reversivelmente a ação desta enzima. O primeiro antibiótico carbapenêmico resistente à hidrólise pela DHP-I foi o meropenem, que assim como o ertapenem e o

doripenem, apresenta o grupo 1- β -metil em sua estrutura, portanto não requer a administração de um inibidor da DPH-I (MARTÍNES et al., 2010).

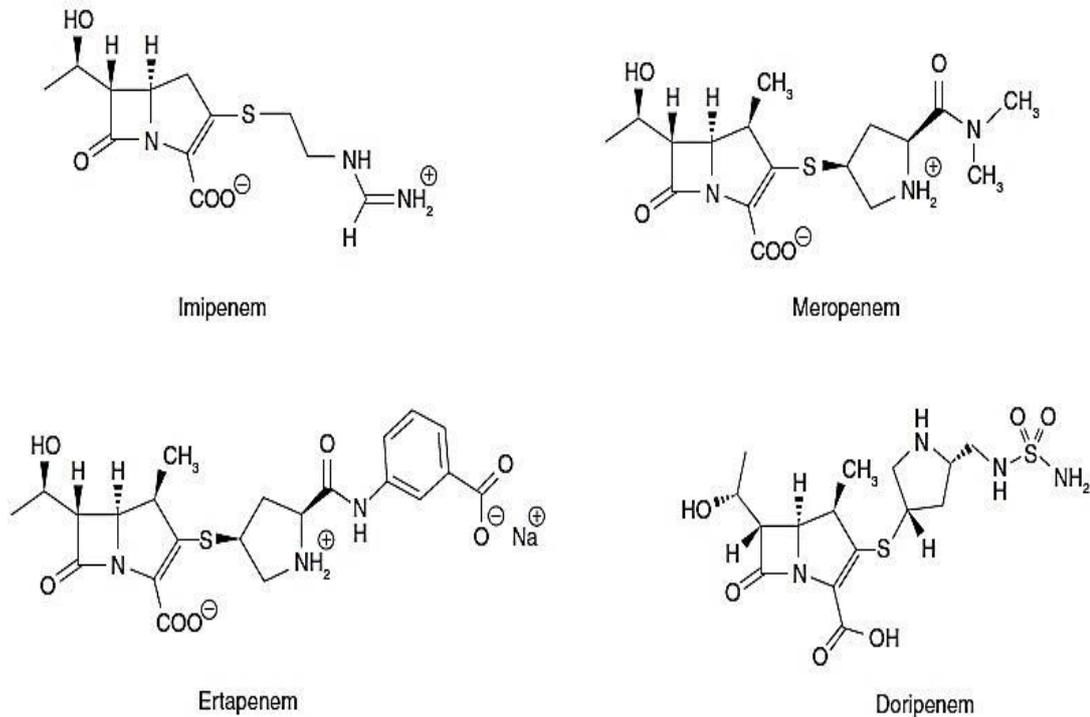


Figura 2- Principais carbapenemas disponíveis no mercado (Fonte: MARTÍNES et al., 2010).

3.2 DORIPENEM – ASPECTOS GERAIS

O doripenem é um antibiótico de amplo espectro de ação, que apresenta atividade frente à ampla gama de agentes patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos. Uma série de estudos *in vitro* fornecem informações importantes acerca do perfil de atividade microbiológica do doripenem, que demonstram sua relevância no contexto clínico. Os dados *in vitro* indicam que o doripenem combina a atividade intrínseca do meropenem contra patogênicos Gram-negativos e a atividade intrínseca de imipenem contra Gram-positivos. Também é notável o fato de o doripenem apresentar elevada atividade frente a microrganismos problemáticos, resistentes a outros medicamentos, como a *P. aeruginosa*. E sua característica de resistência à hidrólise por uma variedade de enzimas β -lactamases, incluindo penicilamases, cefalosporinases e β -lactamases de espectro estendido (EMEA, 2007; SAHM, 2009).

Este fármaco foi lançado para uso clínico em 2005 no Japão, com o nome de FINIBAX[®]. Em 2007, foi aprovado pelo FDA para uso nos Estados Unidos, sob o nome comercial de DORIBAX[®]. Em 2010 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o uso do doripenem no Brasil. Este é fabricado pela JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA, e comercializado com o nome de DORIPREX[®]. O doripenem não apresenta excipientes em sua formulação, e pode ser encontrado nas doses de 250 mg e 500 mg em forma farmacêutica de pó para solução injetável. (EMEA, 2007; PATERSON et al., 2009).

3.2.1 Características físico-químicas

- Aparência: pó branco ligeiramente amarelado;
- Nome químico: ácido (4R,5S,6S)-3-(((3S,5S)-5-[[aminosulfonyl]amino]methyl]-3-pyrrolidiny]thio]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo 1azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxílico;
- Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}N_4O_6S_2$;
- Massa molecular: 438,52 g/mol (doripenem mono-hidratado);
- pKa: pKa₁ 2,8 e pKa₂ 7,9 (em solução aquosa);
- Estrutura química: Ver Figura 3.

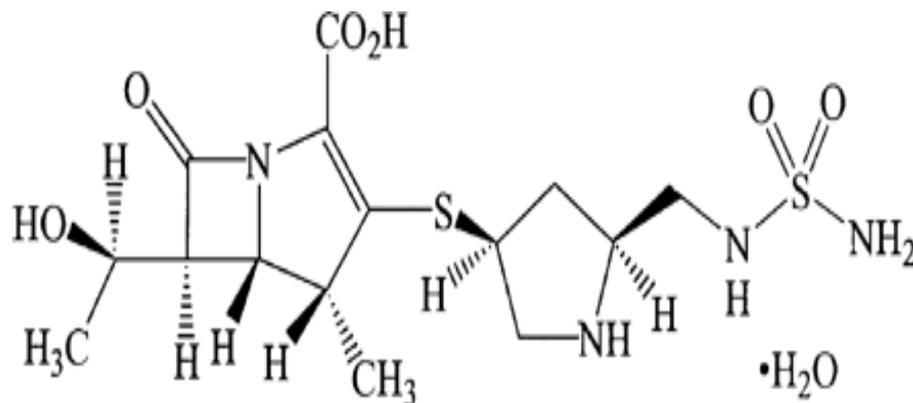


Figura 3- Estrutura química do doripenem (Fonte: ORTHO-MCNEIL JANSSEN PHARMACEUTICALS, 2009).

- solubilidade: O doripenem é solúvel em N,N-dimetilformamida, moderadamente solúvel em água e tampão pH 3-9, ligeiramente solúvel em metanol, e praticamente insolúvel em acetonitrila, etanol (99,5%), 2-propanol,

1-octanol, tetra-hidrofurano, acetato de etila e hexano, a 20 °C (ORTHO-MCNEIL JANSSEN PHARMACEUTICALS, 2009).

3.2.2 Mecanismo de ação

O doripenem age inibindo a síntese da parede celular bacteriana durante o processo de transpeptidação, ligando-se ao resíduo serina das transpeptidases, denominadas PBPs (penicillin-binding proteins), impedindo a formação de peptidoglicano, composto este fundamental que confere rigidez à parede celular bacteriana (KNAPP et al., 2001; MARTÍNES et al., 2010). O doripenem apresenta alta afinidade pelas enzimas PBP2 e PBP3 em *P. aeruginosa*, e PBP2 em *Escherichia coli*. Em geral, o perfil de ligação do doripenem PBPs se assemelha ao perfil do meropenem (PATERSON et al, 2009).

3.2.3 Indicações

O doripenem é utilizado no tratamento de infecções hospitalares moderadas e graves. É indicado principalmente para o tratamento de infecções mistas no trato urinário, infecções intra-abdominais, pielonefrites, e em pneumonias associadas ou não ao uso de ventilação mecânica (LIVERMORE, 2009; SAHM, 2009). A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) recomenda o uso de doripenem 500 mg em intervalos de 8 horas. Considerando que o tempo de infusão e a duração do tratamento dependem do tipo de infecção a ser tratada.

3.2.4 Atividade antimicrobiana

Alguns trabalhos publicados na relatam sua atividade antimicrobiana, principalmente frente a *P. aeruginosa* e o comparam com a atividade de outras carbapenemas (CASTANHEIRA et al., 2009; JONES et al., 2005; SAHM, 2009). Jones e colaboradores (2005) avaliaram a atividade do doripenem e de outros derivados carbapenêmicos frente a bacilos Gram-negativos. O estudo utiliza 380 amostras de cepas selvagens e subgrupos resistentes (produtoras de β -lactamases). Os resultados demonstram uma atividade do doripenem comparável ao meropenem,

e consistentemente superior à atividade do imipenem e ertapenem frente à *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Quando testada a suscetibilidade de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes a estes fármacos, 2% das cepas apresentaram-se suscetíveis ao meropenem e 22,4% suscetíveis ao doripenem. Estas cepas não apresentaram suscetibilidade ao imipenem e ertapenem.

Em trabalho realizado por Castanheira e colaboradores (2009), a atividade do doripenem é comparada com a de outras carbapenemas frente à *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa* e outros bacilos não-fermentadores. Os testes foram realizados em 14979 isolados clínicos, submetidos ao programa de vigilância global do doripenem, durante o período de 2003 a 2007. Todos os isolados foram testados utilizando o método de microdiluição, descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). No estudo foram utilizadas 9256 cepas de *P. aeruginosa* e 438 cepas de outras *Pseudomonas* spp., onde 77,2% das cepas *P. aeruginosa* apresentaram suscetibilidade ao doripenem, o mesmo observado para 82,9% das outras cepas de *Pseudomonas* spp. Avaliando-se a concentração inibitória mínima, o doripenem apresentou potência 2 vezes maiores que o imipenem e o meropenem.

Goldstein e Citron (2009) avaliaram a atividade do doripenem frente a microrganismos anaeróbicos. No estudo, o doripenem apresentou atividade *in vitro* contra quase todos os gêneros e espécies de bactérias anaeróbias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo espécies do grupo *B. fragilis*, com exceção de *S. wadsworthensis*. Esta atividade é comparável com outras carbapenemas existentes (ertapenem, meropenem). Embora a resistência seja possível, continua a ser relativamente rara. Este amplo espectro de ação torna possível seu uso clínico em monoterapia para o tratamento de infecções intra-abdominais mistas geradas por bactérias aeróbias e anaeróbias.

3.3 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA

Estão descritas na literatura diferentes técnicas para quantificação do doripenem em fluidos biológicos e em sua forma farmacêutica. Para quantificação em plasma e soro destacam-se os métodos cromatográficos, já para forma farmacêutica, encontram-se métodos por eletroforese capilar, espectrofotometria na região ultravioleta e métodos microbiológicos de quantificação.

Para análise simultânea de doripenem e de outras três carbapenemas em plasma humano, Dailly e colaboradores (2011) desenvolveram e validaram um método por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) com detecção ultravioleta em 295 nm. O método foi desenvolvido utilizando uma coluna de pentafluorofenil de tamanho de partícula 2,6 μm , e fase móvel composta por metanol (solvente A) e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L com pH ajustado para 7,0 (solvente B). A vazão utilizado foi 1,0 mL/min e a concentração de fase móvel variou de 0 a 30% do solvente A no tempo de 0 a 5 minutos de corrida. O método demonstrou ser rápido, com apenas 7 minutos de corrida, e com boa sensibilidade, com limite de quantificação de 0,50 mg/L para todas as carbapenemas.

Sutherland e Nicolau (2007) desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) utilizando extração em fase sólida para determinação do doripenem em soro humano e de rato. O método utiliza um sistema de fase reversa com coluna C-18 e fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato de potássio 0,026 mol/L e 4,35% de metanol. A vazão utilizada foi de 1,5 mL/min e a detecção em 295 nm.

Mantovani e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade por CLAE-UV, para quantificação do doripenem em sua forma farmacêutica. O método foi desenvolvido utilizando coluna C-18 e fase móvel tampão fosfato de potássio 0,05 mol/L pH 4,8 e acetonitrila (96:04, v/v). A vazão de eluição foi de 1,0 mL/min e a detecção em comprimento de onda de 298 nm. A especificidade do método foi demonstrada através da análise de amostras oriundas da degradação térmica, degradação oxidativa e hidrólise em meio ácido e alcalino do doripenem. Estas análises demonstraram não haver interferência dos produtos de degradação formados no doseamento do fármaco. A faixa de linearidade testada foi de 5-50 $\mu\text{g/mL}$ com coeficiente de correlação de 0,999. O tempo de retenção do doripenem foi de 7,35 minutos e a concentração de trabalho foi de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Cielecka-Piontek e Jelinska (2010) aplicaram um método espectrofotométrico por UV-derivada para a determinação quantitativa de doripenem em forma farmacêutica, na presença de seus produtos de degradação. A validação foi realizada utilizando a primeira derivada dos espectros de absorção do padrão e da amostra degradada em diferentes valores de pH. O comprimento de onda utilizado foi de 324 nm, e o método apresentou linearidade na faixa de 0,42-11,30 $\times 10^{-2}$ mg/L

($r=0,9981$). O método proposto por espectrofotometria UV-derivada demonstrou-se adequado para determinação de doripenem em sua forma farmacêutica.

Michalska e colaboradores (2011) aplicaram a técnica de eletroforese capilar, como método indicativo de estabilidade. Para formação dos produtos de degradação, o fármaco foi submetido a estresse térmico em diferentes temperaturas, hidrólise em meio ácido (HCl 0,1 mol/L) e alcalino (NaOH 0,1 mol/L), oxidação (H_2O_2 3%) e luz. Para separação do fármaco e de seus produtos de degradação, o método utilizou tampão fosfato de potássio 100 mM pH 2,9 com a adição de 10% de metanol. A faixa de linearidade testada foi de 0,03-4,5 mg/mL para 10 segundos de injeção e 0,01-10,0 mg/mL para 30 segundos de injeção. Os limites de detecção e quantificação da técnica foram de 3,0 e 10,33 μ g/mL.

Fuhr e colaboradores (2013) propuseram um método microbiológico de difusão em ágar para quantificação do doripenem. A quantificação foi realizada a partir da determinação do halo de inibição gerado a partir da atividade do doripenem e a especificidade foi avaliada através de ensaios com amostras de doripenem degradadas sob diferentes condições. O método foi desenvolvido utilizando cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. O método demonstrou ser linear, preciso, exato e específico. Os resultados indicaram que o método pode ser utilizado em ensaios de rotina analítica na determinação da potência do antibiótico, bem como em ensaios aplicando amostras degradadas.

Em estudo recente, Reddy e colaboradores (2014) desenvolveram e validaram um método por CLUE para determinação do doripenem na presença de impurezas. Os autores utilizaram duas impurezas conhecidas para o estudo, a “impureza 1”, oriunda da hidrólise do anel β -lactâmico, e a “impureza 2”, oriunda de um processo de dimerização (Figura 4). O sistema cromatográfico foi composto por uma coluna C-18 (50 x 4,6mm, 1,8 μ m). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de tampão fosfato de potássio 10 mmol/L (pH 6,0), acetonitrila e metanol na proporção de 10:0,05:0,05 como “fase móvel A”, e tampão e acetonitrila (7:3, v/v) como “fase móvel B”, com eluição em gradiente e vazão de eluição de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi de 45 °C, e o volume de injeção de 2 μ L. O método demonstrou-se eficaz para o objetivo proposto, com tempo total de corrida de 8 minutos.

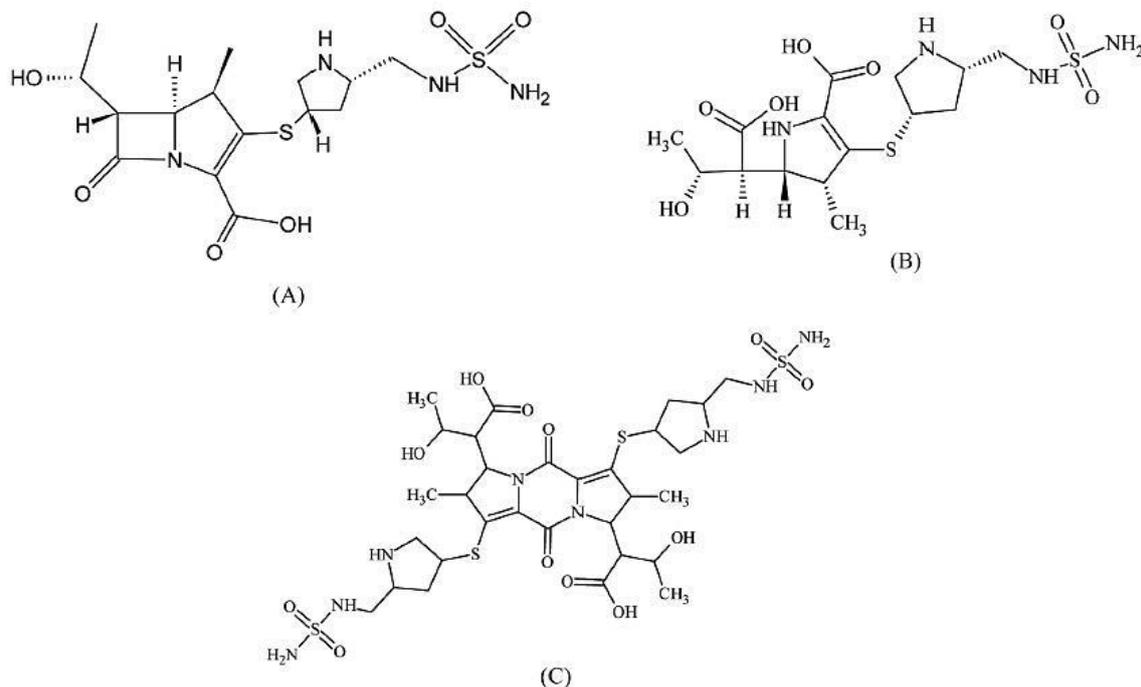


Figura 4- Principais impurezas relacionadas ao doripenem: A) doripenem; B) “impureza 1” e C) “impureza 2” (Fonte: REDDY et al., 2014).

3.4 ESTABILIDADE DAS CARBAPENEMAS

A estabilidade química de derivados carbapenêmicos é abordada em alguns estudos publicados na literatura. Nestes, é possível notar o comportamento instável da classe quando em solução. Esta instabilidade acentua-se com o aumento da temperatura, ou com a exposição dos fármacos a agentes catalíticos ácidos e principalmente alcalinos. A elevada instabilidade das carbapenemas em meio alcalino, deve-se ao ataque nucleofílico de uma base na carbonila do anel β -lactâmico. Os principais produtos formados pela degradação das carbapenemas são decorrentes da hidrólise do anel β -lactâmico e da formação de derivados diméricos (MENDEZ et al., 2007; REDDY et al., 2014)

O trabalho publicado por Swanson e colaboradores (1986) descreve a cinética de degradação térmica do imipenem reconstituído em solução salina e em soro humano. As amostras foram preparadas em solução salina na concentração de 2,5 mg/mL e submetidas as temperaturas de 2, 25, 37 e 50 °C. Os resultados demonstraram que, nestas condições, o fármaco segue uma cinética de degradação de primeira ordem, com tempo de meia vida de 2 horas quando submetido a 37 °C e

6 horas a 25 °C. Em soro humano, as amostras foram preparadas na concentração de 100 µg/mL e submetidas às temperaturas de 20 °C e 37 °C. Também observou-se uma cinética de primeira ordem com tempo de meia vida de 10,73 horas a 37 °C. Os cálculos de cinética de degradação indicam uma energia de ativação em torno de 17 kcal/mol, valor característico de reações de hidrólise, o que sugere que houve uma clivagem do anel β-lactâmico.

Smith e colaboradores (1990), submeteram o imipenem à degradação em meio ácido (pH 4,0) e em meio básico (pH 9,0). Os resultados demonstram uma grande decomposição do fármaco em um curto intervalo de tempo, observando-se que em apenas 3 horas a pH 4,0, na temperatura de 20 °C, o fármaco degradou mais de 90%. O principal produto de degradação foi formado pelo rompimento do anel β-lactâmico e formação de um derivado dimérico (Figura 5).

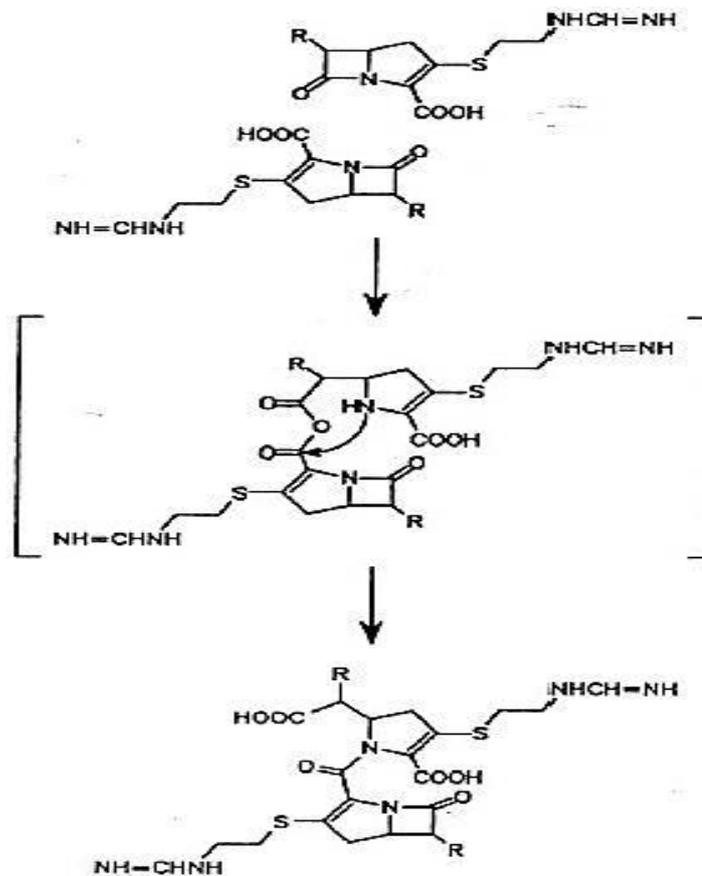


Figura 5- Rota de degradação do imipenem para formação de seu derivado dimérico (Fonte: SMITH et al., 1990).

Em outro estudo, Mendez e colaboradores (2006) determinaram a cinética de degradação do meropenem em pó e solubilizado em solução salina. As amostras

foram preparadas em solução salina na concentração de 50 mg/mL e submetidas às temperaturas de 25, 35 e 45 °C, observando-se uma cinética de decomposição de primeira ordem, com tempo de meia vida de 19,64 horas a 35 °C e 15,11 horas a 45 °C. A amostra em pó foi submetida às temperaturas de 70, 80 e 90 °C. A degradação seguiu uma cinética de primeira ordem, com tempo de meia vida de 340 dias a 80 °C e 51 dias quando mantido a 90 °C.

A identificação dos produtos da degradação térmica e alcalina do meropenem foi realizada por Mendez e colaboradores (2007). Para a identificação do principal produto da degradação térmica, a amostra foi preparada a 50 mg/mL em água e armazenada a 45 °C durante 36 horas. O produto de degradação foi isolado por cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa. A identificação do produto de degradação ocorreu por ressonância magnética nuclear (RMN). A rota de degradação térmica do meropenem pode ser observada na Figura 6, ocorrendo primeiramente com a hidrólise do anel β -lactâmico, seguida da eliminação da cadeia alcóolica, e descarboxilação e aromatização da cadeia lateral, para formação do produto de degradação.

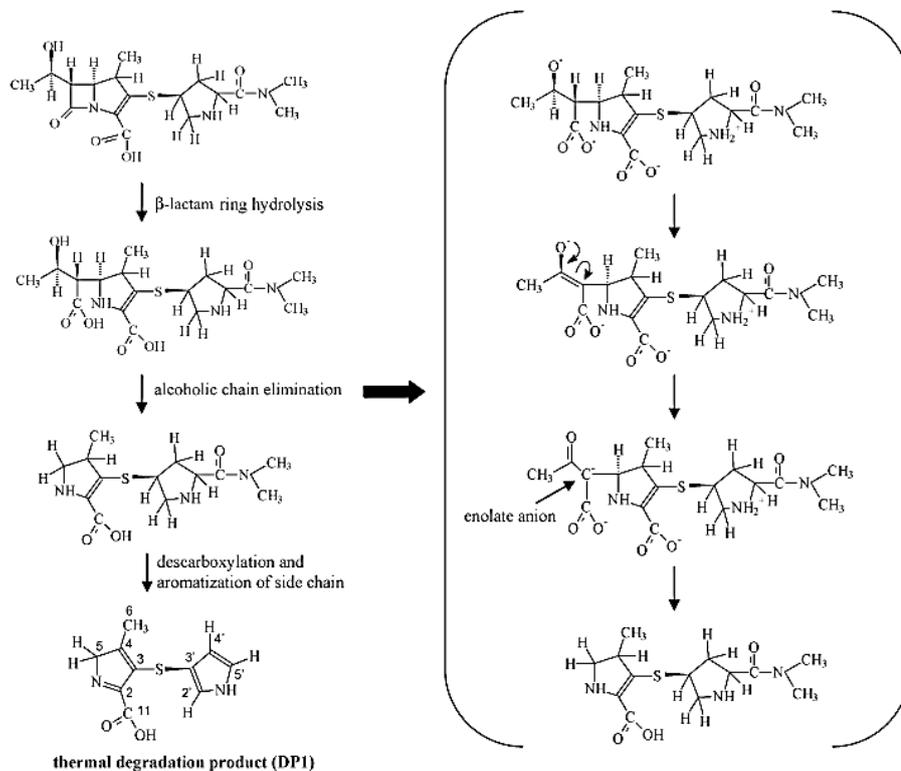


Figura 6- Rota de degradação térmica do meropenem (Fonte: MENDEZ et al., 2007).

Para a identificação do produto oriundo da degradação alcalina, a amostra foi preparada em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. As análises por RMN e espectrometria de massas demonstraram que o produto de degradação foi gerado pela hidrólise do anel β -lactâmico (Figura 7).

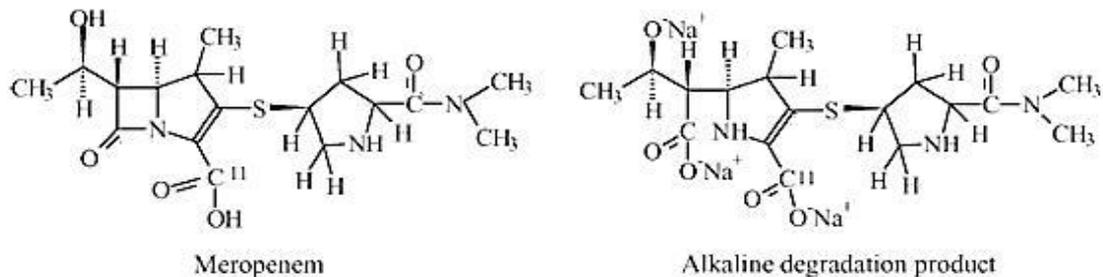


Figura 7- Produto de decomposição oriundo da degradação alcalina do meropenem (Fonte: MENDEZ et al., 2007).

Em trabalho publicado por Zajac e colaboradores (2007), foi avaliada a estabilidade do ertapenem em soluções com valores de pH variando de 0,45 a 12,5. As amostras foram submetidas às temperaturas de 30 °C, 40°C, 50 °C e 60 °C. Como esperado, a maior estabilidade do ertapenem em solução foi observada na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, mais próxima à neutralidade.

Sanjonz e colaboradores (2006) submeteram o ertapenem a diferentes fatores de degradação, como hidrólise em meio ácido e básico e degradação térmica. Todas as condições de estresse testadas levaram à formação de quatro produtos de degradação. Estes produtos foram formados pela quebra do anel β -lactâmico, etanolise do anel β -lactâmico, dimerização e clivagem da cadeia lateral como demonstrado na Figura 8.

Mcquade e colaboradores (2004) avaliaram a estabilidade do ertapenem solubilizado em diferentes fluidos de infusão, como cloreto de sódio a 0,9% e a 0,225%, solução de ringer e bicarbonato de sódio a 5%. Para o estudo, as amostras foram estocadas a 4 e 25 °C. Na menor temperatura, o fármaco manteve-se estável por 72 horas em cloreto de sódio a 0,9% e em solução de Ringer, por 96 horas em cloreto de sódio a 0,225% e por 24 horas em solução de bicarbonato de sódio a 5%. Na temperatura de 25 °C o ertapenem deve ser administrado em no máximo 6 horas

quando reconstituído em cloreto de sódio a 0,9% e a 0,225% e em solução de ringer, e no máximo 4 horas quando reconstituído em bicarbonato de sódio a 5%.

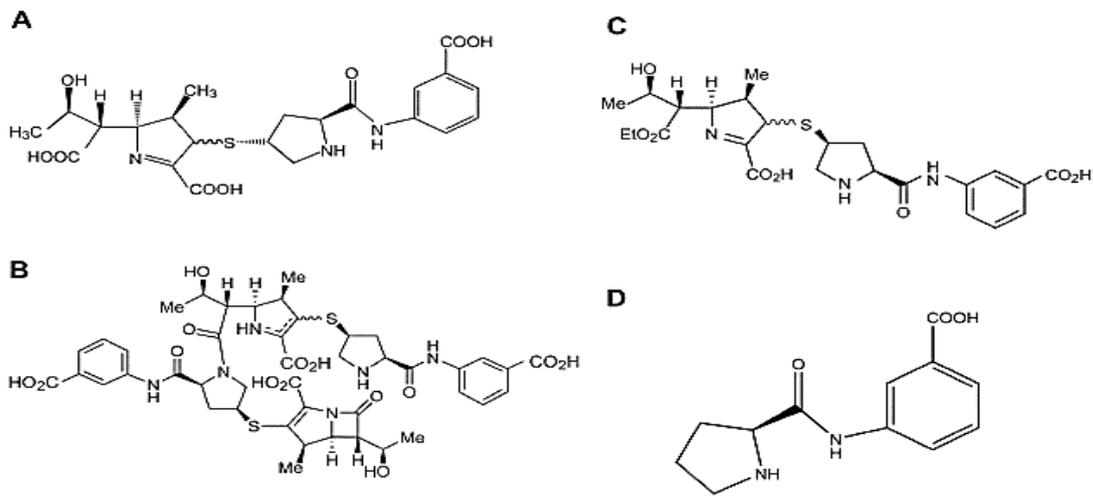


Figura 8- Produtos de degradação do ertapenem formados pela: quebra do anel β -lactâmico (A), dimerização (B), etanóis do anel β -lactâmico (C) e quebra da cadeia lateral (D) (Fonte: SANJONZ et al., 2006).

Em estudo realizado por Keel e colaboradores (2011), os derivados carbapenêmicos imipenem (Primarix[®]), meropenem (Merrem[®]) e doripenem (Doribax[®]) foram reconstituídos em solução salina, simulando suas condições de uso. Estas soluções foram submetidas às temperaturas de 30°C, 35°C e 40°C, com o objetivo de avaliar o tempo necessário para que os fármacos atingissem uma concentração inferior a 90% da concentração inicial. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1- Tempo necessário para atingir concentração menor que 90% da concentração inicial (adaptado de KEEL et al., 2011).

Fármaco	Temperatura		
	30°C	35°C	40°C
Doripenem	16 h	12 h	8 h
Imipenem	6 h	4 h	3 h
Meropenem	12 h	8 h	6 h

Neste trabalho o doripenem demonstrou a maior estabilidade dentre os derivados estudados. No caso do imipenem, sua decomposição ocorreu em apenas 3 horas quando submetido à 40 °C, com uma redução do seu teor acima de 10%.

Psathas e colaboradores (2008) avaliaram a estabilidade do doripenem em diferentes fluidos de infusão. Para o estudo, as amostras foram reconstituídas em solução salina e em dextrose 5%. Depois de reconstituídas, as amostras foram submetidas às condições de 25 °C ± 2 °C e 60% ± 5% de umidade relativa, e condições de refrigeração a 5 °C ± 3 °C e 60% de umidade relativa. Foram consideradas estáveis as amostras que mantiveram suas concentrações maiores que 90% da concentração inicial. Em solução salina, as amostras mantiveram sua potência durante 12 horas mantidas em temperatura ambiente e 72 horas sob refrigeração. Quando reconstituídas em dextrose 5%, os tempos foram de 4 horas à temperatura ambiente e 48 horas sob refrigeração. Os autores mencionam o produto de degradação formado pela dimerização do doripenem (Figura 9).

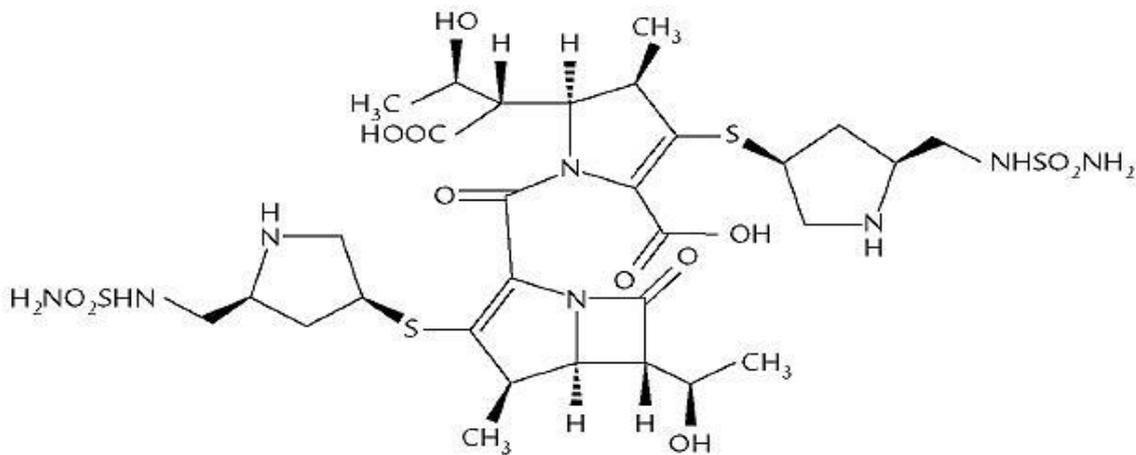


Figura 9- Produto de degradação gerado pela dimerização do doripenem (Fonte: PSATHAS et al., 2008).

Fuhr e colaboradores (2013) estudaram a cinética de degradação do doripenem em solução, quando submetido à temperatura de 45 °C e à radiação UV-C. Neste estudo, após 12 horas o doripenem apresentou redução de seu teor inicial em 44,26% na temperatura de 45 °C, e 57,23 % quando submetido à radiação UV-C. Os dados demonstraram que, para ambas as condições, o doripenem seguiu uma cinética zero ordem.

A *European Medicines Agency* (EMA) recomenda que, após a reconstituição e diluição em solução de cloreto de sódio 0,9%, o doripenem pode ser armazenado por até 12 horas à temperatura ambiente, e por até 72 horas sob refrigeração a 4 ou 8 °C. Quando preparado em solução de dextrose a 5 %, a recomendação é de 4 horas à temperatura ambiente e de 24 horas sob refrigeração.

CAPÍTULO I
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR UFLC

1 INTRODUÇÃO

Segundo a RDC nº 899 de 29 de maio de 2003, a validação de um método analítico consiste em garantir por meio de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para validação de um método analítico indicativo de estabilidade, os parâmetros que devem ser avaliados são a linearidade, precisão, exatidão, robustez e especificidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os métodos indicativos de estabilidade são técnicas analíticas indicadas para análise de amostras oriundas de estudos de estabilidade, capazes de detectar ao longo do tempo mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de um fármaco. Estes métodos devem ser específicos, capazes de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem nenhuma interferência (BRASIL, 2012).

Devido a sua alta resolução, sensibilidade e especificidade, o método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o mais utilizado para estas análises. Cerca de 85 a 90% dos métodos indicativos de estabilidade descritos na literatura, utilizam a técnica de CLAE, pois permite a separação e a visualização do fármaco e de seus produtos de degradação (BAKSHI & SHING, 2002). Recentemente o uso de fases estacionárias com reduzido tamanho de partícula, menores que 2 μm , e o desenvolvimento de equipamentos capazes de operar com pressões elevadas, acima de 9000 psi, deram origem a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que surge como alternativa aos métodos por CLAE, por apresentarem melhor performance, menor tempo de análise e menor consumo de solventes (MALDANER et al., 2009).

Para o desenvolvimento destes métodos, a adequabilidade do sistema é um fator importante a ser levado em consideração. A adequabilidade de um sistema cromatográfico pode ser avaliada por um conjunto de dados, como o número de pratos teóricos (N) que é um indicativo de eficiência da coluna, a resolução (R) que indica o grau de separação entre duas ou mais substâncias presentes na amostra, o fator de cauda (T) que demonstra a simetria do pico, o fator de retenção (k) e a

precisão instrumental (repetibilidade de injeções), que é avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) entre uma série de injeções (SHABIR, 2003).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

Produto farmacêutico: Para o estudo foram utilizadas amostras comerciais de doripenem, DORIBAX[®] 500 mg pó para solução e infusão (Ortho-McNeil Janssen Pharmaceuticals, Inc.).

Substância química de referência (SQR): Adquirida junto a AK Scientific Inc. (Mountain View, USA) com pureza declarada de 99,32%.

2.2 SOLVENTES E REAGENTES

- Acetonitrila grau CLAE – Tédia[®]
- Ácido clorídrico – Vetec[®]
- Ácido orto-fosfórico – Merck[®]
- Água ultrapura
- Hidróxido de sódio – Vetec[®]
- Peróxido de hidrogênio – Fmaia[®]
- Trietilamina – Vetec[®]

2.3 EQUIPAMENTOS

- Balança Shimadzu – AY220[®]
- Estufa Nova ética – Série 400[®]
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu –Prominence[®]
- Lavadora Ultra-Sônica Unique – USC 2850A[®]
- Sistema de Filtração Ocean[®]
- Sistema purificador de água, Millipore - Direct-Q 3 UV UltrapureWater Systems[®].

2.4 METODOLOGIA

2.4.1 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método foi realizado utilizando um cromatógrafo a líquido Shimadzu Prominence[®] UFLC (ultra fast liquid chromatograph), equipado com degasser DGU-20A3, bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. Como fase estacionária foi utilizado uma coluna Merck C-18 endcapped (50 x 4,0 mm, 2 µm).

2.4.1.1 Preparo da amostra de doripenem

A partir da pesagem de 10 mg de fármaco e transferência do conteúdo para balão volumétrico de 100 mL, resultando em uma solução à 100µg/mL, uma alíquota de 5 mL desta solução foi transferida quantitativamente para um balão de 25 mL, obtendo-se solução com concentração final de trabalho de 20 µg/mL. A reconstituição do fármaco e todas as diluições foram realizadas utilizando água ultrapura.

2.4.1.2 Condições cromatográficas testadas

Para o desenvolvimento e otimização do método, foram testadas diferentes sistemas de fase móvel, variando-se a concentração do solvente orgânico e o pH do solvente aquoso. Como solvente aquoso foi testado ácido fosfórico 0,01% em diferentes valores de pH (ajustados com trietilamina), e o solvente orgânico utilizado foi a acetonitrila (ACN). Como fase estacionária foi utilizado uma coluna Merck C-18 endcapped (50 x 4,0 mm, 2 µm). As amostras foram injetadas em triplicata para todas as condições testadas, e foram avaliados os valores de adequabilidade para definir a melhor condição. As condições testadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Valores de pH e vazões testados para o desenvolvimento de método por UFLC.

Fase móvel	Valores de pH	Vazão de fase móvel (mL/min)
Ác. Fosfórico 0,01%:ACN (98:02)	3,8 – 4,8 – 6,0	0,2 – 0,3 – 0,4
Ác. Fosfórico 0,01%:ACN (96:04)	3,8 – 4,8 – 6,0	0,2 – 0,3 – 0,4
Ác. Fosfórico 0,01%:ACN (94:06)	3,8 – 4,8 – 6,0	0,1 – 0,15 – 0,2

Como solvente aquoso selecionou-se o ácido fosfórico 0,01%, e pH ajustado com trietilamina, com o objetivo de evitar o uso de tampões, minimizando assim os riscos de precipitação dos mesmos no equipamento. A escolha da acetonitrila como solvente orgânico e seu uso em baixas concentrações baseiam-se no artigo publicado por Mantovani e colaboradores (2012), que validou um método por CLAE para quantificação de doripenem na forma farmacêutica.

2.4.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada de acordo com as diretrizes estabelecidas na RDC n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), e no guia Q2 (R1) de 2005 do ICH (ICH, 2005). Os parâmetros validados foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

2.4.2.1 Especificidade

A especificidade pode ser conceituada como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Segundo a RDC n° 899 29 de maio de 2003, a especificidade do método pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é

afetado por esses materiais. Porém, quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

Estes estudos de degradação sob condições forçadas são indispensáveis para o desenvolvimento destes métodos, além de fornecerem informações importantes acerca da estabilidade intrínseca da molécula (BRASIL, 2013; ICH, 2003).

As condições de estresse aplicadas no presente estudo estão descritas a baixo.

- A) *Degradação térmica*: Para a degradação térmica, a amostra de doripenem foi reconstituída em água ultrapura à concentração de 1,0 mg/mL, e armazenada em estufa na temperatura de 35 °C durante 48 horas. Para a análise, foi retirada uma alíquota desta amostra e diluída a concentração de 20,0 µg/mL;
- B) *Degradação Oxidativa*: Na degradação oxidativa, as amostras foram reconstituídas em água ultrapura na concentração de 100 µg/mL, e depois diluídas para a concentração de 50 µg/mL em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%. O tempo de degradação da amostra com o peróxido foi de 30 minutos;
- C) *Degradação em meio ácido e alcalino*: Para a degradação em meio ácido e alcalino, as amostras de doripenem foram reconstituídas em água ultrapura na concentração de 100 µg/mL, e depois diluídas à concentração de 50µg/mL em HCl 0,1 mol/L e NaOH 0,1 mol/L, respectivamente. Os tempos de reação foram de 3 minutos para degradação alcalina e 15 minutos para degradação ácida. Ambas as amostras foram neutralizadas antes da análise;
- D) *Fotólise*: Para a degradação fotolítica, o doripenem foi submetido à radiação UV-A em câmara de fotoestabilidade na concentração de 100 µg/mL em água. Após 6 horas de exposição à luz, a amostra foi diluída em água à concentração de 50 µg/mL.

2.4.2.2 Linearidade

É a capacidade do método de demonstrar que os sinais analíticos obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Para obtenção da curva de calibração, pesou-se analiticamente 10 mg de doripenem SQR e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume do balão com água ultrapura, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mL com auxílio de uma bureta, para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com água ultrapura, obtendo-se as concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg/mL.

O gráfico da curva de calibração foi obtido a partir da plotagem dos valores das áreas dos picos em função da concentração de doripenem. A linearidade foi estudada a partir da obtenção do coeficiente de correlação (r) e da análise de variância (ANOVA).

2.4.2.3 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-dia) foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) obtido de seis determinações a 100% da concentração de teste (20µg/mL). A precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada por meio do DPR entre os teores das amostras em três dias diferentes.

Preparo do padrão: para o preparo do padrão, pesou-se 10 mg de doripenem SQR, e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL para obtenção de uma solução à 100 µg/mL. Desta solução, foram transferidos 5 mL para um balão volumétrico de 25 mL, resultando na concentração de trabalho de 20 µg/mL.

Preparo da amostra: para o preparo das amostras, pesou-se 10 mg de doripenem produto farmacêutico (Doribax®), e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma solução à 100 µg/mL. Desta solução, foram transferidos 5 mL para um balão de 25 mL resultando na concentração de trabalho de 20 µg/mL.

A reconstituição e as diluições da SQR e do produto farmacêutico foram realizadas utilizando água ultrapura.

A concentração (Ca), em µg/mL, das amostras de doripenem foram calculadas conforme a equação abaixo:

$$C_a = \frac{(A_a \times C_{SQR})}{A_{SQR}}$$

Onde:

A_a = Área da solução amostra do doripenem;

C_{SQR} = concentração da solução de SQR do doripenem em $\mu\text{g/mL}$;

A_{SQR} = Área da solução SQR de doripenem.

2.4.2.4 Exatidão

A exatidão foi determinada por meio do método de recuperação de padrão. Para o teste, foram preparadas amostras na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ conforme descrito na seção 2.2.3. Nestas amostras foram adicionadas concentrações conhecidas de solução padrão, obtendo-se as concentrações de 22,0, 24,0, e 26,0 $\mu\text{g/mL}$ conforme a Tabela 3. Todas as diluições foram realizadas em balões de 25 mL. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra.

Tabela 3- Preparo das soluções para o teste de exatidão pelo método de recuperação de padrão, aplicado ao método cromatográfico por UFLC para determinação de doripenem.

Amostra	Volume (mL) de solução da amostra (100 $\mu\text{g/mL}$)*	Volume (mL) de solução da SQR (100 $\mu\text{g/mL}$)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)*
Nível 0	5,0	-	20,0
Nível 1	5,0	0,5	22,0
Nível 2	5,0	1,0	24,0
Nível 3	5,0	1,5	26,0

*concentração teórica

A equação utilizada para calcular a porcentagem de padrão recuperada está descrita abaixo:

$$R\% = \frac{(C_r - C_a)}{C_{SQR}} \times 100$$

Onde:

$R\%$ = porcentagem de padrão recuperada;

C_r = concentração da solução amostra ($\mu\text{g/mL}$), com a adição da solução de SQR de doripenem;

C_a = concentração da solução amostra de doripenem ($\mu\text{g/mL}$);

C_{SQR} = Concentração resultante de doripenem SQR ($\mu\text{g/mL}$) adicionada na amostra.

2.4.2.5 Robustez

A robustez de um método pode ser definida como sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas. Esta robustez pode ser analisada através de uma análise fatorial, com a utilização do desenho experimental de Plackett–Burman, que permite variar uma série de fatores em um número reduzido de experimentos. Também possibilita determinar o efeito de cada um dos fatores no sistema cromatográfico (HEYDEN et al., 2001).

Para efetuar o teste de robustez através do desenho experimental de Plackett–Burman, é necessário estabelecer os parâmetros normais da análise. E a partir dos parâmetros normais, são feitas pequenas alterações em um nível acima e um nível abaixo para cada fator avaliado. As condições testadas para a robustez estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4- Fatores e níveis avaliados no teste de robustez para desenvolvimento de método por UFLC.

Parâmetro	Nível (-)	Condição normal	Nível (+)
pH	3,5	3,8	4,1
Concentração de acetonitrila	1,8 %	2,0 %	2,2 %
Comprimento de onda de detecção	295 nm	298 nm	301 nm
Vazão de fase móvel	0,36 mL/min	0,4 mL/min	0,44 mL/min
Temperatura do forno da coluna	20 °C	25 °C	30 °C
Coluna cromatográfica	Merck®	Merck®	Shimadzu®

Tabela 5- Desenho experimental de Plackett–Burman para determinação da robustez no desenvolvimento do método por UFLC.

Exp.	pH	Dummy	Detecção	Vazão	Dummy	Dummy	Dummy	Coluna	% de ACN	Temp.	Dummy
1	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-
2	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+
3	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-
4	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-
5	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+	1-
6	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+	1+
7	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+	1+
8	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-	1+
9	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+	1-
10	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+	1+
11	1+	1-	1+	1+	1+	1-	1-	1-	1+	1-	1+
12	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-	1-

A Tabela 5 demonstra os níveis e os fatores avaliados para cada experimento. Os fatores *dummy* foram utilizados apenas para completar o número de fatores no desenho experimental e para calcular o erro do experimento.

O efeito de cada um dos fatores foi calculado pela equação abaixo:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}$$

Onde:

E_x = Efeito do fator;

$\sum Y(+)$ e $\sum Y(-)$ = Soma das respostas do fator em análise em seu nível acima (+) e em seu nível abaixo (-)

N= Número de experimentos no desenho experimental.

Para calcular a estimativa do erro experimental utilizou-se a seguinte equação:

$$E_e = \sqrt{\frac{\sum E_{dummy}^2}{n_{erro}}}$$

Onde:

E_e = Estimativa do erro aleatório do experimento;

$\sum E_{dummy}^2$ = soma quadrada do n_{erro} dos dummy.

A significância dos fatores em análise foi determinada através do teste *t* de *Student*, conforme a seguinte equação:

$$t = \frac{E_x}{E_e}$$

Onde:

E_x = Efeito do fator em análise;

E_e = Estimativa do erro aleatório do experimento.

O valor de *t* calculado foi comparado com o de *t* tabelado para um nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$) e 5 graus de liberdade (GL).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Conforme mencionado anteriormente, os parâmetros de adequabilidade fornecem dados importantes acerca do desempenho de um sistema cromatográfico, e garantem que o mesmo está apto a gerar resultados confiáveis (SHABIR 2003).

Para escolha do melhor sistema cromatográfico, foram analisadas amostras sob diferentes condições de fase móvel, pH e vazão como descrito na seção 2.2.2. Nestas análises, observou-se que as condições com maior concentração de solvente orgânico, 4 e 6 % de acetonitrila, ocasionaram em uma baixa retenção do

fármaco na coluna, e elevados valores de fator de cauda. A fase móvel que apresentou o melhor desempenho foi a composta por ácido fosfórico 0,01% (pH 3,8) com 2% de acetonitrila e vazão de 0,4 mL/min. Os resultados de adequabilidade do sistema para os diferentes sistemas eluentes testados estão descritos na Tabela 6.

Ao observar os resultados obtidos, observa-se uma direta influência da concentração de acetonitrila na qualidade do sistema cromatográfico. A fase móvel composta com 6% de acetonitrila foi a que apresentou os piores valores de adequabilidade do sistema. Os baixos valores de tempo de retenção e de fator de retenção apresentados evidenciam uma baixa interação do fármaco com a coluna cromatográfica. Em todas as condições de vazão e pH testados, o número de pratos teóricos e o fator de retenção apresentaram-se abaixo do preconizado na literatura.

Tabela 6- Valores de adequabilidade de sistema para as condições testadas no desenvolvimento do método cromatográfico.

Condições testadas		Parâmetros de adequabilidade do sistema			
pH	Vazão (mL/min)	Tr (min)	N	k	T
Ácido Fosfórico 0,01%: Acetonitrila (94:06, v/v)					
4,8	0,1	4,50	1401	1,26	1,43
4,8	0,15	3,00	980	1,27	1,56
4,8	0,2	2,75	827	1,74	1,65
3,8	0,2	2,40	684	1,43	1,61
Ácido Fosfórico 0,01%: Acetonitrila (96:04, v/v)					
3,8	0,2	3,99	1645	3,00	1,48
3,8	0,3	2,70	1373	1,87	1,43
6,0	0,2	3,69	1616	4,65	1,41
6,0	0,3	2,44	1347	2,75	1,44
6,0	0,4	1,86	1227	2,69	1,42
Ácido Fosfórico 0,01%: Acetonitrila (98:02, v/v)					
4,8	0,2	8,37	4947	6,17	1,46
4,8	0,3	5,39	3781	4,62	1,17
3,8	0,2	8,98	4805	7,60	1,14
3,8	0,3	6,45	4178	8,34	1,24
3,8	0,4	4,21	3515	5,09	1,15

Quando utilizado 4% de acetonitrila na fase móvel, houve um ligeiro aumento no número de pratos teóricos, que mesmo assim apresentaram-se abaixo do preconizado. Também observou-se um aumento no fator capacidade, indicando maior interação do fármaco com a coluna.

Os melhores resultados de adequabilidade do sistema foram obtidos utilizando 2% de acetonitrila na fase móvel. A diminuição da concentração do solvente orgânico levou a uma maior interação do fármaco com a coluna, o que ocasionou um aumento no tempo de retenção e no fator capacidade, levando também a um aumento no número de pratos teóricos.

A Figura 10 ilustra alguns cromatogramas obtidos da análise do doripenem sob as mesmas condições de vazão e pH, variando-se apenas a concentração de acetonitrila.

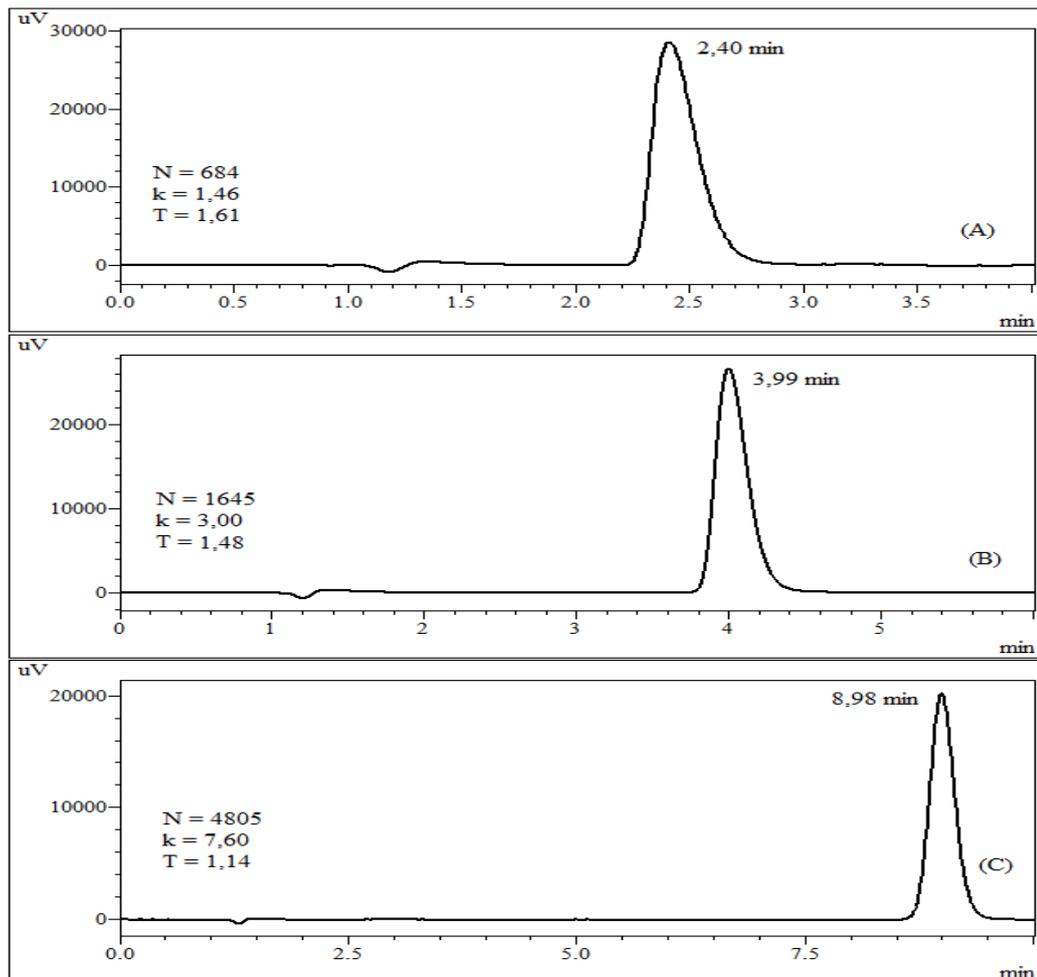


Figura 10- Influência da concentração de acetonitrila na análise do doripenem por CLAE. Cromatogramas ilustrativos de análise com fase móvel contendo 6% de acetonitrila (A), 4% de acetonitrila (B) e 2% de acetonitrila (C). Análises realizadas com vazão de 0,2 mL/min.

Outro fator determinante nos resultados obtidos foi à vazão da fase móvel, a qual interfere principalmente no tempo de retenção e no fator capacidade do fármaco. O pH da fase móvel foi o fator de menor influência no método proposto.

O método cromatográfico estabelecido com fase móvel composta por ácido fosfórico 0,01% (pH 3,8):acetonitrila (98:02, v/v) com vazão de eluição de 0,4 mL/min e detecção em 298 nm foi selecionado como sistema adequado para a validação do método cromatográfico, pois foi o que apresentou melhor resposta nos parâmetros de adequabilidade do sistema, com reduzido tempo de análise. Os valores de adequabilidade do sistema, para esta condição, estão expostos na Tabela 7. Os cromatogramas de análise da SQR e da amostra estão demonstrados na Figura 11.

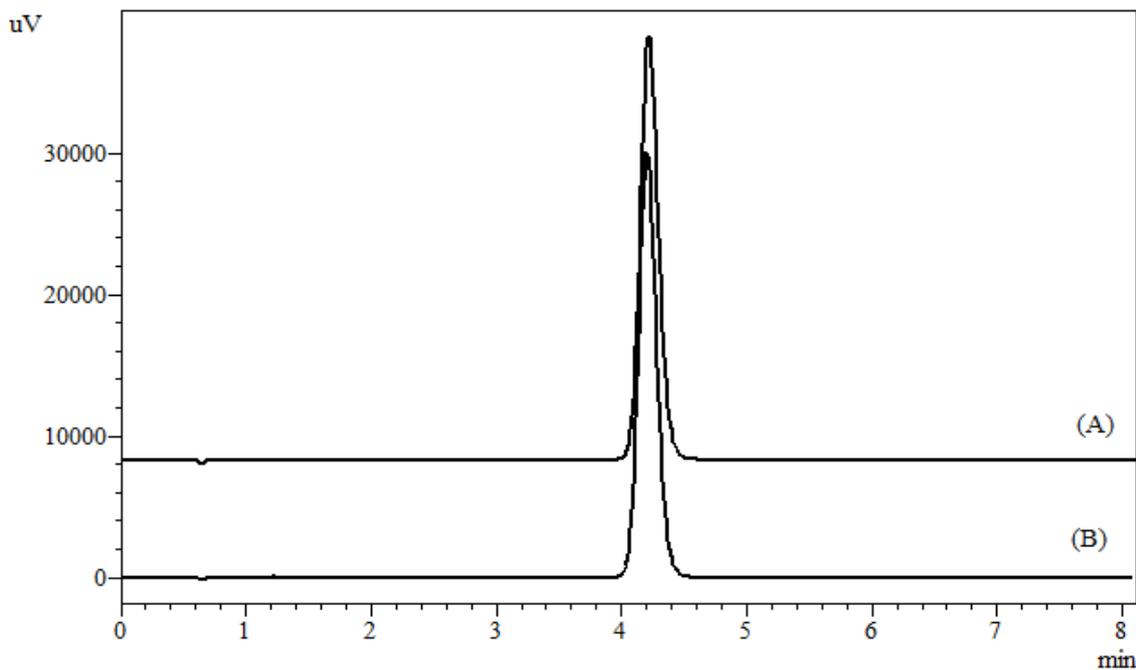


Figura 11- Cromatogramas sobrepostos demonstrativo da análise de SQR de doripenem (A) e amostra comercial de doripenem (B). Com fase móvel composta por ácido fosfórico 0,01% (pH 3,8):acetonitrila (98:02, v/v) com vazão de 0,4 mL/min e detecção em 298 nm.

Tabela 7- Valores de adequabilidade do sistema obtidos experimentalmente e valores recomendados para método por CLAE (FDA, 1994; SHABIR, 2003).

Parâmetro	Recomendação	Valores obtidos
Pratos teóricos	> 2000	3515
Fator de cauda	< 2	1,15
Fator capacidade	> 2	5,20
Repetibilidade das injeções	DPR ≤ 1%, n ≥ 5	DPR 0,12%, n=6

3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

3.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio da análise de amostras de doripenem submetidas a condições de degradação forçada, conforme descrito na seção 2.4.2.1.

A resolução do pico referente ao doripenem demonstrou-se adequada para todas as condições. Os dados de pureza de pico indicaram que não houve interferências ou co-eluição dos produtos de degradação com o doripenem. Estes dados indicam a especificidade do método frente às condições de degradação testadas.

Na degradação térmica, a taxa de decomposição do fármaco foi de aproximadamente 32%, a 35°C durante 24 horas. No cromatograma ilustrativo é possível observar a formação de dois produtos de degradação mais polares que o fármaco nos tempos de 1,40 e 2,63 minutos (Figura 12).

Quando submetido à degradação oxidativa em peróxido de hidrogênio a 3%, observou-se um decaimento de aproximadamente 30% do teor inicial do doripenem, em um período de 40 minutos. É possível visualizar a formação de dois produtos de degradação nos tempos de 0,93 e 1,44 minutos (Figura 13).

Quando submetido à degradação alcalina, observou-se uma acentuada decomposição do doripenem, o qual, em 2 minutos de reação, apresentou redução de teor em mais de 60%. Esta intensa degradação pode ser atribuída à hidrólise do

anel β -lactâmico da carbapenema em meio alcalino. Esta reação ocorre devido ao ataque nucleofílico da base, na carbonila do anel β -lactâmico. A mesma reação é descrita por Mendez e colaboradores (2007) para o meropenem. A hidrólise em meio ácido também levou a uma acentuada degradação. Em ambas as condições, é possível a visualização de um produto de degradação no tempo de 1,10 minutos. Os cromatogramas estão demonstrados nas Figuras 14 e 15.

Nos ensaios de decomposição fotolítica, o doripenem apresentou degradação de cerca de 10% em 6 horas sob radiação UV-A. Foi possível observar a formação de um produto de degradação no tempo de 2,18 minutos (Figura 16).

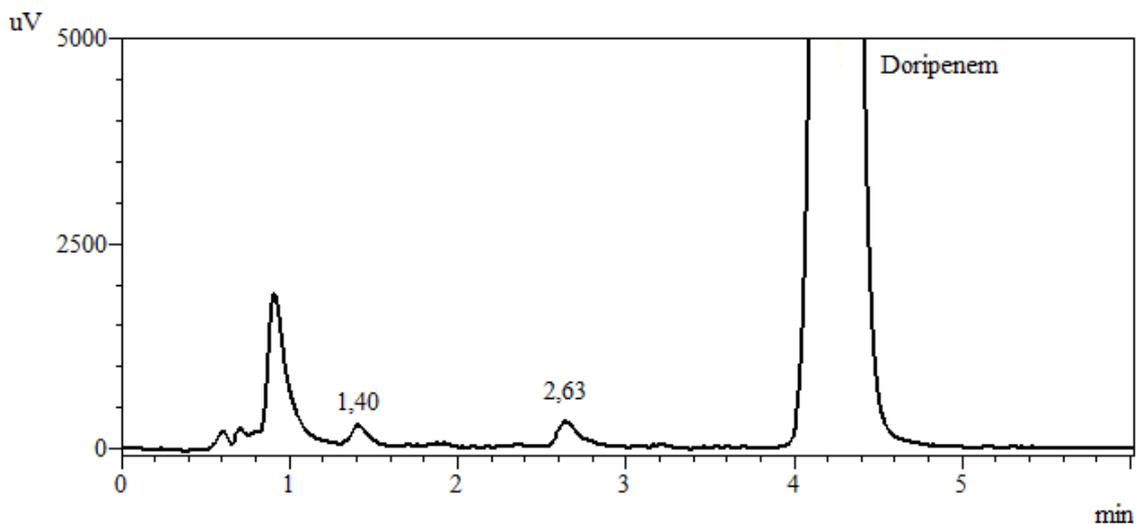


Figura 12- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado durante 24 horas a 35 °C. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.

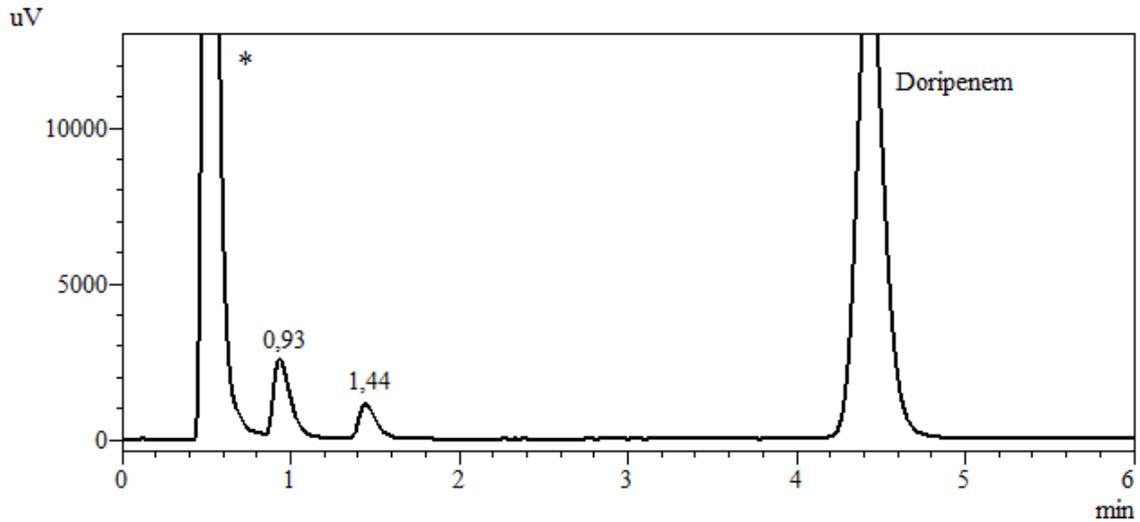


Figura 13- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado em peróxido de hidrogênio a 3% durante 40 minutos. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC. *Pico referente à fenacetina, estabilizante presente no produto oxidante.

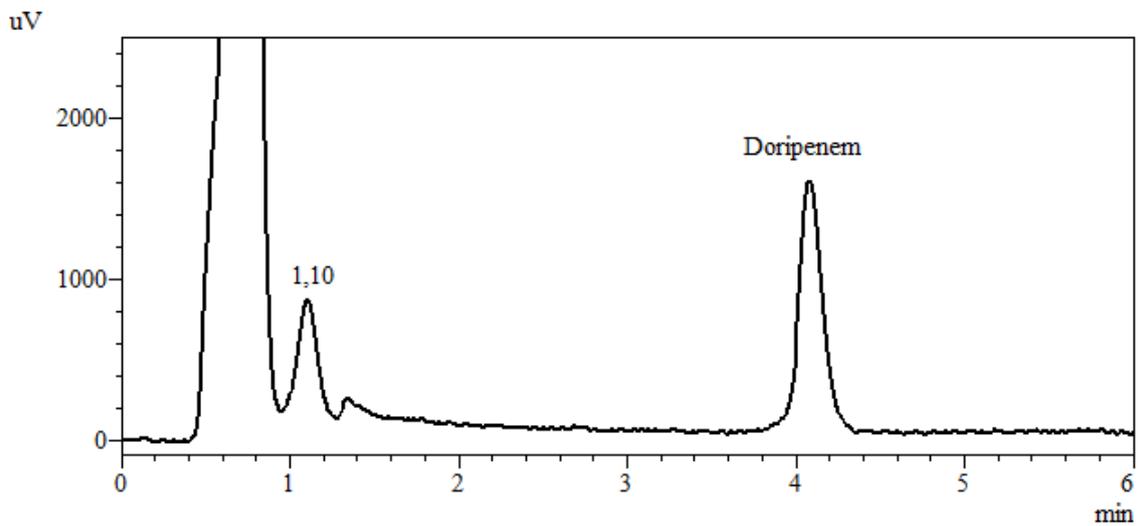


Figura 14- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado em ácido clorídrico 0,1 mol/L durante 10 minutos. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.

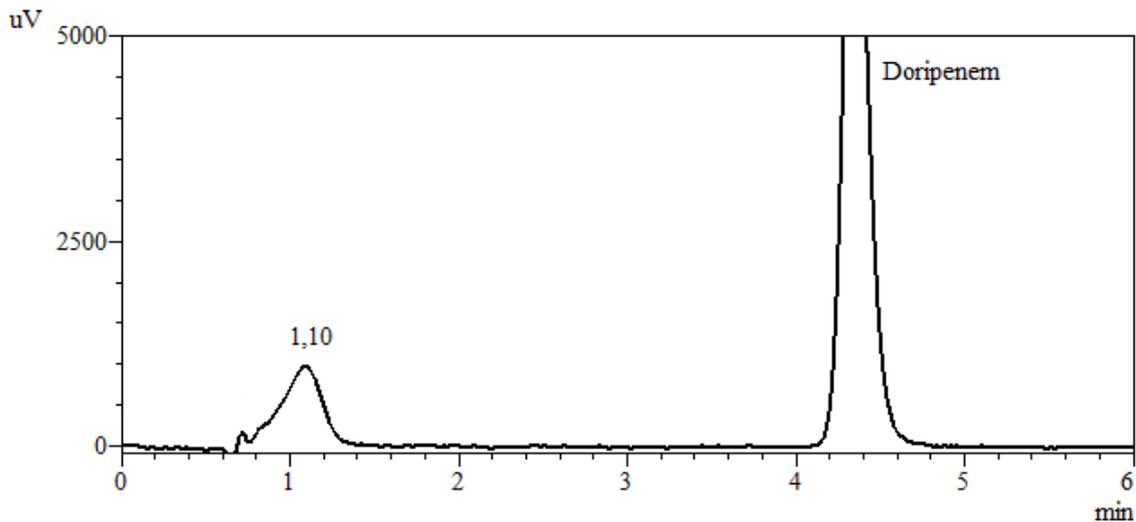


Figura 15- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem degradado em hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 2 minutos. Análise realizada para a avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.

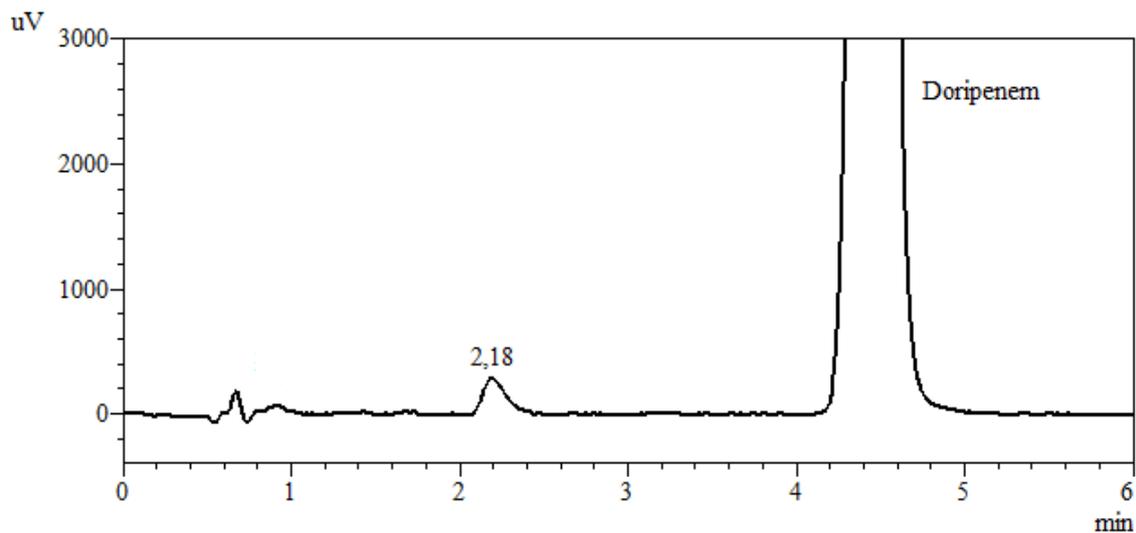


Figura 16- Cromatograma demonstrativo da análise do doripenem submetido à decomposição sob radiação UV-A durante 6 horas. Análise realizada para avaliação da especificidade do método proposto por UFLC.

3.2.2 Linearidade

O parâmetro linearidade foi estabelecido no intervalo de concentração de 5,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados das áreas obtidas nos ensaios estão descritos na Tabela 8. A Figura 17 ilustra a curva padrão do doripenem, obtida por meio da plotagem das áreas obtidas em função da concentração.

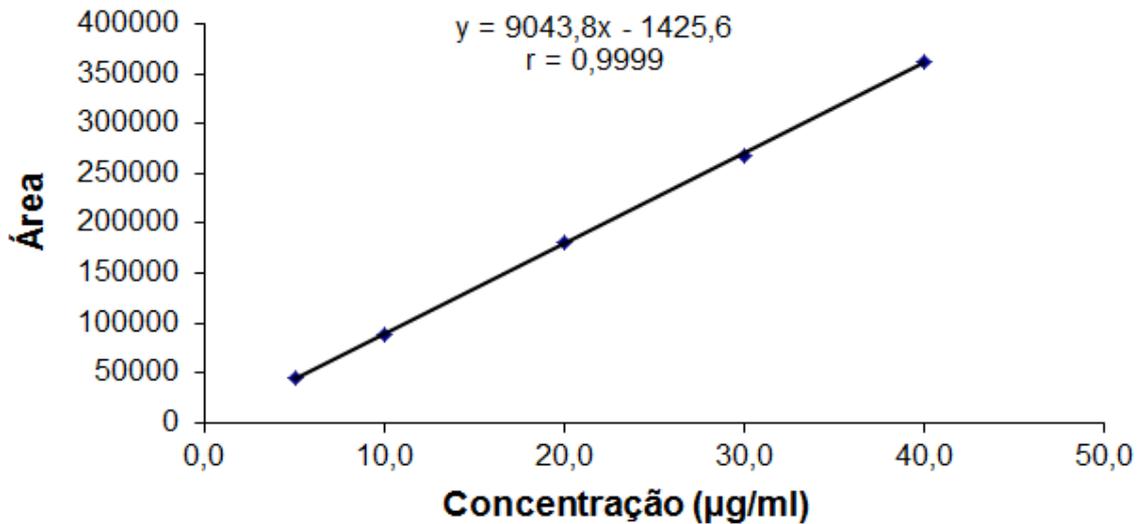


Figura 17- Representação gráfica da curva padrão, construída através plotagem das médias das áreas obtidas versus a concentração de doripenem.

Tabela 8- Áreas obtidas para obtenção da curva padrão na faixa de análise de 5,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$, durante o desenvolvimento de método por UFLC para determinação do doripenem em pó para solução injetável.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas	Média das áreas	DPR
5,0	44919	44791	0,54
	44945		
	44508		
10,0	88202	88306	0,11
	88398		
	88319		
20,0	180699	180284	0,02
	180095		
	180058		
30,0	266215	266855	0,20
	267172		
	267177		
40,0	368460	362249	1,48
	359458		
	358803		

Os resultados estatísticos obtidos por ANOVA estão descritos Tabela 9.

Tabela 9- Análise de variância dos resultados obtidos para linearidade do método por UFLC para determinação do doripenem em pó para solução injetável.

Fatores de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F(calc)
Entre	4	201251409250	50312852312	8491,14*
Regressão linear	1	201206245334	201206245334	33957*
Desvio de linearidade	3	45163916	15054639	2,5
Resíduo	10	59253325	5925332	
Total	14	201310662574		

*Valor significativo para $p < 0,05$.

O coeficiente de correlação $r = 0,9999$ indica a relação entre as áreas obtidas e a concentração de doripenem. A equação da reta obtida através do método dos mínimos quadrados foi $y = 9043,8x - 1425,6$. E a análise de variância (ANOVA) demonstrou que houve regressão linear significativa, sem desvio de linearidade, para um grau de significância de 5%. Estes resultados conferem a linearidade do método na faixa estudada.

3.2.3 Precisão

Conforme descrito na Tabela 10, os resultados de repetibilidade, em 3 dias de análise, são traduzidos em teores médios de 101,59%, 99,20% e 100,39%. O valor máximo de DPR foi obtido no segundo dia do experimento (DPR = 1,13). Para a precisão inter-dia, calculou-se a média de todos os teores obtidos nos três ensaios de repetibilidade, obtendo-se valores de teor médio de 100,40% (DPR = 1,40). Todos os resultados de DPR obtidos apresentaram-se de acordo com as especificações da literatura para este parâmetro (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 10- Resultados obtidos através do ensaio de precisão por UFLC para determinação de doripenem pó para solução injetável.

	Repetibilidade	
	Teor (%) ^a	DPR
Dia 1	101,59	0,25
Dia 2	99,20	1,13
Dia 3	100,39	0,41
Precisão inter-dia ^b	100,40	1,40

^aMédia de 6 determinações em triplicata.

^bMédia dos resultados obtidos nos três diferentes dias.

3.2.4 Exatidão

A exatidão foi calculada como a percentagem de fármaco recuperado a partir das amostras de teste. Conforme o observado na Tabela 11, o método proposto por UFLC apresentou uma boa exatidão, com uma média de recuperação de padrão entre 101,68% e 100,13%.

Tabela 11- Resultados obtidos através do ensaio de exatidão aplicado ao desenvolvimento de método por UFLC para determinação de doripenem pó para solução injetável.

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	Concentração de padrão adicionado (µg/mL)	Concentração de padrão recuperada (µg/mL) ^a	Recuperação média (%) ^a	DPR
Nível 1	20	2,16	2,17	100,24	0,99
Nível 2	20	4,32	4,42	101,68	0,86
Nível 3	20	6,48	6,49	100,13	1,83

^aMédia de três amostras em duplicata.

3.2.5 Robustez

A robustez do método analítico, determinada utilizando o desenho experimental de Plackett–Burman, permitiu a avaliação do efeito de diversos fatores na análise cromatográfica. O efeito de cada um dos fatores analisados no

experimento e o valor de t calculado estão expressos na Tabela 12. Os teores obtidos para cada experimento indicado na Tabela 5 estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 12- Resultados dos efeitos e valores de t calculado para cada fator analisado no teste de robustez para o método por UFLC. Para determinação do doripenem em pó para solução injetável.

Fator	Efeito (%)	t calculado
pH	-0,72	1,21
λ do detector (nm)	0,74	1,25
vazão (mL/min)	0,70	1,17
Marca da coluna	-0,07	0,12
% de acetonitrila	-0,72	1,21
Temperatura do forno (°C)	1,06	1,78

$t_{\text{tab}(0,05; 5)} = 2,57$; Erro Experimental (E_e) = 0,594

Tabela 13- Teores obtidos no ensaio de robustez através do desenho experimental de Plackett–Burman aplicado ao desenvolvimento do método por UFLC para determinação de doripenem em pó para solução injetável.

Experimento	Teor de doripenem (%)
1	100,51
2	98,97
3	99,69
4	99,78
5	100,72
6	99,40
7	99,70
8	97,18
9	100,13
10	102,07
11	99,99
12	100,56

Depois de calculado o efeito para cada fator estudado, a aplicação do Teste *t* de *student*, através da comparação entre o valor de *t* calculado para cada fator e o valor de $t_{(0,05;5)}$; bicaudal tabelado (2,57), demonstrou que os efeitos oriundos de cada fator avaliado não acarretaram em diferenças significativas na quantificação de doripenem. O método apresentou um erro experimental no valor de 0,594. Através dos resultados obtidos no ensaio, conclui-se que o método é robusto frente aos fatores avaliados.

4 CONCLUSÕES

- ✓ Entre os fatores avaliados para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para análise do doripenem, a concentração do solvente orgânico apresentou maior influência na performance do sistema cromatográfico;
- ✓ As condições estudadas de fase móvel, a composta por ácido fosfórico 0,01% (pH= 3,8):acetonitrila (98:02, v/v), com vazão de eluição de 0,4 mL/min, volume de injeção de 5 µL e detecção em 298 nm, permitiram o desenvolvimento adequado do método, aliando valores de adequabilidade do sistema com rápido tempo de análise;
- ✓ O método proposto demonstrou-se específico quando aplicado a amostras degradadas com a presença de produtos de degradação, podendo ser aplicado em estudos de estabilidade;
- ✓ O método por UFLC demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto, estando de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo ICH (2005) e pela RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Constitui uma alternativa rápida e segura para análise de rotina do doripenem, com menor consumo de solventes. E não utiliza sais para tamponar a fase móvel.

CAPÍTULO II
ESTABILIDADE OXIDATIVA E TÉRMICA DO ANTIBIÓTICO
DORIPENEM: CINÉTICA E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os estudos de estabilidade têm como objetivo obter informações sobre a qualidade de um fármaco ou medicamento e sua variação em função do tempo, sob influência de uma série de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz. Além destes, outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, processos de fabricação e tipo e propriedades dos materiais de embalagem são importantes (BRASIL, 2005; NULDEMAN, 1975). Segundo a resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), os estudos de estabilidade podem ser classificados como estudos de estabilidade acelerada, estudos de acompanhamento e estudos de longa duração.

Além destes estudos citados acima, há também os testes de estabilidade forçada ou testes de estresse. Estes testes devem ser realizados em condições mais severas de degradação, excedendo as condições utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada. A exposição do insumo farmacêutico ativo ou do produto acabado à condições de estresse, como estresse térmico, hidrólise em meio alcalino e em meio ácido, oxidação e fotólise fornece informações importantes acerca da estabilidade intrínseca da molécula e de suas possíveis rotas de degradação. Além disso, estes testes são indispensáveis para o desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade (ALSANTE et al., 2007; BRASIL, 2012; ICH, 2003).

Segundo Blessy e colaboradores (2013), os estudos de estabilidade forçada apresentam diversos objetivos, tais como determinar a estabilidade intrínseca de um fármaco presente em uma formulação e revelar os mecanismos de degradação deste fármaco quando submetido à hidrólise, oxidação, termólise ou fotólise. É sabido que a elucidação da estrutura dos produtos de degradação, formados sobre diferentes condições de estresse, permite estabelecer as vias de decomposição, e assim compreender a natureza química do fármaco. A aplicação de estudos de estabilidade forçada nas etapas de pré-formulação contribuem para o desenvolvimento de formas farmacêuticas mais estáveis.

Os estudos de degradação forçada também contribuem para a obtenção de dados cinéticos a respeito da decomposição do fármaco. Uma cinética de decomposição envolve principalmente dois fatores, a ordem de reação e a

velocidade de reação. Ao determinar a ordem de reação, é possível definir como a velocidade de reação varia de acordo com a concentração dos reagentes. Diversos fatores podem afetar a velocidade de reação, entre eles a temperatura, agentes catalíticos ácidos ou básicos, oxidação e luz (NULDEMAN, 1975; SINKO, 2008).

As principais ordens de reação relacionadas a degradação de medicamentos são estabelecidas em ordem zero, primeira ordem e segunda ordem. As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade de reação não depende da concentração dos reagentes. Nas reações de primeira ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes, enquanto nas reações de segunda ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração dos dois reagentes ou à segunda potência da concentração de um dos reagentes (NULDEMAN, 1975; SINKO, 2008).

As ordens de reação podem ser representadas pelas seguintes equações (NULDEMAN, 1975):

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

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

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

Onde: C_0 corresponde à concentração inicial da substância, C corresponde à concentração da substância após degradação por um período de tempo t , e k é a constante de velocidade de reação.

Segundo Sinko (2008) a ordem de reação pode ser determinada por meio de diferentes métodos. No método de substituição, os dados de um estudo cinético podem ser substituídos pelas formas integradas das equações que descrevem as diferentes ordens de reação. Quando o valor de k (constante de velocidade de reação), calculado para uma dessas equações, permanecer constante dentro dos limites de variação experimental, passa-se a considerar que a ordem de reação é descrita por esta equação.

Já para o método gráfico a ordem de reação pode ser definida por meio de representações gráficas, as quais devem relacionar a concentração da substância reagente em função do tempo (ordem zero), o log da concentração da substância reagente em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração da substância reagente em função do tempo (segunda ordem). A representação que

apresentar a melhor reta, com coeficiente de correlação mais próximo a unidade, é definida como a ordem de reação.

Após determinar a ordem e a velocidade reação, é possível calcular outros parâmetros cinéticos como o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que é o tempo necessário para que o fármaco atinja 50% de seu teor declarado, e o $t_{90\%}$, tempo necessário para que o fármaco atinja 90% de seu teor inicial. Este último parâmetro serve como indicativo de vida útil do fármaco (NULDEMAN, 1975; SINKO, 2008).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUTO FARMACÊUTICO E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

O produto farmacêutico e a substância química de referência utilizados estão descritos na seção 2.1 do Capítulo 1.

2.2 SOLVENTES E REAGENTES

- Acetonitrila grau CLAE – Tédia[®]
- Água ultrapura
- Fosfato de potássio monobásico – Fmaia[®]
- Peróxido de hidrogênio – Fmaia[®]

2.3 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Shimadzu – AY220[®]
- Estufa Nova Ética – Série 400[®]
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, Shimadzu –Prominence[®]
- Lavadora Ultra-Sônica Unique – USC 2850A[®]
- Sistema de Filtração Ocean[®]
- Sistema purificador de água, Millipore - Direct-Q 3 UV UltrapureWater Systems[®].

2.4 METODOLOGIA

2.4.1 Cinética de degradação oxidativa

A avaliação da estabilidade oxidativa do antibiótico doripenem foi determinada a partir da exposição do fármaco a peróxido de hidrogênio nas concentrações de 3 e 10%. Para determinação da cinética de degradação, as amostras de doripenem foram analisadas, após decomposição em diferentes tempos de reação com o agente oxidante. Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com a ordem de reação, a qual foi determinada por meio do método gráfico.

2.4.1.1 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras, pesou-se 10 mg de amostra e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, o qual teve seu volume completado com água ultrapura, obtendo-se solução à 100 µg/mL. Após, transferiu-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL, resultando em uma concentração de 50 µg/mL. Esta segunda diluição foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio a 3 e a 10%. As amostras foram analisadas após os tempos de 5, 10, 20, 30, 45, 60 e 75 minutos.

2.4.1.2 Quantificação das amostras

A quantificação do doripenem nas amostras degradadas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo método validado por Mantovani e colaboradores (2012), utilizando as seguintes condições:

- Coluna C-18 Shimadzu Shim-pack[®] ODS (250 x 4,0 mm, 5 µm);
- Fase móvel: tampão fosfato de potássio 0,01 mol/L e acetonitrila (94:06, v/v);
- Vazão de fase móvel: 1,0 mL/min ;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Detecção: UV-DAD, 298 nm.

Utilizou-se equipamento cromatógrafo a líquido Shimadzu Prominence[®], equipado com degasser DGU-20A₅, bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A, forno de coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software LC Solution V. 1.24 SP1.

2.4.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

A ordem de reação foi determinada utilizando o método gráfico, e a constante de velocidade de reação (k), o $t_{90\%}$ e o $t_{1/2}$ foram calculados considerando uma reação de segunda ordem. As seguintes equações foram consideradas:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt \quad t_{90\%} = \frac{1}{9kC_0} \quad t_{1/2} = \frac{1}{kC_0}$$

Onde:

C = concentração final;

C_0 = concentração inicial;

k = constante de velocidade de reação;

t = tempo.

2.4.2 Estabilidade térmica

A cinética de degradação térmica do doripenem foi determinada por Barbosa (2012). No estudo, o doripenem foi submetido à degradação nas temperaturas de 25°C, 35 °C e 45 °C. As amostras foram analisadas em diferentes tempos de degradação, e após determinada a ordem de reação, foram calculados os parâmetros cinéticos.

O presente trabalho faz uma releitura dos dados obtidos por Barbosa (2012), no intuito de complementar os dados obtidos, com a aplicação da equação de Arrhenius e a determinação da energia de ativação, com subsequente proposição das estruturas químicas dos produtos de degradação formados.

A energia de ativação para a degradação térmica foi determinada por meio da construção do gráfico de Arrhenius. O mesmo foi construído a partir da plotagem do logaritmo neperiano de k obtido para cada temperatura *versus* o inverso da temperatura em Kelvin. O gráfico pode ser descrito pela seguinte equação:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

Onde:

k = Constante de velocidade de reação;

A = Fator de Arrhenius;

E_a = Energia de ativação;

T = Temperatura na escala Kelvin;

R = Constante universal dos gases.

2.4.3 Análises por LC-MS

As análises por CLAE foram conduzidas utilizando um cromatógrafo a líquido Shimadzu Prominence[®], equipado com controlador SLC-10A, bomba LC-20AD, injetor automático SIL-10AF e detector SPD-M10A PDA. Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m). A fase móvel consistiu de ácido fórmico 0,05% e acetonitrila (96:04, v/v). A detecção foi feita em detector DAD, fixado em 298 nm.

O sistema de detecção por espectrometria de massas foi conduzido em equipamento hifenado ao cromatógrafo a líquido. Utilizou-se espectrômetro de massas Esquire plus 3000[®] (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). O mesmo conta com uma interface de electrospray (ESI) e analisador de massas do tipo ion trap. O software utilizado para aquisição de dados foi o Esquire CONTROL 5.2. A análise por LC-MS foi realizada no modo íon-positivo, operado de acordo com as seguintes condições: temperatura do gás nitrogênio 320 °C; fluxo do gás de secagem 7 L/min; tensão do capilar 4000V; pressão do nebulizador 27 psi. Os espectros de massa foram registrados em modo de varredura completa na faixa de 200-800 m/z .

Para a análise por CLAE-MS foram selecionadas as amostras que apresentaram um perfil de formação de produtos de degradação majoritários,

especificamente a amostra de doripenem degradada em produtos de degradação. Estas foram, a amostra de doripenem degradada em peróxido de hidrogênio à 3% durante 75 minutos, e a amostra submetida à degradação térmica por 48 horas na temperatura de 35 °C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO OXIDATIVA

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade em fármacos. Ela envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Os mecanismos de oxidação dependem da natureza química do fármaco e da presença de espécies reativas de oxigênio ou outros agentes oxidantes. A maioria das reações de oxidação em preparações farmacêuticas relaciona-se à auto-oxidação, que ocorre espontaneamente pela influência inicial do oxigênio atmosférico (LEITE, 2005; SILVA et al., 2009).

Para estudos de estresse, Singh & Bakshi (2000) recomendam a utilização de peróxido de hidrogênio na faixa 1 a 30%. Os autores sugerem que o estudo inicie-se utilizando peróxido de hidrogênio na concentração de 3% durante 6 horas. Havendo degradação total do fármaco, recomendam diminuir o tempo de exposição ou a concentração do agente oxidante. Para fármacos menos suscetíveis a oxidação, a recomendação é utilizar peróxido de hidrogênio a 30% durante 24 horas. Não havendo degradação suficiente, o fármaco deve ser declarado estável frente à oxidação.

Os resultados da análise quantitativa indicaram uma alta susceptibilidade do doripenem à oxidação. Quando exposto ao peróxido de hidrogênio à 3%, após 75 minutos de reação, o fármaco apresentou um decaimento de 31,81% do seu teor inicial. E quando submetido à decomposição em peróxido de hidrogênio à 10%, o decaimento foi de 41,39% em 75 minutos.

O teor residual de doripenem e o DPR obtido na análise referente a cada tempo degradação estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Teor residual do doripenem após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio à 3 e à 10%, em diferentes tempos de reação. E quantificação por CLAE.

Concentração de Peróxido de hidrogênio	Tempo (minutos)	Teor residual de doripenem (%)*	DPR
3%	0	100	0,07
	5	94,45	1,45
	10	89,72	2,34
	20	83,48	2,91
	30	80,69	0,67
	45	75,17	5,20
	60	74,10	1,86
	75	68,19	5,76
10%	0	100	0,05
	5	94,83	1,62
	10	88,77	0,03
	20	82,89	1,87
	30	77,70	2,86
	45	70,59	0,22
	60	64,23	1,82
	75	58,61	2,83

* Média da determinação de duas amostras individuais para cada tempo.

A Tabela 15 apresenta os dados utilizados na construção dos gráficos para determinação da ordem de reação.

Tabela 15- Valores de teor residual, logaritmo do teor residual e 1/ teor residual de doripenem, depois de submetido à degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio a 3% e a 10% em diferentes tempos. Quantificação por CLAE.

Concentração de Peróxido de hidrogênio	Tempo (minutos)	Teor residual de doripenem (%)	Log do teor residual de doripenem	1/ concentração residual de doripenem
3%	0	100	2,00	0,01
	5	94,45	1,975	0,0106
	10	89,72	1,953	0,0111
	20	83,48	1,922	0,0120
	30	80,69	1,907	0,0124
	45	75,17	1,876	0,0133
	60	74,10	1,870	0,0135
	75	68,19	1,834	0,0147
10%	0	100	2,00	0,01
	5	94,83	1,977	0,0105
	10	88,77	1,948	0,0113
	20	82,89	1,919	0,0121
	30	77,70	1,890	0,0129
	45	70,59	1,849	0,0142
	60	64,23	1,808	0,0156
	75	58,61	1,768	0,0171

A representação gráfica que apresentou o coeficiente de correlação mais próximo à unidade para ambas as condições testadas (Tabela 16) foi obtida plotando-se a recíproca do teor residual de doripenem versus o tempo. Isto indica que a degradação oxidativa do doripenem seguiu uma reação de segunda ordem. Em reações de segunda ordem, a velocidade de reação é dependente da concentração das duas substâncias reagentes ou da segunda potência da concentração de uma delas.

Tabela 16- Valores de coeficiente de correlação para as ordens de reação referentes à degradação oxidativa do doripenem.

	Coeficiente de correlação (r)	
	H ₂ O ₂ a 3%	H ₂ O ₂ a 10%
Zero ordem	0,9591	0,9860
Primeira ordem	0,9714	0,9954
Segunda ordem	0,9807	0,9989

As representações gráficas obtidas para determinação da ordem de reação estão ilustradas nas Figuras 18, 19 e 20.

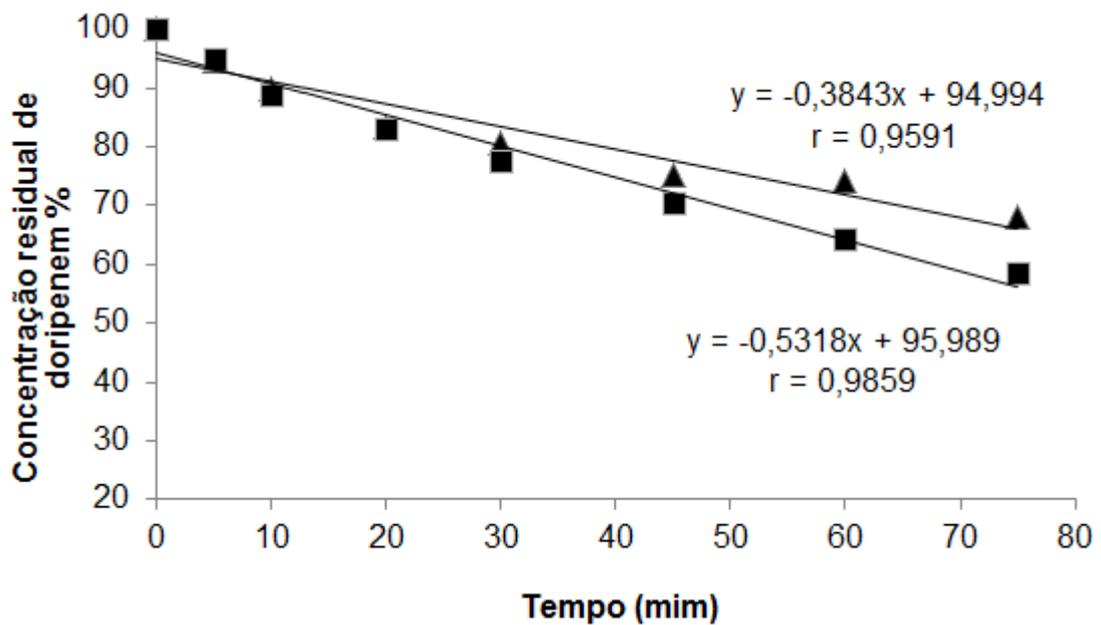


Figura 18- Representação gráfica para reação de zero ordem, após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio a 3 e a 10%, em diferentes tempos de reação. Quantificação por CLAE. (▲) H₂O₂ a 3%; (■) H₂O₂ a 10%.

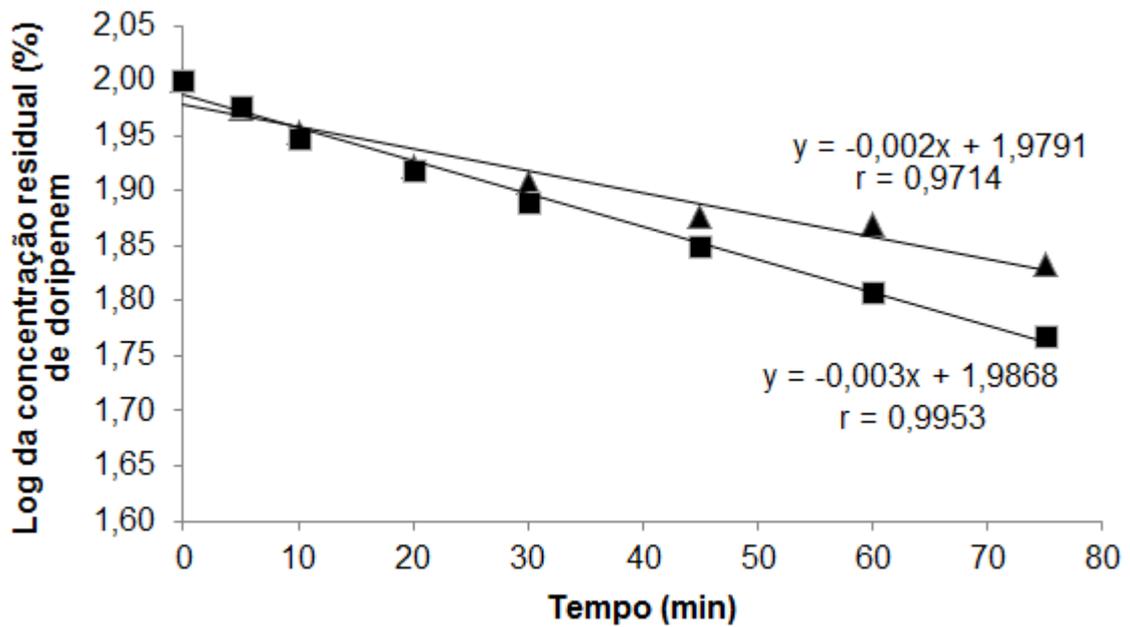


Figura 19- Representação gráfica para uma reação de primeira ordem, após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio a 3 e a 10%, em diferentes tempos de reação. Plotagem do log da concentração residual de doripenem *versus* o tempo. Quantificação por CLAE. (▲) H₂O₂ a 3%; (■) H₂O₂ a 10%.

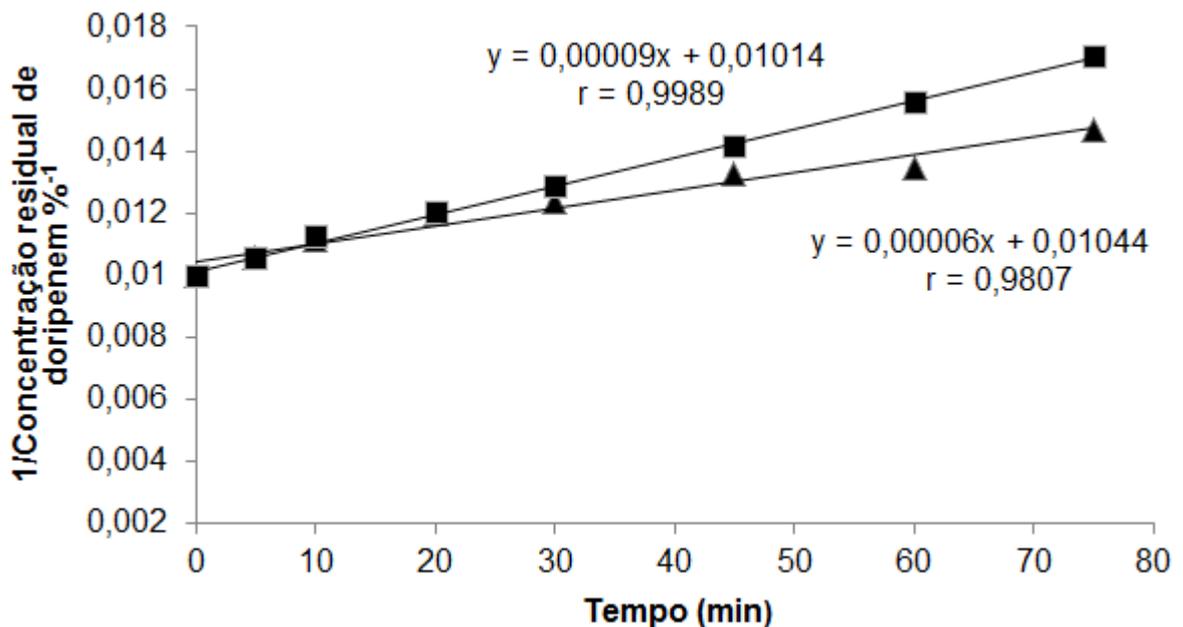


Figura 20- Representação gráfica para uma reação de segunda ordem, após degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio a 3 e a 10%, em diferentes tempos de reação. Plotagem de 1 / concentração residual de doripenem *versus* tempo. Quantificação por CLAE. (▲) H₂O₂ a 3%; (■) H₂O₂ a 10%

A partir da determinação da ordem de reação, torna-se possível um maior entendimento do perfil de degradação da amostra, de modo a permitir também a obtenção de outros dados cinéticos, como a velocidade de reação (k), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e o $t_{90\%}$. Os valores de k para cada tempo de exposição e o valor de k médio estão expostos na tabela 17.

Tabela 17- Valores de velocidade de degradação do doripenem, obtidos segundo cinética oxidativa de segunda ordem.

Concentração de peróxido de hidrogênio	Tempo (min)	Concentração de doripenem (%)	Valores de k (% ⁻¹ .min ⁻¹)	k médio (% ⁻¹ .min ⁻¹)
3%	0	100	---	0,000086
	5	94,45	0,00012	
	10	89,72	0,00011	
	20	83,48	0,00010	
	30	80,69	0,00008	
	45	75,17	0,00007	
	60	74,10	0,00006	
	75	68,19	0,00006	
10%	0	100	----	0,00010
	5	94,83	0,00010	
	10	88,77	0,00013	
	20	82,89	0,00011	
	30	77,70	0,00010	
	45	70,59	0,00009	
	60	64,23	0,00009	
	75	58,61	0,00009	

A constante de velocidade de reação foi maior para as amostras submetidas à degradação com H₂O₂ a 10%. Neste caso o tempo de meia vida e o $t_{90\%}$ foram de 100,00 e 11,11 minutos, respectivamente. Quando submetido à degradação em H₂O₂ a 3% o tempo de meia vida e o $t_{90\%}$ foram de 116,27 e 12,91 minutos, respectivamente.

Através da análise cromatográfica, foi possível a visualização de dois produtos de degradação nos tempos de 3,66 (Pd-1) e 4,27 (Pd-2) minutos, como ilustrado na Figura 21. Estes produtos foram formados em ambas as condições testadas. Os dados de pureza de pico indicaram que não houve interferência dos produtos de degradação no pico referente ao doripenem.

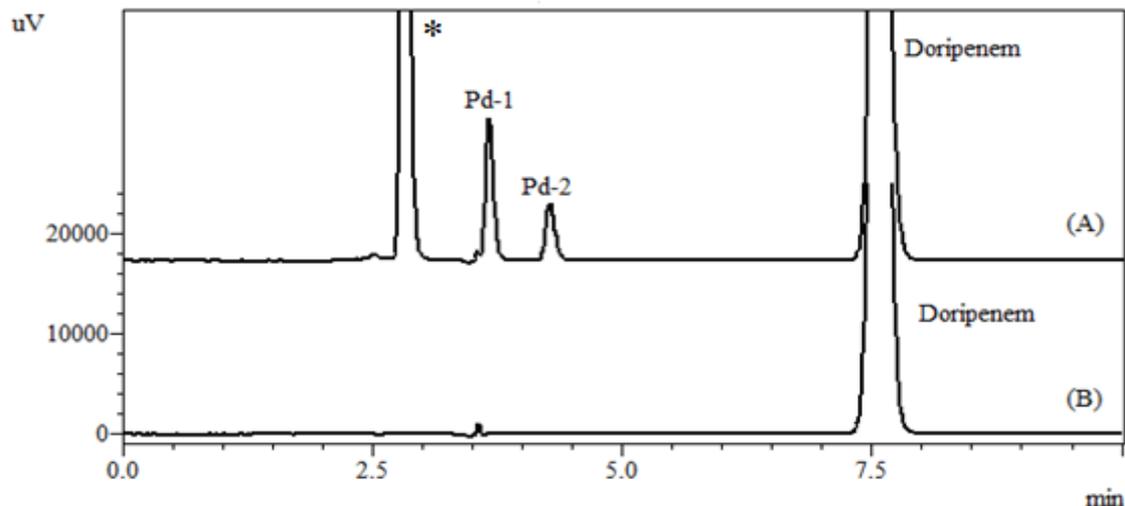


Figura 21- Cromatogramas sobrepostos ilustrativo da análise das amostras de doripenem submetidas à degradação oxidativa. A) doripenem degradado com peróxido de hidrogênio a 3% durante 75 minutos. B) doripenem SQR. * Pico referente à fenacetina, estabilizante presente no produto oxidante.

3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

Quando submetido à degradação por estresse térmico, o doripenem apresentou uma acentuada degradação, mesmo no armazenamento à temperatura ambiente (Tabela 18). Este perfil de instabilidade se assemelha ao observado para outros derivados carbapenêmicos (FUHR et al., 2013; SMITH et al., 1990). Os dados obtidos no presente trabalho indicam que quando armazenado à 35°C por 48 horas o doripenem apresentou decaimento de 42,19% em seu teor. Na temperatura de 45 °C, o teor decaiu 45,67% em 24 horas. A constante de velocidade de reação foi de 0,00518 μ /h para a temperatura de 25 °C, 0,01306 μ /h para a temperatura de 35 °C e 0,02541 μ /h para a temperatura de 45 °C.

Tabela 18- Valores de teor residual de doripenem para as amostras submetidas à degradação térmica a 25 °C, 35 °C e 45 °C. Dados analíticos obtidos através de metodologia por CLAE-UV (adaptado de BARBOSA 2012).

Temperatura	Tempo (h)	Teor (%)*	DPR
25 °C	24	90,47	0,96
	48	81,56	9,00
	72	67,54	2,75
	96	65,05	1,48
	120	51,36	2,09
	144	47,38	2,81
	35 °C	12	87,15
24		67,52	3,10
36		57,99	9,68
48		57,81	2,42
60		48,55	2,07
72		39,02	5,66
45 °C		2	96,61
	4	94,67	2,20
	6	86,00	1,19
	8	83,74	9,42
	10	79,59	1,92
	12	75,43	2,11
	24	54,33	2,01

*Média da determinação de três amostras, analisadas em triplicata.

A degradação térmica do doripenem seguiu uma cinética de primeira ordem. A representação gráfica da cinética de primeira ordem está ilustrada na Figura 22.

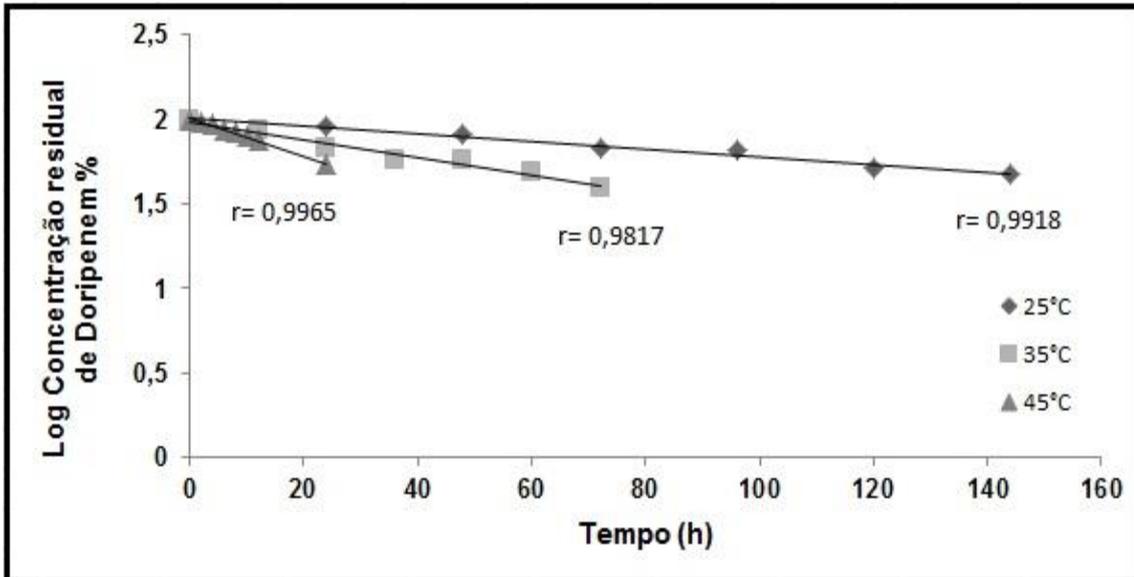


Figura 22- Representação gráfica para plotagem de cinética de decomposição térmica do doripenem seguindo primeira ordem, plotagem do log da concentração residual de doripenem x tempo (Fonte: Barbosa 2012).

Com os valores de constante de velocidade de reação obtidos por Barbosa (2012), calculou-se a energia de ativação através da equação de Arrhenius. Esta energia de ativação pode ser definida como a energia mínima necessária para que se inicie uma reação química a partir dos reagentes presentes.

A equação de Arrhenius é uma ferramenta útil para estudos de estabilidade térmica, pois expressa uma relação quantitativa entre a temperatura, a energia de ativação e a constante de velocidade de reação. O aumento da velocidade de reação em função do aumento da temperatura pode ser explicada por um deslocamento na distribuição de *Maxwell Boltzmann* (RUSSEL, 1994).

Em qualquer temperatura existe uma distribuição, a *distribuição de Maxwell Boltzmann*, de energias cinéticas moleculares, e, a temperaturas mais elevadas, essa distribuição se desloca no sentido de ter um maior número de moléculas rápidas e menos moléculas lentas. A Figura 23 ilustra uma representação da distribuição de energias cinéticas moleculares de uma substância, em duas diferentes temperaturas. A energia de ativação está assinalada no diagrama (área sombreada). Podemos observar que a fração de moléculas com energia igual ou superior a energia de ativação aumenta com a temperatura (RUSSEL, 1994).

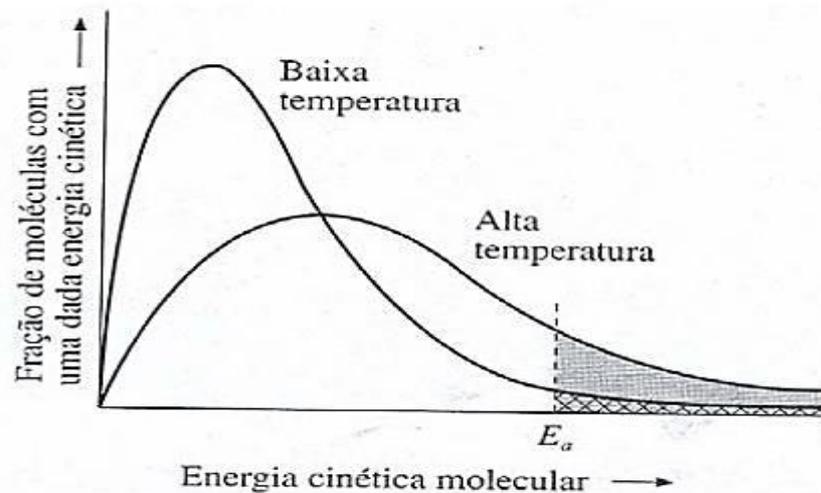


Figura 23- Efeito da temperatura sobre a fração do número total de moléculas com energia igual ou superior a energia de ativação (Fonte: RUSSEL, 1994).

Segundo Yoshioka e Stella (2000), geralmente os valores de energia de ativação observados na degradação de fármacos encontram-se na faixa de 10 a 30Kcal/mol. Os autores citam também a influência do aumento da temperatura sobre a energia de ativação. Em uma dada reação, com energia de ativação de 10Kcal/mol, um aumento de 10 °C na temperatura acarretaria em um aumento de 1,76 vezes na reatividade dos compostos. Já para uma reação com energia de ativação de 30 Kcal/mol, o aumento de 10 °C na temperatura aumentaria 5,5 vezes a velocidade da reação.

A degradação térmica do doripenem em solução reconstituída apresentou uma energia de ativação de 15 Kcal/mol, dentro da faixa citada por Yoshioka e Stella (2000). Segundo os autores, para uma reação com energia de ativação de 15 Kcal/mol, o aumento de 10 °C na temperatura aumentaria 2,34 vezes a velocidade de reação. Observou-se experimentalmente que a velocidade de reação aumentou em média 2,23 vezes.

O gráfico de Arrhenius obtido plotando-se o logaritmo neperiano das constantes de velocidade de reação do doripenem em função da temperatura está ilustrado na Figura 24, com perfil linear na faixa de 25 a 45 °C ($r= 0,9971$).

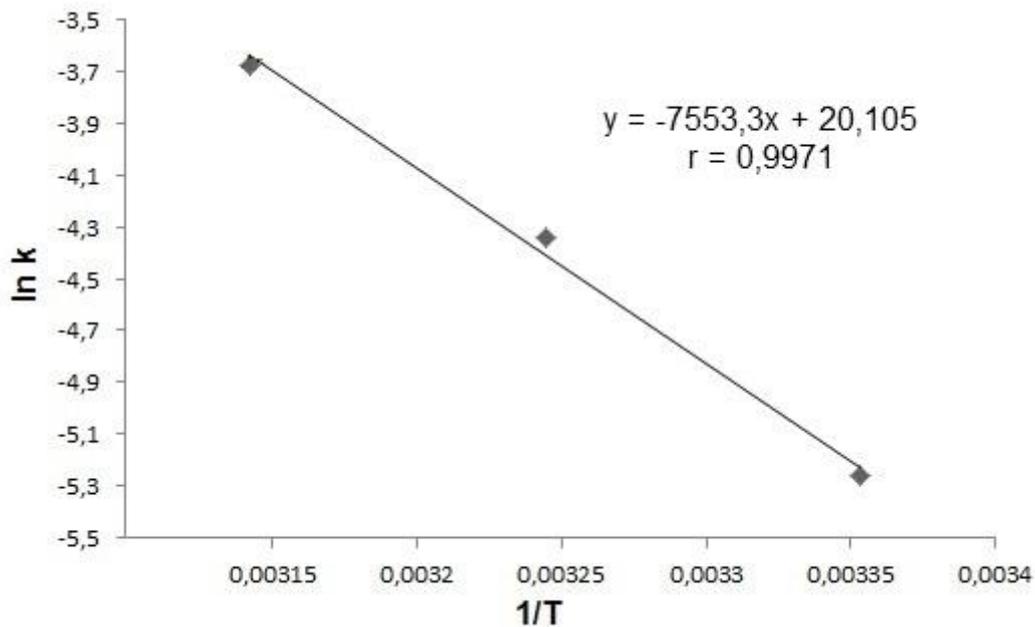


Figura 24- Representação do gráfico de Arrhenius obtido em estudo de degradação térmica do antibiótico doripenem.

Segundo Swanson e colaboradores (1986), valores de energia de ativação em torno de 17 kcal/mol são característicos de reações de hidrólise. A energia de ativação de 15 kcal/mol observado para a degradação térmica do doripenem sugere que a hidrólise do anel β -lactâmico, constitui a principal via de decomposição do fármaco.

Através da análise cromatográfica, foi possível a visualização de dois produtos de degradação mais polares que o doripenem, nos tempos de 6,15 e 7,46 minutos, como ilustrado na Figura 25.

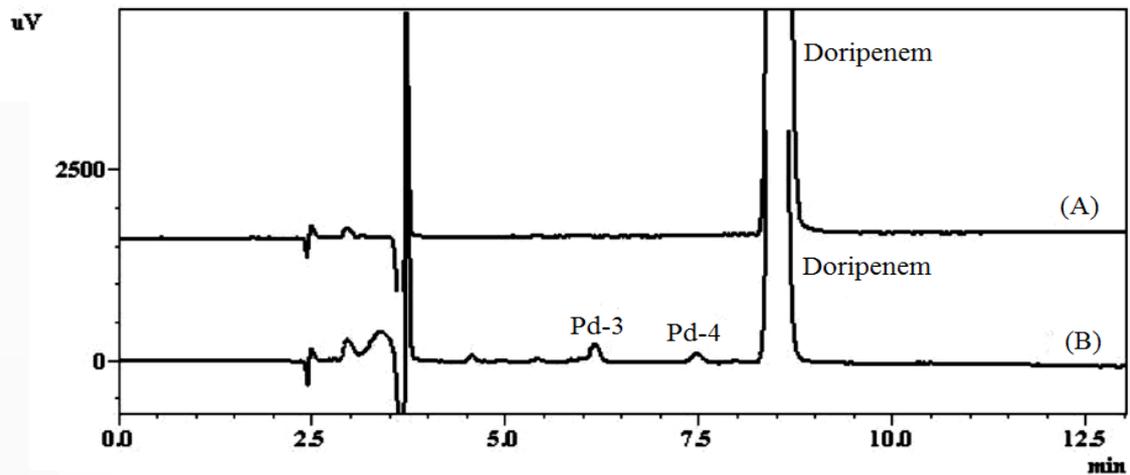


Figura 25- Cromatograma demonstrativo da degradação térmica do doripenem. (A) doripenem SQR. (B) amostra degradada à 35 °C por 72 horas;

3.3 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR LC-MS

A combinação da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas (LC-MS) tem apresentado um impacto significativo no desenvolvimento e análise de fármacos nas últimas décadas. Devido a sua alta sensibilidade e especificidade, a técnica por LC-MS pode ser aplicada em diversas etapas, desde o desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas, até o controle de qualidade do produto final. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica bastante vantajosa para a análise e identificação de impurezas e produtos de degradação, pois devido à capacidade de separação da cromatografia líquida, não se faz necessário o isolamento e a purificação das impurezas (LEE et al., 1999)

Conforme citado anteriormente, as carbapenemas apresentam susceptibilidade a diversos fatores de degradação, dentre eles temperatura e umidade, hidrólise ácida e alcalina, oxidação e luz. Devido à alta reatividade da carbonila do anel β -lactâmico, a clivagem deste anel apresenta-se como a principal rota de degradação desta classe. Reddy e colaboradores (2014) citam o produto oriundo da abertura do anel β -lactâmico e o dímero formado a partir da condensação dos anéis como as principais impurezas relacionadas ao doripenem. Este comportamento de abertura de anel e dimerização é uma reação já conhecida, e

descrita em trabalhos com carbapenemas publicados na literatura (MENDEZ et al., 2007; SANJONZ et al., 2006; SMITH et al., 1990).

Através da análise por LC-MS das amostras de doripenem degradadas e do estudo dos espectros de massas obtidos, com as prováveis fragmentações, tornou-se possível a proposição das estruturas químicas destes produtos. Sob condição de degradação oxidativa, a análise por LC-MS revelou a formação de três produtos de degradação, de relação massa/carga (m/z) 411, 427 e 437. Na degradação térmica, a análise por LC-MS revelou a formação de diversos produtos de degradação, dentre eles os de m/z 411 e 427, possivelmente os mesmos formado na condição oxidativa. Além destes, destacam-se também os produtos de m/z 664, 650 e 634.

A Figura 26 representa o espectro de massas da amostra de doripenem sem degradação. Na figura, visualiza-se um pico de m/z 421 [$M+H^+$] referente ao doripenem.

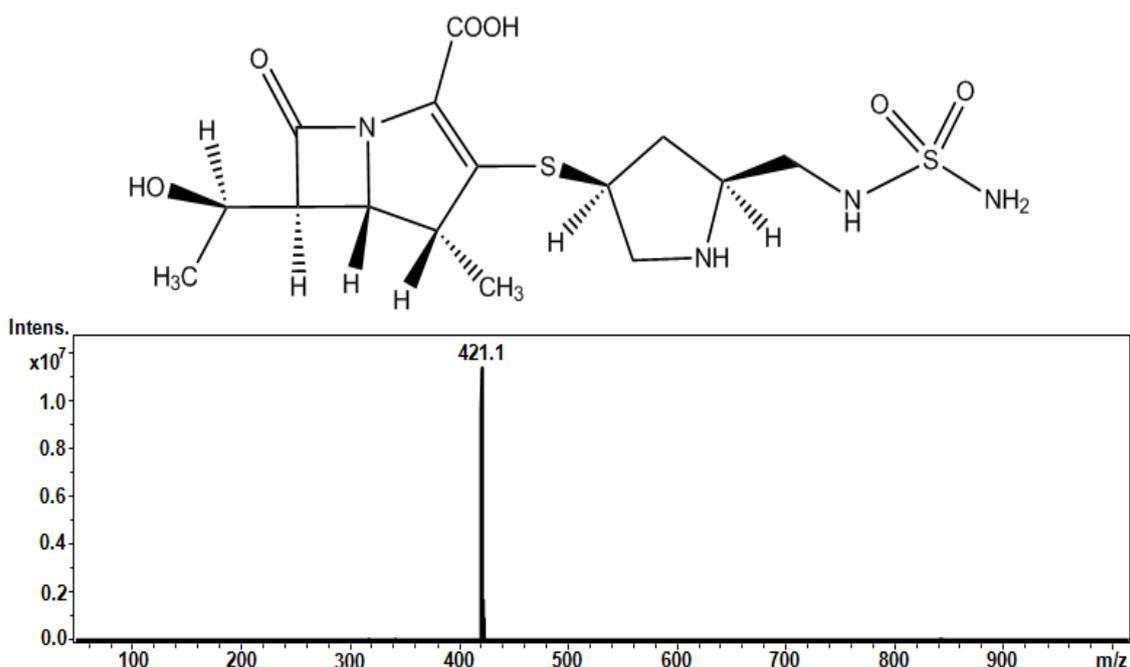


Figura 26- Estrutura química do doripenem e espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem sem degradação.

Entre os produtos formados, aquele com m/z 437 [$M+H$] ((4R,5S)-5-((S)-1-carboxy-2-oxopropyl)-4-methyl-3-(((5S)-5-((sulfamoylamino)methyl)pyrrolidin-3-yl)thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid), formado após a degradação oxidativa do doripenem, refere-se à estrutura química do doripenem após o rompimento do anel β -lactâmico e a oxidação da cadeia alcoólica, levando a formação de uma cetona (Figura 27).

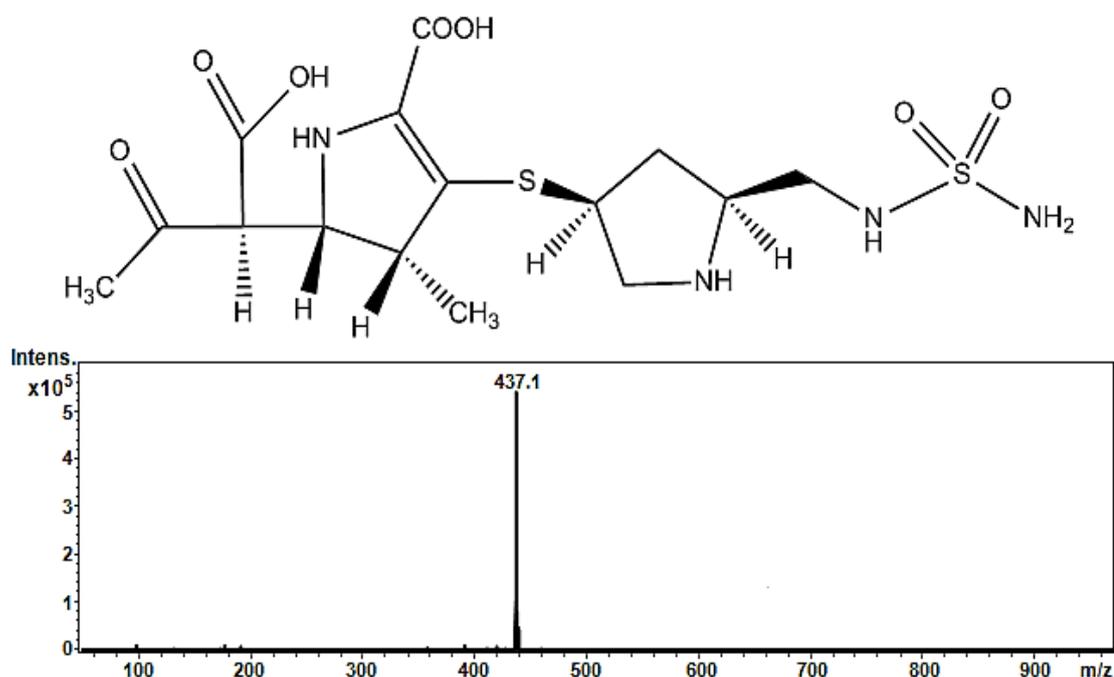


Figura 27- Estrutura molecular do produto de degradação de m/z 437, formado a partir do rompimento do anel β -lactâmico e da oxidação da cadeia alcoólica do doripenem. E espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação oxidativa.

Os produtos de degradação que apresentaram m/z 411 e 427 foram formados em ambas as condições de estresse. Estes produtos possivelmente são formados pelo rompimento do anel β -lactâmico e alterações na cadeia lateral alcoólica. A Figura 28 ilustra o produto (4R,5R)-5-((R)-carboxy(hydroxy) methyl)-4-methyl-3-(((5S)-5-((sulfamoylamino) methyl) pyrrolidin-3-yl) thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid de m/z 411. A Figura 29 ilustra o produto (5R)-5-((S)-1-carboxy-2,2-dihydroxyethyl)-3-(((5S)-5-((sulfamoylamino) methyl) pyrrolidin-3-yl)thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid de m/z 427.

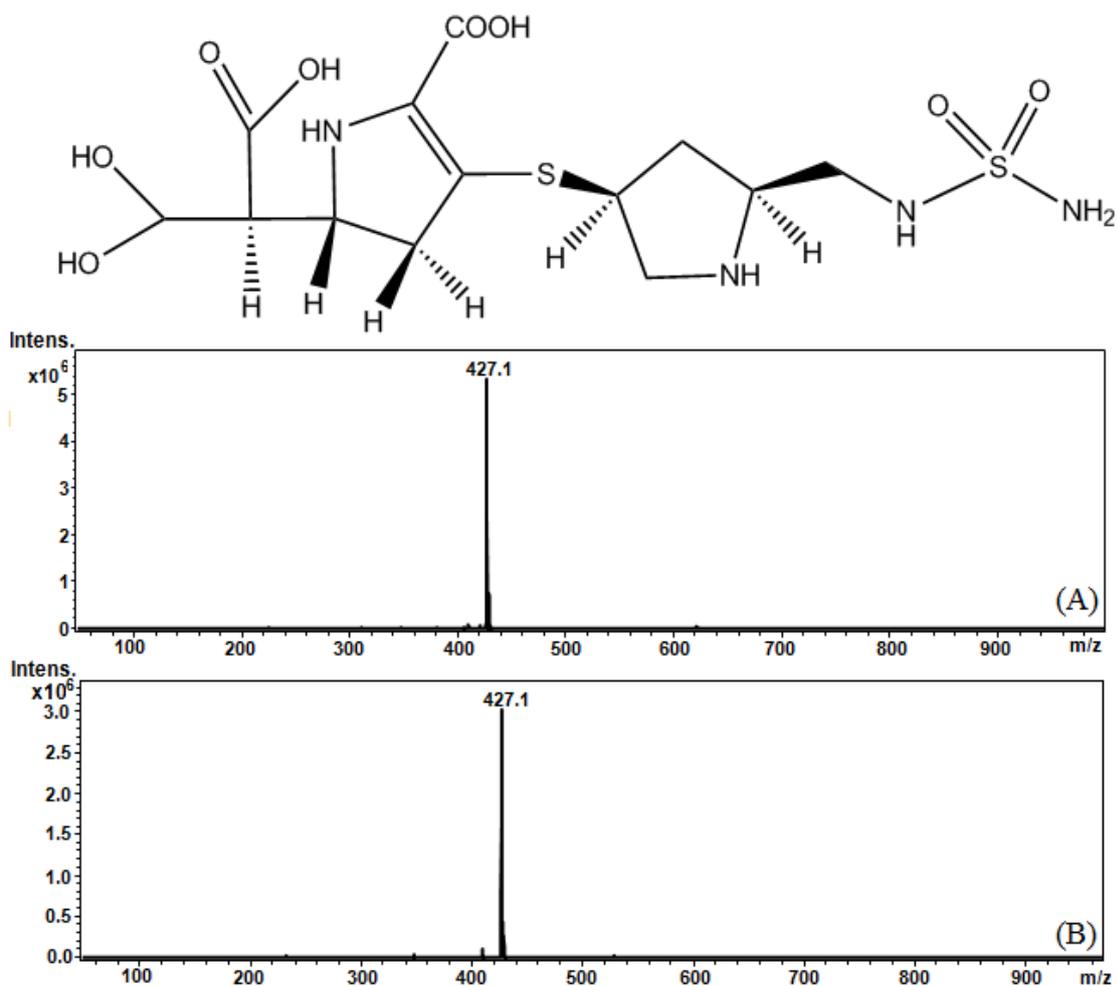


Figura 29- - Estrutura molecular do produto de decomposição de m/z 427 (5R)-5-((S)-1-carboxy-2,2-dihydroxyethyl)-3-(((5S)-5 ((sulfamoylamino) methyl) pyrrolidin-3-yl)thio)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid formado a partir da hidrólise do anel β -lactâmico e alterações na cadeia lateral alcoólica. (A) espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação oxidativa e (B) espectro de massas obtido através da análise da amostra de doripenem submetida à degradação térmica.

A degradação térmica também levou a formação de produtos de decomposição de m/z 664, 650 e 634 que por apresentarem massa molecular superior a massa do fármaco, possivelmente são formados através de quebras no produto dimérico do doripenem. Este dímero formado através da condensação dos anéis β -lactâmicos (Figura 30), é citado por Reddy e colaboradores como uma das principais impurezas relacionadas ao fármaco.

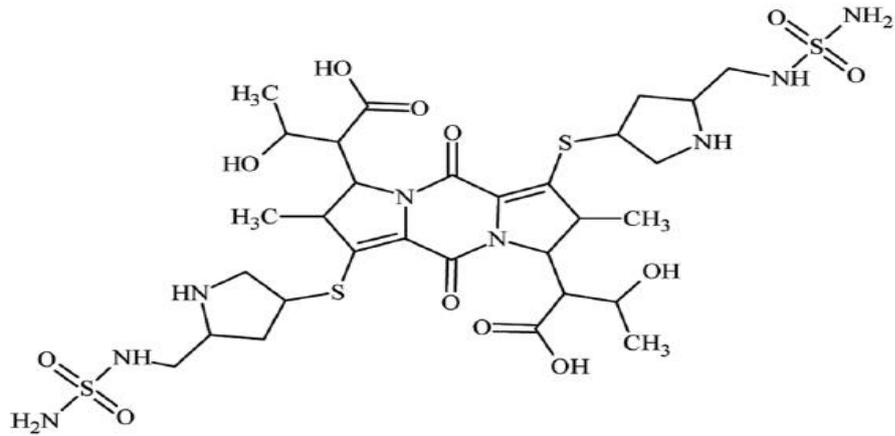


Figura 30- Produto dimérico do doripenem formado através da condensação dos anéis β -lactâmicos (Fonte: REDDY et al., 2014)

A Figura 31 ilustra o produto de degradação 2,2'-(1-mercapto-2,7-dimethyl-5,10-dioxo-6-((5-((sulfamoylamino)methyl)pyrrolidin-3-yl)thio)-2,7,8,10-tetrahydro-3H,5H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine-3,8-diyl)bis(3-hydroxybutanoic acid) de m/z 664.

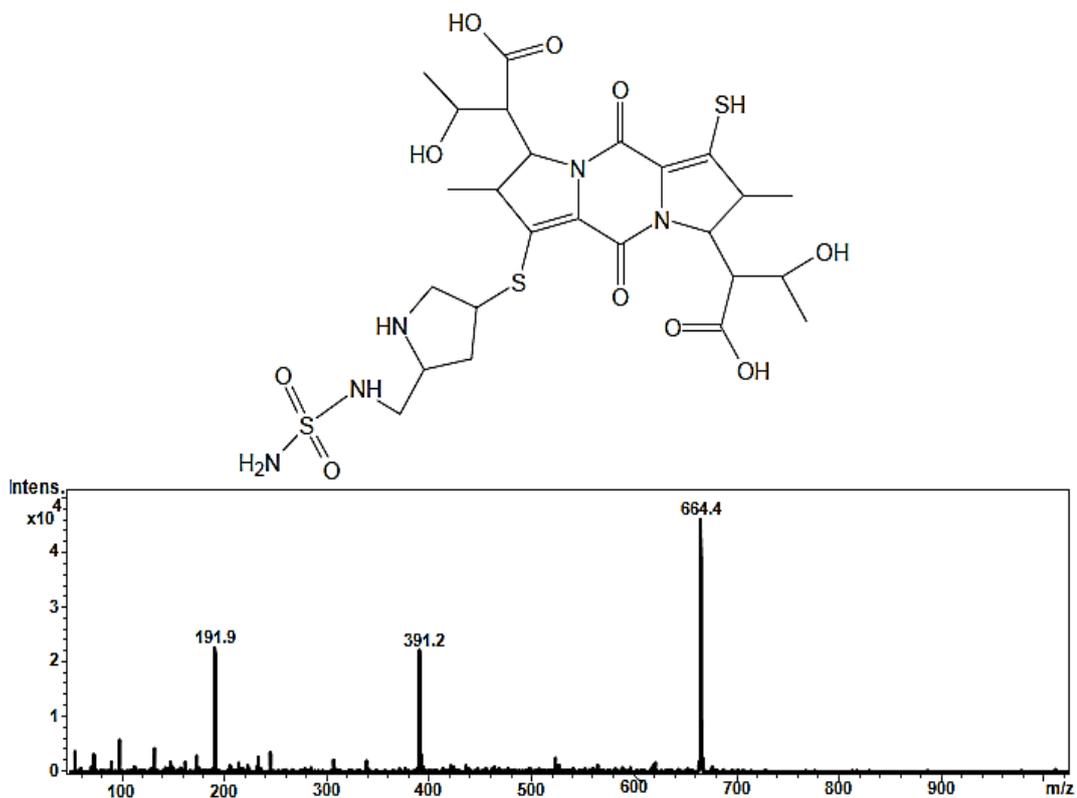


Figura 31- Estrutura molecular do produto de decomposição de m/z 664, formado a partir de quebras no dímero do doripenem. E espectro de massas da amostra de doripenem submetida a estresse térmico.

A Figura 32 ilustra o produto de decomposição 2-(8-(1-carboxy-2-hydroxyethyl)-6-mercapto-2,7-dimethyl-5,10-dioxo-1-((5-((sulfamoylamino) methyl) pyrrolidin-3-yl)thio)-2,7,8,10-tetrahydro-3H,5H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazin-3-yl)-3-hydroxybutanoic acid, de m/z 650. A Figura 33 ilustra o produto de decomposição 2-(8-(1-carboxy-2-hydroxyethyl)-6-mercapto-2,7-dimethyl-5,10-dioxo-1-((5-((sulfamoylamino) methyl)pyrrolidin-3-yl)thio)-2,7,8,10-tetrahydro-3H,5H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazin-3-yl)-3-oxopropanoic acid, de m/z 634.

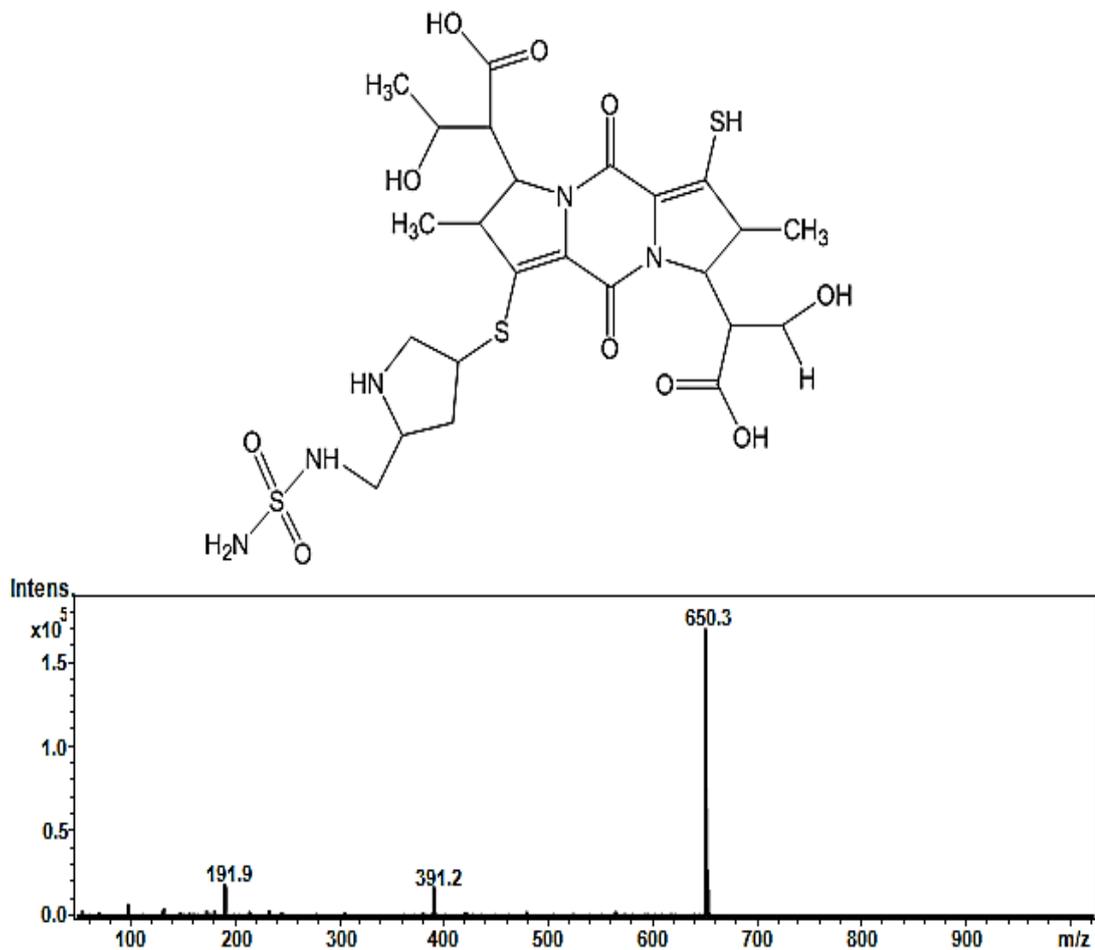


Figura 32- Estrutura molecular do produto de decomposição de m/z 650, formado a partir de quebras no dímero do doripenem. E espectro de massas da amostra de doripenem submetida a estresse térmico.

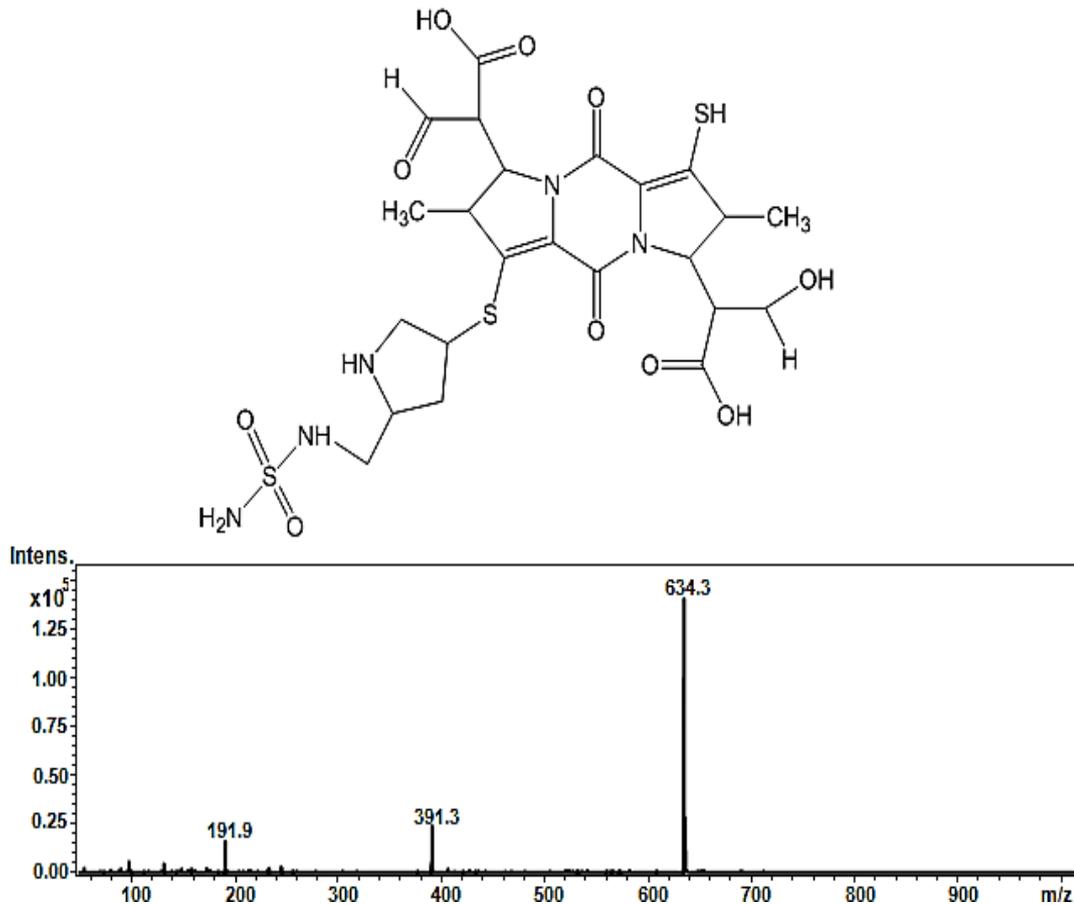


Figura 33- Estrutura molecular do produto de decomposição de m/z 634, formado a partir de quebras no dímero do doripenem. E espectro de massas da amostra de doripenem submetida a estresse térmico.

Os cuidados com a estabilidade de fármacos e medicamentos e com a formação de produtos de degradação cada vez mais ganham a atenção das autoridades reguladoras. Recentemente foi aprovada pela ANVISA a RDC n° 58, de 20 de dezembro de 2013 (BRASIL 2013), que estabelece parâmetros para verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento. Esta resolução determina os limites necessários para notificação (valor acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado nos estudo de estabilidade) identificação (valor acima do qual um produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada) e qualificação (valor acima do qual um produto de degradação deverá ser qualificado quanto a sua segurança biológica) dos produtos de degradação, levando em consideração a dose máxima diária do medicamento.

Os limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação. No caso do doripenem, sua dose máxima recomendada por dia é de 1500 mg, e seus limites de formação de produto de degradação são de 0,05%, 0,2% e 0,3% para notificação, identificação e qualificação, respectivamente.

4 CONCLUSÕES

- ✓ Quando submetidas à degradação oxidativa, as amostras reconstituídas de doripenem apresentaram uma cinética de decomposição seguindo uma reação de segunda ordem;
- ✓ As amostras reconstituídas de doripenem apresentaram uma cinética de decomposição de primeira ordem, quando submetidas à degradação térmica. A energia de ativação, calculada através da equação de Arrhenius, foi de 15 Kcal/mol, valor característico de reações de hidrólise;
- ✓ As análises por LC-MS permitiram propor a estrutura química de produtos de degradação formados sobre ambas as condições de estresse, com destaque para os produtos formados pela hidrólise do anel β -lactâmico e pelo processo de dimerização;
- ✓ Foram propostos seis produtos de degradação, de m/z 437 formado sob condição de estresse oxidativo, de m/z 411 e 427 formados em ambas as condições de estresse, e de m/z 664, 650 e 634 formados nas amostras de doripenem submetidas à degradação térmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 59, p 29 -37, 2007

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

BARBOSA, F. **Determinação da estabilidade térmica do antibiótico doripenem – cinética de degradação**. Aprovado 21/11/2012. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Farmácia, UNIPAMPA. 2012

BIRNBAUM, J.;KAHAN, F. M.;MACDONALD J. S. Carbapenems, A New Class of Beta-Lactam Antibiotics. **The American Journal of Medicine**. v. 78. 1985.

BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal Pharmaceutical Analysis**. p. 159-165. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº45, de 9 de agosto de 2012. dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº1, de 29 de junho de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 agosto de 2005.

CASTANHEIRA, M.; JONES R. N.; LIVERMORE, D. M. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V .63, p. 426–433, 2009.

CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A. The UV-derivative spectrophotometry for the determination of doripenem in the presence of its degradation products **Spectrochimica Acta Part A**. v.77, p. 554–557, 2010.

DAILLY, E.; BOUQUIÉ, R.; DESLANDES, G.; JOLLIET, P.; LEFLOCH, R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, entapetem, empenem, mero penem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p.1137-1142, 2011.

EMA. **European Medicines Agency European Public Assessment Report (EPAR) summary for the public.** Julho, 2008.

FUHR, F.; PALIOSA P. K.; COSTA, M. C. N., GARCIA, C. V.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M.; MENDEZ, A. S. L. Bioassay Applied to Quantitative Determination of Doripenem in Powder for Injection – Method Validation and Degradation Kinetics Study. **Current Pharmaceutical Analysis.** v. 9, p. 244-251, 2013.

GOLDSTEIN, E.J.C.; CITRON, D.M. Activity of a novel carbapenem, doripenem, against anaerobic pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 63, p. 447 – 454, 2009.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness:ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 24, p. 723 – 753. 2001.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS Q1A(R2).** 2003.

ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1).** 2005

JONES, R. N.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various β -lactamase resistance mechanisms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 52, p. 71–74, 2005.

KEEL, R. A.; SUTHERLAND C. A.; CRANDON J. L.; NICOLAU D. P. Stability of doripenem, imipenem and meropenem at elevated room temperatures. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 37, p. 174 – 185. 2011.

KNAPP, K. M.; ENGLISH B. K. Carbapenems. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* v. 12, p. 175-185, 2001.

LEE, M.S.; KERNS, E.H. LC/MS applications in drug development. **Mass Spectrometry Reviews.** v. 18, p. 187± 279, 1999.

LEITE, E.G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos.** 2005. 199 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LIVERMORE, D. M. Doripenem: antimicrobial profile and clinical potential. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 63, p. 455–458, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estudo da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova.** v. 32, p. 214-222, 2009.

MANTOVANI, L.; SAYAGO, C.; DE CAMARGO, V. B.; SILVEIRA, V.; GARCIA, C.; SCHAPOVAL, E. ; MENDEZ, A.S.L. Stability-indicating RP-HPLC Method for Analysis of the Antibiotic Doripenem in Pharmaceutical Formulation Comparison to UV Spectrophotometry and Microbiological Assay. **Acta Chromatographica**. v. 24, p. 367-382, 2012.

MARTÍNEZ, M. J. F.; GARCÍA, M. G.; SÁNCHEZ, E. G.; SÁNCHEZ, J. E.G. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 28, p. 56-64, 2010.

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

MENDEZ, A.S.L.; DALOMO, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 41, p. 1363 – 1366. 2006.

MENDEZ, A.; CHAGASTELLES, P.; PALMA, E.; NARDI, N.; SCHAPOVAL, E. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 350, p. 95 – 102. 2007.

MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Determination of doripenem and related substances in medicinal product using capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**. v.34, p.475–482, 2011.

NULDEMAN, N.S. **Estabilidad de medicamentos**. 1ª edição, Buenos Aires, El Ateneo. 1975.

ORTHO-MCNEIL JANSSEN PHARMACEUTICALS. **DORIBAX® for injection 500 mg Powder for Intravenous Infusion – Product Information**. 2009.

PATERSON. D.L.; DEPESTEL, D.D. Doripenem. **Reviews Of Anti-Infective Agents**. v.49, 2009.

PSATHAS, P. A.; KUZMISSION, A.; IKEDA, K; YASUO, S. Stability of Doripenem in Vitro in Representative Infusion Solutions and Infusion Bags. **Clinical Therapeutics**. v. 30, p. 11, 2008.

REDDY, P; SOWJANYA; P; SHANMUGASUNDARAM P; NAIDU, P. Y; HANUMANARAJU, G. V; KARTHIKEYAN, R. Stability indicating ultra performance liquid chromatography method for the simultaneous estimation of doripenem and its degradation products. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v, 37. p, 298–310, 2014

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. 2. ed. São Paulo Makron Books. v. II. 1994.

SAHM, D. In Vitro Activity of Doripenem. **Clinical Infectious Diseases**. V.49, n.1, p.11-16, 2009.

SAJONZ, P.; WU, Y. NATISHAN, T. K.; MCGACHY, N. T.; Tora D. Challenges in the Analytical Method Development and Validation for an Unstable Active Pharmaceutical Ingredient. **Journal of Chromatographic Science**. v. 44, 2006.

SHAM, D. In Vitro Activity of Doripenem. **Clinical Infectious Diseases**. v.49, p.11-16, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. p. 55 – 66. 2003.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, p. 129 – 135. 2009.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology on-line**. v, 24. p, 1-14. 2000.

SINKO, P.J. **Martin- físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5ª edição. Artmed, 2008.

SMITH, G. B.; DEZENY, G. C.; DOUGLAS, A. W. Stability and kinetics of degradation of imipenem in aqueous solution. **Journal of pharmaceutical sciences**. v, 79. p, 732 – 740. 1990.

SUTHERLAND, C.; NICOLAU, D.P. Development of an HPLC method for the determination of doripenem in human and mouse serum. **Journal of Chromatography B**, v.853, p. 123–126, 2007.

SWANSON, D. J.; DEANGELIS, C.; SMITH, I. L.; ACHENTHAH, J. J. Degradation kinetics os empenem in normal saline and in human serum. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**. v, 29. p, 936 - 937, 1986.

YOSHIOKA, S; STELLA, V.S. **Stability Drugs and Dosage Forms**. New York. Kluwer Academic / Plenum Publisher. 2000.

ZAJAC, M.; CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA A. Stability of ertapenem in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43. p, 445 – 449. 2006.

Anexo 1

14/06/2015

Imprimir

Assunto: Submission Confirmation

De: J. of Pharmaceutical & Biomedical Analysis (ees.jpba.0.31ecf6.58f8fd02@eesmail.elsevier.com)

Para: andreaslmendez@yahoo.com.br;

Data: Domingo, 14 de Junho de 2015 13:52

Dear Dr. Andreas Mendez,
Full Length Article

Your submission entitled "Stability-indicating UFLC method for determination of doripenem in powder for injection - reaction kinetics and degradations products by LC-MS" has been received by the Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jpba/>.

Your username is: Andreas Mendez

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/jpba/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned by the journal staff.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Submissions Being Processed for Author Andreas Mendez

Page: 1 of 1 (2 total submissions)

Display 10 results per page.

# Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Stability of paliperidone in osmotic tablets: decomposition reaction kinetics and degradation products	Jun 14, 2015	Jun 14, 2015	Submitted to Journal
Action Links		Stability-indicating UPLC method for determination of doripenem in powder for injection - reaction kinetics and degradations products by LC-MS	Jun 14, 2015	Jun 14, 2015	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (2 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu