



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

***TAHISA MARCELA PEDROSO***

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
ERTAPENEM SÓDICO EM PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO  
INJETÁVEL**

Processo FAPESP nº 2013/12959-0  
Processo FAPESP (BEPE) nº 2015/03412-3

**Araraquara-SP**  
**2017**

***TAHISA MARCELA PEDROSO***

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE  
ERTAPENEM SÓDICO EM PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO  
INJETÁVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**

**Araraquara-SP  
2017**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**P372d**

Pedroso, Tahisa Marcela

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para caracterização e quantificação de ertapenem sódico em pó liofilizado para solução injetável / Tahisa Marcela Pedroso. – Araraquara, 2017.

238 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Hérica Regina Nunes Salgado.

1. Ertapenem sódico. 2. Controle de qualidade. 3. Métodos analíticos. 4. Validação.  
5. Espectroscopia. 6. Cromatografia. 7. Ensaio microbiológico. 8. Eletroforese capilar. I. Salgado,  
Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

TAHISA MARCELA PEDROSO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ERTAPENEM SÓDICO EM PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

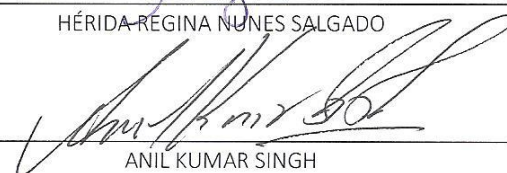
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 15 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO



ANIL KUMAR SINGH



CARLOS HENRIQUE GOMES MARTINS



ÁLVARO JOSÉ DOS SANTOS NETO



MARLUS CHORILLI

*Dedico este trabalho ao meu marido Stijn  
Hebben, ao meu filho Lucas José Hebben, e  
aos meus pais e irmãos por sempre me  
apoíarem.*

## AGRADECIMENTOS

É com muita fé que eu agradeço a Deus por me guiar em todas as etapas de minha vida, me conceder saúde, perseverança, paciência e capacidade para realização deste trabalho. Não há como expressar em palavras a minha gratidão a todos aqueles que me incentivaram ao longo desses anos de muitos desafios e superações. Percebo o quanto eu caminhei, mas também o quanto eu ainda tenho a caminhar! No entanto, neste momento, eu só quero agradecer a todos e comemorar o início dessa nova jornada.

A toda a minha família e amigos pelo apoio, incentivo e compreensão.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Hérica Regina Nunes Salgado, pela oportunidade concedida, pela confiança, paciência, amizade e colaboração. A você, minha profunda admiração e gratidão!

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa de estudo que me proporcionou a oportunidade de realizar o doutorado-sanduíche em Gante na Bélgica. Experiência de grande aprendizado e crescimento, tanto pessoal como profissional (Processo nº 2013/12959-0 e BEPE nº 2015/03412-3).

Ao Laboratório Farmacêutico Merck Sharp & Dohme, pela gentil doação de ertapenem sódico substância química de referência e ertapenem sódico em pó liofilizado para solução injetável, utilizados no decorrer deste estudo. Em especial, à colaboradora Darida Meneghetti que sempre me atendeu com presteza, atenção, dedicação e comprometimento ao seu trabalho.

Aos professores que participaram da banca examinadora de qualificação e defesa por dedicarem seu tempo corrigindo e assim, contribuindo com esse trabalho. Prof. Dr. Anil Kumar Singh; Prof. Dr. Álvaro J. S. Neto; Prof. Dr. Carlos H. G. Martins; Prof. Dr. Endler M. Borges; Prof. Dr. Marlus Chorilli; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natalia V. de Moraes.

A todos os meus colegas de laboratório que compartilharam comigo conhecimento, aprendizado e alegrias ao decorrer desses anos: Ana Carolina Kogawa, Bianca de Marco, Caroline Magnani, Danilo Rodrigues, Felipe Fernandes, Josilene Corrêa, Ketylin Migliato, Lívia Consortti, Mariana Teixeira e Rúbia Sversut. Em especial, à Eliane Gandolpho Tótolli, que esteve presente me apoiando durante toda a realização deste trabalho.

À Maria de Fátima Rodrigues Moreti, pelo apoio técnico e amizade.

À Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Quezia Bezerra Cass do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE, Departamento de Química na Universidade Federal de São Carlos, a quem eu admiro imensamente, o meu agradecimento pelos ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Paschoal Batistuti do Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, o meu agradecimento pelos

ensinamentos sobre validação de métodos analíticos ministrados em aulas do Programa de pós-graduação na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Masetto de Gaitani, Mariana Barbieri Alvarez Demets e Bruna Juliana Moreira do Laboratório de Separações e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/SP do Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo acolhimento e ensinamentos a mim concedidos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Dr. Paulo César Dantas da Silva e todos os colaboradores do Departamento de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB por disponibilizar o equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência usado neste estudo e por me receber com tanto carinho.

Ao Prof. Dr. Frederic Lynen do Grupo de Ciência de Separação, Departamento de Química Orgânica e Macromolecular na Faculdade de Ciências da Universidade de Gante por conceder a oportunidade de realizar o meu doutorado-sanduíche. Em especial ao meu amigo Giacomo Russo que partilhou comigo momentos de trabalho e de amizade sincera.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ann Van Schepdael e todos os colegas de Laboratório do Grupo de Pesquisa de Análise Farmacêutica na Universidade KU Lovaina, na Bélgica, ao qual eu tive o prazer em trabalhar, eu agradeço pelo acolhimento, direcionamento e acompanhamento deste trabalho. Em especial, ao Dr. Prasanta Paul pelo apoio técnico e científico e a Donatela Sadriaj pelo carinho e amizade.

Às empresas Agilent Technologies, Waters Technologies e à distribuidora de produtos farmacêuticos Allcrom, bem como seus respectivos colaboradores Dr<sup>ª</sup>. Simone Nascimento, Dr<sup>ª</sup>. Cintia Cristina Reis e Dr<sup>ª</sup>. Daniela Alvarenga, pela parceria firmada com nosso laboratório contribuindo fortemente para que o nosso grupo continue a desenvolver estudos de qualidade e mérito científico. Por acreditarem na pesquisa acadêmica no Brasil e pelo incentivo e suporte à pesquisa na forma de doação de colunas cromatográficas, os nossos sinceros agradecimentos!

Ao meu amigo Edson Teixeira da empresa Quântica Analítica, que sempre foi atencioso e nunca poupou esforços para me ajudar a desenvolver este trabalho. Obrigada pelo suporte técnico e amizade. Sempre serei grata a você que muito me ensinou!

A todos os profissionais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista por me receber e me auxiliar ao decorrer desses anos: Professores, grupo de pós-graduação, bibliotecárias, funcionárias da cantina, porteiros e serventes o meu sincero agradecimento!

## RESUMO

O ertapenem sódico é um antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos, disponível comercialmente na forma de pó liofilizado para solução injetável. Apresenta ação contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, aeróbias e anaeróbias. O objetivo do trabalho foi desenvolver métodos qualitativos e quantitativos para avaliação de ertapenem sódico. O ertapenem sódico foi caracterizado quanto ao seu aspecto físico, solubilidade, teor de umidade, ponto de fusão, por métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Sete métodos quantitativos foram desenvolvidos e validados. O método de espectrofotometria na região ultravioleta foi desenvolvido utilizando água purificada como solvente e obteve regressão linear de  $y = 0,0219x - 0,0017$  e  $R^2 = 0,9999$ . O método por espectrofotometria na região do infravermelho, apresentou regressão linear de  $y = 0,5141x + 0,021$  e  $R^2 = 0,9993$ . Dentre os métodos cromatográficos foi desenvolvido método cromatografia com interação hidrofílica; cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e cromatografia em fluido supercrítico. O método de cromatografia com interação hidrofílica foi desenvolvido, utilizando como fase móvel A: acetonitrila e B: água (88:12 v/v) 0,1 % de ácido fórmico pH 2,5, no modo isocrático, a regressão linear foi  $y = 29928 x - 547879$ , e  $R^2 = 0,9994$ , enquanto que para o método por cromatografia líquida em fase reversa a fase móvel utilizada foi A: água e B: etanol (80:20 v/v) com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5 no modo isocrático, a regressão linear foi  $y = 23043x - 38525$ , e  $R^2 = 0,9999$ . No método de cromatografia em fluido supercrítico a fase móvel foi A: dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e B: uma mistura ternária de 70: 25: 5 metanol: etanol: água v/v/v, no modo gradiente. Para este método o regulador de contrapressão foi ajustado em 175 Bars. A regressão linear foi  $y = 7426,6x + 51489$  e  $R^2 = 0,9996$ . O método de eletroforese capilar foi desenvolvido usando solução tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7 e 15 kV de voltagem, a regressão linear foi  $y = 2281,7x - 24495$  e  $R^2 = 0,9994$ . Além dos métodos químicos, um método microbiológico por turbidimetria foi validado, capaz de determinar o percentual médio de ertapenem sódico em pó liofilizado para solução injetável frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O método microbiológico foi avaliado pelo ensaio 3 x 3, descrito na Farmacopeia Brasileira. O método microbiológico por turbidimetria obteve regressão linear de  $y = -1,140 \ln(x) + 3,6706$ ,  $R^2 = 0,9996$  para a SQR e  $y = -1,148 \ln(x) + 3,6942$ ,  $R^2 = 0,9998$  para a amostra. Por fim, este trabalho contempla métodos intercambiáveis para avaliação de ertapenem sódico que contribuem para aprimorar o controle de qualidade de ertapenem sódico produto comercializado.

**Palavras-chave:** ertapenem sódico, controle de qualidade, métodos analíticos, validação, espectrofotometria, CLAE, ensaio microbiológico, eletroforese capilar.



## ABSTRACT

Ertapenem sodium is an antimicrobial from the carbapenems class, commercially available in lyophilized powder form for injectable solution. It exhibits action against Gram-negative, Gram-positive, aerobic and anaerobic bacteria. The ertapenem sodium was characterized for its physical appearance, solubility, moisture content, melting point, by spectroscopic and chromatographic methods. Seven quantitative methods have been developed and validated. The method by spectroscopy on the ultraviolet region was developed using purified water as solvent and obtained linear regression of  $y = 0.0219x - 0.0017$ ,  $R^2 = 0.9999$ . For the method for spectroscopy in the infrared region, KBr pellets were prepared and measured, and the linear regression was  $y = 0.021 + 0.5141x$ ,  $R^2 = 0.9993$ . Among the chromatographic methods, a hydrophilic interaction liquid chromatography method was developed; reversed-phase high-performance liquid chromatography, and supercritical fluid chromatography. The hydrophilic interaction liquid chromatography was developed using as mobile phase A: acetonitrile and B: water (88:12 v/v) 0.1% formic acid pH 2.5, in isocratic mode, linear regression was  $y = 29928x - 547879$ ,  $R^2 = 0.9994$ . Whereas the method by reversed-phase high-performance liquid chromatography to the mobile phase was used A: water and B: ethanol (80:20 v/v) with 0.1% formic acid pH 2.5 in isocratic mode, linear regression was  $y = 23043x - 38525$ , and  $R^2 = 0.9999$ . Regarding the supercritical fluid chromatography method the mobile phase consists of A: carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and B: a ternary mixture of 70: 25: 5 methanol: ethanol: water v/v/v, in the gradient mode. For this method the back pressure regulator was set to 175 Bars. The linear regression was  $y = 7426.6 x + 51489$ ,  $R^2 0.9996$ . The capillary electrophoresis method was developed using potassium phosphate buffer 10 mM pH 7 and 15 kV voltage, the linear regression was  $y = 2281.7x - 24495$  and  $R^2 = 0.9994$ . In addition to the analytical methods, a microbiological method by turbidimetry was developed, capable of determining the mean percentage of ertapenem sodium powder lyophilized for injection solution, before the microorganism *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The microbiological method was evaluated by the 3 x 3 test described in the Brazilian Pharmacopoeia. The microbiological method by turbidimetry obtained a linear regression of  $y = -1.140 \text{ Ln}(x) + 3.6706$ ,  $R^2 = 0.9996$  for the standard and  $y = -1.148 \text{ Ln}(x) + 3.6942$ ,  $R^2 = 0.9998$  for the sample. Finally, this work contemplates interchangeable methods for the evaluation of ertapenem sodium that contribute to improve the quality control of commercially available ertapenem sodium.

**Keywords:** sodium ertapenem, analytical methods, capillary electrophoresis, HPLC, microbiological assay, quality control, spectroscopy, validation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Estrutura química de tienamicina.....	28
<b>Figura 2-</b> Estrutura química de carbapenêmicos.....	29
<b>Figura 3-</b> Dímeros de ERTM.....	48
<b>Figura 4-</b> Produtos de degradação de ERTM.....	49
<b>Figura 5-</b> Microscopia óptica de ERTM SQR.....	69
<b>Figura 6-</b> Capilares contendo ERTM SQR (a) e ERTM em pó liofilizado para solução injetável (b), antes e depois da fusão.....	74
<b>Figura 7-</b> Cromatogramas de Placebo (a) ERTM SQR (b) e ERTM em pó liofilizado para solução injetável (c), nos sistemas 5, 6 e 11 visualizados em luz UVC <sub>254</sub> nm.....	77
<b>Figura 8-</b> Cromatogramas de placebo (a) ERTM SQR (b) e ERTM em pó liofilizado para solução injetável (c), em fase móvel água: etanol (2:8) v/v, (sistema 11) visualizados em luz UVC <sub>254</sub> nm (A) e revelada em vapores de iodo (B).....	79
<b>Figura 9-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável intacto (1) e em solução: neutra a 60 °C (2), fotolítica em temperatura ambiente ± 25 °C (3) e alcalina (4), ácida (5) oxidativa (6) a 60 °C utilizando fase móvel água: etanol (2:8) v/v e revelados em câmara com luz UVC <sub>254</sub> nm, logo após o preparo (A), após degradação de 1 h (B), 3 h (C), 12 h (D), 24 h (E) e 72 h .....	80
<b>Figura 10-</b> Espectro na região de infravermelho de ERTM SQR em pastilhas de KBr.....	83
<b>Figura 11-</b> Espectro de absorção na região do ultravioleta de ERTM SQR, ERTM em pó liofilizado para solução injetável, ambos em concentração de 21 µg mL <sup>-1</sup> e o placebo constituído dos adjuvantes presentes na forma farmacêutica, utilizando água como solvente.....	86
<b>Figura 12-</b> Espectro de absorção na região do ultravioleta, solução de ERTM SQR na concentração de 21 µg mL <sup>-1</sup> , utilizando como solvente: Tampão fosfato de sódio pH 6, pH 7 e pH 8 (A); metanol e etanol (B); ácido clorídrico 0,01 M e hidróxido de sódio 0,01 M (C).....	86
<b>Figura 13-</b> Cromatograma de ERTM SQR (preto), ERTM em pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de 100 µg mL <sup>-1</sup> , obtidos com fase móvel ACN: água: (88:12 v/v) com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5 e fase estacionária: CIH Kinetex 2,6 µm (4,6 x 100 mm) Phenomenex <sup>®</sup> , para o método de CIH.....	92
<b>Figura 14-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> sobrepostos, para determinação da conformidade do sistema cromatográfico do método de CIH.....	93
<b>Figura 15-</b> Mecanismo de interação em CIH - Retenção do analito <i>versus</i> fase móvel em proporção crescente de solvente orgânico.....	96

<b>Figura 16-</b> Coeficiente de distribuição de ERTM determinado por <i>software</i> ACD/Labs.	<b>100</b>
<b>Figura 17-</b> Cromatogramas de diferentes fases estacionárias usando fase móvel água: etanol (80:20 v/v), com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5, solução de ERTM SRQ 100 µg mL <sup>-1</sup> .....	<b>101</b>
<b>Figura 18-</b> Cromatograma de ERTM SQR (preto), ERTM em pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de 100 µg mL <sup>-1</sup> , obtidos com fase móvel: água: etanol (80:20 v/v), pH 2,5 ajustado com ácido fórmico e fase estacionária: ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent® para o método CLAE - FR.....	<b>102</b>
<b>Figura 19-</b> Sobreposição de 10 cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável na concentração de 100 µg mL <sup>-1</sup> , obtidos com fase móvel: água: etanol (80:20 v/v), pH 2,5 ajustado com ácido fórmico e fase estacionária: ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent® para o método de CLAE – FR.....	<b>103</b>
<b>Figura 20-</b> Estrutura da coluna ZORBAX Bonus-RP - Agilent Technologies®.....	<b>105</b>
<b>Figura 21-</b> Cromatogramas sobrepostos de ERTM SQR (preto), e de ERTM em pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de 100 µg mL <sup>-1</sup> ; fase móvel A:CO <sub>2</sub> e B:mistura ternária de 65: 30: 5 metanol:etanol:água v/v/v sob gradiente de eluição; fase estacionária: ProntoSil 120-5-Pyridine 4,6 x 250 mm, 5 µm Bischoff®; método de CFS.....	<b>118</b>
<b>Figura 22-</b> Conformidade do sistema - Sobreposição de dez cromatogramas ERTM em pó liofilizado para solução injetável em concentração de 100 mg mL <sup>-1</sup> .....	<b>119</b>
<b>Figura 23-</b> Esquema de apresentação da microespécies <i>versus</i> pH para ERTM segundo a plataforma <i>online Chemicalize</i> .....	<b>124</b>
<b>Figura 24-</b> Eletroferograma do eletrólito, adjuvantes e soluções degradantes sem qualquer vestígio de ERTM.....	<b>126</b>
<b>Figura 25-</b> Eletroferogramas sobrepostos de ERTM SQR (azul) <i>versus</i> ERTM em pó liofilizado para solução injetável (preto).....	<b>127</b>
<b>Figura 26-</b> Eletroferogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> sobrepostos, para determinação da conformidade do sistema do método de eletroforese capilar.....	<b>128</b>
<b>Figura 27-</b> Espectro de absorção por infravermelho de ERTM SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa.....	<b>132</b>
<b>Figura 28-</b> Curva analítica de ERTM, obtida pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	<b>134</b>
<b>Figura 29 -</b> Análise de resíduos para ERTM pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.....	<b>134</b>

<b>Figura 30-</b> Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para ERTM SQR no comprimento de onda de 297 nm.....	<b>142</b>
<b>Figura 31-</b> Curva analítica de ERTM, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	<b>144</b>
<b>Figura 32 -</b> Análise de resíduos para ERTM pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	<b>144</b>
<b>Figura 33-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação ácida (HCl 0,01 M) a 25 °C. Para o método por CIH.....	<b>153</b>
<b>Figura 34-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 2,50 h (azul), sob degradação alcalina (NaOH 0,01 M) a 25 °C. Para o método por CIH.....	<b>153</b>
<b>Figura 35-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação oxidativa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03%) a 25 °C. Para o método por CIH.....	<b>153</b>
<b>Figura 36-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 6,00 h (azul), sob degradação fotolítica (luz UV) a 25 °C. Para o método por CIH.....	<b>154</b>
<b>Figura 37-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação neutra (água) a 25 °C. Para o método por CIH.....	<b>154</b>
<b>Figura 38-</b> Curva analítica de ERTM, obtida pelo método CIH.....	<b>156</b>
<b>Figura 39 -</b> Análise de resíduos para ERTM pelo método por CIH.....	<b>156</b>
<b>Figura 40-</b> Cromatograma de ERTM 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 3 h (azul), sob degradação ácida (HCl 0,01 M) a 25 °C, para o método por CLAE-FR.....	<b>165</b>
<b>Figura 41-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 1,50 h (azul), sob degradação alcalina (NaOH 0,01 M) a 25 °C, para o método por CLAE-FR.....	<b>166</b>
<b>Figura 42-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 1,50 h (azul), sob degradação oxidativa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03 %) a 25 °C, para o método por CLAE-FR.....	<b>166</b>
<b>Figura 43-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 12 h, (azul) sob degradação neutra (água) a 50 °C, para o método por CLAE-FR.....	<b>166</b>

<b>Figura 44-</b> Cromatograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (azul) e após 12 h (preto), sob degradação Fotolítica (luz UVC <sub>254 nm</sub> ) 25 °C, para o método por CLAE-FR.....	<b>167</b>
<b>Figura 45-</b> Curva analítica de ERTM, obtida pelo método CLAE-FR.....	<b>167</b>
<b>Figura 46 -</b> Análise de resíduos para ERTM pelo método CLAE-FR.....	<b>168</b>
<b>Figura 47-</b> Cromatogramas das soluções usadas para promover a degradação e adjuvantes sem qualquer vestígio de ERTM, pelo método CFS .....	<b>179</b>
<b>Figura 48-</b> Cromatogramas da degradação oxidativa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03%), sobreposição do pico de ERTM em pó liofilizado para solução injetável sem degradação e após 24 horas de degradação. Para o método por CFS.....	<b>180</b>
<b>Figura 49-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 36 h (azul), sob degradação alcalina (NaOH 0,01 M) a 25 °C, para o método por CFS.....	<b>180</b>
<b>Figura 50-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 120 h (azul), sob degradação ácida (HCl 0,01 M) a 25 °C, para o método por CFS.....	<b>181</b>
<b>Figura 51-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 1 h (azul), sob degradação térmica a 60 °C, para o método por CFS.....	<b>181</b>
<b>Figura 52-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 2 h (azul), sob degradação neutra (água) a 60 °C, para o método por CLAE-FR.....	<b>181</b>
<b>Figura 53-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 24 h (azul), sob degradação neutra (água) a 40 °C, para o método por CFS.....	<b>182</b>
<b>Figura 54-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 120 h (azul), sob degradação neutra (água) a 25 °C, para o método por CFS.....	<b>182</b>
<b>Figura 55-</b> Cromatogramas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável 100 µg mL <sup>-1</sup> tempo zero (preto) e após 14 dias (azul), sob degradação fotolítica (luz UVC <sub>254 nm</sub> ) 25 °C, para o método por CFS.....	<b>182</b>
<b>Figura 56-</b> Limites de detecção e de quantificação para ERTM pelo método de CFS.....	<b>184</b>
<b>Figura 57-</b> Determinação do limite de detecção de ERTM em pó liofilizado para solução injetável no método CFS.....	<b>184</b>
<b>Figura 58-</b> Determinação do limite de quantificação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável no método CFS.....	<b>184</b>

<b>Figura 59-</b> Curva analítica de ERTM, obtida pelo o método CFS.....	<b>185</b>
<b>Figura 60 -</b> Análise de resíduos para ERTM pelo método CFS.....	<b>186</b>
<b>Figura 61-</b> Eletroferograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável degradação neutra (temperatura ambiente - 25 °C), após 120 horas, pelo método de eletroforese capilar.....	<b>195</b>
<b>Figura 62-</b> Eletroferograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável estresse fotolítico (UVC <sub>254</sub> ), após 14 dias, pelo método de eltroforese capilar.....	<b>195</b>
<b>Figura 63-</b> Eletroferograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável degradação de ácido (HCl 0,01 M), após 120 horas, pelo método de eletroforese capilar	<b>196</b>
<b>Figura 64-</b> Eletroferograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável degradação alcalina (NaOH 0,01 M), após 36 horas, pelo método de eletroforese capilar	<b>196</b>
<b>Figura 65-</b> Eletroferograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável degradação oxidativa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03%), após 24 horas, pelo método de eletroforese capilar	<b>196</b>
<b>Figura 66-</b> Eletroferograma de ERTM em pó liofilizado para solução injetável estresse térmico (50 °C), após 1 hora, pelo método de eletroforese capilar.....	<b>197</b>
<b>Figura 67-</b> Curva analítica de ERTP SQR pelo método eletroforese capilar.....	<b>197</b>
<b>Figura 68 -</b> Análise de resíduos para ERTM pelo método eletroforese capilar.....	<b>198</b>
<b>Figura 69 -</b> Curvas analíticas de soluções de ERTM SQR e ERTM em pó liofilizado para solução injetável, em concentrações de 12,80; 16,00 e 20,00 µg mL <sup>-1</sup> , obtidas pelo método microbiológico turbidimétrico.....	<b>208</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Métodos de CLAE para a determinação de ERTM em matriz biológica.....	<b>38</b>
<b>Tabela 2-</b> Métodos de CLAE para a determinação de ERTM em forma farmacêutica.....	<b>43</b>
<b>Tabela 3-</b> Teste de robustez utilizando o modelo experimental de Plackett-Burman.....	<b>60</b>
<b>Tabela 4-</b> Termos descritivos no teste de solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira.....	<b>70</b>
<b>Tabela 5-</b> Solubilidade da ERTM em pó para solução injetável em diferentes solventes a 25 °C.....	<b>70</b>
<b>Tabela 6-</b> Umidade do ERTM em pó para solução injetável determinado em analisador de umidade por infravermelho.....	<b>72</b>
<b>Tabela 7-</b> Valores do ponto de fusão obtidos para amostra de ERTM SQR.....	<b>73</b>
<b>Tabela 8-</b> Faixas de frequências e grupamentos correspondentes das bandas observadas nos espectros de infravermelho de ERTM SQR e ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	<b>83</b>
<b>Tabela 9-</b> Condições testadas durante o desenvolvimento do método para quantificação de ERTM por CIH.....	<b>91</b>
<b>Tabela 10-</b> Parâmetros estabelecidos para a determinação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável, pelo método CIH.....	<b>91</b>
<b>Tabela 11-</b> Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico, para determinação de ERTM por CIH.....	<b>93</b>
<b>Tabela 12-</b> Condições testadas durante o desenvolvimento do método cromatografia líquida de fase reversa para a determinação de ERTM.....	<b>99</b>
<b>Tabela 13-</b> Parâmetros estabelecidos para a determinação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável, pelo método cromatografia líquida de fase reversa.....	<b>101</b>
<b>Tabela 14-</b> Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico, para a análise de ERTM por cromatografia líquida de fase reversa.....	<b>102</b>
<b>Tabela 15-</b> Fase estacionária <i>versus</i> tempo de retenção do analito pelo método cromatografia líquida de fase reversa.....	<b>104</b>
<b>Tabela 16-</b> Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema, para determinação de ERTM por cromatografia em fluido supercrítico.....	<b>118</b>
<b>Tabela 17-</b> Intervalo de pH em que as soluções tamponantes são eficientes de acordo com seu pKa.....	<b>124</b>

<b>Tabela 18-</b> Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema, para determinação de ERTM por eletroforese capilar.....	<b>128</b>
<b>Tabela 19-</b> Valores das absorvâncias referentes ERTM SRQ para a construção da curva analítica através do método de espectrofotometria na região do infravermelho.....	<b>135</b>
<b>Tabela 20-</b> Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho.....	<b>135</b>
<b>Tabela 21-</b> Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho.....	<b>136</b>
<b>Tabela 22-</b> Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método por espectrofotometria na região do infravermelho.....	<b>137</b>
<b>Tabela 23-</b> Determinação da exatidão do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho.....	<b>137</b>
<b>Tabela 24-</b> Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho.....	<b>138</b>
<b>Tabela 25-</b> Obtenção da curva de Ringbom de ERTM por espectrofotometria no UV.....	<b>142</b>
<b>Tabela 26-</b> Construção da curva de Ringbom por espectrofotometria na região do UV para ERTM SQR.....	<b>143</b>
<b>Tabela 27-</b> Valores de absorvância determinados para a curva analítica de ERTM SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 297 nm.....	<b>145</b>
<b>Tabela 28-</b> Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	<b>145</b>
<b>Tabela 29-</b> Determinação da precisão intermediária do método espectrofotométrico na região do UV para análise de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	<b>146</b>
<b>Tabela 30-</b> Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método de espectrofotometria na região do UV.....	<b>147</b>
<b>Tabela 31-</b> Determinação da exatidão do método analítico por espectrofotometria na região do UV de ERTM.....	<b>147</b>
<b>Tabela 32-</b> Avaliação da robustez do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do UV.....	<b>148</b>
<b>Tabela 33-</b> Valores das áreas referentes aos picos de ERTM SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico por CIH.....	<b>155</b>



<b>Tabela 34-</b> Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método por CIH.....	<b>156</b>
<b>Tabela 35-</b> Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por CIH..	<b>157</b>
<b>Tabela 36-</b> Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método CIH.....	<b>158</b>
<b>Tabela 37-</b> Exatidão do método analítico para análise ERTM por CIH.....	<b>158</b>
<b>Tabela 38-</b> Fatores selecionados e níveis de variabilidade para o método por CIH.....	<b>159</b>
<b>Tabela 39-</b> Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman por CIH.....	<b>159</b>
<b>Tabela 40-</b> Valores das áreas referente ao pico de ERTM SQR para construção da curva analítica para o método CLAE-FR.....	<b>168</b>
<b>Tabela 41-</b> Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método por CLAE – FR.....	<b>169</b>
<b>Tabela 42-</b> Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por CLAE – FR.....	<b>170</b>
<b>Tabela 43-</b> Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método CLAE - FR	<b>170</b>
<b>Tabela 44-</b> Exatidão do método analítico para análise ERTM por CLAE – FR.....	<b>171</b>
<b>Tabela 45-</b> Parâmetros selecionados e níveis de variabilidade para CLAE – FR.....	<b>171</b>
<b>Tabela 46-</b> Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman, CLAE – FR.....	<b>172</b>
<b>Tabela 47-</b> Percentuais obtidos no estudo de degradação forçada para ERTM pelo método CFS.....	<b>180</b>
<b>Tabela 48-</b> Limite de detecção e quantificação para ERTM pelo método de CFS.....	<b>183</b>
<b>Tabela 49-</b> Valores das absorvâncias referentes a ERTM SRQ para a construção da curva analítica através do método de eletroforese capilar.....	<b>186</b>
<b>Tabela 50-</b> Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método por CFS.....	<b>187</b>
<b>Tabela 51-</b> Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por CFS..	<b>187</b>
<b>Tabela 52-</b> Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método CFS.....	<b>188</b>
<b>Tabela 53-</b> Exatidão do método analítico para análise ERTM por CLAE – FR.....	<b>188</b>
<b>Tabela 54-</b> Parâmetros selecionados e níveis de variabilidade para CFS.....	<b>189</b>

<b>Tabela 55-</b> Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman, CFS...	<b>189</b>
<b>Tabela 56-</b> Percentuais obtidos no estudo de degradação forçada para ERTM pelo método eletroforese capilar.....	<b>195</b>
<b>Tabela 57-</b> Valores das absorvâncias referentes a ERTM SRQ para a construção da curva analítica através do método de eletroforese capilar.....	<b>198</b>
<b>Tabela 58-</b> Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método de eletroforese capilar.....	<b>199</b>
<b>Tabela 59-</b> Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por eletroforese capilar.....	<b>200</b>
<b>Tabela 60-</b> Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método eletroforese capilar.....	<b>200</b>
<b>Tabela 61-</b> Exatidão do método analítico para análise ERTM por eletroforese capilar....	<b>201</b>
<b>Tabela 62-</b> Parâmetros selecionados e níveis de variabilidade para eletroforese capilar..	<b>201</b>
<b>Tabela 63-</b> Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman em eletroforese capilar.....	<b>202</b>
<b>Tabela 64-</b> Parâmetros estudados para a avaliação de percentual médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico.....	<b>204</b>
<b>Tabela 65-</b> Parâmetros padronizados para avaliação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico.....	<b>204</b>
<b>Tabela 66-</b> Absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade do ensaio microbiológico para avaliação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável por método turbidimétrico.....	<b>208</b>
<b>Tabela 67-</b> Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de ERTM, utilizando o método turbidimétrico.....	<b>209</b>
<b>Tabela 68-</b> Precisão intermediária do método turbidimétrico para ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	<b>209</b>
<b>Tabela 69-</b> Teste de adição para determinação da exatidão do ensaio microbiológico por turbidimetria.....	<b>210</b>
<b>Tabela 70-</b> Exatidão do método turbidimétrico para determinação de ERTM pelo teste de adição.....	<b>210</b>
<b>Tabela 71-</b> Avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	<b>211</b>

<b>Tabela 72-</b> Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos sete métodos validados.....	<b>213</b>
<b>Tabela 73-</b> Análise da variância dos teores médios de ERTM pó liofilizado para solução injetável.....	<b>213</b>

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1-</b> Volume morto para o método de cromatografia.....	<b>53</b>
<b>Equação 2-</b> Fator de capacidade para o método cromatográfico.....	<b>53</b>
<b>Equação 3-</b> Número de pratos para o método cromatográfico.....	<b>54</b>
<b>Equação 4-</b> Assimetria do pico para o método cromatográfico.....	<b>54</b>
<b>Equação 5-</b> Resolução.....	<b>54</b>
<b>Equação 6-</b> Concentração de ERTM na amostra.....	<b>55</b>
<b>Equação 7-</b> Teor percentual de ERTM.....	<b>55</b>
<b>Equação 8-</b> Limites de detecção.....	<b>57</b>
<b>Equação 9-</b> Limites de quantificação.....	<b>57</b>
<b>Equação 10-</b> Cálculo de recuperação.....	<b>59</b>
<b>Equação 11-</b> Equação para análise fatorial por Plackett-Burman.....	<b>60</b>
<b>Equação 12-</b> Equação de Lambert-Beer.....	<b>140</b>
<b>Equação 13-</b> Equação de Hewitt para determinação da percentual médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	<b>207</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<b>As</b>	Fator de assimetria
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain-Heart Infusion</i>
<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Service</i>
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CIH</b>	Cromatografia com interação hidrofílica
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CLUE</b>	Cromatografia líquida de ultra eficiência
<b>CQ</b>	Controle de qualidade
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de diodos
<b>DHP</b>	Enzima desidropeptidase renal
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>EC</b>	Eletroforese capilar
<b>ERTM</b>	Ertapenem sódico
<b>F<sub>cal</sub></b>	Valor de F calculado
<b>F<sub>tab</sub></b>	Valor de F tabelado
<b>FEO</b>	Fluxo eletroosmótico
<b>FM</b>	Fase móvel
<b>GL</b>	Graus de liberdade
<b>HILIC</b>	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
<b>HPLC-RP</b>	<i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IFA</b>	Ingrediente farmacêutico ativo
<b>ISO</b>	<i>International Standard Organization</i>
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
<b>LSS</b>	Lauril sulfato de sódio
<b>MBL</b>	metalo- $\beta$ -lactamases
<b>MES</b>	Ácido 2-[N-morfolino] etano sulfônico
<b>MOPS</b>	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico
<b>MRSA</b>	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>N</b>	Número de pratos
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>QM</b>	Quadrados médios
<b>PLPs</b>	Proteínas de ligação das penicilinas
<b>r</b>	Coeficiente de correlação
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinação
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>R<sub>t</sub></b>	Fator de retenção
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina
<b>SQ</b>	Soma dos quadrados
<b>SFC</b>	<i>Supercritical fluid chromatography</i>
<b>SQR</b>	Substância química de referência
<b>TLC</b>	<i>Thin-layer chromatography</i>
<b>t<sub>R</sub></b>	Tempo de retenção
<b>UV</b>	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>28</b>
3.1. Carbapenêmicos.....	28
3.1.1. Ertapenem sódico.....	30
3.2. Classificação de carbapenêmicos.....	32
3.3. Mecanismo de ação dos carbapenêmicos.....	33
3.4. Resistência antimicrobiana.....	33
3.5. Métodos analíticos.....	36
3.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	36
3.5.2. Cromatografia eletrocínética micelar.....	36
3.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
3.6. Estabilidade e produtos de degradação.....	46
3.7. Presença de formas polimórficas.....	50
3.8. Ensaio microbiológicos.....	50
3.9. Validação de métodos.....	51
3.9.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	52
3.9.1.1. Tempo da substância não retida ( $T_0$ ).....	52
3.9.1.1. Fator de retenção ( $k'$ ).....	53
3.9.1.3. Número de pratos (N).....	54
3.9.1.4. Assimetria do pico ( $A_s$ ).....	54
3.9.1.5. Resolução (R).....	54
3.9.2. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	55
3.9.3. Especificidade e Seletividade.....	55
3.9.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	57
3.9.5. Linearidade.....	58
3.9.6. Precisão.....	58
3.9.7. Exatidão.....	59
3.9.8. Robustez.....	59
3.9.9. Critérios de aceitação para os parâmetros de validação.....	61
3.10. Química verde.....	62
<b>4. ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO.....</b>	<b>66</b>
4.1. Substância Química de Referência (SQR).....	67
4.2. Forma Farmacêutica.....	67
<b>5. ANÁLISE QUALITATIVA.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1. Características físicas.....</b>	<b>68</b>
5.1.1. Material.....	68
5.1.2. Método.....	68
5.1.3. Resultados e discussão.....	68
<b>5.2. Determinação de solubilidade.....</b>	<b>68</b>
5.2.1. Material.....	69
5.2.2. Método.....	69
5.2.3. Resultados e discussão.....	70
<b>5.3. Determinação de umidade.....</b>	<b>71</b>
5.3.1. Material.....	71
5.3.2. Método.....	71
5.3.3. Resultados e discussão.....	71
<b>5.4. Determinação do ponto de fusão.....</b>	<b>72</b>
5.4.1. Material.....	73

5.4.2. Método.....	73
5.4.3. Resultados e discussão.....	73
<b>5.5. Cromatografia em camada delgada.....</b>	<b>74</b>
5.5.1. Material.....	75
5.5.2. Método.....	75
5.5.3. Resultados e discussão.....	76
<b>5.6. Espectrofotometria na região de infravermelho.....</b>	<b>81</b>
5.6.1. Material.....	82
5.6.2. Método.....	82
5.6.3. Resultados e discussão.....	82
<b>5.7. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....</b>	<b>84</b>
5.7.1. Material.....	85
5.7.2. Método.....	85
5.7.3. Resultados e discussão.....	85
<b>5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....</b>	<b>87</b>
<b>5.8.1. Cromatografia com interação hidrofílica – CIH.....</b>	<b>88</b>
5.8.1.1. Material.....	89
5.8.2.2. Método.....	89
5.8.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	90
5.8.2.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	90
5.8.2.2.3. Preparo das fases móveis.....	90
5.8.2.3. Resultados e discussão.....	90
5.8.2.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	92
<b>5.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa - CLAE-FR.....</b>	<b>97</b>
5.8.2.1. Material.....	98
5.8.2.2. Método.....	98
5.8.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	98
5.8.2.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	98
5.8.1.2.3. Preparo das fases móveis.....	99
5.8.1.3. Resultados e discussão.....	99
5.8.1.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	102
<b>5.9. Cromatografia em fluido supercrítico – CFS.....</b>	<b>107</b>
5.9.1. Material.....	111
5.9.2. Método.....	112
5.9.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	112
5.9.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	113
5.9.2.3. Preparo da fase móvel.....	113
5.9.3. Resultados e discussão.....	113
5.9.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	118
<b>5.10. Eletroforese capilar.....</b>	<b>120</b>
5.10.1. Material.....	122
5.10.2. Método.....	122
5.10.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	122
5.10.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	123
5.10.2.3. Preparo do eletrólito.....	123
5.10.3. Resultados e discussão.....	123
5.10.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	127
<b>6. ANÁLISE QUANTITATIVA.....</b>	<b>130</b>
<b>6.1. Espectrofotometria na região do infravermelho.....</b>	<b>130</b>
6.1.1. Material.....	131

6.1.2. Método.....	131
6.1.2.1. Preparo das pastilhas de ERTM SQR.....	131
6.1.2.2. Preparo das pastilhas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	132
6.1.3. Resultados e discussão.....	132
6.1.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	132
6.1.3.2. Validação do método.....	133
6.1.3.2.1. Linearidade.....	133
6.1.3.2.2. Limites de detecção e de quantificação.....	136
6.1.3.2.3. Precisão.....	136
6.1.3.2.4. Exatidão.....	136
6.1.3.2.5. Robustez.....	137
<b>6.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....</b>	<b>139</b>
6.2.1. Material.....	140
6.2.2. Método.....	140
6.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	140
6.2.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	141
6.2.3. Resultados e discussão.....	141
6.2.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	141
6.2.3.2. Validação do método.....	141
6.2.3.2.1. Curva de ringbom.....	141
6.2.3.2.2. Linearidade.....	143
6.2.3.2.3. Limite de detecção e limite de quantificação.....	145
6.2.3.2.4. Precisão.....	146
6.2.3.2.5. Exatidão.....	146
6.2.3.2.6. Robustez.....	147
<b>6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....</b>	<b>149</b>
<b>6.3.1. Cromatografia com interação hidrofílica – CIH.....</b>	<b>149</b>
6.3.1.1. Material.....	149
6.3.1.2. Método.....	150
6.3.1.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	150
6.3.1.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	151
6.3.1.2.3. Preparo da fase móvel.....	151
6.3.1.3. Resultados e discussão.....	151
6.3.1.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	151
6.3.1.3.2. Conformidade do sistema cromatográfico.....	151
6.3.1.3.3. Validação do método.....	152
6.3.1.3.3.1. Seletividade e estudos de degradação forçada.....	152
6.3.1.3.3.2. Linearidade.....	154
6.3.1.3.3.3. Limites de detecção e quantificação.....	157
6.3.1.3.3.4. Precisão.....	157
6.3.1.3.3.5. Exatidão.....	157
6.3.1.3.3.6. Robustez.....	158
<b>6.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa - CLAE-FR.....</b>	<b>162</b>
6.3.2.1. Material.....	162
6.3.2.2. Método.....	163
6.3.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	163
6.3.2.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	163
6.3.2.2.3. Preparo da fase móvel.....	164
6.3.2.3. Resultados e discussão.....	164
6.3.2.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	164



6.3.2.3.2. Conformidade do sistema cromatográfico.....	164
6.3.2.3.3. Validação do método.....	164
6.3.2.3.3.1. Seletividade e estudos de degradação forçada.....	165
6.3.2.3.3.2. Linearidade.....	167
6.3.2.3.3.3. Limites de detecção e quantificação.....	169
6.3.2.3.3.4. Precisão.....	169
6.3.2.3.3.5. Exatidão.....	170
6.3.2.3.3.6. Robustez.....	171
<b>6.4. Cromatografia em fluidos supercríticos – CFS.....</b>	<b>174</b>
6.4.1. Material.....	176
6.4.2. Método.....	176
6.4.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	177
6.4.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	177
6.4.2.3. Preparo da fase móvel.....	177
6.4.3. Resultados e discussão.....	177
6.4.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	177
6.4.3.2. Conformidade do sistema cromatográfico.....	178
6.4.3.3. Validação do método.....	178
6.4.3.3.1. Seletividade por estudo da degradação forçada.....	178
6.4.3.3.2. Limites de detecção e de quantificação.....	183
6.4.3.3.3. Linearidade.....	185
6.4.3.3.4. Precisão.....	187
6.4.3.3.5. Exatidão.....	187
6.4.3.3.6. Robustez.....	188
<b>6.5. Eletroforese capilar.....</b>	<b>191</b>
6.5.1. Material.....	192
6.5.2. Método.....	192
6.5.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR.....	192
6.5.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	193
6.5.2.3. Preparo do eletrólito.....	193
6.5.3. Resultados e discussão.....	193
6.5.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	193
6.5.3.2. Conformidade do sistema eletroferográfico.....	193
6.5.3.3. Validação do método.....	194
6.5.3.3.1. Seletividade por estudo da degradação forçada.....	194
6.5.3.3.2. Linearidade.....	197
6.5.3.3.3. Limites de detecção e de quantificação.....	199
6.5.3.3.4. Precisão.....	199
6.5.3.3.5. Exatidão.....	200
6.5.3.3.6. Robustez.....	201
<b>6.6. Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico.....</b>	<b>203</b>
6.6.1. Ensaio preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos.....	203
6.6.2. Execução do ensaio.....	204
6.6.3. Material.....	204
6.6.4. Método.....	205
6.6.4.1. Preparo do meio de cultura.....	206
6.6.4.2. Preparo do inóculo.....	206
6.6.4.3. Preparo das soluções de ERTM SQR.....	206
6.6.4.4. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.....	206
6.6.5. Resultados e discussão.....	206

6.6.5.1. Cálculo do percentual médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável	207
6.6.5.2. Validação do método.....	207
6.6.5.2.1. Linearidade.....	207
6.6.5.2.2. Precisão.....	209
6.6.5.2.3. Exatidão.....	209
6.6.5.2.4. Robustez.....	210
<b>7. ANÁLISE COMPARATIVA.....</b>	<b>213</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>215</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>217</b>
<b>TRABALHOS REALIZADOS.....</b>	<b>237</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes classes de fármacos, os antimicrobianos estão entre os mais comumente prescritos. Isso por que as doenças infecciosas e o surgimento emergente de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis clinicamente representam um problema global. O uso indiscriminado e, muitas vezes, incorreto de antimicrobianos, são os principais fatores que acarretam no surgimento de patógenos resistentes, interferindo na terapia. Medidas preventivas são indispensáveis para minimizar o surgimento de micro-organismos resistentes, já que o desenvolvimento de novos antimicrobianos capazes de combatê-los demanda tempo e elevados custos. Neste contexto, é crescente a preocupação com a qualidade dos fármacos em uso e ressalta-se a importância da conscientização sobre este tema.

Métodos analíticos eficazes e confiáveis, capazes de quantificar o teor de antimicrobianos, bem como avaliar a sua atividade (potência), são essenciais para avaliação da qualidade do fármaco, pois a dosagem do antimicrobiano deve ser suficiente para inibir o crescimento do micro-organismo responsável pela infecção, permitindo a regressão da doença.

O ertapenem sódico (ERTM) é um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico da classe dos carbapenêmicos. Essa classe de fármacos possui espectro de atividade mais amplo que a maioria dos outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias.

O desenvolvimento e validação de métodos para quantificação do fármaco, priorizando a otimização de técnicas com menores custos, reduzidos tempos de análise e facilidade de execução, são de alta relevância para análise do fármaco no controle de qualidade da indústria farmacêutica. Além disso, métodos de análise que apresentem a diminuição do consumo de solventes orgânicos, reduzindo os resíduos gerados, e/ou dando prioridade para o uso de solventes menos tóxicos estão em evidência, visto que nas últimas décadas há uma preocupação com os impactos que as atividades industriais causam sobre o meio ambiente.

Considerando que o ERTM é um fármaco que vem sendo empregado como agente terapêutico para o tratamento de várias doenças infecciosas desde sua aprovação pelo Food and Drug Administration (2001), e ainda hoje não apresenta monografia em nenhum compêndio oficial, justifica-se o fato deste trabalho propor métodos analíticos para avaliar as características físico-químicas do fármaco, bem como o desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos para sua quantificação, que são imprescindíveis para a garantia da qualidade na produção de medicamentos seguros e apropriados para uso da população.

**2. OBJETIVOS**

Desenvolver e validar métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa de ERTM em pó liofilizado para solução injetável.

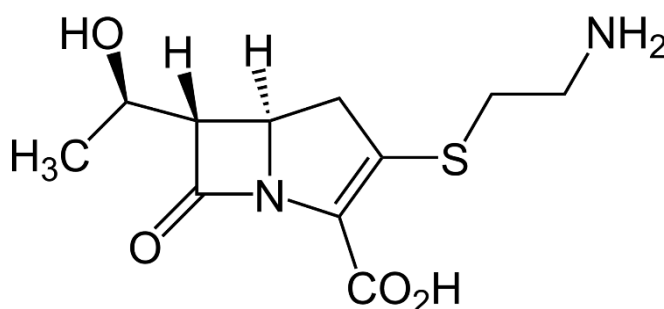
- ✓ Análises qualitativas: características físicas; ponto de fusão; cromatografia em camada delgada (CCD); espectrofotometria nas regiões do ultravioleta (UV) e infravermelho (IV); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fluido supercrítico.
  
- ✓ Análises quantitativas: espectrofotometria nas regiões do IV médio e UV; cromatografia com interação hidrofílica; cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa; cromatografia em fluido supercrítico; eletroforese capilar e ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico,
  
- ✓ Análise comparativa entre os métodos desenvolvidos e validados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Carbapenêmicos

Os antimicrobianos carbapenêmicos foram originalmente desenvolvidos a partir da tienamicina, um produto natural derivado da bactéria *Streptomyces cattleya*, descoberto em 1976, que, embora apresentasse potente atividade antimicrobiana e estabilidade frente às  $\beta$ -lactamases, possuía instabilidade química e resultava em toxicidade renal (Figura 1). No entanto, sua descoberta foi essencial para o desenvolvimento de novos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos pertencentes a esta classe (BIRNBAUM et al., 1985).

**Figura 1-** Estrutura química de tienamicina.



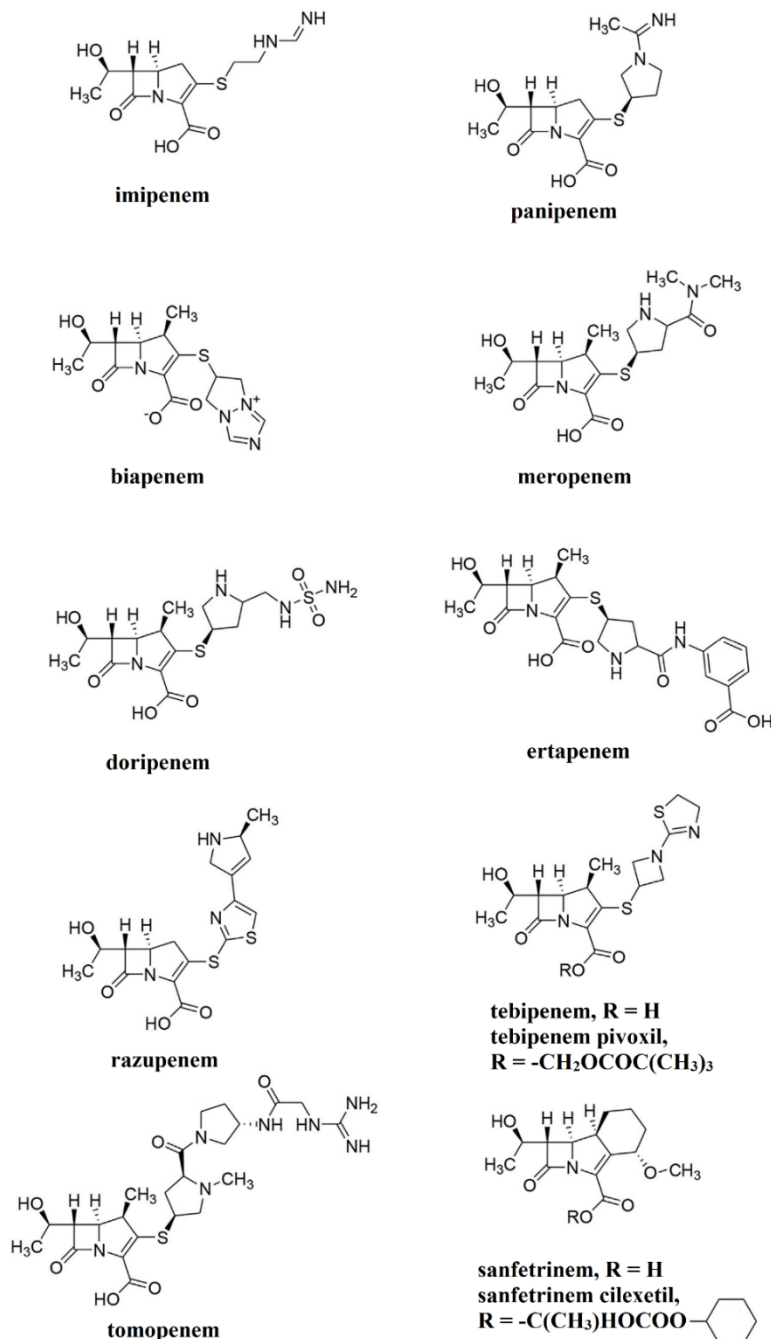
*Fonte:* Figura desenhada usando ChemDraw Profissional 15.1, baseada na literatura El-Gamal et al., 2017

Os carbapenêmicos são antimicrobianos que possuem um anel  $\beta$ -lactâmico acoplado a um anel de cinco elementos que difere das penicilinas por conter um átomo de carbono no anel de tiazolidina no lugar do átomo de enxofre presente nas penicilinas e por ter uma ligação insaturada neste mesmo anel. Outra diferença significativamente importante é o substituinte hidroxietil em posição *trans*, ao contrário das penicilinas em que o substituinte se encontra em posição *cis*; essa diferença isomérica é responsável por sua maior estabilidade frente às enzimas  $\beta$ -lactamases, que confere um amplo espectro de atividade (CIELECKA-PIONTEK et al., 2011). Essas diferenças fazem com que os carbapenêmicos tenham um espectro de atividade mais amplo que a maioria dos outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e os tornam mais resistentes à enzima  $\beta$ -lactamase, o principal mecanismo de resistência de muitas bactérias (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

Os carbapenêmicos representam um grupo de antimicrobianos essenciais para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Dentre os antimicrobianos desta classe estão disponíveis comercialmente o imipenem, panipenem, meropenem, biapenem, doripenem e ertapenem. Dentre os fármacos mais recentes incluídos a esse grupo encontram-se

o razupenem, sanfetrinem, ienapenem, tebipenem e tomopenem (EL-GAMAL et al., 2017). A estrutura química dos fármacos que compõem esta classe é apresentada na Figura 2.

**Figura 2-** Estrutura química de carbapenêmicos.



*Fonte:* Figuras desenhadas em ChemDraw Profissional 15.1, baseadas na literatura El-Gamal et al., 2017

O primeiro carbapenêmico lançado foi o imipenem em 1985, nos Estados Unidos e em 1987, no Japão. No entanto, devido à sua alta sensibilidade à desidropeptidase renal, foi necessário associá-lo à cilastatina, que o protege da biotransformação por esta enzima. O segundo carbapenem lançado em 1993, no Japão, foi o panipenem, usado em associação com

betamipron, um inibidor da recaptção do panipenem no túbulo renal para evitar a nefrotoxicidade. Posteriormente, o meropenem foi introduzido no Japão em 1995 e aprovado nos Estados Unidos em 1996. O meropenem foi o primeiro carbapenêmico com a adição do grupamento 1- $\beta$ -metil, que inibe a sua degradação pela enzima desidropeptidase renal - DHP, responsável por catalisar a reação de hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e, portanto, não necessitando associação com cilastatina ou betamipron (CUNHA, 2002).

O biapenem tem uma atividade bactericida rápida e de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em um estudo para determinar a atividade *in vitro* de vários antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas, o biapenem foi mais eficaz contra espécies de *Escherichia coli* e *Klebsiella*. O doripenem se destaca por ser tão ativo quanto o imipenem contra bactérias Gram-positivas, atividade semelhante à do meropenem contra bactérias Gram-negativas, e ainda, apresenta uma menor tendência à resistência contra  $\beta$ -lactamases bacterianas dentre os carbapenêmicos (EL-GAMAL et al., 2017). O ertapenem foi o primeiro com características químicas que representaram um avanço para este grupo, tornando o mais resistente às enzimas  $\beta$ -lactamases e com a vantagem de apresentar atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micro-organismos aeróbios e anaeróbios. Ressalta-se que são poucos os antimicrobianos atualmente disponíveis com um espectro de ação que engloba tais micro-organismos (CUNHA, 2002; HAMMOND, 2004).

O razupenem é um antimicrobiano injetável de largo espectro, que apresentou muitos efeitos colaterais em ensaios clínicos de fase II e teve o seu estudo descontinuado na América. O tebipenem é um antimicrobiano pró-fármaco de largo espectro disponível comercialmente apenas no Japão que tem sido considerado o primeiro antimicrobiano carbapenêmico de uso oral do mundo. Em geral, os demais carbapenêmicos têm baixa biodisponibilidade oral, porque eles não podem atravessar as membranas gastrointestinais. O sanfetrinem é o primeiro  $\beta$ -lactâmico tricíclico da classe dos carbapenêmicos a ser desenvolvido e apresenta um amplo espectro de atividade bactericida. O sanfetrinem cilexetil é um pró-fármaco biodisponível oralmente de sanfetrinem. O tomopenem é um antimicrobiano de amplo espectro de atividade contra diferentes Gram-positivos e Gram-negativos, aeróbios e anaeróbicos que se destaca por ser mais potente contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* (EL-GAMAL et al., 2017).

### 3.1.1. Ertapenem sódico

Inicialmente denominado MK-0826, MK-826 e L-749.345, o ERTM teve sua aprovação pela FDA em 2001 (CUNHA, 2002). Desde então, está disponível comercialmente na forma

farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável via endovenosa e intramuscular, com o nome INVANZ<sup>®</sup> pelo Laboratório Farmacêutico Merck Sharp & Dohme. Vem sendo empregado como agente terapêutico para o tratamento de infecções adquiridas na comunidade, infecções intra-abdominais, infecções do trato urinário, infecções cutâneas, pneumonia, infecções ginecológicas agudas, infecções pós-parto, incluindo endometriose, aborto e infecções pós-cirúrgicas, e é também utilizado na profilaxia da cirurgia de colo retal e septicemia bacteriana (SWEETMAN, 2011).

O produto é apresentado em caixas com frasco-ampola contendo 1,046 g de ERTM, equivalente a 1 g de ertapenem (SWEETMAN, 2011). Segundo as informações contidas na bula do INVANZ<sup>®</sup>, cada frasco-ampola contém os seguintes adjuvantes: bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio (para ajustar o pH). As formulações destinadas ao uso intramuscular devem ser reconstituídas em diluente próprio constituído de solução de cloridrato de lidocaína 1% (ANVISA, 2013).

O ERTM é o sal monossódico do ácido [4*R*-[3(3*S*,5*S*),4 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\beta$ (*R*)]-3-[[5-[[[(3-carboxifenil)amino]carbonil]-3-pirrolidinil]tio]-6-(1-hidroxietil)-4-metil-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxílico. Sua fórmula empírica é C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Na. Apresenta-se na forma de pó branco a quase branco, higroscópico, pouco cristalino, com peso molecular de 497,50 g mol<sup>-1</sup>. É solúvel em água e em solução de cloreto de sódio a 0,9%, praticamente insolúvel em etanol e insolúvel em acetato de isopropila e tetraidrofurano (THE MERCK INDEX, 2013).

A estrutura química do ERTM possui um anel  $\beta$ -lactâmico acoplado a um anel insaturado de cinco elementos e contém um átomo de carbono no lugar do habitual átomo de enxofre presente nos demais  $\beta$ -lactâmicos (HAMMOND, 2004). O ertapenem sódio possui o grupo 1- $\beta$ -metil substituído na carbonila do  $\beta$ -lactâmico, assim como no meropenem, o que confere maior estabilidade à desidropeptidase renal. O grupamento *trans*-1-hidroxietil presente na estrutura dos carbapenêmicos é responsável pelo seu espectro de ação que engloba a grande maioria dos micro-organismos produtores de  $\beta$ -lactamase, por conferir maior estabilidade à molécula; o grupamento *trans*-1-hidroxietil desloca a molécula de água dificultando a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, o que o torna mais resistente à enzima  $\beta$ -lactamase, que é o principal mecanismo de resistência de muitas bactérias (HAMMOND, 2004; CIELECKA-PIONTEK, 2011).

O ERTM possui uma cadeia lateral aniônica composta por um grupamento benzoato. O ácido benzoico *meta* substituído é determinante para manter o seu espectro antibacteriano Gram-negativo, além disso, aumenta o seu peso molecular e a lipofilicidade; a unidade de ácido



carboxílico, ionizado a pH fisiológico, resulta em uma carga líquida negativa. Como resultado, o ertapenem é altamente ligado às proteínas plasmáticas ( $\cong 95\%$ ) ampliando sua meia-vida, o que permite a conveniência de ser administrado apenas uma vez ao dia (CUNHA, 2002; HAMMOND, 2004; KITCHEN; MUSSON; FISHER, 2004; LEFEUVRE et al., 2008; CIELECKA-PIONTEK, 2011).

### 3.2. Classificação carbapenêmicos

É comum que os fármacos de uma mesma classe tenham distintas características resultando em diferenças na sua atividade antimicrobiana. O surgimento de novos fármacos de uma mesma classe leva à formação de um sistema de classificação, para agrupar os fármacos com propriedades semelhantes, usualmente um sistema de classificação por “gerações” vem sendo empregado para penicilinas, cefalosporinas e fluorquinolonas.

Até o surgimento do ertapenem, não havia um sistema de classificação consolidado para os carbapenêmicos. No entanto, com o surgimento do ertapenem, Shah e Isaacs (2003) propuseram um sistema de classificação com base no seu espectro microbiológico, já que não era mais possível considerar todos os carbapenêmicos disponíveis como uma classe homogênea, pois o ertapenem difere dos demais tanto farmacologicamente como quanto ao espectro microbiológico. Neste sistema de classificação, três grupos foram sugeridos e o ertapenem seria o primeiro carbapenêmico do grupo 1 (Quadro 1).

**Quadro 1-** Sistema de classificação para os carbapenêmicos, segundo Shah e Isaacs (2003)

Grupo	Fármacos	Atividade	Indicação
1	ertapenem	Amplo espectro, com atividade contra patógenos aeróbios e anaeróbios. Atividade limitada contra bacilos Gram-negativos não fermentativos.	Infecções adquiridas na comunidade
2	imipenem meropenem doripenem	Amplo espectro que possuem potente atividade contra bacilos Gram-negativos não fermentadores	Infecções nosocomiais
3	Nenhum fármaco licenciado até o momento *razupenem	Atividade clínica contra Estafilococos resistentes à meticilina	

\*Fármaco em fase de desenvolvimento porém não comercializado devido aos efeitos colaterais nos ensaios clínicos de Fase II.

O ERTM apresenta atividade contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, tem atividade limitada contra *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*. O ertapenem tem potência semelhante ao meropenem e é ligeiramente mais potente do que o imipenem contra agentes patogênicos Gram-negativos, enquanto imipenem é ligeiramente mais potente contra os agentes patogênicos Gram-positivos (SHAH; ISAACS, 2003).

### **3.3. Mecanismo de ação dos carbapenêmicos**

A parede celular bacteriana é composta por peptidoglicano, um componente heteropolimérico que proporciona estabilidade mecânica rígida em virtude da sua estrutura reticulada. O peptidoglicano é constituído de cadeias de glicanos que consistem em filamentos lineares de dois amino açúcares alternados e unidos por meio de ligações cruzadas de cadeias peptídicas, sendo esses amino açúcares o N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico. O ácido N-acetilmurâmico é um penta peptídeo que possui como dipeptídeo terminal uma molécula D-alanil-D-alanina. A biossíntese desse peptidoglicano envolve cerca de 30 enzimas bacterianas e pode ser dividida em três estágios de reações. O último estágio consiste na finalização da ligação cruzada, onde a molécula de glicina terminal da ponte da pentaglicina liga-se à quarta molécula do penta peptídeo (D-alanina), liberando a quinta molécula (também D-alanina) (BRUNTON et al., 2012; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

As *proteínas ligadoras de penicilina* – PLPs presentes nos micro-organismos catalisam a reação de transpeptidação, removendo a alanina terminal para formar uma ligação cruzada com um peptídeo adjacente, resultando em uma parede celular rígida. Os  $\beta$ -lactâmicos são análogos estruturais do substrato D-alanil-D-alanina natural e ligam-se covalentemente às PLPs no sítio ativo, inibindo assim a reação de transpeptidação, bloqueando a síntese de peptidoglicano e levando à morte celular. Deste modo, os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são bactericidas que agem inibindo essa última etapa da síntese do peptidoglicano (BRUNTON et al., 2012; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

### **3.4. Resistência antimicrobiana**

São inúmeros os fatores que podem desencadear o surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos. A resistência aos antimicrobianos é um processo natural da evolução dos micro-organismos como um mecanismo defesa, no entanto, o uso incorreto ou indiscriminado destes fármacos facilita o surgimento de patógenos resistentes, interferindo na

terapia. Isso ocorre devido ao uso excessivo de antimicrobianos em países com regulamentos de vendas ruins onde os antimicrobianos são de fácil acesso ao público.

Outro fator que pode favorecer o desenvolvimento de patógenos resistentes consiste na má qualidade destes produtos, que podem levar à utilização de doses subterapêuticas contribuindo para o desenvolvimento de patógenos resistentes. Com isso, medidas preventivas são indispensáveis para minimizar o surgimento de micro-organismos resistentes, já que o desenvolvimento de novos antimicrobianos capaz de os combater demanda tempo e elevados custos.

Embora os carbapenêmicos sejam os mais potentes  $\beta$ -lactâmicos e seu amplo espectro de atividade englobe muitos dos micro-organismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas, o desenvolvimento de micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos é uma ameaça emergente e tem sido relatado (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; PALZKILL, 2013, BREILH et al., 2013; MELETIS, 2016).

Vale ressaltar que a resistência aos carbapenêmicos em algumas espécies é intrínseca. Este é o caso, por exemplo, de *Stenotrophomonas maltophilia*, que possui a metalo- $\beta$ -lactamase, no entanto, isso não é comum entre as bactérias clinicamente importantes e para a maioria delas a resistência aos carbapenêmicos é adquirida por eventos mutacionais ou aquisição de genes (MELETIS, 2016).

Em geral, os carbapenêmicos tendem a ter uma melhor estabilidade contra as enzimas  $\beta$ -lactamases em comparação com outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. As  $\beta$ -lactamases são enzimas produzidas pelos micro-organismos como mecanismos de defesa; elas possuem atividade hidrolítica capazes de inativar os antimicrobianos pela abertura do anel  $\beta$ -lactâmico presente nessas substâncias. São muitas as enzimas  $\beta$ -lactamases atualmente existentes, as quais podem ser classificadas pelo o seu perfil de atividade, como apresentado no Quadro 2 (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

**Quadro 2-** Grupo de  $\beta$ -lactamases segundo Nordmann, Dortet, Poirel (2012)

<i><math>\beta</math>-lactamases</i>	
<i><b>Penicilinas</b></i>	Capazes de inativar penicilinas, mas não degradam cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos.
<i><b>Cefalosporinas</b></i>	Inativam preferencialmente as cefalosporinas e aminopenicilinas, mas não afetam outras penicilinas (carboxi e ureido penicilinas), aztreonam e carbapenêmicos.
<i><b><math>\beta</math>-lactamase de espectro estendido (ESBL)</b></i>	Inativam todos os $\beta$ -lactâmicos exceto carbapenêmicos e são inibidas pelos inibidores de $\beta$ -lactamases como ácido clavulânico.
<i><b>Carbapenemases</b></i>	Capazes de inativar os carbapenêmicos, algumas enzimas inativam outros tipos de moléculas $\beta$ -lactâmicos. Muitas dessas enzimas não são inibidas pelos inibidores de $\beta$ -lactamases disponíveis.

As  $\beta$ -lactamases são subdivididas em classes A, B, C e D. As enzimas de classe C (ACT-1/AmpC, DHA-1, CMY-2, CMY-10) não são consideradas carbapenemases. Contudo, apesar de possuírem um baixo potencial de hidrólise do carbapenêmico, podem contribuir para o desenvolvimento de resistência ao carbapenêmico devido à diminuição da permeabilidade da membrana externa e/ou da sobre-expressão da bomba de efluxo (MELETIS, 2016).

A classe A de metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) é representada pelas enzimas KPC, GES, IBC, NMC-A, CFS-1, IMI e SME que foram as primeiras descritas nos EUA, mas agora já estão presentes em todo o mundo. Na classe B encontram-se as enzimas IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, AIM, DIM, FIM, POM e KHM; estas metalo- $\beta$ -lactamases foram detectadas a partir do meio ambiente e bactérias oportunistas. A resistência aos carbapenêmicos mediada por metalo- $\beta$ -lactamases tem se destacado na literatura e é considerada clinicamente importante, uma vez que sua atividade não é inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamase disponíveis como o ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam e NXL-104. A hidrólise é dependente da interação do  $\beta$ -lactâmico com íon de zinco no local ativo, que explica a inibição da sua atividade por EDTA, um quelante de cátions bivalentes. A classe D, também conhecida como oxacilinas, inclui 232 enzimas com algumas variantes que possuem atividade carbapenemase dentre elas a OXA-48 e a OXA-181, que têm sido relatadas em regiões do mediterrâneo e têm aumentado progressivamente em outras áreas geográficas (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; PALZKILL, 2013).

As carbapenemases mais eficazes, em termos de hidrólise do carbapenêmico e dispersão geográfica, são os tipos KPC, VIM, IMP, NDM e OXA-48. Os KPCs inativam todos os

antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e são apenas parcialmente inibidos por inibidores da  $\beta$ -lactamase como o ácido clavulânico, tazobactam e ácido borônico (MELETIS, 2016). *Pseudomonas* e várias espécies de *Acinetobacter* também tendem a possuir resistência aos carbapenêmicos por hidrólise enzimática. Outro mecanismo de resistência bacteriana aos carbapenêmicos ocorre pelas porinas bacterianas que podem influenciar a permeabilidade da membrana celular nas bactérias, tornando-as menos suscetíveis aos carbapenêmicos (EL-GAMAL et al., 2017).

O progresso da resistência microbiana aos antimicrobianos existentes é alarmante. Com isso, é preciso preservar os antimicrobianos que ainda apresentam atividade contra esses patógenos. Neste contexto, o controle de qualidade tem um papel fundamental para se assegurar a correta dosagem contribuindo de forma preventiva a minimizar o desenvolvimento de microorganismos resistentes. Estudos das características físicas e químicas do fármaco e a quantificação do teor da substância ativa são de fundamental importância para a indústria farmacêutica garantir a qualidade do produto comercializado.

### 3.5. Métodos Analíticos

#### 3.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O método de cromatografia densitométrico por camada delgada foi descrito em 2010 por Abdel-Moety e colaboradores, para a determinação de ertapenem e imipenem na presença de seus produtos de degradação, sem separação prévia. A fase móvel utilizada foi *n*-butanol: água: acetona (4:3:3 v/v/v) e o  $R_f$  apresentado foi de 0,58 e 0,39 para ertapenem e seu produto de degradação e  $R_f$  0,44 e 0,25 para imipenem e seu produto de degradação, respectivamente.

#### 3.5.2. Cromatografia eletrocínética micelar

O método de cromatografia eletrocínética micelar foi desenvolvido por Michalska, Pajchel e Tyski (2009), usando dihidrogênio fosfato de sódio 60 mM e tampão ácido bórico 20 mM pH 6,0, e detecção UV 214 nm para a determinação de ERTM e suas impurezas.

#### 3.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de ertapenem têm sido descritos na literatura. Os primeiros métodos desenvolvidos consistem em um sistema em que diferentes fases móveis se alternam entre duas colunas para se obter a separação desejada (MUSSON et al., 1998; MUSSON et al., 2002; KITCHEN; MUSSON; FISHER, 2004). Desde então, novos métodos têm sido publicados na tentativa de se adequar às exigências dos laboratórios de análise de rotina, que necessitam de métodos rápidos, simples e

de fácil execução. No entanto, muitos dos métodos analíticos apresentados na literatura para análise do ERTM por cromatografia líquida de alta eficiência são para a análise do fármaco em fluidos biológicos (Tabela 1). Os trabalhos publicados para a análise do ERTM em produtos farmacêuticos são apresentados na Tabela 2.

É válido ressaltar que o ERTM ainda não possui monografia em nenhum compêndio oficial e, portanto, os métodos validados para análise deste fármaco na indústria farmacêutica são de alta relevância.

**Tabela 1-** Métodos de CLAE para a determinação de ERTM em matriz biológica

Matriz	Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
Plasma e urina humano	Coluna de extração: Maxsil ODS (50 x 4,6 mm, 10 µm) Coluna analítica: Hypersil BDS C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm) para plasma (150 x 4,6 mm, 5 µm) para urina.	Bomba 1 (extração): tampão fosfato 25 mM, pH 6,5 (7,1 g fosfato de sódio dibásico anidro em 2000 mL de água, pH ajustado para 6,5 com ácido fosfórico, 85%). Bomba 2 (FM): tampão fosfato de sódio 25 mM pH 6,5: metanol (89,5: 10,5 v/v)	UV 300	Bomba 1:1,5 Bomba 2:2,0	9,9 plasma 20,0 urina	MUSSON et al., 1998 MAJUMDAR et al., 2002
Urina humana	Coluna de extração: Prism RP (20 x 4,6 mm, 5 µm). Coluna analítica: Aquasil C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)	Bomba 1 (extração): tampão fosfato 25 mM, pH 6,5 (fosfato de sódio dibásico anidro 7,1 g em 2000 mL de água, pH ajustado para pH 6,5 com ácido ortofosfórico, 85%) Bomba 2 (FM): tampão fosfato 25 mM, pH 6,5: metanol (90:10 v/v)	UV 300	Bomba 1:2,0 Bomba 2:1,8	18	MUSSON et al., 2002
Plasma de camundongo	Keystone C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato 25 mM pH 6,5: metanol (100: 9,5 v/v)	UV 300	1,0	10,5	XUAN et al., 2002
Plasma humano	Hypersil BDS C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato de sódio 25 mM pH 6,5: metanol (90:10 v/v)	UV 300	2,0	5,5	MUSSON et al., 2003

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação)**- Métodos de CLAE para a determinação de ERTM em matriz biológica

Matriz	Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
Líquido cefalorraquidiano humano	Coluna de extração: Maxsil C <sub>18</sub> (50 × 4,6 mm, 10 µm) Coluna analítica: Hypersil BDS C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)	Bomba 1 (extração): ácido fórmico 0,1 % Bomba 2 (FM): acetonitrila 0,1 %: ácido fórmico (15: 85 v/v)	UV *	Bomba 1: 1,5 Bomba 2: 2,0	7	KITCHEN; MUSSON; FISHER, 2004
Plasma humano	Synergi Hydro- RP 80A (250 x 4,6 mm, 0,4 µm)	Acetonitrila: tetra-hidrofurano: tampão citrato 0,025 M pH 4,5 (10:1:89 v/v/v)	UV 315	*	*	NIX; MATTHIAS; FERGUSON, 2004
Plasma e lavado bronco-alveolar humano	Prontosil 120 AQ + C <sup>18</sup> (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente: A: Tampão fosfato 10 mM pH 6,5 com ácido fosfórico concentrado: B: acetonitrila 94 % A: 06 % B (v/v) 0 a 2 min 82 % A: 18 % B (v/v) 2 a 7 min 94 % A: 06 % B (v/v) 7 a 14 min	UV 305	1,0	6,2	GORDIEN et al., 2006
Plasma humano	Synergi Polar-RP A80 Mercury LC (10 x 2,0 mm, 4 µm)	Gradiente: A: água 0,2 mM acetato de amônio 0,1 % ácido acético pH 3,8: B: metanol 100 % A : 0 % B (v/v) 0 min 10 % A : 90 % B (v/v) 5 min 100 % A: 0 % B (v/v) 3 min	MS-SIM m/z 473,9	0,5	3,7	KOEL et al., 2006

Continua na próxima página



**Tabela 1 (continuação)-** Métodos de CLAE para a determinação de ERTMem matriz biológica

Matriz	Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Tr (min)	Referência
Plasma e células do tecido pulmonar humano	Hypersil ODS (125 × 3 mm, 3 μm)	Gradiente: A: água: B: metanol com 25 mM acetato de amônio 95 % A : 05 % B (v/v) 0 min 50 % A :50 % B (v/v) 5 min	UV 300	0,08	15	MUNDKOWSKI et al., 2006
Plasma humano	Hypersil ODS (100 × 4,6 mm, 5 μm)	Água: metanol: ácido orto fosfórico (64:35:1 v/v/v)	UV 300	1,0	4	SOLTANI; MACGOWAN; LOVERING, 2006
Plasma humano	Atlantis C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm, 3 μm)	Gradiente: tampão A: água: ácido fórmico 0,05 %: tampão B: acetonitrila: ácido fórmico 0,05 % 90 % A : 10 % B (v/v) 0 min 90 % A : 10 % B (v/v) 3 min 50 % A : 50 % B (v/v) 8 min 30 % A : 70 % B (v/v) 8,1 min 30 % A : 70 % B (v/v) 10 min 90 % A : 10 % B (v/v) 10,1 min 90 % A : 10 % B (v/v) 14 min	UV 300	1,0	8,44	D'AVOLIO et al., 2008
Microdialisado, sangue e músculo de rato	Xterra MS C <sub>18</sub> (150 × 3,9 mm, 5 μm)	A: água: ácido fórmico 99,9: 0,1, v/v B: acetonitrila: ácido fórmico 99,9: 0,1 v/v (82: 18 v/v)	M/M m/z 476,2	0,8	1,97	LEFEUVRE et al., 2008

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação)-** Métodos de CLAE para a determinação de ERTMem matriz biológica

Matriz	Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
Plasma humano	Pré-coluna Satisfaction Plus (15 × 3 mm, 5 μm) Coluna analítica Satisfaction C <sub>8</sub> Plus (250 × 3 mm, 5 μm)	Gradiente: A: metanol: B: tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 0 % A: 100 % B v/v 0 min 30 % A: 70 % B v/v 25 min 0 % A: 100 % B v/v 10 min	UV 298	0,5	23,8	LEGRAND et al., 2008
Plasma humano	Coluna: Waters XBridge C <sub>18</sub> (30 x 4,6 mm, 2,5 μm)	Acetonitrila: tampão de fosfato 50 mM a pH 2,4 (12: 88 v/v)	UV 304	1,0	4,4	MCWHINNEY et al., 2010; BRISCOE et al., 2012
Plasma humano	Kinetex Penta fluoro fenil (100 × 4,6 mm, 2,6 μm)	Gradiente: A: metanol: B: tampão fosfato de sódio Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,1 M pH 7 ajustado com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% 0 % A: 100 % B v/v 0 min 30 % A: 70 % B v/v 5 min Aumento progressivo do solvente A	UV 295	1,0	5,8	DAILLY et al., 2011
Sangue seco	Agilent Zorbax Eclipse Plus C <sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,8 μm)	Gradiente: A: água: B: acetonitrila Ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico 95 % A: 5 % B v/v. Sendo que: 95% de B foi alcançado em 1 min e mantida durante 15 seg; as condições iniciais foram restauradas em 5 s.	CLUE-MS/MS MRM: m/z 476,2 > 432,2	0,4	1,04	LA MARCA et al., 2012

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação)-** Métodos de CLAE para a determinação de ERTMem matriz biológica

Matriz	Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
Plasma humano	Thermo Hypersil-Keystone Aquasil C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente: A: acetonitrila: B: acetato de amônio 25 mM, pH 4,5 5 % A : 95 % B v/v 0 min 5 % A : 95 % B v/v 3 min 40 % A : 60 % B v/v 8 min 5 % A : 95 % B v/v 8,1 min 5 % A: 95 % B v/v 10 min	UV 254	1	6,28	PICKERING; BROWN, 2012
Urina humano	Luna C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm, 5 µm)	Metanol: água 18 % v/v pH 8,0 ajustado pela adição de solução de hidróxido de sódio 1,0 M e 25 mM de ácido fosfórico	UV 220	1	11,50	DEMIRALAY et al., 2013

\*Dados não apresentados

**Tabela 2-** Métodos de CLAE para a determinação de ERTMem forma farmacêutica

Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
Hamilton PRP - X100 (250 x 4,1 mm, 10 µm)	270-280 mg de ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico em 1,98 L de água. pH 9,5 ajustado com solução aquosa hidróxido de sódio e 20 mL de metanol	UV 305	1,5	10	NATISHAN; SAJONZ, 2001
Inertsil Phenyl (100 x 0,25 mm)	A: tampão fosfato de sódio 0,1% pH 8,0 B: acetonitrila 98 % A: 2 % B v/v 0 min 95 % A : 5 % B v/v 3 min 85 % A : 15 % B v/v 25 min 75 % A : 25 % B v/v 35 min 75 % A : 25 % B v/v 45 min 98 % A : 2 % B v/v 47 min 98 % A : 2 % B v/v 62 min	UV 230	1	≅15	SAJONZ et al., 2001
YMC C <sub>8</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente: A: ácido fosfórico 0,05 % pH 2,2; B: acetonitrila 90 % A : 10% B v/v 5 min 70 % A : 30 % B v/v 15 min 10 % A : 90 % B v/v 5 min 90 % A : 10 % B v/v 5 min	UV 220	1,5	≅ 14	VAILAYA et al., 2005

Continua na próxima página

**Tabela 2 (continuação)-** Métodos de CLAE para a determinação de ERTMem forma farmacêutica

Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
Básica YMC Waters (100 x 4,6 mm)	Gradiente: A: Solução aquosa de ácido fosfórico 0,05 %: B: acetonitrila 90 % A : 10 % B v/v 0 min 60 % A : 40 % B v/v 15 min 10 % A : 90 % B v/v 16 min 10 % A : 90 % B v/v 19 min 90 % A : 10 % B v/v 20 min 90 % A : 10 % B v/v 30 min	UV 230	1,5	8,4	SAJONZ; PETER, 2005
Fenil Inertsil (250 x 4,6 mm)	Gradiente: A: tampão fosfato de sódio a 0,1% em água pH 8,0: B: acetonitrila 98 % A : 2% B v/v 0 min 95 % A : 5 % B v/v 3 min 85 % A : 15 % B v/v 22 min 75 % A : 25 % B v/v 10 min	UV 230	1	15	SAJONZ et al., 2006
LiChrospher RP <sub>18</sub> (250 × 4 mm, 5 µm)	Tampão fosfato 25 mM pH 6,5: metanol (15: 85 v/v)	UV 298	1,2	*	ZAJAC; CIELECKA-PIONTEK; JELINSKA, 2006
LiChrosorb C <sub>18</sub> (250 x 4,0 mm, 5 µm)	Tampão fosfato 25 mM pH 6,5: metanol (15: 85 v/v)	UV 298	1,2	0-15	CIELECKA-PIONTEK; ZAJAC; JELINSKA, 2008

\*Dados não apresentados

Continua na próxima página

**Tabela 2 (continuação)**-Métodos de CLAE para a determinação de ERTMem forma farmacêutica

Coluna	Fase móvel	Deteção (nm)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	T <sub>R</sub> (min)	Referência
LiChrosorb C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 10 µm)	Acetato de amônio 0,05 M: acetonitrila: metanol: trietilamina pH ajustado para 6,5 ± 0,1 com ácido fosfórico (80:10:10: 0,1 v/v/v/v)	UV 297	1	3,92	ABDEL-MOETY et al., 2010
ODS C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente: A: acetato de amônio 0,01 mol L <sup>-1</sup> e B: acetonitrila. 98 % A : 2 % B v/v 0 min 98 % A : 2 % B v/v 6 min 75 % A : 25 % B v/v 20 min 65 % A : 35 % B v/v 30 min	UV 230	1	≅ 14	XIE et al., 2012 SHI et al., 2012

### 3.6. Estabilidade e produtos de degradação

Para que possa ser usado na terapia humana com segurança, o fármaco deve demonstrar estabilidade adequada na formas farmacêuticas e em fluidos corporais, por isso, os produtos de degradação resultantes da sua biotransformação devem ser investigados (CIELECKA-PIONTEK, 2011).

O estudo de estabilidade avalia o perfil de degradação do fármaco e a formação de produtos de degradação, que são impurezas provenientes de modificações químicas geradas durante o seu armazenamento, decorrentes de fatores externos, como temperatura, umidade, luz e pH, além de possíveis reações com adjuvantes ou com a embalagem primária. Esses produtos de degradação são indesejáveis e podem causar alterações à saúde. Esse é um tema de suma importância para a indústria farmacêutica, bem como, para comunidade, uma vez que está diretamente relacionada à qualidade do fármaco e, portanto, à maior segurança no consumo medicamentoso.

Em 23 de janeiro de 2012, a Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA, por meio da consulta pública nº 11, estabeleceu os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos, que resultou na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 58 de 2013 da Anvisa, que estabelece parâmetros para a 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 da vida útil do medicamento. Em dezembro de 2015, terminou o prazo dado as indústrias farmacêuticas para se adequarem às novas regras que entraram em vigor.

Dentre as exigências impostas por essa resolução estão: estudos de degradação forçada, que exige a degradação de 10-30% do produto por meio da exposição a condições de estresse por aquecimento, umidade, hidrólise ácida e alcalina, oxidação, exposição fotolítica e íons metálicos; limite de identificação, notificação e qualificação das impurezas; perfil de degradação; pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e qualificação desses produtos (BRASIL, 2013).

A estabilidade do ertapenem é um tema já discutido na literatura. A solução aquosa de ERTM demonstrou ser estável por 2 dias sob refrigeração a 5 °C e por 1 dia em temperatura ambiente (NATISHAN et al., 2001). Abdel-Moetye colaboradores (2010) descreveram que soluções de ERTM se mantiveram estáveis em água e em soluções cloreto de sódio por apenas 4 horas e em solução de glicose 5% por 3 h à temperatura ambiente. No entanto, os resultados apresentados por Tice (2004) apontam que solução de ERTM em cloreto de sódio manteve-se estável por 6 horas, ambos realizados em temperatura de 25 °C.

Em um estudo de estabilidade realizado por Mcquade et al., 2004, o ertapenem foi reconstituído com água estéril e diluído em várias soluções para infusão intravenosa. As soluções foram armazenadas a -20, 4 e 25 °C e a estabilidade foi monitorada. Os resultados encontrados apontam que o ertapenem foi estável por até 6 horas quando preparado em cloreto de sódio ou solução de Ringer mantida a 25 °C, mas exibiu estabilidade inferior a 1 hora em soluções de manitol, glicose, heparina sódica e cloreto de potássio mantidas a 25 °C. Quando armazenada a 4 °C, a solução de ertapenem em cloreto de sódio ou solução de Ringer foi estável por 3 a 4 dias; o estudo indica ainda que as soluções de ertapenem congeladas a -20 °C demonstram extrema variabilidade e, portanto, não devem ser congeladas. Gordien e colaboradores (2006) relataram que ERTM mostrou ser estável por 6 meses em solução tampão pH 6,5 se congelada a -80 °C e foi estável por 12 horas em temperatura ambiente.

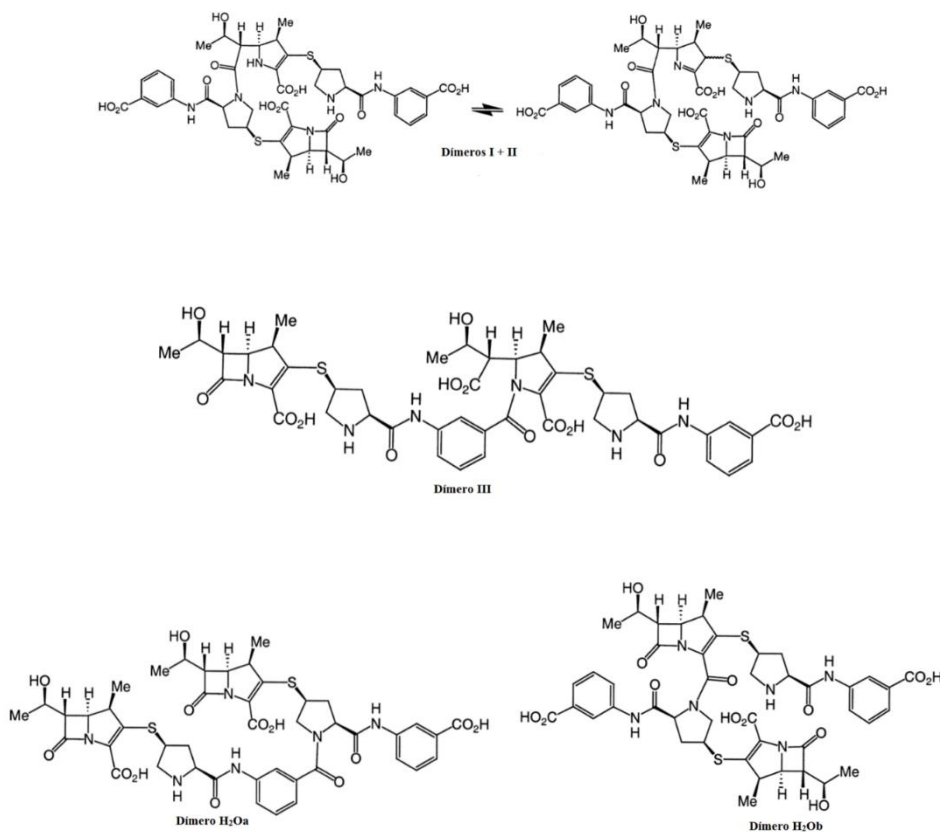
Os resultados para estabilidade apresentados por Musson e colaboradores (1998) apontam que a solução de ERTM em solução tampão de ácido 2-[N-morfolino] etano sulfônico (MES) 0,1 M pH 6,5 e etileno glicol 1:1 v/v foi estável por 12 horas a 5 °C e por 23 horas a 24 °C. A solução em plasma estabilizado se manteve estável por 12 meses a -70 °C e em urina estabilizada por 11 meses. Dez anos mais tarde, o mesmo estabilizador foi usado por Lefeuvre et al. (2008); seus resultados indicaram que a solução de ERTM em Ringer estabilizado com tampão MES 0,1 M pH 6,5 e etilenoglicol (1:1, v/v) se manteve estável por um mês a -20 °C e -80 °C, mesmo após três ciclos de congelamento e descongelamento, mas foi instável a 4 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Legrand et al. (2008), em que a solução de plasma estabilizado com solução tampão de ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (MOPS) pH 6,8 ajustado com hidróxido de sódio 2,5 M 50/50 (v/v) se manteve estável por um mês a -80 °C e por 24 h a 8 °C, em plasma estabilizado a solução se manteve estável por 72 h a 4 °C.

Sabe-se que os carbapenêmicos contêm um sistema de anéis que se tornam instáveis em água, a valores altos ou baixos de pH e que o principal produto de degradação formado pela hidrólise da molécula consiste na abertura do anel  $\beta$ -lactâmico. A formação deste produto de degradação aumenta em temperaturas acima de 10 °C (MCQUADE et al., 2004; ABDEL-MOETY et al., 2010). Para alguns autores este foi o único produto de degradação encontrado (NAGIBA et al., 2009; ABDEL-MOETY et al., 2010). No entanto, dímeros e desidratados de dímeros de ertapenem podem estar em equilíbrio na solução. A formação de dímeros está diretamente relacionada à concentração de ERTM em uma solução. É possível observar que a formação desses dímeros ocorre a partir da reação entre os grupamentos carbonila e amina presentes na molécula ou oriundos da abertura do anel  $\beta$ -lactâmico. Os dímeros são formados



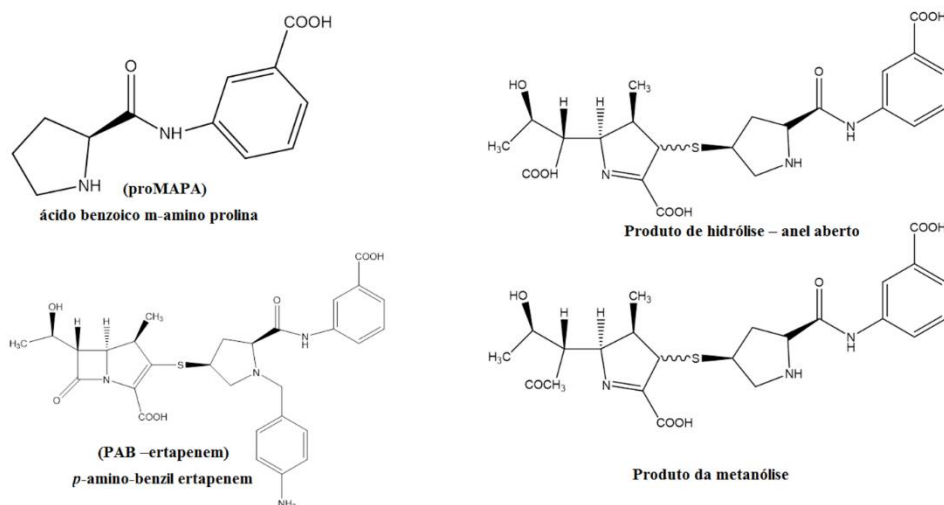
rapidamente em soluções concentradas com no mínimo,  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  ou mais (Figura 3) (SAJONZ et al., 2001, MCQUADE et al., 2004; SAJONZ et al., 2006).

**Figura 3** - Dímeros de ERTM



*Fonte:* Figuras desenhadas em ChemDraw Profissional 15.1 baseadas na literatura Sajonz et al., 2001; Vailaya et al., 2005

Na presença de álcoois, produtos de degradação podem ser formados pela etanólise; como o etanol é usado no processo de síntese é possível que esse produto aparecerá no produto final devido à presença de etanol residual (SAJONZ et al., 2001; SAJONZ et al., 2006). A determinação de substâncias voláteis usadas no processo de síntese do fármaco como etanol, metanol e *n*-butanol foi quantificada no produto acabado em um trabalho publicado por Natishan e Wu, em 1998. Além do produto de hidrólise de anel aberto e dos dímeros presentes em solução, uma impureza a partir da cadeia lateral de ertapenem, o *meta*-amino-benzoico prolina-proMABA foi encontrado na análise de ERTM (Figura 4) (SAJONZ et al., 2006).

**Figura 4** - Produtos de degradação de ERTM

Fonte: Figuras desenhadas em ChemDraw Profissional 15.1, baseadas na literatura Sajonz et al., 2001; Vailaya et al., 2005; Sajonz et al., 2006.

A estabilidade do fármaco é inerente ao pH em que se encontra em uma solução. Para Zajac e colaboradores (2006), a faixa de pH em que a solução de ertapenem mantém maior estabilidade é entre 5 a 6. Estes dados estão de acordo com o demonstrado por Sajonz et al. (2001; 2006), em que a faixa de pH sugerida foi de 5,5 a 7,0, sendo o pH 7 preferido, por proporcionar uma ótima estabilidade e evitar a formação de dímeros. Os autores relatam ainda que as soluções de ERTM são menos estáveis em pH de 9,3 e que pH acima de 7 propicia a formação do seu produto de degradação pela abertura do anel  $\beta$ -lactâmico. No entanto, para Natishan et al. (2001), o valor da constante de dissociação ácido/base - pKa deve ser levado em consideração e com isso o pH ideal para se obter maior estabilidade deve ser 9,5, garantindo assim que o ertapenem estará completamente ionizado, uma vez que o ERTM apresenta estrutura anfótera com três grupos funcionais ionizáveis relevantes, sendo dois centros ácidos (COOH) e um centro básico (anel pirrolidina). Os referidos valores de pKa para ERTM são: pKa<sub>1</sub> 2,72; pKa<sub>2</sub> 3,96 e pKa<sub>3</sub> 7,06 (NATISHAN et al., 2001; VAILAYA et al., 2005). No entanto, segundo a plataforma *online Chemicalize* os dois pKa de relevância para ERTM são 3,37 e 9,03.

A constante de dissociação ácido base – pKa é um importante parâmetro de absorção, distribuição, metabolização, excreção, bem como, no desenvolvimento de formulações e de métodos analíticos, sendo necessário seu conhecimento para se estabelecer as condições cromatográficas ideais.

A determinação da constante de dissociação para ERTM e outros  $\beta$ -lactâmicos em solução binária de água/acetonitrila e água/metanol foi apresentada por Demiralay et al., em

2012 e 2013. Nestes trabalhos, os valores de pKa foram calculados pelo programa NLREG e foram comparados a valores de pKa obtidos por diferentes metodologias, de um modo geral, existe uma boa concordância entre os valores apresentados neste trabalho e os referidos por Natishan et al. (2001) e Vailaya et al. (2005). Estudos relacionados à instabilidade e ao perfil de impurezas de um fármaco são essenciais para o desenvolvimento de novos métodos analíticos.

### **3.7. Presença de formas polimórficas**

Formas polimórficas de ERTM foram descritas na literatura (BRANDS et al., 2003; MING et al., 2011; REDDY et al., 2012). A pesquisa de possíveis formas polimórficas é recomendada pela FDA. No Brasil, passou a ser uma exigência para o registro de novos produtos desde 29 de maio de 2003, com a RDC nº 136 (FDA, 2004; BRASIL, 2017). Investigar a atividade dos diferentes polimorfos é extremamente importante, pois, embora sejam quimicamente idênticos, sabe-se que apresentam diferentes conformações espaciais, que podem afetar a atividade terapêutica por modificar as propriedades farmacológicas.

### **3.8. Ensaio microbiológico**

A excelência do laboratório de controle de qualidade microbiológico é de suma importância na prevenção e controle de doenças infecciosas, impedindo a disseminação de agentes patogênicos resistentes e otimizando o tratamento com os antimicrobianos atualmente disponíveis (THOMSON, 2010). Métodos de difusão em ágar foram usados para avaliar a atividade do fármaco frente a vários micro-organismos (GOLDSTEIN et al., 2000; COTTAGNOUD et al., 2003), no entanto, não foram encontrados métodos microbiológicos validados para quantificação do teor do fármaco na forma farmacêutica para uso no controle de qualidade.

O progresso da resistência aos carbapenêmicos é um problema alarmante, uma vez que estes são considerados os fármacos de última escolha para o tratamento de infecções graves por enterobactérias. Assim, é necessário investigar as mudanças no perfil farmacológico dos carbapenêmicos (PAL; TRIPATHI, 2013). A ausência de novos e eficazes antimicrobianos faz com que o controle de infecções contra patógenos multirresistentes seja uma preocupação constante. Em 27 fevereiro de 2017, em Genebra, a Organização Mundial da Saúde publicou a sua primeira lista de "agentes patogênicos prioritários" resistentes aos antimicrobianos, trata-se de um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana. A lista da OMS é dividida em três categorias de acordo com a urgência da necessidade

de novos antimicrobianos: prioridade crítica, alta e média. Dentre o grupo de prioridade crítica encontram-se *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*. Essas bactérias tornaram-se resistentes a um grande número de antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, considerados os melhores antimicrobianos disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes. Com isso, os ensaios microbiológicos capazes de fornecer resultados laboratoriais rápidos e precisos se tornam indispensáveis.

### **3.9. Validação de métodos**

A validação de métodos analíticos é uma prática comum e necessária na indústria farmacêutica. A qualificação de instalação e verificação de desempenho para a qualificação operacional são fundamentais para garantir que a instrumentação pode ser usada para a análise com reprodutibilidade e robustez. Os processos de validação são obrigatórios para o controle de qualidade. A especificação de qualificação de instrumentação e a validação dos procedimentos analíticos na indústria farmacêutica são determinadas pelo *Guideline for Industry in Harmonised Tripartite Guideline* (ICH, 2005). Desta forma, é possível desenvolver produtos com qualidade desde a sua concepção até a sua avaliação final pelo controle de qualidade para que possa ser liberado para a comercialização e seja seguro para o consumidor (ANTON; SIFFRIN, 1999).

Os órgãos regulatórios do Brasil exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, adotam documentos oficiais que são diretrizes a serem seguidas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às autoridades regulatórias, evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. A Resolução RDC nº 166, de 24/07/2007 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências determina que a validação deva garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017).

Os métodos analíticos são de suma importância para os laboratórios farmacêuticos no desenvolvimento de novos medicamentos, na determinação da pureza do fármaco e na identificação de possíveis impurezas que podem afetar a eficácia do fármaco e/ou ser tóxico para as pessoas. Por isso, os requisitos para qualquer método são rigorosos, dado que os resultados são de grande importância para a saúde humana. É essencial que os métodos desenvolvidos apresentem alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, possam

quantificar o fármaco com precisão, robustez e exatidão, e se possível sejam simples, econômicos, rápidos e fáceis de executar (ABBOTT et al., 2008).

Todos os métodos analíticos desenvolvidos neste estudo de pesquisa foram devidamente validados segundo as recomendações das diretrizes vigentes (BERZAS et al., 2004; ICH, 2005; BRASIL, 2017) para garantir que os métodos desenvolvidos possam ser usados em aplicações analíticas para quantificação de ERTM.

### **3.9.1. Conformidade do sistema cromatográfico**

O ICH (2005) estabelece como parte prévia ao processo de validação, o teste de conformidade do sistema (*system suitability*) para os métodos cromatográficos. O teste é uma etapa essencial para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estão aptos para a validação do método bem como o bom desempenho do cromatógrafo durante a realização das análises.

A conformidade do sistema cromatográfico pode ser verificada injetando dez replicatas de soluções de erapenem substância química de referência (SQR) em uma mesma concentração. A partir dos cromatogramas gerados, os parâmetros fator de retenção, número de pratos e assimetria do pico cromatográfico podem ser mensurados manualmente ou pelo *software* usado. Esses parâmetros foram calculados segundo Cass, Degani, 2012 e a USP 38, 2015 e estão apresentados nas Equações de 1 a 4. O tempo de retenção, a área do pico e o desvio padrão relativo (DPR) também devem ser avaliados. Em caso de não conformidade, ajustes no equipamento e/ou nos parâmetros selecionados precisam ser adequados e uma nova avaliação da conformidade do sistema deve ser realizada até que os parâmetros estejam em conformidade.

#### **3.9.1.1. Tempo da substância não retida ( $T_0$ )**

O tempo da substância não retida ( $T_0$ ), conhecido vulgarmente como “tempo morto” ou “volume morto”, é o tempo, normalmente em minutos, necessário para que o analito percorra o sistema cromatográfico do ponto de injeção até o detector, ou seja, é o tempo de eluição de um soluto não retido pela fase estacionária que está diretamente relacionado ao sistema cromatográfico e à coluna utilizada.

O  $T_0$  pode ser verificado experimentalmente pela injeção de uma substância que não tenha afinidade pela fase estacionária ou pela injeção de um solvente em que o detector em uso seja capaz de visualizar. Também pode ser verificado pela visualização da primeira perturbação da linha de base que geralmente se apresenta com a inflexão do pico no cromatograma.

Alguns exemplos de substâncias comumente usadas para esta finalidade no modo reverso de eluição são água, uracil, ureia,  $\text{NaNO}_3$ ; no modo normal de eluição usa-se acetona, dissulfeto, hidrocarbonetos saturados ou aromáticos; e no modo CIH de eluição geralmente usa-se tolueno. O  $T_0$  também pode ser estimado teoricamente baseado nas dimensões da coluna cromatográfica, sendo calculado pela metade do volume interno da coluna em mL dividido pela vazão em  $\text{mL min}^{-1}$  (Equação 1) (CASS; DEGANI, 2012).

$$T_0 = \frac{0,5 \cdot (\pi \cdot r^2 \cdot L)}{\text{vazão}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

$T_0$  = Tempo da substância não retida - “volume morto”;

Vazão = em  $\text{mL min}^{-1}$

$$\text{Volume interno da coluna} = \begin{cases} \pi = 3,14 \\ r^2 = \text{raio da coluna em cm} \\ L = \text{comprimento da coluna em cm} \end{cases}$$

As substâncias que eluírem no  $T_0$  ou próximo a ele não possuem interação adequada com a fase estacionária e, portanto, não há precisão e exatidão apropriada para quantificá-las. O parâmetro que avalia se a interação entre o analito e a fase estacionária é adequada é o fator de retenção ( $k'$ ).

### 3.9.1.2. Fator de retenção ( $k'$ )

O primeiro parâmetro da conformidade do sistema cromatográfico que deve ser avaliado para o desenvolvimento de um método cromatográfico é o fator de retenção. O fator de retenção é a medida da posição do pico de interesse em relação a substância não retida (Equação 2). Considera-se que há interação adequada entre o analito e a fase estacionária quando  $k \geq 2$ . Se necessário, é possível ajustar o fator de retenção alterando a força da fase móvel (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; CASS; DEGANI, 2012).

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$k'$  = Fator de retenção

$t$  = Tempo de retenção do pico de interesse

$t_0$  = Tempo da substância não retida (volume morto)

### 3.9.1.3. Número de pratos (N)

O número de pratos indica a eficiência da coluna cromatográfica e é definido pelas medidas do tempo de retenção e do alargamento de bandas. Cada prato corresponde a uma etapa de equilíbrio do soluto entre as fases móvel e estacionária, deste que, as condições adequadas tenham sido estabelecidas, a eficiência é considerada adequada acima de 2000 pratos. A Equação 3 apresenta cálculo para a obtenção do número de pratos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; CASS; DEGANI, 2012).

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t}{w_{0,5}}\right)^2 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

$t$  = Tempo de retenção da substância analisada

$w$  = Largura a meia altura do pico

### 3.9.1.4. Assimetria do pico ( $A_s$ )

A assimetria do pico ( $A_s$ ) é a medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido longitudinal. Pode ser calculada pela medida da largura do pico na base a 10 % da sua altura e pela distância entre o máximo do pico e a cauda ( $f$ ), conforme apresentado na Equação 4 (CASS; DEGANI, 2012).

$$A_s = \frac{b_f}{a_f} \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

$A_s$  = Assimetria do pico

$b_f$  = Distância do ponto médio ao ponto posterior medido na base do pico a 10 % da sua altura

$a_f$  = Distância do ponto frontal ao ponto médio medido na base do pico a 10 % da sua altura

### 3.9.1.5. Resolução (R)

A resolução é o parâmetro cromatográfico que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, e é calculada segundo a Equação 5 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; CASS; DEGANI, 2012).

$$R = 1,18 \frac{t_2 - t_1}{W_{1,h/2} + W_{2,h/2}} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$t_2$  e  $t_1$  = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

$W_{1,h/2}$  e  $W_{2,h/2}$  = respectivas larguras dos picos à meia altura.

### 3.9.2. Cálculo do teor médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável

O teor médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável é calculado pelo doseamento entre a substância química de referência *versus* a amostra, em triplicata. Para a realização deste ensaio usa-se normalmente a concentração mediana da curva analítica. Embora o teor médio não seja diretamente um dos parâmetros de validação, muitos desses parâmetros são avaliados pelo desvio padrão relativo entre os doseamentos, como é o caso da precisão intermediária, (interdias e entre analistas), bem como para a determinação da robustez adotadas neste estudo. Cabe ressaltar que existem diferentes maneiras de se avaliar tais parâmetros e o modo adotado são apresentados no decorrer de cada tópico. A concentração de ERTM na amostra é calculada pela Equação 6 e o seu teor percentual pela Equação 7.

$$C_A = A_A \times \frac{C_{SQR}}{A_{SQR}} \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

$C_A$  = concentração da amostra

$A_A$  = absorvância da amostra

$C_{SQR}$  = concentração da substância química de referência

$A_{SQR}$  = absorvância da substância química de referência

$$C_A \% = \frac{(C_A \times 100)}{C_T} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

$C_A\%$  = Concentração percentual da amostra

$C_A$  = Concentração de ERTM encontrada na amostra

$C_T$  = Concentração teórica de ERTM na amostra

### 3.9.3. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017). Para isso, pode se submeter uma amostra do fármaco à degradação forçada em condições ácida, alcalina, neutra, oxidativa, térmica, fotolítica e avaliar a interferência de possíveis produtos de degradação na quantificação do fármaco.

Para um método ser considerado indicativo de estabilidade, ele precisa ser capaz de quantificar a diminuição da quantidade do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) no fármaco devido à sua degradação. O estudo de degradação forçada nos permite gerar produtos de degradação em um período de tempo muito mais curto que os tradicionais estudos de



estabilidade que incluem estudos a longo prazo (24 meses) e estudos de estabilidade acelerada (6 meses). O estudo de degradação forçada pode ser utilizado para produzir um perfil de degradação semelhante ao do que seria observado num estudo de estabilidade formal, e portanto, é adequado para desenvolver métodos indicativos de estabilidade que podem ser aplicados posteriormente para a análise do fármaco.

A degradação forçada é um processo que envolve a degradação de fármacos em condições mais severas, gerando produtos de degradação que devem ser avaliados para determinar a estabilidade da molécula durante o desenvolvimento de métodos de análise, a fim de confirmar que tais produtos não interferem na detecção e quantificação da substância principal em análise. Embora o estudo de degradação forçada seja uma exigência das agências regulatórias como ICH e FDA, as orientações regulamentares não especificam as condições de degradação a serem usadas, uma vez que, essas devem ser ajustadas inerente a cada fármaco. Com isso, uma revisão sobre estudo de estabilidade foi apresentada por Blessy e colaboradores (2014), em que, reúne as normas regulatórias, bem como, contribuições de pesquisadores sobre o tema. O estudo de degradação forçada realizado para o desenvolvimento dos métodos neste estudo foi baseado neste trabalho.

As concentrações das soluções usadas na degradação e o tempo de exposição do fármaco devem ser ajustadas a fim de se avaliar a degradação de no mínimo 5% e não mais que 20% da concentração inicial. Isso por que, degradações severas podem gerar produtos de degradação secundários que não são de interesse para o nosso estudo. O estresse pode ser aumentado ou diminuído para se adequar o tempo gasto para se obter suficiente degradação. Não é necessário que a degradação forçada resulte em produtos de degradação. Após a exposição do fármaco as condições de estresse, o estudo pode ser terminado se não houver degradação. A concentração de fármaco recomendada para o estudo da degradação é de 1 mg mL<sup>-1</sup>. No entanto, alguns pesquisadores sugerem que a concentração usada para o estudo deve ser compatível com a concentração do fármaco presente nas formulações finais (BLESSY et al., 2014).

O teste de estresse é geralmente realizado com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico de 0,1 a 1 M para a degradação ácida e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio 0,1 a 1 M para hidrólise alcalina. Em caso de baixa solubilidade em água, pode se utilizar co-solventes para dissolvê-los. O teste de degradação é normalmente iniciado à temperatura ambiente e, se não houver degradação, é aplicada uma temperatura elevada (50-70 °C). O teste de estresse não deve exceder mais de 7 dias. Na degradação oxidativa, soluções a 0,1-3% de peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente durante sete dias ou até uma degradação máxima de 20% pode potencialmente gerar produtos de degradação relevantes. Na degradação fotolítica as

amostras de fármaco devem ser expostas à luz UV no comprimento de onda na faixa de 320-400 nm e na degradação térmica as amostras devem ser expostas ao calor seco ou úmido a 40-80 °C (BLESSY et al., 2014).

Se as impurezas forem conhecidas e estiverem disponíveis, o ensaio de degradação forçada não é necessário. Basta injetar a misturas destas substâncias para promover a análise. Também é aceito promover a “contaminação” da amostra com uma substância química de referência conhecida que seja semelhante ao fármaco analisado. A seletividade é confirmada pela ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção do fármaco a ser quantificado, o que pode ser verificado com detector de diodos - DAD e podem ser calculados pela resolução entre os picos das substâncias que eluem próximas umas às outras (ICH, 2005).

### 3.9.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é representado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto que, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

De acordo com o método proposto por Snyder, Kirkland e Dolan (2010), o LD e o LQ podem ser determinados injetando uma diluição em série em níveis crescentes em triplicata. Com isso, o LD e LQ são determinados pela observação da razão sinal-ruído, de  $s/n > 3$  para LD e  $s/n > 10$  associado ao DPR% da área do pico em triplicata  $< 2$  para LQ.

O LD e o LQ também podem ser verificados usando a curva analítica feita em triplicata e calculados segundo preconizado pela ICH, 2005, que se baseiam no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica (Equações 8 e 9).

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$$

**Equação 8**

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$$

**Equação 9**

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão da interseção de y na equação de regressão

IC = inclinação da curva analítica

É válido mencionar que, para os métodos analíticos voltados ao controle de qualidade o LD e LQ não são exigidos pelas leis regulamentadoras ICH (2005) e Brasil (2017). Isso por que, nesse caso em específico, os valores de LD e LQ são realizados apenas para demonstrar que as concentrações da curva analítica estão acima das concentrações a serem quantificadas com exatidão, e, portanto, não é necessário se obter valores baixos, já que tais métodos não serão aplicados para quantificação de ERTM em matrizes complexas tais como plasma humano. Trata-se da quantificação do analito em sua forma farmacêutica. Portanto, pode se utilizar quantidades maiores, que proporcionam resultados mais precisos e robustos, o que não é um problema desde que se tenha quantidade de SQR e amostra.

### **3.9.5. Linearidade**

É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2017). Para a construção da curva analítica, diferentes concentrações de substância química de referência são preparadas a partir de uma solução estoque. A curva analítica é construída com 5 a 7 concentrações acima da contração do limite de quantificação. Este procedimento é repetido por três dias em triplicata. Cada valor médio das áreas absolutas obtidas é plotado em relação à respectiva concentração, a equação da reta é determinada e avaliada estatisticamente pela análise de regressão linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e/ou coeficiente de correlação (R), pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA). A homocedasticidade dos dados foi investigada pelo gráfico de dispersão dos resíduos, segundo o preconizado pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

### **3.9.6. Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Ou seja, representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. A precisão é determinada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 2005; BRASIL, 2017). A repetibilidade é efetuada por meio de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo e pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo – DPR% (desvio padrão/média x 100). A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou

equipamentos, é avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%) dos teores obtidos por doseamento de substância química de referência *versus* amostra na forma farmacêutica em triplicata decorrente de três dias consecutivos ou por teste *t de Student*. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo.

### 3.9.7. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método pode ser determinada pelo o método de adição de padrão (substância química de referência), no qual adicionam-se quantidades conhecidas do analito, de pureza conhecida ao medicamento; pela análise de uma amostra na qual quantidade conhecida do fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) e ainda, pode ser inferida uma vez que a precisão, linearidade e especificidade são estabelecidas (ICH, 2005).

A exatidão do método deve ser determinada a partir de três níveis de concentrações, baixa, média e alta (R1, R2 e R3), em triplicata e dentro do intervalo linear. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A Equação 10 apresenta como a porcentagem de recuperação (R%) é a determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002; BRASIL, 2017).

$$R\% = \left[ \frac{(Cf - Cu)}{Cs} \right] \times 100 \quad \text{10 Equação}$$

Em que:

$Cf$  = concentração da substância de amostra adicionada de SQR

$Cu$  = concentração da amostra

$Cs$  = concentração teórica da SQR adicionada

### 3.9.8. Robustez

A robustez representa o grau de reprodutibilidade do teste, ou seja, a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, com a finalidade de se verificar a confiabilidade da análise (BRASIL, 2017). Os parâmetros alterados podem ser avaliados individualmente pela comparação dos doseamentos de SQR *versus* amostra, bem

como, por modelos experimentais de análise simultânea como Youden-Steiner e Plackett-Burman. Nesse estudo, a robustez dos métodos desenvolvidos foi avaliada individualmente ou pelo modelo de Plackett-Burman quando a técnica analítica permitiu a alteração de sete parâmetros simultâneos. O modelo fatorial de Plackett-Burman avalia a diferença dos teores obtidos em triplicata nos doseamentos de SQR *versus* amostra decorrente das pequenas alterações efetuadas nos parâmetros analíticos de forma simultânea. Para isso, uma matriz de 15 experimentos variando 7 parâmetros em nível superior e inferior é disponibilizada. Como apresentado na Tabela 3, em que, as letras de A a G representam os parâmetros analíticos selecionados e o número de 1 a 15 é o número de experimentos em que 0 corresponde aos parâmetros normais pré-estabelecidos no processo, enquanto que os valores 1 e -1 são, respectivamente, os níveis superiores e inferiores a esses parâmetros.

**Tabela 3-** Teste de robustez utilizando o modelo experimental de Plackett-Burman

Parâmetro Analítico	Combinação Fatorial														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0
B	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0
C	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1
D	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0
E	0	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1
F	1	0	1	0	0	1	1	0	-1	0	-1	0	0	-1	-1
G	1	1	0	1	0	0	1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1

A G: Parâmetro analítico selecionado; 1-15: número de experimentos, em que  $2n + 1$ .  $n$  = número de parâmetro, 1, 0, -1: níveis dos parâmetros

A escolha dos parâmetros e os níveis em que devem ser testados são muito importantes para obtenção de um teste de robustez confiável. Os parâmetros devem ser condizentes com a realidade prática e os níveis devem refletir a variação que pode ser geralmente observada.

Os resultados obtidos são calculados pela diferença dos teores da mesma forma proposta por Youden, Steiner (1975). Em que, para determinar a influência das variações de cada parâmetro, a média dos doseamentos, realizados em triplicata correspondente aos parâmetros normais, é comparada às médias dos doseamentos correspondentes aos níveis alterados. Portanto, o efeito médio de cada parâmetro variado é a diferença média entre as observações determinadas nos níveis extremos e aqueles determinados no nível ideal em módulo. A Equação 11 exemplifica a avaliação do efeito da alteração do parâmetro A, do mesmo modo os outros parâmetros também são avaliados (BERZAS et al., 2004).

$$\sqrt{2S} > |DA|$$

**Equação 11**

Em que:

$$S = \sqrt{\frac{2}{7}(DA^2 + DB^2 + DC^2 + DD^2 + DE^2 + DF^2 + DG^2)}$$

Sendo que o desvio de cada parâmetro alterado (DA, DB, DC etc...) deve ser menor que o valor resultante de  $\sqrt{2S}$  para se inferir que os efeitos obtidos com as variações dos parâmetros não foram significativos e, portanto, o método é robusto para todos os fatores selecionados.

Para determinar a influência das alterações em cada parâmetro, comparou-se a média dos doseamentos realizados em triplicata correspondentes aos níveis normais com a média da dosagem correspondente aos níveis modificados, para se obter o efeito médio de cada variável.

Durante o processo de validação analítica, conhecimentos de estatística são fundamentais, uma vez que a interpretação correta dos resultados assegura a conformidade com as exigências regulatórias, além de evitar falsas conclusões nos estudos realizados. A validação de métodos analíticos é imprescindível para o controle de qualidade na produção de medicamentos seguros.

Esta pesquisa científica contempla temas atuais e de elevada importância; refere-se à garantia da qualidade dos medicamentos utilizados na terapêutica humana. A literatura apresenta poucos artigos científicos descrevendo o desenvolvimento de métodos analíticos voltados para o controle de qualidade deste fármaco na forma farmacêutica. Portanto, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a caracterização e quantificação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável empregando métodos viáveis e seguros, sem prejudicar o meio ambiente são essenciais para o uso seguro deste produto, proporcionando benefícios globais. Soma-se a isso, o fato do ERTM ainda não possuir monografia em nenhum compêndio oficial, o que reitera a relevância e o mérito técnico-científico deste estudo.

Nesse sentido, justifica-se o fato deste trabalho propor a realização de técnicas analíticas para avaliar as características físico-químicas do fármaco, bem como, o desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos para quantificação do ERTM na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, que são imprescindíveis para a garantia da qualidade na produção de medicamentos seguros e apropriados para uso da população.

### **3.9.9. Critérios de aceitação para os parâmetros de validação**

Os critérios usados para avaliar os limites de aceitação do teste de conformidade do sistema cromatográfico foram analisados de acordo com a revisão dos parâmetros de aceitação para teste de conformidade do sistema apresentada por Bose em 2014, ICH, 2005 e,

recentemente, pela Resolução RDC nº 166, de 24/07/2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (BRASIL, 2017). Os resultados são considerados adequados quando o fator de retenção "k" é inferior a 2 e o número de pratos "N" é acima de 2000. Além disso, o desvio padrão relativo (DPR) menor que 2,0 % é aconselhável para a avaliação da área do pico e do tempo de retenção dos cromatogramas proveniente de dez injeções consecutivas.

Dentre os parâmetros de validação, a linearidade é avaliada estatisticamente pela análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA). Os testes estatísticos devem ser realizados com um nível de significância de 5%. O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero e o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. Além disso, a homocedasticidade dos dados deve ser investigada pela análise dos resíduos, e considera-se adequado resíduos homogêneos com desvio  $\leq 2$  % para inferir que o modelo é considerado adequado para utilização.

A seletividade é realizada submetendo o fármaco em análise à degradação forçada para verificar se há interferentes coeluinto no mesmo tempo de retenção do fármaco a ser quantificado. Para substâncias que eluem próximas umas às outras o resultado pode ser avaliado pela resolução entre os picos cromatográficos dessas substâncias. Se a resolução for abaixo de 1, infere-se que não há resolução / separação, e portanto os picos estão coeluinto; a resolução  $\geq 1$  é aceita e a resolução acima de 1,5 é considerada perfeita ou seja ambos os picos retornam à linha de base, o que indica que as substâncias encontram-se completamente separadas.

Os parâmetros de robustez e precisão são avaliados pelo DPR% dos teores obtidos entre os doseamentos em triplicata de ERTM SQR *versus* ERTM em pó liofilizado para solução injetável, sendo considerado adequado quando obtiver DPR%  $< 2$ . A exatidão é avaliada pelo teste de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, como determinado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002; BRASIL, 2017). O teor médio, obtido em três diferentes níveis de concentrações dentro do intervalo linear deve ser avaliado em triplicata e apresentar DPR%  $< 2$ .

### **3.10. Química verde**

A química verde é um tema atual que vem sendo muito discutido em diferentes áreas pela comunidade acadêmica, e mundialmente encorajada por pesquisadores e empresas com consciência ambiental. A química verde tem como finalidade reduzir e, se possível, eliminar o uso de substâncias tóxicas para proteger o meio ambiente e a saúde humana (ANASTAS, 1999). Esta é uma tendência que tem ganhado impulso e vem sendo rapidamente adotada também por

laboratórios e indústrias farmacêuticas que têm tentado se adequar para desenvolver métodos de análises farmacêuticas que reduzam o dano ambiental e os riscos operacionais para o analista (CUE; ZHANG, 2009; ZHANG; CUE, 2012; ROSCHANGAR; SHELDON; SENANAYAKE, 2015).

Técnicas analíticas que priorizem a sustentabilidade ambiental têm sido apresentadas na literatura como método ecoamigável, método ecológico, método analítico verde, métodos amigos do ambiente, método ambientalmente amigável (CONSORTTI; SALGADO, 2017; FIGUEIREDO; SALGADO, 2017; KOGAWA; SALGADO, 2017; RECHELO, et al., 2017; RODRIGUES; SALGADO, 2016; KOGAWA; MELLO; SALGADO, 2016; NATORI; TÓTOLI; SALGADO, 2016; ASSASSI et al., 2015; EL-HADY; ALBISHRI; RENGARAJAN, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2014a; TÓTOLI; SALGADO, 2014b).

Em 1998, Anastas e Warner apresentaram 12 princípios da Química Verde, desde então, estes princípios vêm sendo discutidos na literatura (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIÉSNIK, 2013; KOEL et al., 2011; KOEL; KALJURAND, 2006; LENARDÃO et al., 2003).

Os 12 princípios da química analítica verde segundo Galuszka, Migaszewski e Namiéński (2013) são:

1. As técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento de amostras;
2. O tamanho e a quantidade das amostras devem ser as menores possíveis;
3. As medidas *in situ* devem ser priorizadas;
4. Os processos e operações analíticas devem ser integrados para economizar energia e reduzir o uso de reagentes;
5. Os métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados;
6. A derivatizações devem ser evitadas;
7. A geração de grandes volumes de resíduos analíticos deve ser evitada e o correto destino destes resíduos deve ser providenciado;
8. Os métodos multi-analito ou multi-parâmetro são preferidos em relação aos métodos que analisam um analito por vez;
9. O uso de energia elétrica deve ser minimizado;
10. Os reagentes obtidos a partir de fontes renováveis devem ser preferidos;
11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do operador deve ser aumentada.



Dentre as inúmeras propostas de se otimizar os métodos analíticos, a mais cogitada é a possibilidade de se substituir o solvente orgânico utilizado por solventes menos tóxicos (PRAT; HAYLER; WELLS, 2014; PENA-PEREIRA; KLOSKOWSKI; NAMIEŚNIK, 2015; RAVIKIRAN; PRASAD; ANOOP, 2015; SHEN; CHEN; BEEK, 2015; WELTON, 2015).

A seleção de solventes ambientalmente amigáveis deve ser priorizada na escolha de solventes a serem usados no desenvolvimento de métodos analíticos. De acordo com a classificação The Center for Drug Evaluation and Research (CDER) e da Food and Drug Administration (FDA), 2012, os solventes de classe III têm o menor potencial tóxico e menor risco para a saúde humana. Por isso, devem ser selecionados em relação aos demais sempre que possível. Estes solventes são: ácido acético, heptano, acetona, acetato de isobutila, anisol, acetato de isopropila, 1-butanol, acetato de metila, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, acetato de butila, metiletilcetona, éter terc-butílico, metil-isobutilcetona, sulfóxido de dimetila, 2-metil-1-propanol, etanol, pentano, acetato de etila, 1-pentanol, éter etílico, 1-propanol, formiato de etila, 2-propanol, ácido fórmico e acetato de propila.

Em 2014, PRAT, HAYLER e WELLS, publicaram uma revisão, onde são comparados os guias de seleção de solventes até então disponíveis com o intuito de ajudar o analista a escolher os solventes mais sustentáveis. Uma padonização entre essas classificações ainda não está disponível.

Além da substituição, redução ou eliminação do uso de solventes orgânicos, as análises em nanoescala e miniaturização são incentivadas. Os métodos por espectrofotometria na região do infravermelho e na região UV, a eletroforese capilar, a cromatografia em fluido supercrítico e o ensaio microbiológico proposto neste trabalho já são métodos considerados naturalmente “verdes” uma vez que na maioria dos casos não há a necessidade de uso de solventes orgânicos. No entanto, a técnica analítica mais utilizada ainda hoje pela indústria farmacêutica, sem dúvida, é a cromatografia líquida de alta eficiência.

Diferentes maneiras de se otimizar os métodos cromatográficos têm sido sugeridas na literatura. A diminuição do diâmetro interno da coluna permite a redução de 90% do solvente utilizado sem perda da seletividade do cromatograma. Este efeito é ainda mais pronunciado quando se utiliza colunas capilares ou com dimensões nano, para as quais a vazão é de 0,1 a 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Outra opção seria diminuir o comprimento da coluna cromatográfica; quanto menor o comprimento da coluna, menor será o tempo de retenção, com isso se obtém análises mais rápidas com menor consumo de solvente. Entretanto, nesse caso observa-se uma perda de eficiência da coluna cromatográfica. Pode se ainda, diminuir o tamanho da partícula, neste caso se obtém uma drástica diminuição do tempo de retenção e portanto, diminuição do tempo de

análise e do volume de solvente, sem a perda de eficiência, no entanto, como consequência ocorre o aumento na pressão do sistema necessitando equipamento compatível (LANÇAS, 2009).

A adequada escolha da fase estacionária em relação ao analito também contribui para otimização do tempo de retenção e com isso, minimiza o tempo de análises e consumo de solvente necessário para a análise. Usar apenas água em elevadas temperaturas como fase móvel é um grande nicho no momento. Aumentando a temperatura da água ocorre a diminuição da constante dielétrica da água que permite seletividades únicas. O aumento na temperatura facilita a solubilização do analito na fase móvel reduzindo o tempo de retenção. Essa técnica tem sido empregada com sucesso, no entanto, deve ser feita com cautela uma vez que interfere na qualidade da fase estacionária se a mesma não for apropriada para uso em altas temperaturas (YANG et al., 2011; PEREIRA, et al., 2009; LANÇAS, 2009).

Estratégias para reciclar o solvente usado e/ou descontaminar os resíduos gerados no laboratório decorrente das técnicas analíticas também têm sido questão de investigação e aprimoramento (GARRIGUES; ARMENTA; GUARDIA, 2010; LANÇAS, 2009; NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006).

#### 4. ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO

**Nome de comercial:** INVANZ®

**Nome genérico:** Ertapenem sódico (CAS 153773-82-1)

**Nome químico:** sal monossódico do ácido [4R-[3(3S,5S),4 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\beta$ (R)]]-3-[[5-[[3-carboxifenil)amino]carbonil]-3-pirrolidinil]tio]-6-(1-hidroxi-etil)-4-metil-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0] hept-2-ene-2-carboxílico.

**Fórmula química:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>SNa

**Massa molecular:** 497,50 g mol<sup>-1</sup>

**Teor de sódio:** 48,3 mg/g

**Propriedades físico-químicas:** Apresenta-se na forma de pó branco a quase branco, higroscópico, pouco cristalino. É solúvel em água e em solução de cloreto de sódio a 0,9%, praticamente insolúvel em etanol e insolúvel em acetato de isopropila e tetraidrofurano (THF) (THE MERCK INDEX, 2013).

**Categoria:** Antimicrobiano

**Classe:** Carbapenêmico

**pKa:** O grau de ionização da molécula é fundamental para obtenção de resultados simétricos em técnicas analíticas. O pKa de ERTM pode ser verificado na plataforma *Chemicalize* disponível *online*, em que, os dois pKa mais fortes, ácido e básico são, respectivamente, apresentados 3,37 e 9,03. O pKa também foi calculado de forma empírica usando *software* ACD/Labs 6.0, que exibiu 7 valores de pKa para a molécula ERTM sendo estes 14,55 ± 0,70, 14,36 ± 0,20, 7,94 ± 0,60, 4,37 ± 0,60, 4,30 ± 0,70, 4,03 ± 0,10, 2,51 ± 0,40. Além disso, diferentes valores de pKa para ERTM são citados na literatura, estes valores foram previamente discutidos no item 3.6, que aborda a estabilidade do fármaco (NATISHAN et al., 2001; CROCKER, WANG, MCCAULEY, 2001; VAILAYA et al., 2005; DEMIRALAY et al., 2012; DEMIRALAY et al., 2013).

**Comercialização de ERTM no mundo:** O ERTM está disponível como INVANZ® (Merck) em vários países como: Alemanha, Argentina, Austrália, Áustria, Brasil, Canadá, Chile, Dinamarca, Espanha, Estados Unidos, Filipinas, Finlândia, França, Grécia, Hong Kong, Hungria, Irlanda, Israel, Itália, Malásia, Nova Zelândia, Polônia, Portugal, Reino Unido, Rússia, Singapura, Suécia, Tailândia e Venezuela (SWEETMAN, 2011).

**4.1. Substância Química de Referência (SQR)**

A substância de referência utilizada foi o padrão secundário com teor declarado de 99,2% (Lote nº EB004C1).

**4.2. Forma Farmacêutica**

Foram utilizadas amostras comerciais de ERTM, marca comercial INVANZ<sup>®</sup> na forma farmacêutica pó para solução injetável em frasco ampola contendo 1 g de substância ativa que contendo os adjuvantes hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio (Lote nº 2178140). A SQR e a forma farmacêutica foram gentilmente cedidas pelo laboratório Merck Sharp & Dohme do Brasil (Campinas-SP).

## **5. ANÁLISE QUALITATIVA**

A caracterização de substâncias ativas pelo controle de qualidade é indispensável para obtenção de medicamentos eficazes e estáveis, garantindo o seu conteúdo nas especialidades farmacêuticas e a sua conservação durante todo o período em que é comercializado. Neste trabalho as características físicas do fármaco, a sua solubilidade, ponto de fusão e pH foram avaliados; métodos qualitativos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta, espectrofotometria no infravermelho e técnicas cromatográficas foram utilizados para análise e identificação de ERTM pó liofilizado para solução injetável.

### **5.1. Características físicas**

O ERTM pó liofilizado para solução injetável, descrito no item 4.2., foi avaliado visualmente em relação ao aspecto, cor, odor e por microscopia óptica para verificar a cristalinidade da partícula.

#### **5.1.1. Material**

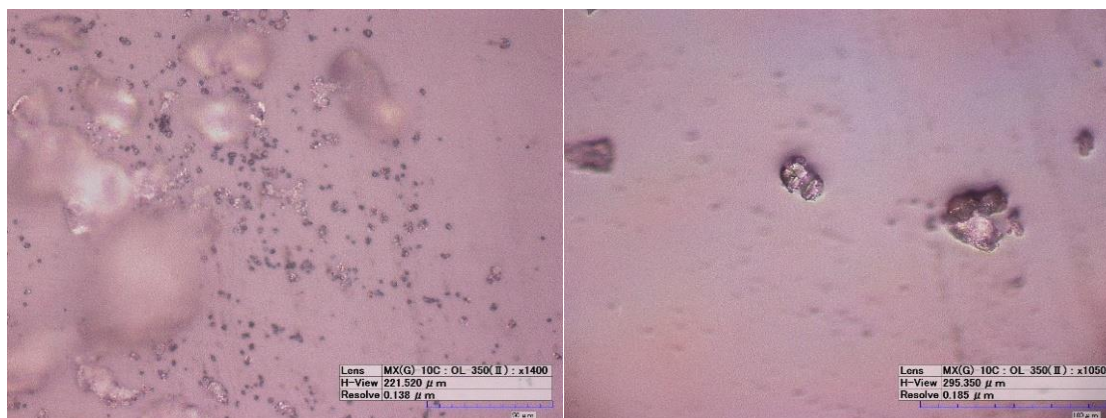
Para avaliar a cristalinidade da partícula foi usado Microscópio Hirox<sup>®</sup> modelo KH-7700.

#### **5.1.2. Método**

Uma porção do pó liofilizado de ERTM para solução injetável descrito no item 4.2. foi distribuída em um vidro de relógio e analisada quanto a cor e odor. Para análise microscópica, uma pequena alíquota desta porção foi colocada em uma lâmina de vidro, a qual foi coberta com uma lamínula e foi inserida no microscópio para visualização. O aumento de 1.050 e 1.400 vezes foram usados para a análise.

#### **5.1.3. Resultados e discussão**

O ERTM apresentou-se sob a forma de pó branco e inodoro. A microscopia óptica, embora seja uma técnica simples, permite avaliar os aspectos morfológicos bem como o tamanho de partícula e caracterizar os sólidos em amorfos ou cristalinos. A avaliação microscópica das partículas (Figura 5) demonstra que o ERTM apresenta refração indicando traços de cristalinidade, e, portanto, é caracterizada como forma pouca cristalina. As descrições estão de acordo com a citada pelo fabricante e descritas na bula.

**Figura 5-** Microscopia óptica de ERTM substância química de referência.

## 5.2. Determinação de solubilidade

Embora o teste de solubilidade não possa ser tomado no sentido estrito de constante física, complementa e corrobora com os demais ensaios, sendo preditivo na determinação da melhor solubilidade para testes quantitativos, podendo ter um valor definitivo caso a substância não apresente a solubilidade mínima exigida, principalmente, no solvente água (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### 5.2.1. Material

Todas as determinações foram realizadas em tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, com auxílio de micropipeta e agitador Phoenix modelo AT 56. Os solventes utilizados foram acetonitrila (J.T Baker), água purificada (Milli-Q®), etanol PA (Cinética) e metanol PA (Synth). O solvente acetonitrila foi grau CLAE e os demais solventes foram de grau analítico.

### 5.2.2. Método

Foram transferidos 10 mg de ERTM pó liofilizado para solução injetável descrito no item 4.2. para os tubos de ensaios, aos quais foram adicionadas alíquotas crescentes de solvente sob agitação em agitador Phoenix modelo AT 56, para observação quanto à dissolução do produto. O ensaio de solubilidade foi realizado a 25 °C. A solubilidade encontrada é designada por termos descritivos, conforme o preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010), e os seus significados estão relacionados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Termos descritivos no teste de solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira

<b>Termo descritivo</b>	<b>Solvente</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

**Fonte:** FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

### 5.2.3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos foram apresentados segundo os termos descritivos disponíveis na Farmacopeia Brasileira (2010); a expressão partes refere-se à dissolução de 1 g do soluto em 1 mL do solvente. A fim de minimizar o consumo de amostra e solventes, as quantidades utilizadas neste teste foram adequadas proporcionalmente para 10 mg de soluto. Os resultados obtidos no teste de solubilidade para ERTM pó para solução injetável em diferentes solventes encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5**- Solubilidade de ERTM pó para solução injetável em diferentes solventes a 25 °C

<b>Solventes</b>	<b>Termo descritivo</b>
Acetonitrila	Praticamente insolúvel
Água Purificada	Facilmente solúvel
Etanol	Praticamente insolúvel
Metanol	Solúvel

A solubilidade é um método qualitativo que caracteriza a amostra de acordo com a sua polaridade, sendo útil na identificação e pureza dos fármacos. Este parâmetro também é necessário para a determinação dos solventes a serem utilizados nos testes quantitativos. De acordo com os parâmetros avaliados, a amostra de ERTM pó liofilizado para solução injetável apresenta-se facilmente solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol; esses resultados são condizentes com The Merck Index (2013) usado como referência por não dispor de monografia em compêndios farmacopeicos até o momento. O ERTM foi solúvel em metanol e praticamente insolúvel em acetonitrila. Estes solventes foram escolhidos por serem os solventes de escolha para o desenvolvimento dos métodos quantitativos e esses resultados devem ser considerados na escolha dos solventes a serem usados como fase móvel e para a solubilização da amostra no desenvolvimento dos métodos para que não haja problemas de precipitação da

amostra. Portanto, o fármaco mostrou ser facilmente solúvel em água, solvente escolhido sempre que possível para o uso nos testes quantitativos a serem realizados.

### **5.3. Determinação de umidade**

Considerando que muitas substâncias farmacopeicas encontram-se na forma hidratada ou com água absorvida, os métodos de determinação de umidade são de alta relevância. O método de perda por dessecação é usualmente realizado para verificar a quantidade de substância volátil presente na amostra.

#### **5.3.1. Material**

O teor de umidade da amostra de ERTM descrito no item 4.2. foi analisado pela técnica de perda por dessecação realizado em analisador de umidade por infravermelho, modelo IV-2000 (Gehaka<sup>®</sup>, SP, Brasil), que se trata de uma balança com aquecimento por radiação infravermelha, que permite avaliar a umidade da amostra.

#### **5.3.2. Método**

A determinação de substâncias voláteis da amostra de ERTM em pó liofilizado para solução injetável (descrita no item 4.2) foi realizada de acordo com a técnica para determinação da perda por dessecação utilizando balança por infravermelho, preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010). O método de dessecação em analisador de umidade por infravermelho consiste em dessecar o fármaco até peso constante, em temperatura apropriada, durante o tempo necessário. Neste ensaio, o conteúdo de um frasco de ERTM pó para solução injetável foi pesado e registrado. Foi transferido na sequência para o equipamento, onde permaneceu por 1 min a 105 °C, o teor de umidade foi calculado automaticamente pelo equipamento. A análise foi realizada em triplicata e as determinações foram conduzidas de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010).

#### **5.3.3. Resultados e discussão**

Os resultados encontrados para os métodos de determinação de umidade são apresentados na Tabela 6.



**Tabela 6** - Umidade de ERTM pó para solução injetável determinado em analisador de umidade por infravermelho

<b>Ensaio</b>	<b>Teor de umidade (%)</b>
1	1,90
2	1,80
3	2,00
<b>Média</b>	1,90
<b>DP<sup>a</sup></b>	0,10
<b>EPM<sup>b</sup></b>	0,05

<sup>a</sup>DP= Desvio padrão; <sup>b</sup>EPM= Erro Padrão da Média

O teor de umidade obtido por analisador de umidade por infravermelho foi de 1,90%, sendo considerado adequado. Dentre os métodos existentes para se avaliar umidade, o método determinação da perda por dessecação usando balança por infravermelho foi escolhido por ser um método simples, prático, rápido quando comparado ao tradicional método gravimétrico e não tem as limitações do método de Karl Fischer, que além de ser aplicado apenas para a determinação de água o método limita-se aos casos em que a amostra a ser analisada não reaja com os componentes do reagente de Karl Fischer ou com o iodeto de hidrogênio formando água durante a reação. O método escolhido por analisador de umidade por infravermelho é capaz de detectar substâncias voláteis, além de não gerar resíduos a serem descartados.

É interessante lembrar que cada molécula de água possui massa molar equivalente a 18,015 g/mol, portanto a umidade excessiva pode interferir na pesagem da quantidade exata de fármaco, levando a resultados duvidosos de teor ou potência, em análises quantitativas. Altos teores de umidade também podem indicar má conservação das matérias-primas propiciando a deterioração dos produtos. Com isso, a determinação de umidade é útil para se estabelecer o tempo de dessecação ao qual a amostra deve ser previamente submetida às análises quantitativas, sendo um ensaio de extrema importância para a obtenção de pesagem precisa e resultados confiáveis.

#### **5.4. Determinação do ponto de fusão**

A faixa de fusão de uma substância é o intervalo de temperatura compreendido desde o início da fluidificação da substância ao término da fusão, que é evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida, enquanto que o ponto de fusão é a temperatura na qual uma substância se encontra completamente fundida (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A determinação do ponto de fusão é um método simples, econômico e rápido, frequentemente empregado na caracterização de uma substância, sendo ainda um importante

indicativo de pureza, quando comparado com padrões de referência, pois uma pequena quantidade de impureza pode causar diminuição do ponto de fusão ou alargar a faixa de fusão de uma determinada substância.

#### 5.4.1. Material

Foram utilizados tubos capilares com 1,6 mm de espessura e 7,5 cm de comprimento e equipamento automático Stuart Scientific SMP3 - Staffordshire, UK.

#### 5.4.2. Método

O ponto de fusão foi determinado pelo método do capilar. Após dessecar o ERTM SQR por 1 hora a 105 °C, uma porção do pó foi introduzida e compactada em tubos capilares, de modo a formar coluna de aproximadamente 3 a 4 cm de altura. Os capilares foram inseridos verticalmente no equipamento automático, utilizando-se taxa de aquecimento de 1,0 °C por minuto, prosseguindo até 10,0 °C após a completa fusão do fármaco.

#### 5.4.3. Resultados e discussão

Para a realização do ponto de fusão, foram utilizadas amostras de ERTM pó liofilizado para solução injetável, descrito no item 4.2., submetidas a três ensaios efetuados em diferentes dias, cada ensaio é determinado em triplicata simultaneamente. O mesmo procedimento foi realizado para ERTM SQR (item 4.1.), a fim de comparar os resultados. O ponto de fusão foi observado visualmente e os resultados obtidos estão apresentados da Tabela 7.

**Tabela 7** - Valores do ponto de fusão obtidos para ERTM amostra e SQR

<b>Ensaio</b>	<b>SQR (°C)</b>	<b>ERTM (°C)</b>
1	233,00	247,80
2	234,00	248,10
3	233,70	248,00
<b>Média</b>	233,50	247,97
<b>DPR<sup>b</sup></b>	0,30	0,06

<sup>a</sup>DP= Desvio Padrão; <sup>b</sup>DPR= Desvio Padrão Relativo.

O ERTM SQR apresentou início de degradação, visualizada em 232 °C pela alteração de cor das amostras, aumentando progressivamente de intensidade até sua completa carbonização, de branco a amarelo-alaranjado-marrom-preto e fundiu em torno de 234 °C (Figura 6). No entanto, a fusão das amostras de ERTM em pó liofilizado para solução injetável foi evidenciada em aproximadamente 15 °C acima em relação à SQR. Acredita-se que esta

alteração é decorrente dos adjuvantes contidos na amostra em pó liofilizado para solução injetável, bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio com ponto de fusão de 270 °C e 318 °C, respectivamente, segundo o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 6 edição (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

**Figura 6** - Capilares contendo ERTM SQR (a) e ERTM forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável (b), antes e depois da fusão.



Até o presente momento não há monografia para o ERTM em compêndios oficiais. Laudos de análises de fornecedores como Toronto Research Chemicals, com sede em Toronto, Canadá, indicam que o ponto de fusão para o fármaco em estudo é de < 222 °C. Enquanto que seus cadastros em *sites* como “Chemical Book”, por distribuidores chineses deste produto, no site Health & Medical e no laudo de análise do fornecedor USBiological Life Sciences indicam que o ponto de fusão para ERTM é de 230-234 °C.

### 5.5. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica usualmente empregada na indústria farmacêutica para acompanhamento de reações orgânicas, identificação de fármacos e determinação de impurezas, e de produtos de degradação. Além disso, a CCD vem sendo empregada como uma técnica semiquantitativa (ROY et al., 1997; DURÓN et al., 2008; GANDHI et al., 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2014) e quantitativa (STAREK; KRZEK, 2010; PHATTANAWASIN et al., 2011; STAREK; LASKAWSKI; DABROWSKA, 2011). O método trata-se de uma técnica de adsorção líquido-sólido, que consiste na separação simultânea de substâncias através da migração de substâncias por afinidade à fase estacionária. Suas vantagens consistem em ser um método simples, rápido, visual e econômico (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

### 5.5.1. Material

As placas utilizadas para identificação do fármaco foram cromato folhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Sorbent Technologies<sup>®</sup>, Geórgia, EUA) adquiridas comercialmente. Para o preparo das diferentes fases móveis testadas, foram usados os seguintes solventes: acetona (Qhemis<sup>®</sup>), acetonitrila (J.T. Baker<sup>®</sup>), ácido acético (Qhemis<sup>®</sup>), água purificada (Milli-Q<sup>®</sup>), etanol (Synth), metanol (Synth<sup>®</sup>) e *n*-butanol (Synth<sup>®</sup>). O placebo foi constituído de bicarbonato de sódio P.A. (Synth<sup>®</sup>) e hidróxido de sódio P.A. (Vetec<sup>®</sup>). Para as análises dos produtos de degradação foi necessário o preparo de soluções de hidróxido de sódio 0,01 M (Vetec<sup>®</sup>), ácido clorídrico 0,01 M (Qhemis<sup>®</sup>) e peróxido de hidrogênio 3% (Vetec<sup>®</sup>). A SQR e as amostras de pó liofilizado para solução injetável utilizadas foram descritas nos itens 4.1. e 4.2., respectivamente. As pesagens dessas substâncias foram realizadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo<sup>®</sup>, Suíça).

### 5.5.2. Método

A fase móvel foi preparada e transferida para cuba cromatográfica de vidro (Desaga Heidelberg, Alemanha), onde permaneceu por 30 minutos até sua saturação. Para o preparo das soluções a serem impregnadas nas placas de sílica, pesou-se 5 mg de SQR e transferiu-se para balões volumétricos de 5 mL; o volume foi completado com água purificada (Milli-Q<sup>®</sup>), obtendo solução de 1 mg mL<sup>-1</sup>. O mesmo procedimento foi realizado para ERTM pó liofilizado para solução injetável. Estas soluções também foram utilizadas para análise de eventual degradação em condições neutra e fotolítica (UVC<sub>254</sub> nm). Nas soluções de estresse alcalino, ácido e oxidativo, ao invés de água purificada, o volume foi completado com soluções de NaOH 0,01 M, HCl 0,01 M e peróxido de hidrogênio 3%, respectivamente, e permaneceram em banho de aquecimento a 60 °C. Todos os solventes utilizados para eluição da amostra foram solventes de grau analítico.

Alíquotas de 10 µL de cada solução foram aplicadas em placas de sílica com dimensões de 10,0 x 10,0 cm previamente ativadas em estufa a 105 °C por 1 hora. Estas placas foram inseridas individualmente em cuba cromatográfica com a fase móvel, onde permaneceram até a eluição das substâncias por 8 cm. Em seguida, a placa foi retirada e, após a evaporação do solvente, as manchas foram visualizadas por fluorescência em câmara com luz UVC<sub>254</sub> nm, posteriormente foram reveladas em vapores de iodo (Synth<sup>®</sup>, SP, Brasil). As soluções submetidas a estresse foram observadas de tempos em tempos por um período de 72 horas. Realizou-se a comparação das manchas ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável, quanto ao tamanho, forma, posição e valores de R<sub>f</sub> calculados.

Os seguintes sistemas de fases móveis foram testados:

Sistema 1: *n*-butanol: ácido acético 99,7%: água (4:2:4) v/v/v

Sistema 2: *n*-butanol: água: acetona (4:3:3) v/v/v

Sistema 3: ácido acético 99,7%: água: metanol (1:2:7) v/v

Sistema 4: água: metanol (3:7) v/v

Sistema 5: água: metanol (2:8) v/v

Sistema 6: água: metanol (1:9) v/v

Sistema 7: metanol

Sistema 8: água: etanol (3:7) v/v

Sistema 9: ácido acético 99,7%: água: etanol (1:2:7) v/v

Sistema 10: ácido acético 99,7%: água: etanol (2:1:7) v/v

Sistema 11: água: etanol (2:8) v/v

Sistema 12: água: etanol (1:9) v/v

Sistema 13: etanol

### 5.5.3. Resultados e discussão

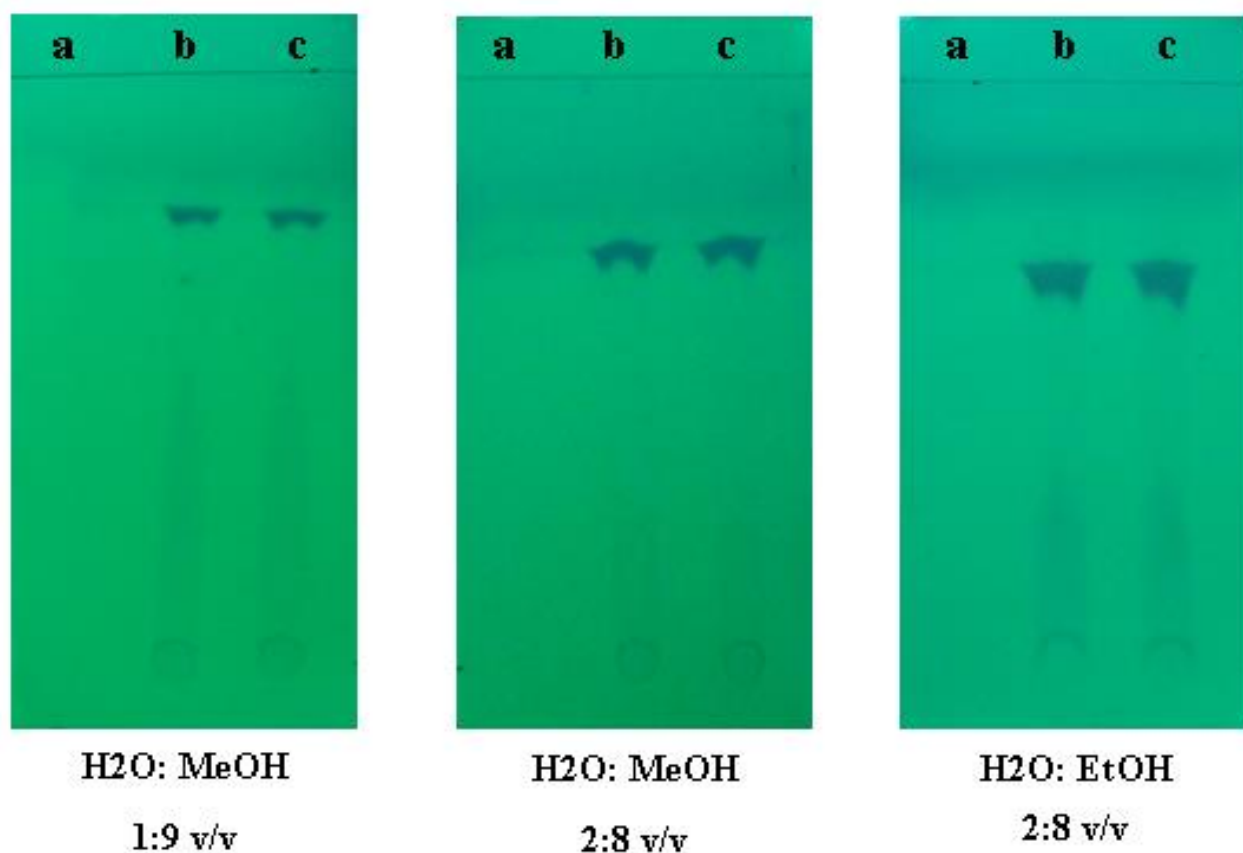
A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta na caracterização de muitas moléculas farmacêuticas, por ser de fácil execução e baixo custo. Considerando que os compêndios oficiais ainda não descrevem técnicas de análise para ERTM (EP, 2010; FP, 2005; BP, 2010; FB, 2010; USP 38, 2015), buscou-se na literatura estudos que descrevessem técnicas de CCD para ERTM ou produtos relacionados e foi verificado que há poucos estudos neste seguimento. Em 2003, Mendez desenvolveu uma técnica de análise por CCD para meropenem, a qual utilizou como fase móvel *n*-butanol: ácido acético: água (4:2:4) v/v/v (sistema 1). Esta fase móvel foi testada para ertapenem já que os fármacos apresentam similaridades estruturais. A fase móvel mostrou ser adequada com  $R_f$  de 0,69 e é capaz de separar o fármaco do meropenem, que apresenta  $R_f$  0,39, mas a elevada concentração de água ocasiona lentidão na análise.

Apenas um trabalho descrevendo o método de CCD para ERTM foi encontrado na literatura (ABDEL-MOETY et al., 2010). Trata-se de um sistema de eluição substância por *n*-butanol: água: acetona (4:3:3) v/v/v (sistema 2). O  $R_f$  de ERTM foi 0,58 e o produto de degradação (molécula de ERTM com o anel  $\beta$ -lactâmico aberto) foi 0,39. No entanto, essa fase móvel proporciona um tempo de análise demasiadamente longo, em torno de 1 hora de corrida e o solvente acetona tem suas limitações de aquisição, uma vez que, a venda deste solvente é controlada pela polícia federal por ser utilizada em uma das etapas do refino da cocaína.

Portanto, proporções de água/metanol e água/etanol foram testadas almejando o desenvolvimento de método simples e economicamente viável.

O sistema 3 (ácido acético: água: metanol (1:2:7) v/v/v) apresentou mancha nítida e uniforme, contudo, o eluente tem alta polaridade, ficando pouco retido na fase estacionária, o  $R_f$  foi de 0,84. As manchas referentes ao sistema 4 (água: metanol (3:7) v/v) não apresentaram nitidez adequada. Dentre os sistemas testados, os que se destacaram foram os sistemas 5, 6 constituídos de água: metanol e o sistema 11 constituído de água: etanol. O ERTM apresentou  $R_f$  0,76 no sistema 5 e tempo de eluição foi de 20 minutos, proporcionando uma análise prática e rápida e o sistema 6 apresentou resultado igualmente satisfatório com  $R_f$  0,70. Os sistemas 5, 6 e 11 estão representados na Figura 7, em fotografias dos cromatogramas comparando o placebo (bicarbonato e hidróxido de sódio), SQR e a amostra de ERTM em pó liofilizado para solução injetável respectivamente, visualizados em luz UVC<sub>254</sub> nm.

**Figura 7** - Cromatogramas de placebo (a) ERTM SQR (b) e ERTM pó liofilizado para solução injetável (c), nos sistemas 5, 6 e 11 visualizados em luz UVC<sub>254</sub> nm.

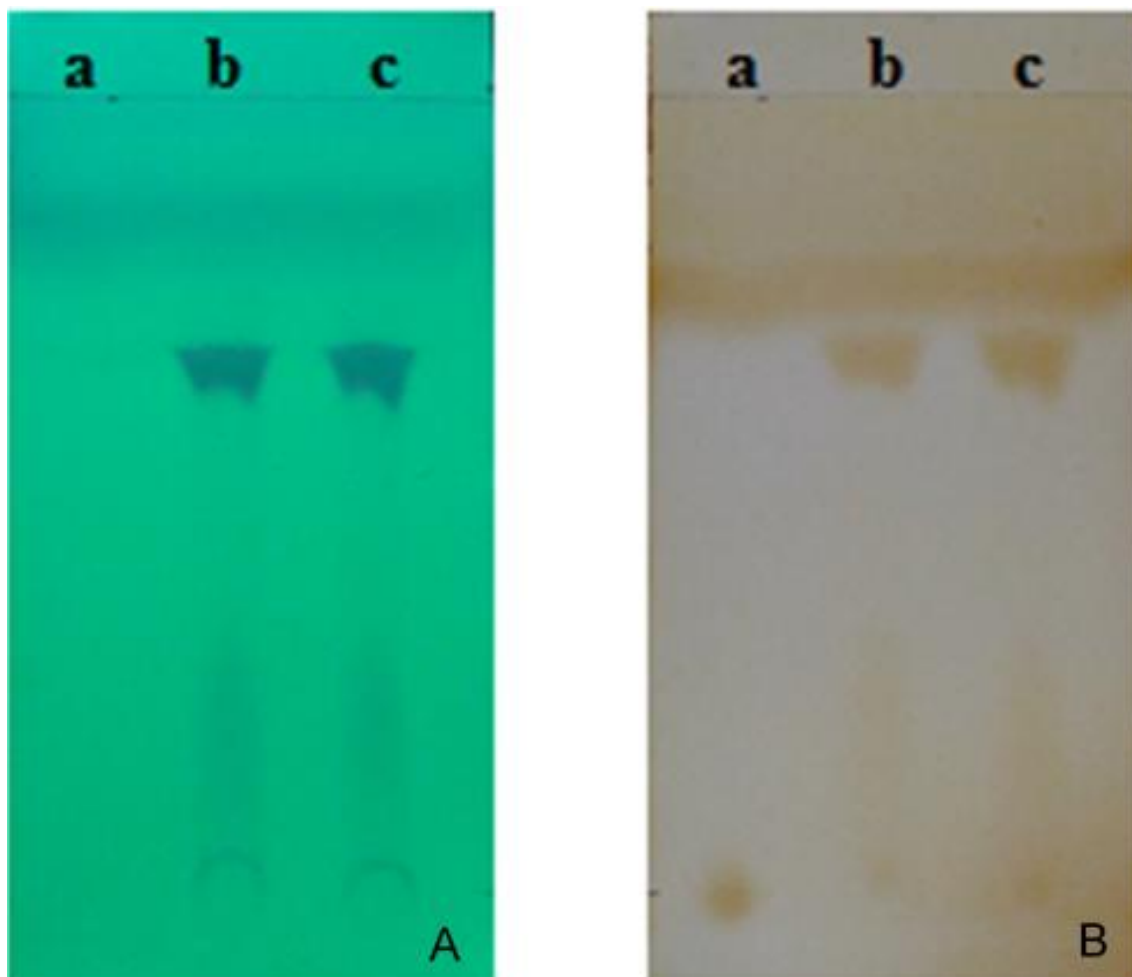


O sistema 7 (metanol) apresentou  $R_f$  0,55 e manchas no formato de uma semicircunferência. O sistema 8 (água: etanol (3:7) v/v) apresentou rastro; para solucionar o problema, o sistema 9 proposto, ácido acético: água: etanol (1:2:7) v/v, obteve  $R_f$  de 0,72, mas ainda assim houve a presença de rastro decorrente da ionização da molécula. Por isso, no sistema 10 (ácido acético: água: etanol (2:1:7) v/v) a quantidade de ácido acético foi aumentada. No entanto, mesmo sendo o ácido acético um ácido fraco, a molécula do ertapenem foi instável e se degradou gerando duas manchas na placa de sílica. O sistema 12 (água: etanol (1:9) v/v) não obteve resultados satisfatórios por não apresentar manchas bem definidas e reprodutivas, enquanto que o sistema 13 (etanol) apenas um rastro foi visualizado.

Embora os sistemas 5 e 6 tenham apresentado resultados adequados, a fase móvel escolhida foi a do sistema 11, constituído de água: etanol (2:8) v/v, com  $R_f$  0,66 e o tempo de eluição de 1 hora. Apesar do tempo de eluição ser um pouco maior em relação ao sistema 5, ocasionado pelo aumento da proporção de água na fase móvel, o sistema 11 apresentou a vantagem de ter como solvente etanol, e, portanto, não necessitar de tratamento de resíduos, propiciando economia para a indústria farmacêutica e benefícios ao meio ambiente.

Uma vez escolhida a fase móvel, a análise foi realizada em triplicata e os resultados apresentaram-se reprodutíveis. A mancha apresentada para a forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável apresentou as mesmas características da mancha correspondente a SQR permitindo, assim, a identificação do fármaco. A análise indicou pureza, uma vez que pontos adicionais não foram verificados. Os adjuvantes contidos no fármaco foram testados como placebo e para este, nenhuma mancha foi visualizada indicando não interferir nas análises. A placa foi visualizada em luz UVC<sub>254</sub> nm. Como alternativa de revelação, pode-se ainda expor a placa a vapores de iodo para a visualização. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

**Figura 8-** Cromatogramas de placebo (a) ,ERTM SQR (b) e ERTM pó liofilizado para solução injetável (c), em fase móvel água: etanol (2:8) v/v, (sistema 11) visualizados em luz UVC<sub>254</sub> nm (A) e revelada em vapores de iodo (B). Fase estacionária: Silica gel 60 F254.

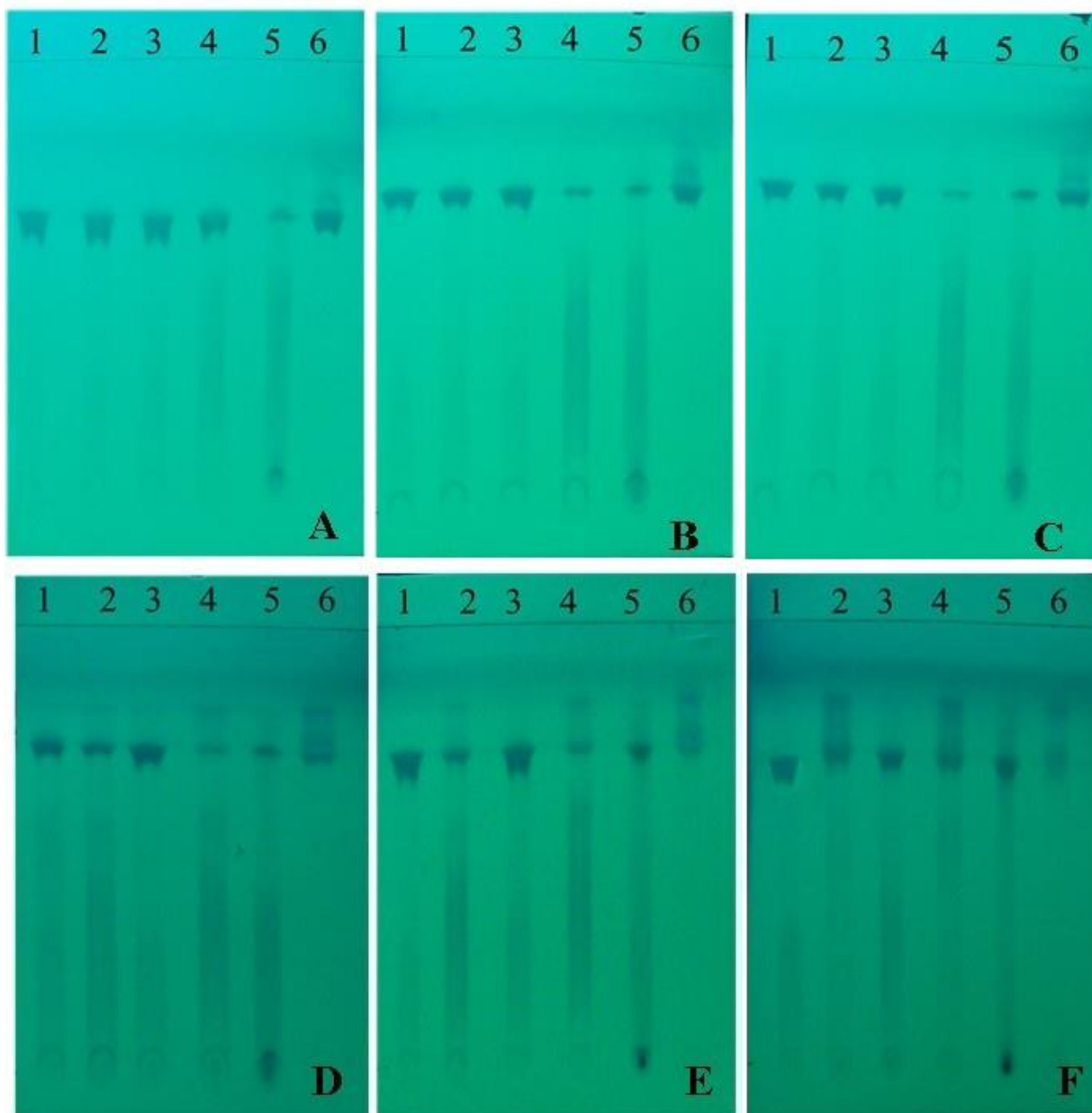


Um estudo indicativo de estabilidade por cromatografia em camada delgada foi realizado com a fase móvel escolhida. Neste estudo, o fármaco foi submetido a condições de estresse para verificar se o método é capaz de separar as impurezas geradas com a degradação da molécula.

Na Figura 9, são apresentadas as fotografias dos cromatogramas de ERTM pó liofilizado para solução injetável intacto e submetido a estresse em solução neutra, fotolítica, alcalina, ácida e oxidativa, utilizando o sistema 11 como fase móvel água: etanol (2: 8) v/v, visualizados em luz ultravioleta.



**Figura 9-** Cromatograma de ERTM pó liofilizado para solução injetável sem degradar (1) e em solução: neutra a 60 °C (2), fotolítica em temperatura ambiente  $\pm$  25 °C (3) alcalina (4), ácida (5), e oxidativa (6) a 60 °C, utilizando fase móvel água: etanol (2:8) *v/v*, e revelados em câmara com luz UVC<sub>254</sub> nm, logo após o preparo (A), após degradação de 1 h (B), 3 h (C), 12 h (D), 24 h (E) e 72 h (F)



O sistema proposto com fase móvel água: etanol (2: 8) *v/v* demonstrou ser adequado para a realização do estudo de estabilidade. O método foi conduzido sob condições de estresse, no qual o fármaco foi submetido à exposição fotolítica em temperatura ambiente e à hidrólise ácida, alcalina, neutra e oxidativa, em temperatura de 60 °C. Em situações de estresse oxidativo, as manchas referentes a produtos de degradação apareceram imediatamente após o preparo.

Para as condições de estresse de hidrólise ácida, alcalina e neutra, pontos adicionais foram observados durante o período analisado. O maior número de manchas visualizadas ocorreu nas amostras submetidas a condições de estresse ácida, alcalina e neutra, respectivamente. Nas condições fotolíticas não houve formação de manchas adicionais no período observado (72 horas). O estudo indicou a capacidade do método proposto em detectar a formação de produtos de degradação evidenciada pela visualização de manchas adicionais geradas sob as condições de estresse.

O método desenvolvido mostrou ser adequado para identificar ERTM na forma farmacêutica, contribuindo para melhorar o controle de qualidade deste produto, com as vantagens de ser um método simples, utilizar fase móvel de fácil preparo e de fácil descarte que não prejudica o meio ambiente. Os resultados encontrados indicam que o ERTM é facilmente identificável, apresentando mancha característica e intensa de coloração roxa, em câmara de UVC<sub>254</sub> nm e marrom em vapores de iodo, nos sistemas testados.

### **5.6. Espectrofotometria na região de infravermelho**

A espectrofotometria na região do infravermelho (IV) é uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa e é de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas. Além disto, vem sendo amplamente utilizada em linhas de produção e no controle de processos industriais. Possui vantagens como a redução no tempo de análise, diminuição nas quantidades de amostra e identificação ou caracterização de estruturas complexas (LOPE; FASCIO, 2004).

Os equipamentos destinados ao registro de espectros na região do infravermelho consistem em uma fonte luminosa apropriada, um monocromador e um detector. O espectro é geralmente apresentado em função da transparência, isto é, a relação entre a intensidade da radiação transmitida e a intensidade da radiação incidente. Pode igualmente ser apresentado em função da absorvância, que é definida como sendo o logaritmo decimal do inverso da transparência (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2010).

Informações químicas e físicas, de característica qualitativa e quantitativa, também podem ser obtidas a partir dos espectros no infravermelho próximo, região de 13300 a 4000 cm<sup>-1</sup>, que são caracterizados pela absorção da radiação por sobretons e combinação de modos vibracionais fundamentais de ligações como C-H, N-H, O-H e S-H (SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2007). Em 2008, Elizarova, Shtyleva, Pleteneva sugeriram um método de identificação de medicamentos baseado nesta região espectral que foi introduzido na farmacopeia russa.

No mesmo ano, Zhang, Feng e Hu descreveram um método para a determinação do teor de umidade em  $\beta$ -lactâmicos também fundamentado nos espectros de infravermelho próximo, porém a comparação direta entre o espectro da amostra e da substância química de referência nesta região não é recomendada, já a espectrofotometria no infravermelho médio (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) é considerada um ensaio de identificação por excelência, sendo capaz de diferenciar substâncias com pequenas diferenças estruturais e, portanto, é a mais empregada para fins de identificação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### **5.6.1. Material**

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu® (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , com intervalos de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Para a obtenção dos espectros, foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio de grau analítico da marca Synth® (São Paulo, Brasil). Antes de sua utilização, o KBr foi dessecado a 105 °C em estufa modelo 702.780 (Quimis®, SP, Brasil). A SQR e as amostras utilizadas foram descritas nos itens 4.1. e 4.2.

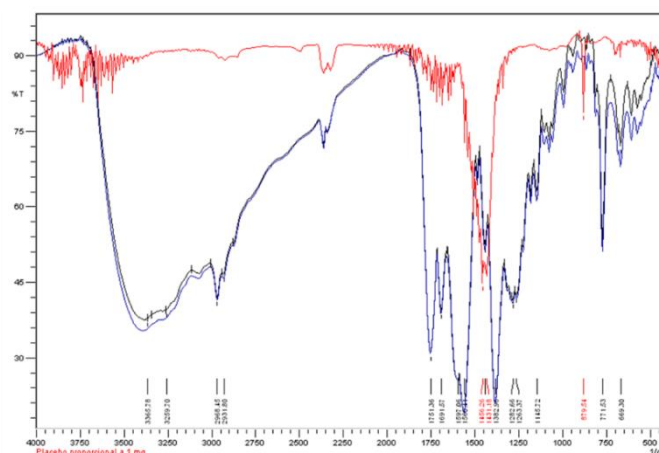
### **5.6.2. Método**

A massa equivalente a 1 mg de ERTM SQR (100 mg da diluição 1:100 em KBr) previamente dessecada por 1 h a 105 °C, foi pesada e triturada em gral de ágata, junto KBr dessecado e pulverizado para confecção de pastilhas de 200 mg (0,5% de ERTM). Essa massa foi acondicionada em moldes especiais e posteriormente prensados a vácuo sob pressão de 80.000 kN formando discos transparentes. O mesmo procedimento foi conduzido para ERTM pó liofilizado para solução injetável. A leitura foi realizada em transmitância e o espectro foi obtido com auxílio do *software IR Solution*.

### **5.6.3. Resultados e discussão**

A análise qualitativa foi realizada pela comparação do espectro de absorção na região do infravermelho de ERTM SQR *versus* ERTM pó liofilizado para solução injetável. O espectro de ERTM pó liofilizado para solução injetável apresentou característica condizente com o espectro de ERTM SQR e os adjuvantes (placebo) não interferiram na região de análise quantitativa (Figuras 10).

**Figura 10** - Espectros na região de infravermelho sobrepostos ERTM SQR (preto), ERTM em pó liofilizado para solução injetável (azul) e placebo (vermelho) em pastilhas de KBr



Os espectros de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentaram bandas de absorção características de substâncias  $\beta$ -lactâmicos, como apresentado na Tabela 8 e estão de acordo com o núcleo carbapenêmico.

**Tabela 8**- Faixas de frequências e grupamentos correspondentes das bandas observadas nos espectros de infravermelho de ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável

Frequência Visualizada (cm <sup>-1</sup> )	Frequência Referência(cm <sup>-1</sup> )*	Grupamentos responsáveis
3365	3500-3300	Estiramento do grupamento N-H pirrolidinil
3259		Hidroxila alcoólica
	3100-3000	Estiramento do grupamento -C=N
2968, 2931	3000-2850	Estiramento do grupamento -C-H
1751	1760-1700	Estiramento do grupamento C=O carbonila de ácido carboxílico
1691	1680-1630	Estiramento do grupamento amida C=O
	1600-1400	Estiramento do grupamento carboxilato COO <sup>-</sup>
1263, 1282, 1382	1350-1000	Estiramento do grupamento C-N
1558	1640 – 1550	Estiramento do grupamento N-H de amida secundária

\* PAVIA et al., 2010

A espectrofotometria no IV é um método de identificação de excelência no controle de qualidade de fármacos, considerada por muitos autores como uma espécie de “impressão digital” da substância, podendo ser usado na identificação de substâncias por comparação ao espectro de referência. Os espectros de absorção de ERTM SQR e ERTM em pó liofilizado para solução injetável na região infravermelho em pastilhas de KBr foram sobrepostos e indicaram similaridade, identificando assim a substância. Os adjuvantes bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio foram avaliados juntos e separadamente e verificou que o bicarbonato de

sódio apresentou bandas insignificantes que se misturam aos ruídos, enquanto que o hidróxido de sódio apresenta uma banda de absorção forte em aproximadamente  $1440\text{ cm}^{-1}$ , no entanto o placebo constituído de ambos os adjuvantes não interferiu na análise.

Os espectros de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentaram bandas características de substâncias  $\beta$ -lactâmicos, como as bandas de estiramento do grupamento N-H pirrolidinil, que foram demonstradas próximas a  $3365\text{ cm}^{-1}$ ; em  $2968$  e  $2931\text{ cm}^{-1}$  apresentam-se as bandas de estiramento do grupamento  $=\text{C-H}$ , enquanto que em  $1751\text{ cm}^{-1}$  aparecem as bandas de estiramento do grupamento carbonila de ácido carboxílico; em torno de  $1691\text{ cm}^{-1}$  encontram-se as bandas de estiramento do grupamento  $\text{C=O}$  que corresponde à carbonila da amida e em  $1440, 1500, 1560, 1597\text{ cm}^{-1}$  encontram-se as bandas de estiramento do grupamento  $\text{C=C}$  de aromático. Sugere-se ainda que as bandas apresentadas em  $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento do grupamento carboxilato ( $\text{COO}^-$ ). As bandas presentes em  $1263, 1282$  e  $1382\text{ cm}^{-1}$  representam os estiramentos do grupamento  $\text{C-N}$ , enquanto as bandas  $1558\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento do grupamento N-H de amida secundária.

Os espectros obtidos para ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável (Figura 10), apresentam as mesmas bandas de absorção características, confirmando o propósito desta técnica na identificação da molécula por comparação com a SQR. Além disso, foram comparados aos espectros do placebo, constituído de adjuvantes hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio, os quais não interferiram nas análises. A técnica de espectrofotometria na região do infravermelho permite correlacionar os picos apresentados nos espectros para, desta forma, caracterizar a substância em análise. Apresenta ótimas evidências de identidade de uma estrutura, sendo prático, rápido e seletivo, com a vantagem de necessitar de pequenas quantidades de amostra, ter um viável custo benefício (referente à instrumentação), ampliar a capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, além de não haver manuseio de materiais tóxicos de não gerar resíduos de solventes orgânicos.

### **5.7. Espectrofotometria na região do ultravioleta**

Espectros de absorção no ultravioleta são empregados como prova de identificação, por comparação do perfil espectral, em que as leituras da SQR e amostra são efetuadas simultaneamente e em condições idênticas quanto ao comprimento de onda, tamanho de cubeta, etc. Espectrofotômetros utilizados na região do ultravioleta são dotados, fundamentalmente, de fonte de radiação, seletor de comprimento de onda, celas de absorção de quartzo (cubetas) para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática, detector de radiação e uma

unidade de leitura e de processamento de sinal. A fonte de radiação pode ser lâmpadas de deutério (160 a 380 nm) ou tungstênio (320 a 2500 nm). Os espectrofotômetros possuem registradores gráficos que permitem a obtenção dos espectros de absorção das substâncias em meio digital. Tal recurso é importante para fins de caracterização da substância a partir da obtenção dos comprimentos de onda de maiores absorvâncias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### **5.7.1. Material**

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-1800, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os solventes testados foram: água purificada (Milli-Q®), ácido clorídrico PA  $M L^{-1}$  (Synth), hidróxido de sódio PA 0,1  $M L^{-1}$  (Merck), metanol PA (Synth), tampão fosfato de pH 6, pH 7 e pH 8. A SQR e as amostras de pó liofilizado para solução injetável utilizadas foram descritas nos itens 4.1. e 4.2., respectivamente.

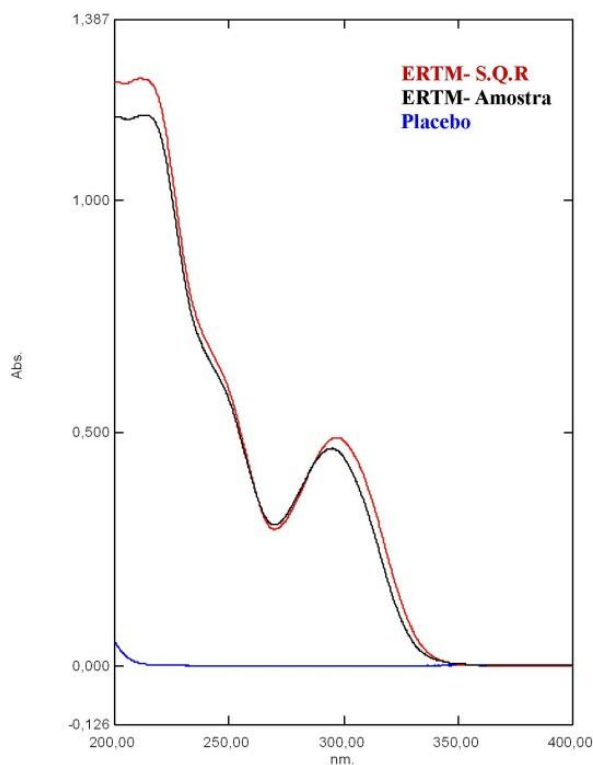
### **5.7.2. Método**

A massa de 20,00 mg de ERTM SQR, previamente dessecada por 1 h a 105 °C foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com água purificada, obtendo-se solução mãe de 200  $\mu g mL^{-1}$ . A partir desta solução foram preparadas soluções em água, metanol, ácido clorídrico 0,01  $M$ , hidróxido de sódio 0,01  $M$ , tampão fosfato de sódio pH 6 e tampão fosfato pH 7 e pH 8, contendo 21,0  $\mu g mL^{-1}$  de ERTM. Os espectros de absorção foram registrados na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm. O mesmo procedimento foi realizado para ERTM pó liofilizado para solução injetável, em que, a massa equivalente a 201 mg de amostra foi pesada a partir de um *pool* de amostras do conteúdo de cinco frascos-ampola.

### **5.7.3. Resultados e discussão**

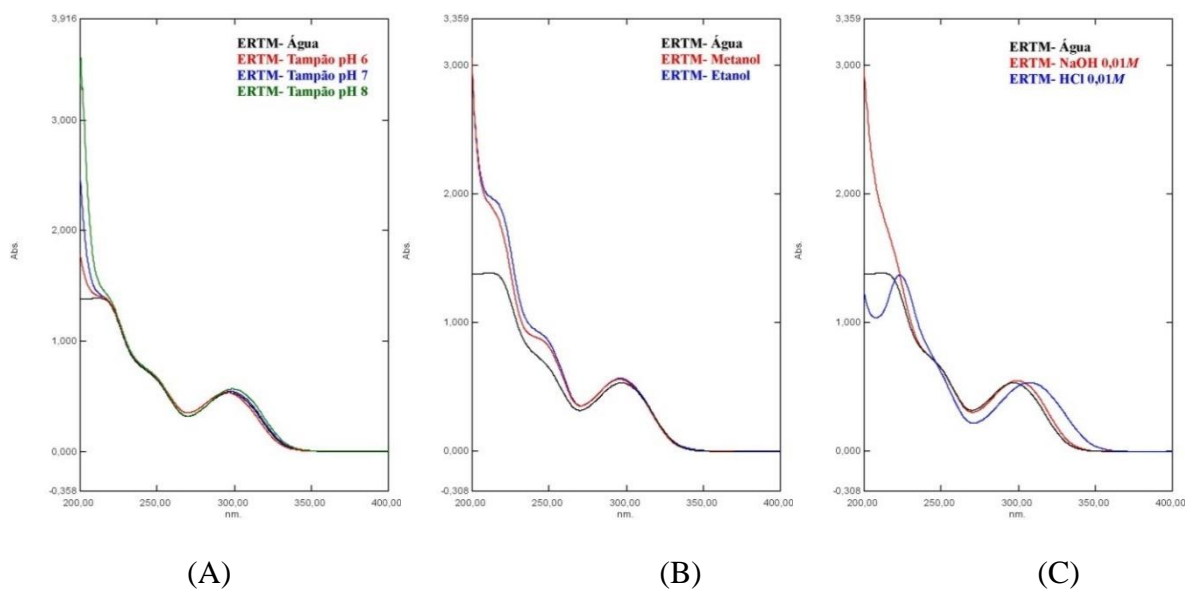
Os espectros de ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável (itens 4.1. e 4.2.) foram analisados em vários solventes na concentração de 21,0  $\mu g mL^{-1}$ . Na Figura 11, o espectro das soluções aquosas de ERTM SQR encontra-se sobreposto ao espectro de amostra de ERTM pó liofilizado para solução injetável e o placebo constituído pelos adjuvantes bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio presentes na forma farmacêutica.

**Figura 11** - Espectro de absorção na região do ultravioleta de ERTM SQR, ERTM pó liofilizado para solução injetável, ambos em concentração de  $21 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o placebo constituído dos adjuvantes presentes na forma farmacêutica, utilizando água como solvente.



Os perfis espectrais de ERTM SQR em diversos solventes são apresentados na Figura 12.

**Figura 12** - Espectro de absorção na região do ultravioleta, solução de ERTM SQR na concentração de  $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando como solvente: tampão fosfato de sódio pH 6, pH 7 e pH 8 (A); metanol e etanol (B); ácido clorídrico 0,01 M e hidróxido de sódio 0,01 M (C)



A absorção molecular na região do ultravioleta depende da estrutura eletrônica da molécula; assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

As amostras de ERTM SQR e a ERTM pó liofilizado para solução injetável dissolvidas em água purificada na concentração de  $21 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram comparadas entre si. A absorção máxima de 0,502 foi observada no comprimento de onda em 297 nm. Dentre os solventes testados, a água apresentou resultados semelhantes às soluções de tampão fosfato pH 6, pH 7 e pH 8, enquanto que utilizando metanol, o máximo de absorção observado foi de 0,531, em 295,80 nm, em etanol o máximo de absorção observado foi de 0,537, em 296,00 nm; em meio ácido foi em 307,80 nm com absorvância de 0,504 e em meio alcalino foi em 299 nm e absorvância de 0,518. Após análise dos espectros, optou-se em usar água purificada como solvente, por apresentar características adequadas nos espectros e por possuir vantagens econômicas e ambientais, tais como ser de fácil aquisição e descarte, ter baixo custo e não gerar resíduos tóxicos ao operador e ao meio ambiente.

Os resultados apontam que os perfis espectrais demonstrados para ERTM SQR e amostra em pó liofilizado para solução injetável, dissolvidos em vários solventes, são condizentes, podendo ser empregados como prova de identificação por comparação. O método corrobora para análise qualitativa de rotina realizada no laboratório de controle de qualidade, podendo ser usado para a identificação de ERTM na forma farmacêutica pó para solução injetável, através das suas características de absorção, com as vantagens de ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo.

### **5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa são os mais comumente utilizados devido à sua habilidade de separar substâncias semelhantes. Este método consiste em se obter uma fase estacionária mais apolar em relação à fase móvel; a molécula eluirá quando a afinidade pela fase móvel for maior que pela fase estacionária. As moléculas eluem em tempos diferentes de acordo com a sua hidrofobicidade e, deste modo, são separadas (SCHLUTER, 1999).

O modo de eluição reverso, sem dúvida, é primeira escolha na análise de substâncias de baixa ou média polaridade. No entanto, as moléculas polares e ionizadas necessitam de fase móvel altamente aquosa para obter retenção nas tradicionais colunas  $C_8$  e  $C_{18}$ , o que pode ocasionar problemas tais como colapso hidrofóbico de fase (*de-wetting*), e a inviabilização de



acoplamento LC/MS, uma vez que diminui a sensibilidade empregando ionização via *electrospray*. Dentre as opções para este tipo de substância, encontra-se a cromatografia em troca iônica e emparelhamento de íons; ambas técnicas podem funcionar bem, mas os analitos precisam ser ionizáveis e estas técnicas também apresentam limitações quanto ao acoplamento LC/MS, porque os reagentes empregados no emparelhamento de íons geralmente causam supressão de sinal em espectrometria de massas, diminuindo a sensibilidade (LANÇAS, 2010; BORGES, 2014).

Nesse contexto, a Cromatografia Líquida por Interação Hidrofílica – CIH é o modo de eluição mais adequado para obtenção de retenção de substâncias polares, fracamente retidas em fase reversa e consiste em uma fase estacionária mais polar em relação à fase móvel, constituída de eluente com alta concentração de solvente orgânico miscível em água (ALPERT, 1990).

### **5.8.1. Cromatografia com interação hidrofílica - CIH**

CIH é uma variação da cromatografia líquida de fase normal e, portanto, trata-se de fase estacionária polar, mas emprega solventes menos tóxicos que os tradicionais eluentes usados em fase normal (hexano e os solventes clorados). Consiste de fase móvel altamente orgânica com pequenas proporções de água, o que propicia maior sensibilidade quando acoplada à LC/MS com fonte de ionização por eletronebulização (BORGES, 2014). O modo CIH é uma ferramenta poderosa e versátil para a indústria farmacêutica, uma vez que os fármacos na sua grande maioria são pequenas moléculas hidrofílicas, com isso, a CIH tem se tornado um método alternativo cada vez mais utilizado (BORGES; ROSTAGNO; MEIRELES, 2014).

O mecanismo de ação do modo de eluição CIH é muito estudado e discutido na literatura. Sabe-se que se trata de interações multimodais incluindo interações eletrostáticas fracas, ligações de hidrogênio e partição entre a fase móvel altamente orgânica e a camada de água em torno da fase estacionária (ALPERT, 1990; MCCALLEY, 2007; LANÇAS, 2010; HECKENDORF et al., 2013).

O solvente acetonitrila com pequena proporção de água é o eluente favorito em CIH por obter melhor retenção de substâncias; álcoois também podem ser empregados, mas uma concentração maior é necessária para se obter retenção. Qualquer solvente aprótico que seja miscível com água pode ser usado, tampões como formiato de amônio e acetato de amônio também são comumente empregados em CIH, devido às suas características de miscibilidade em altas proporções de solventes orgânicos. No entanto, é conveniente ressaltar que estes solventes devem estar em baixas concentrações para que não haja precipitação (geralmente

inferiores a 20 mM são recomendadas); também é comum o uso de até 0,2% de aditivos ácidos para controle de pH tais como ácido fórmico e ácido acético (MCCALLEY, 2007).

O modo CIH tem sido cada vez mais utilizado e já são muitos os tipos de fases estacionárias CIH disponíveis comercialmente. Em 2011, duas classificações foram sugeridas a fim de organizá-las. Na classificação de Kawachi et al., (2011), as fases estacionárias foram divididas em:

- Fortemente retentiva e de alta seletividade: amidas, sulfobetaína, sulfonatos.
- Fracamente retentiva com seletividade limitada: sílica, diol, amino, hidróxi, triazol.

Enquanto que na classificação de McCalley (2007), as fases estacionárias foram divididas em 5 grupos, sendo estes:

- Sílica gel (Si-OH ou Si-O-H<sup>+</sup>)
- Fases neutras quimicamente ligadas (ex: amida, diol)
- Fases de ligantes carregadas (ex: fase amino carregada positivamente e poli-2-sulfoetilaspartamida carregada negativamente)
- Fases zwitteriônicas (ex: sulfobetaína e fosforilcolina)
- Mix de fase reversa com fase CIH (ex: cadeia alquílica diol).

O desenvolvimento de novas colunas e novas aplicações no modo CIH tem contribuído para a sua consolidação, tornando-o mundialmente reconhecido.

#### **5.8.1.1. Material**

Para a realização do método, foram utilizados ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2. O método por cromatografia líquida de modo CIH foi realizado em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (CLUE), Shimadzu equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-AHT, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com *software* LC Solution<sup>®</sup>. A fase estacionária foi coluna CIH Kinetex 2,6 µm (4,6 x 100 mm) Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, EUA).

#### **5.8.1.2. Método**

A análise do fármaco em estudo foi realizada isocraticamente; a vazão da fase móvel foi 0,5 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL, usando detector UV a 297 nm em temperatura de

25 °C. Este método foi conduzido no Departamento de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB.

#### **5.8.1.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR**

Foi pesada a massa de 10 mg de ERTM SQR e transferida para balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com a água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com metanol para obtenção das concentrações de trabalho de 70 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **5.8.1.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola contendo peso médio de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em um recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, 10 mg de ERTM foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, e o volume foi completado com metanol para obtenção das concentrações de trabalho.

#### **5.8.1.2.3. Preparo das fases móveis**

Diferentes fases móveis foram testadas, constituídas de pequenas proporções de água purificada Milli-Q<sup>®</sup> em solventes orgânicos grau CLAE tais como: acetonitrila (J.T. Baker<sup>®</sup>, Tedia<sup>®</sup> e LiChrosolv<sup>®</sup>), etanol (Panreac<sup>®</sup>) e metanol (Vetec<sup>®</sup>). A fase móvel foi filtrada em membrana filtrante de *nylon* com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), sob vácuo usando bomba Prismatec<sup>®</sup> modelo 121 e desgaseificada no ultrassom (Unique Ultrasonic Cleaner Modelo USC – 2850<sup>a</sup>) durante 30 minutos antes do uso.

#### **5.8.1.3. Resultados e discussão**

Ensaio preliminares foram efetuados, a fim de se obter os parâmetros adequados para obtenção de um método confiável. Duas colunas cromatográficas foram avaliadas com diferentes sistemas de fases móveis. Os volumes de injeção avaliados foram 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$  com vazão de 0,1 a 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . O comprimento de onda de 297 nm foi pré-estabelecido por varredura em detector UV. As condições testadas durante o desenvolvimento do método estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9** - Condições testadas durante o desenvolvimento do método para quantificação de ERTM por CIH

<b>Fase móvel</b>	<b>Coluna</b>
Etanol: água (85: 15 v/v)	
Etanol: água (90: 10 v/v)	
Etanol: água (95: 5 v/v)	
Metanol: água (85: 15 v/v)	
Metanol: água (90: 10 v/v)	HILIC Kinetex 2,6 µm (4,6 x 100 mm) Phenomenex®
Metanol: água (95: 5 v/v)	
ACN: água (80: 20 v/v)	Poroshell 120 CIH 2,7 µm (3,0 x 100 mm) Agilent®
ACN: água (85: 15 v/v)	
ACN: água (86: 14 v/v)	
ACN: água (87: 13 v/v)	
ACN: água (88: 12 v/v)	
ACN: água (89: 11 v/v)	
ACN: água (90: 10 v/v)	

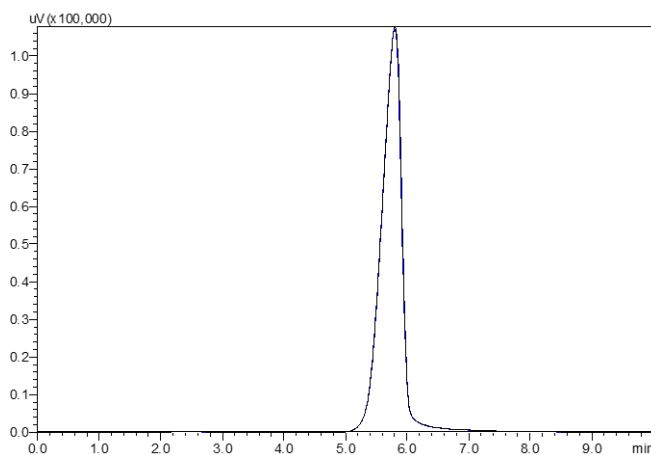
Diferentes concentrações de fase móveis foram testadas afim de se obter uma análise rápida, porém com um adequado fator de retenção ( $k \geq 2$ ). Os parâmetros que apresentaram resultados adequados segundo tempo de retenção, fator de retenção e resolução foram selecionados para o desenvolvimento do método e estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Parâmetros estabelecidos para a determinação de ERTM pó liofilizado para solução injetável, pelo método CIH

<b>Fase móvel</b>	ACN: água: (88:12 v/v) com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5
<b>Coluna</b>	HILIC Kinetex 2,6 µm (4,6 x 100 mm) Phenomenex®
<b>Deteção</b>	297 nm
<b>Vazão</b>	0,5 mL min <sup>-1</sup>
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Temperatura</b>	25 °C ± 2
<b>Tempo de retenção</b>	5,7 minutos

O cromatograma de ERTM obtido pelo método proposto demonstrou resolução e simetria do pico satisfatórias, além de tempo de retenção adequado (5,7 minutos), como é ilustrado na Figura 13.

**Figura 13** - Cromatograma de ERTM SQR (preto), ERTM pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obtidos com fase móvel ACN: água: (88:12 v/v) com 0,1 % de ácido fórmico pH 2,5 e fase estacionária: HILIC Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  (4,6 x 100 mm) Phenomenex<sup>®</sup>, para o método de CIH.



#### 5.8.1.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico

No desenvolvimento de um método analítico é necessário verificar se os requisitos de pré-validação estão em conformidade. A conformidade do sistema cromatográfico é de suma importância para assegurar resultados confiáveis, reprodutíveis e seguros (BOSE, 2014). A conformidade do sistema cromatográfico foi verificada injetando dez replicatas de soluções de ERTM SQR na concentração de trabalho de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os parâmetros tais como fator de retenção, número de pratos, tempo de retenção e a área do pico foram avaliados de acordo com item 3.9.1. anteriormente descrito.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros, fator de retenção, número de pratos, bem como área e tempo de retenção apresentado para ERTM.

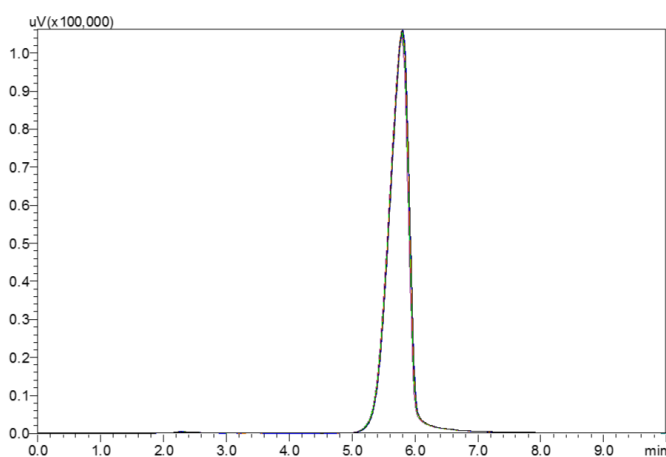
**Tabela 11-** Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico, para determinação de ERTM por CIH

	Área	Tempo de Retenção - $t_r$ (min)	Fator de Retenção - $k'$ ( $> 2,0$ )	Número de Pratos -N ( $>2000$ )
	2406512	5,754	2,46	2101,20
	2410700	5,753	2,46	2100,47
	2414508	5,755	2,46	2101,93
	2384877	5,755	2,46	2101,93
	2374783	5,744	2,46	2093,91
	2372898	5,753	2,46	2100,47
	2494683	5,767	2,47	2110,71
	2468094	5,763	2,47	2107,78
	2461700	5,761	2,47	2106,32
	2431090	5,759	2,47	2104,86
Média	2421985	5,76	2,47	2102,96
DPR	1,71	0,11	0,16	0,22

DPR= Desvio padrão relativo

Os dez cromatogramas da avaliação da conformidade do sistema cromatográfico para ERTM foram sobrepostos e estão apresentados Figura 14.

**Figura 14-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  sobrepostos, para determinação da conformidade do sistema cromatográfico do método de CIH nas mesmas condições que a Figura 13.



O ERTM é uma molécula polar e ionizada, possui 7 pKa dentre eles ácidos, básico e anfóteros, fatores estes que o tornam adequado para o uso do modo de eluição por cromatografia líquida por interação hidrofílica. Diferentes fases móveis foram avaliadas em duas diferentes colunas cromatográficas. Os três solventes testados foram etanol, metanol e acetonitrila, contendo pequenas proporções de água, já que um mínimo de 3% de água na fase móvel é

necessário para a formação de camada de água imprescindível para promover as interações entre o analito e a fase estacionária. Infelizmente para a análise de ERTM, os testes realizados utilizando os álcoois não apresentaram retenção adequada para a quantificação, decorrentes da alta força de arraste da fase móvel. Em CIH o solvente orgânico é usado como eluente fraco e a água é usada como eluente forte. No entanto, os álcoois possuem alta força de arraste em CIH.

Com isso, ainda que a máxima proporção de álcool permitida no modo CIH seja empregada (97:03 etanol: água *v/v* ou metanol: água), que seria a fase móvel mais retentivas, baixo fator de retenção foi apresentado para ERTM. No entanto, excelentes resultados foram alcançados usando o solvente ACN como o eluente fraco, que foi escolhido por apresentar condições favoráveis para a validação. A força da fase móvel foi ajustada para obtenção de uma análise rápida que apresentasse fator de retenção maior que 2. Com isso, a fase móvel escolhida foi ACN: água (88:12 *v/v*) com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5.

O teste de conformidade é essencial para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estejam aptos para identificar e quantificar o fármaco em análise. Os dados obtidos na verificação da conformidade do sistema cromatográfico (Tabela 11) indicam que o sistema desenvolvido é seguro e confiável, estando de acordo com o preconizado pelo FDA (2004) e USP 37 (2014) em que os parâmetros sugeridos são: fator de retenção > 2; número de pratos > 2000; assimetria do pico de 0,80 a 1,20 e DPR desses parâmetros inferior a 2%.

O  $t_0$  estimado teoricamente pela Equação 1 foi 1,66 min e o tempo de retenção para ERTM foi de 5,7 minutos, portanto o fator de retenção de aproximadamente 2,5 indica que há interação adequada entre o analito e a fase estacionária, permitindo que o fármaco seja quantificado com precisão e exatidão. Além disso, o tempo de retenção é considerado satisfatório, pois, para se adequar à rotina das indústrias farmacêuticas, os métodos desenvolvidos precisam apresentar um curto tempo de análise, devido à demanda operacional produtiva. Deste modo, a velocidade da análise tem se tornado cada dia mais importante para o controle de qualidade. Portanto, o método apresenta uma fase móvel simples e pode ser empregado para análise de ERTM na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável.

Tradicionalmente, para a análise de substâncias de alta polaridade, em CIH é necessário uso de fases móveis altamente orgânicas. Geralmente, mais do que 70% de acetonitrila é utilizada para induzir os mecanismos de separação, adsorção e interação iônica, tipicamente, pelo menos 3 a 5% de água na fase móvel é necessário, a fim de estabelecer uma camada sobre a superfície polar da fase estacionária. A ACN é preferida como eluente fraco, por proporcionar melhor retenção do analito em comparação aos álcoois utilizados. No entanto, a fase móvel mais retentiva possível para um analito seria 97:3 ACN: água *v/v*. Não é possível trabalhar com

fase móvel 100% orgânica, pois a retenção seria perdida devido à falta da camada polar necessária para as interações.

O uso de fase móvel contendo altas concentrações de ACN em métodos cromatográficos divide opiniões de pesquisadores que trabalham com técnicas de separação. Em plenárias sobre cromatografia é comum ouvir os pesquisadores engajados no desenvolvimento de métodos sustentáveis benéficos ao meio ambiente, relatarem que a ACN ao ser incinerada gera resíduos de NO<sub>2</sub>, que contribui para a formação de chuva ácida. Por outro lado, a acetonitrila é um subproduto derivado do reciclo de resíduo de acrilonitrila, utilizada na fabricação de plásticos, que de qualquer modo seria incinerado (LANÇAS, 2009).

Em 2008, pesquisadores começaram a buscar alternativas para substituir a ACN por outros solventes, tais como acetona, etanol, metanol. Isso por que, nessa época com a crise econômica que emergiu nos Estados Unidos e afetou a economia mundial, a ACN encontrava-se em escassez e teve um aumento abrupto do seu preço em até 10 vezes do preço normal. Um dos motivos foi decorrente ao impacto no setor automotivo, já que, como foi informado, a ACN é um subproduto derivado da fabricação de plásticos (LANÇAS, 2009).

O Brasil é um dos maiores produtores de etanol de cana-de-açúcar do mundo, o que permite ainda, que grupos de pesquisa refinem o seu próprio etanol a fim de obter etanol de qualidade para o uso em cromatografia, como é o caso do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças da Universidade de São Paulo do Instituto de Química de São Carlos, que tem produzido etanol grau CLAE para as análises de separação de seu laboratório reduzindo assim o custo de aquisição deste solvente. Mas, a sustentabilidade também tem sido levada em consideração em relação ao custo benefício e há ainda, uma discussão sobre a quantidade de energia gasta para produção de etanol grau CLAE em comparação a produção de acetonitrila grau CLAE.

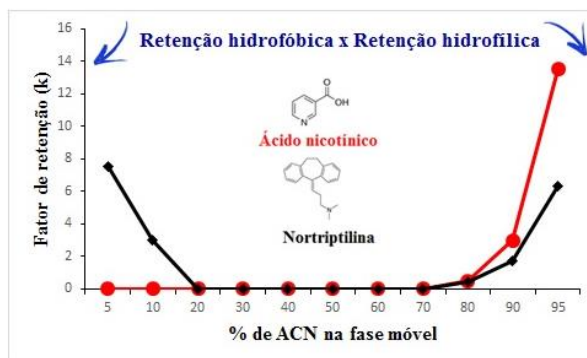
Embora inicialmente o objetivo foi puramente econômico e não por razões ecológicas, ainda hoje se observa um aumento progressivo de trabalhos usando solventes considerados “*eco amigáveis*”, agora decorrente das questões de proteção ambiental. Grupos de pesquisas vêm trabalhando com o desenvolvimento de métodos que substituam a ACN por solventes considerados ecologicamente corretos, que possam trazer benefícios ambientais e ainda precaver caso ocorra uma nova crise financeira. O grupo de pesquisa do professor Pat Sandra da Universidade de Gent na Bélgica propôs alguns métodos no modo de eluição CIH usando 100% de fase aquosa, a qual denominou “*Per Aqueous LC - PALC*” ou “*Aqueous normal-phase LC*”. Outra contribuição dada por este grupo foi o desenvolvimento de um método por cromatografia em fluido supercrítico em que usou fase móvel composta por CO<sub>2</sub>, etanol e



solução tamponante na tentativa de substituir ACN (PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010). Posteriormente, outro grupo de pesquisa propôs ainda usar misturas de carbonato de propileno e etanol para substituir a ACN (TACHEA et al., 2013).

Em 2007, McCalley apresentou importantes considerações sobre o mecanismo de interação em CIH; apontou que, além da retenção hidrofílica por partição líquido-líquido alcançada com as tradicionais fases móveis altamente orgânicas, também é possível reter substâncias ionizáveis, moderadamente hidrofóbicas, por interações siloxano na superfície da partícula, quando se usa a fase inversa em CIH, ou seja, com fase móvel altamente aquosa. Se o conteúdo aquoso da fase móvel for superior a 30%, ligações siloxano podem ocorrer, resultando na retenção de fase inversa, sob estas condições, a retenção ocorre mais notável quando o conteúdo aquoso da fase móvel é maior do que 90%, mas as substâncias mais polares não retêm adequadamente por este tipo de interação. Isto conduz à curva de retenção em forma de “u” muito característico, quando se plota a retenção de analitos através de uma gama de fases móveis que contém 0 a 100% de solvente orgânico, como apresentado na Figura 15.

**Figura 15** - Mecanismo de interação em CIH - Retenção do analito *versus* fase móvel em proporção crescente de solvente orgânico.



Fonte: Gráfico baseado na literatura MCCALLEY, 2007

Atualmente, a química verde está sendo discutida e encorajada mundialmente, não só no mundo acadêmico, mas também por laboratórios e indústrias farmacêuticas. Os métodos analíticos classificados como métodos verdes ou eco-amigáveis priorizam o baixo consumo de solventes orgânicos ou substituição destes por solventes de baixa toxicidade. Dentre as inúmeras propostas de se encontrar um solvente que possa substituir a ACN, há a tentativa incessante de usar etanol. Todavia, substituir a ACN por etanol nem sempre é possível. A ACN é o solvente mais utilizado em cromatografia pelas suas características únicas de baixa viscosidade, conseqüentemente baixa pressão no cromatógrafo, baixa acidez, alta miscibilidade com solventes apolares e água, baixa absorção de luz ultravioleta e, sobretudo, melhor

seletividade é alcançada quando se dispõe de ACN na fase móvel, fazendo com que nem sempre o solvente etanol possa ser intercambiável.

Em contrapartida, o etanol é derivado de fontes renováveis e biodegradáveis e com as novas tecnologias CLUE, a alta viscosidade do etanol, responsável pelo aumento significativo da pressão no equipamento, deixou de ser um problema. Os resíduos de etanol são fáceis de se eliminar não necessitando de incineração. Além disso, etanol é classificado como solvente de classe III, que tem o menor potencial tóxico, assim como ácido acético, acetona, acetato de etila, heptano e dimetil-sulfóxido, de acordo com a classificação The Center for Drug Evaluation and Research (CDER) e da Food and Drug Administration (FDA), 2012.

O etanol tem sido utilizado como o eluente fraco em CIH, e a retenção de substâncias não tem sido um problema, portanto é possível trabalhar com etanol em substituição à ACN, propondo, desta forma, métodos considerados “amigos do ambiente”. Neste aspecto, pode ser citado o estudo para a investigação e quantificação de hidrazinas, substâncias que, embora usados nas sínteses de fármacos, são cancerígenas, e exigem monitoramento. Trata-se de substâncias de alta polaridade e, portanto, fracamente retidas na fase reversa (MIN et al., 2009).

Várias combinações de fase móvel e fase estacionária foram testadas e avaliadas a fim de se estabelecer os parâmetros adequados para o desenvolvimento do método. Excelentes resultados foram obtidos usando álcoois como modificador orgânico associados a fases estacionárias CIH. Os autores verificaram que o tempo de retenção para hidrazinas aumentou proporcionalmente ao tamanho da cadeia alquílica do álcool (metanol < etanol < isopropanol), pois, com o aumento da cadeia alquílica, há a diminuição da polaridade do álcool, o que faz com que as hidrazinas tenham maior afinidade pela camada aquosa na superfície da fase estacionária, propiciando maior retenção. O etanol foi o solvente orgânico escolhido e a força da fase móvel foi estudada variando as proporções de água e etanol (MIN et al., 2009).

Deste modo, os métodos analíticos estão constantemente passando por mudanças e melhorias. A química verde está sendo rapidamente adotada e encorajada no desenvolvimento de novos métodos farmacêuticos, com incentivo das universidades e da indústria farmacêutica; cabe ao pesquisador avaliar as possibilidades frente às características inerentes a cada substância em estudo.

### **5.8.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA - CLAE-FR**

A cromatografia líquida é uma das principais técnicas analíticas nas áreas da ciência devido à sua vasta aplicabilidade. O modo de eluição por fase reversa é, sem dúvida, o mais

utilizado na cromatografia, devido às suas inúmeras vantagens, tais como amplo campo de aplicação, devido à capacidade de separação de substâncias de diferentes polaridades, uso de fases móveis de menor custo e menor toxicidade, rápido equilíbrio da coluna após a mudança de fase móvel, possibilidade de uso de gradiente de eluição resultando em maior rapidez e melhor separação nas análises (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012). A cromatografia líquida de fase reversa pode ser considerada uma técnica de análise para separação, confirmação e quantificação bem difundida e empregada (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

#### **5.8.2.1. Material**

Para a realização do método foram utilizados ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2. O método por cromatografia líquida de modo reverso foi realizado em sistema Waters<sup>®</sup>, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, EUA), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 µL (Rheodyne Breeze<sup>®</sup>, CA, EUA). A análise do fármaco em estudo foi realizada isocraticamente em ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent<sup>®</sup> (Santa Clara, EUA), em temperatura ambiente. As áreas dos picos foram integradas usando o programa de *software* Empower<sup>®</sup>.

#### **5.8.2.2. Método**

O ensaio foi realizado isocraticamente com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20 µL, usando detector UV a 297 nm em temperatura 25 °C.

##### **5.8.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR**

Foi pesada a massa de 20,00 mg de ERTM SQR e transferida para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com a água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg mL<sup>-1</sup>. Alíquota de 5 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com a água purificada para obtenção da concentração de trabalho de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

##### **5.8.2.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola, com peso médio de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em um recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, massa equivalente a 20 mg de ERTM foi pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg mL<sup>-1</sup>. Desta solução, alíquota de 5 mL foi

transferida para balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com a água purificada para obtenção da concentração de trabalho de 100 µg mL<sup>-1</sup>.

### 5.8.2.2.3. Preparo das fases móveis

Diferentes fases móveis foram testadas. As fases móveis foram constituídas por proporções de solventes de grau CLAE tais como: acetonitrila (JT Baker), etanol (JT Baker) e metanol (JT Baker), em solução aquosa (água purificada Milli-Q<sup>®</sup>). Cada fase móvel foi filtrada em membrana filtrante de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), sob vácuo e degaseificada no ultrassom (Unique Ultrasonic Cleaner Modelo USC – 2850A) durante 30 minutos antes do uso.

### 5.8.2.3. Resultados e discussão

Ensaio preliminares foram efetuados, a fim de se obter um método confiável, de modo a evitar danos à coluna cromatográfica e tentar diminuir a formação de resíduos. Vários sistemas de fases móveis foram testados em diferentes colunas cromatográficas em temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 20 µL e a vazão variou entre 0,5 a 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda de 297 nm foi pré-estabelecido por varredura em detector UV. As condições testadas durante o desenvolvimento do método estão apresentadas na Tabela 12.

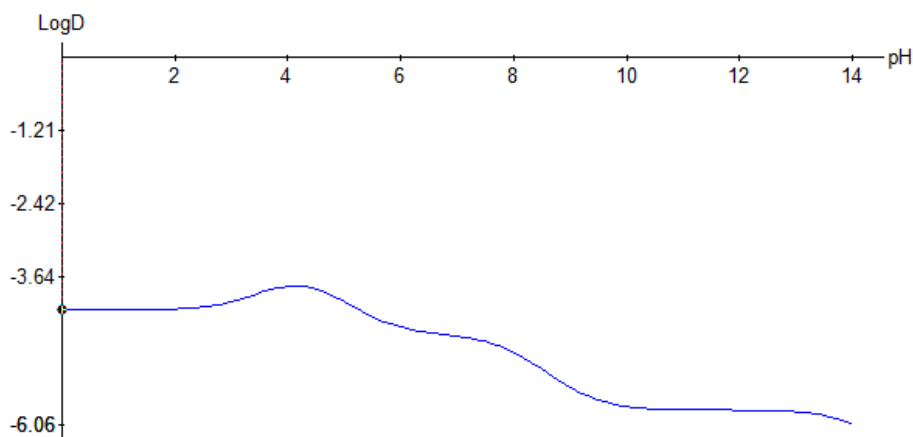
**Tabela 12** - Condições testadas durante o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de fase reversa para a determinação de ERTM

Fase móvel	Coluna
Água: etanol (75:25 v/v)	ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent® (Santa Clara, EUA)
Água: etanol (80:20 v/v)	
Água: etanol (85:15 v/v)	
Água: metanol (75:25 v/v)	ZORBAX SB-Aq (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent® (Santa Clara, EUA)
Água: metanol (80:20 v/v)	
Água: metanol (85:15 v/v)	
Água: acetonitrila (75:25 v/v)	ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent® (Santa Clara, EUA)
Água: acetonitrila (80:20 v/v)	
Água: acetonitrila (85:15 v/v)	

Para estabelecer as melhores condições de trabalho, o coeficiente de distribuição (log D) foi determinado usando *software* ACD/Labs, sendo que o coeficiente de distribuição consiste na avaliação do coeficiente de partição (log de P) em diferentes pHs. Os resultados

indicam que o pH em que a solubilidade do fármaco é mais estável corresponde à faixa de pH menor do que 3 (Figura 16).

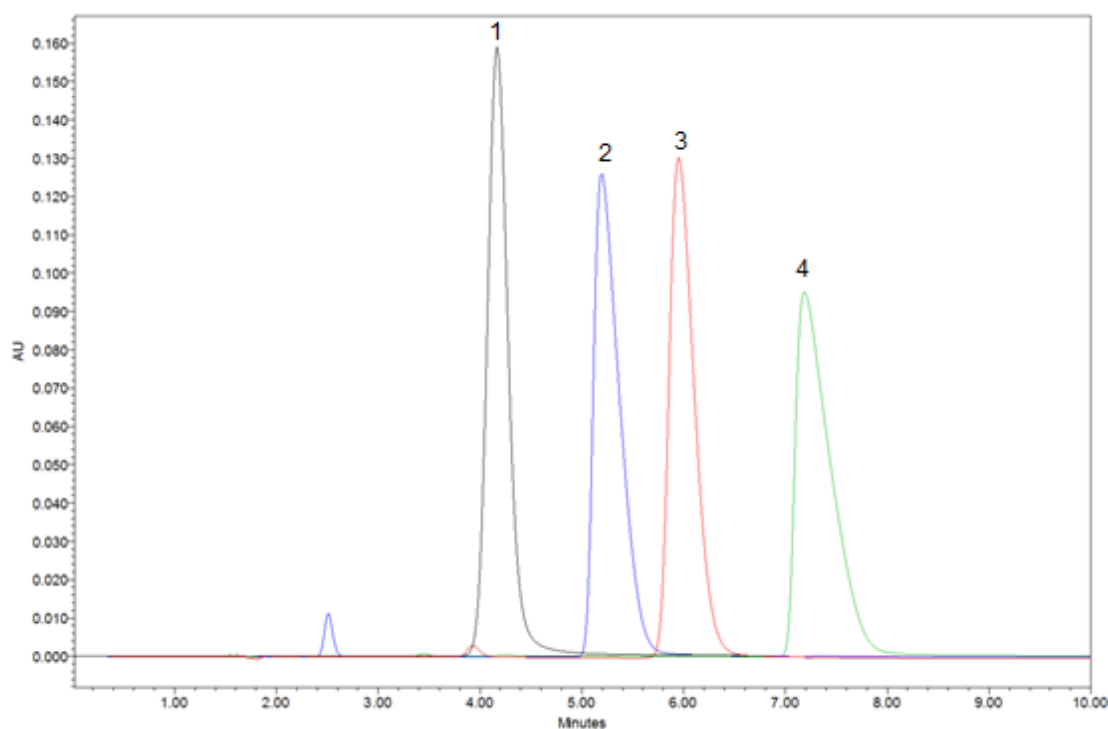
**Figura 16** - Coeficiente de distribuição de ERTM determinado por *software* ACD/Labs



Em CLAE, usando o modo reverso de eluição é desejável trabalhar com a molécula na sua forma não ionizada, pois ácidos e bases não carregados, sofrem ionização formando espécies mais hidrofílicas, propiciando a menor retenção da molécula na fase estacionária em modo de eluição por fase reversa. Considera-se que a molécula estará completamente não ionizada quando estiver 2 unidades de pH acima do seu pKa para bases e 2 unidades de pH abaixo do seu pKa para ácidos. O pKa da molécula foi calculado *in silico* por *software* ACD/Labs e o ertapenem sódio apresentou ter 7 pKas, sendo estes com características ácidas, alcalinas e anfótera:  $14,55 \pm 0,70$ ;  $14,36 \pm 0,20$ ;  $7,94 \pm 0,60$ ;  $4,37 \pm 0,60$ ;  $4,30 \pm 0,70$ ;  $4,03 \pm 0,10$  e  $2,51 \pm 0,40$ . Portanto, trabalhar em pH ácido é o mais adequado, no entanto é preciso considerar a faixa de pH apropriada para a fase estacionária que se pretende usar para não acarretar em danos na coluna cromatográfica. Assim, 0,1% de aditivos tais como ácido acético, ácido fórmico e ácido trifluoroacético (TFA) foram adicionados à fase móvel para ajuste do pH.

A fase móvel água: etanol (80:20 v/v), com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5 foi escolhida para testar as diferentes fases estacionárias, ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m), Zorbax SB (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m), Zorbax SB-Aq (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) e Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m), como apresentado na Figura 17.

**Figura 17** - Cromatogramas de diferentes fases estacionárias usando fase móvel água: etanol (80:20 v/v), com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5, solução de ERTM SRQ 100 µg mL<sup>-1</sup>.



1- ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm); 2- Zorbax SB (4,6 x 150 mm, 5 µm); 3- Zorbax SB-Aq (4,6 x 150 mm, 5 µm); 4- Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (4,6 x 150 mm, 5 µm)

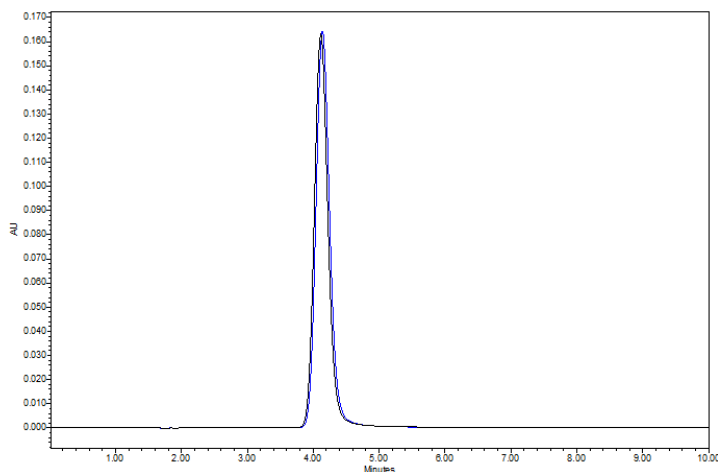
Diante dos resultados obtidos, os parâmetros considerados adequados foram estabelecidos para o método analítico por CLAE e estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Parâmetros estabelecidos para a determinação de ERTM pó liofilizado para solução injetável, pelo método cromatografia líquida de fase reversa

<b>Fase móvel</b>	água: etanol (80:20 v/v); pH 2,5 ajustado 0,1% ácido fórmico
<b>Coluna</b>	ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent®
<b>Deteção</b>	297 nm
<b>Vazão</b>	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Temperatura</b>	25 °C ± 2
<b>Tempo de retenção</b>	4 minutos

O cromatograma de ERTM obtido pelo método proposto demonstrou resolução e simetria do pico satisfatórias, além de um tempo de retenção adequado visando curto tempo de análise (4 minutos), como é ilustrado na Figura 18.

**Figura 18** - Cromatograma de ERTM SQR (preto), ERTM pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obtidos com fase móvel: água: etanol (80:20 v/v), pH 2,5 ajustado com ácido fórmico e fase estacionária: ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) Agilent® para o método CLAE-FR.



#### 5.8.2.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico

O teste de conformidade do sistema cromatográfico (*system suitability*), estabelecido pela ICH (2005), é uma etapa essencial para assegurar o bom desempenho do cromatógrafo durante a realização das análises. A conformidade do sistema foi avaliada, conforme descrita no item 3.9.1., e os resultados obtidos para os parâmetros fator de retenção e número de pratos, bem como área do pico cromatográfico e tempo de retenção para ERTM, estão apresentados na Tabela 14.

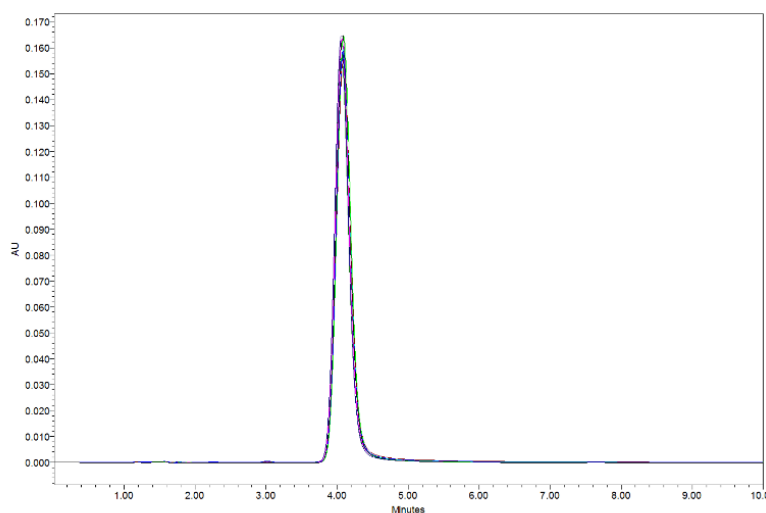
**Tabela 14** - Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema cromatográfico, para a análise de ERTM por cromatografia líquida de fase reversa

	Área	Tempo de Retenção (min)	Fator de Retenção (> 2,0)	Número de pratos (>2000)
	2358819	4,078	2,27	2052,52
	2269093	4,081	2,28	2055,54
	2362990	4,091	2,28	2065,63
	2265235	4,083	2,28	2057,56
	2327085	4,067	2,26	2041,47
	2241127	4,087	2,28	2061,59
	2323999	4,059	2,26	2033,44
	2263842	4,058	2,26	2032,44
	2274930	4,084	2,28	2058,57
	2256419	4,085	2,28	2059,58
Média	2294383	4,08	2,27	2051,83
DPR	1,94	0,29	0,01	0,58

DPR= Desvio padrão relativo

Os 10 cromatogramas da avaliação da conformidade do sistema cromatográfico para ERTM foram sobrepostos e estão apresentados Figura 19.

**Figura 19** - Sobreposição de 10 cromatogramas de ERTM na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obtidos com fase móvel: água: etanol (80:20 v/v), pH 2,5 ajustado com ácido fórmico e fase estacionária: ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm,  $5 \mu\text{m}$ ) Agilent® para o método de CLAE-FR.



No método cromatográfico para a identificação de ERTM proposto neste trabalho, buscou-se diminuir os custos operacionais de modo a evitar danos à coluna cromatográfica, diminuir o tempo de análise e a diminuir a produção de resíduos tóxicos. Para isso, diferentes fases móveis e fases estacionárias foram avaliadas para o desenvolvimento de um método no modo reverso de eluição; os três solventes testados (acetonitrila, etanol e metanol) apresentaram condições favoráveis para a validação, o etanol foi escolhido por ser um solvente “verde”, “eco amigável” e por propiciar excelentes resultados. Dentre os aditivos testados observou-se que quanto mais ácido o aditivo maior resolução do pico cromatográfico, isso por que, em fase móvel com pH ácido, a molécula encontra-se na sua forma menos ionizada. Por outro lado, variando apenas o tipo de aditivo, nas mesmas condições cromatográficas, verificou-se que a retenção do fármaco é inversamente proporcional à acidez do aditivo (retenção: ácido acético > ácido fórmico > ácido trifluoroacético).

Embora maior retenção tenha sido alcançada, o ácido acético foi descartado devido à resolução inadequada gerada pelo alargamento da banda cromatográfica. Excelentes resultados foram alcançados usando ácido trifluoroacético, e apesar de apresentar menor retenção, isso não seria um problema, pois a retenção poderia ser ajustada aumentando a proporção do eluente fraco na fase móvel (água). No entanto, evitou-se o uso de TFA por ser corrosivo, citotóxico e persistir no meio ambiente (PRAT; HAYLER; WELLS, 2014). Finalmente, o ácido fórmico



apresentou resultados adequados e foi o escolhido por ter baixa toxicidade e não ser prejudicial ao meio ambiente, uma vez que se decompõe facilmente em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

Quatro tipos de fase estacionárias foram testadas. A coluna ZORBAX SB<sup>®</sup> e ZORBAX SB-Aq<sup>®</sup> foram selecionadas por serem compatíveis com pHs extremamente ácidos (faixa de pH: 1 a 8) e, além disso, a coluna ZORBAX SB-Aq<sup>®</sup> é adequada ao uso de fases móveis altamente aquosas. A coluna ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl<sup>®</sup> é muito usada para análise de fármacos por ser apropriada para substâncias aromáticas (faixa de pH: 2 a 8) e a coluna ZORBAX Bonus-RP<sup>®</sup> por ser uma fase estacionária diferenciada estericamente protegida e apropriada para substâncias polares que necessitam de fase móvel altamente aquosa (faixa de pH: 2 a 9).

As colunas testadas foram doadas pela empresa Agilent<sup>®</sup> (Santa Clara, EUA). Na indústria farmacêutica, o tempo de análise de um método é de suma importância para liberação dos lotes em produção e, além disso, representa horas de trabalho de analistas, desgaste de equipamentos, uso de solventes e reagentes que em conjunto podem onerar essa etapa.

A solução de ERTM 100 µg mL<sup>-1</sup> foi injetada sob as mesmas condições cromatográficas variando-se apenas a fase estacionária, diferentes tempos de retenção foram observados para o analito, como apresentado na Tabela 15.

**Tabela 15-** Fase estacionária *versus* tempo de retenção de ERTM pelo método cromatografia líquida de fase reversa

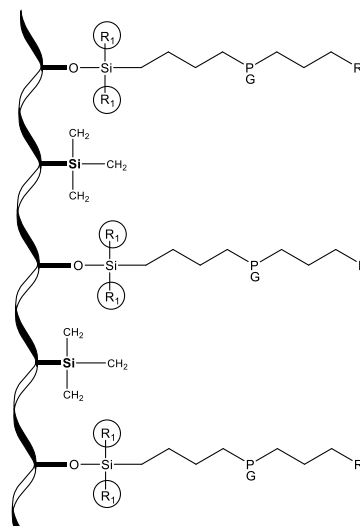
Fase estacionária	Tempo de retenção (min)
ZORBAX Bonus-RP (4,6 x 150 mm 5µm)	4,00
Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (4,6 x 150 mm 5µm)	7,20
Zorbax SB (4,6 x 150 mm 5µm)	5,20
Zorbax SB-Aq (4,6 x 150 mm 5µm)	5,90

A colunas Zorbax SB, Zorbax SB-Aq e Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl apresentaram maior retenção do analito quando comparadas com a coluna ZORBAX Bonus-RP. Adicionalmente o fator de retenção *versus* o tempo de retenção foi avaliado a fim de se obter um método rápido e confiável. Verificou-se que o fator de capacidade (> 2) é adequado para o tempo de retenção proporcionado pela fase estacionária ZORBAX Bonus-RP.

Outra alternativa para se usar as fases estacionárias Zorbax SB, Zorbax SB-Aq e Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl e diminuir o tempo de retenção a fim de se obter uma análise mais rápida seria aumentar a proporção de solvente forte na fase móvel e consequentemente se teria menor retenção do fármaco obtendo um método também adequado, mas isso não foi proposto nesse estudo por que resultaria em maior quantidade de solvente orgânico (etanol), que embora

não seja tóxico e não necessite de tratamento específico para os seus resíduos, tem um maior custo em relação à água. Com isso, a fase estacionária Zorbax Bonus-RP (4,6 x 150 mm, 5 µm) Agilent® (Santa Clara, EUA) foi escolhida por apresentar melhor fator de retenção e tempo de análise compatíveis com o desejado, aliados a uma fase móvel economicamente viável (Figura 20).

**Figura 20-** Estrutura da coluna ZORBAX Bonus-RP - Agilent Technologies®



*Fonte:* Figura desenhada usando ChemDraw Professional 15.1, baseada no Catálogo comercial Agilent Technologies®

Assim, a fase móvel escolhida foi água: etanol (80:20 v/v), com 0,1% de ácido fórmico, pH 2,5. O método por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa apresentou resultados satisfatórios quanto aos testes de conformidade de sistema; tais testes são essenciais para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estejam aptos para identificar e quantificar o fármaco em análise. Os dados obtidos na verificação da conformidade do sistema cromatográfico (Tabela 14) indicam que o sistema desenvolvido é seguro e confiável, estando de acordo com o preconizado pela FDA (2004) e USP 37 (2014), em que os parâmetros sugeridos são: fator de retenção > 2; Número de pratos > 2000; todos com DPR inferior a 2%. Além de um tempo de retenção de 4 minutos, que é considerado satisfatório para a indústria farmacêutica.

Este trabalho propôs o desenvolvimento de um método com uma fase móvel simples, não necessitando de preparo de solução tampão como constituinte, o baixo tempo de análise propicia a diminuição do consumo de solventes orgânicos, diminuindo custos operacionais. Além disso, com a fase móvel escolhida, constituída de água e etanol, os gastos com descarte adequado de resíduos também são diminuídos e são inúmeros os benefícios ao meio ambiente;

as condições selecionadas são apropriadas conseguindo desta forma maior aproveitamento da vida útil da coluna cromatográfica de forma a minimizar custos.

Assim, considerando a importância do ertapenem de sódio para a prática clínica nos dias de hoje e que ainda não há monografia oficial nas farmacopeias, um novo método analítico que não seja prejudicial ao meio ambiente para as análises ao ertapenem de sódio em pó liofilizado para solução injetável é de fundamental importância.

O modo de eluição por fase reversa apresenta excelente retenção para as substâncias de média e baixa polaridade. No entanto, considerando que a maioria dos fármacos são moléculas de alta polaridade, muitas vezes, estes requerem fase móvel altamente aquosa para obtenção de retenção adequada por fase reversa, usando as tradicionais fases estacionárias C<sub>18</sub>. Em contrapartida, esta é uma condição adversa que pode levar à diminuição significativa do tempo de vida útil da coluna cromatográfica. É o caso do ERTM, cuja revisão sobre os seus métodos analíticos apresentado na literatura descreve fases móveis altamente aquosas em colunas tradicionais (PEDROSO; SALGADO, 2015).

As tradicionais fases estacionárias empregadas em CLAE-FR são constituídas de uma camada orgânica apolar ligada quimicamente; a sílica possui inúmeras características, tais como apresentar maior resistência mecânica, possuir alta área superficial e energeticamente homogênea, possuir partículas com uma faixa estreita de distribuição de tamanho, além de ter um método de síntese altamente reprodutível (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Entretanto, o uso da sílica como suporte cromatográfico não apresenta boa estabilidade química e térmica e, portanto, o seu uso limita-se a aplicações em que as fases móveis na faixa de pH 2 a 8 e temperaturas abaixo de 60 °C. Em pH acima de 8, ocorre a dissolução da sílica e o colapso da fase estacionária. Em pH menores que 2, ocorre a hidrólise da ligação siloxano (Si-O-Si-C), ou seja, ocorre a quebra da ligação entre a fase ligada e o suporte cromatográfico, resultando em uma perda contínua de fase ligada, com subsequente perda de retenção do analito. Da mesma forma, a estabilidade térmica é limitada ao uso de temperaturas elevadas associada a fases móveis altamente aquosas, uma vez que nestas condições a sílica é solubilizada, ocorrendo o eventual colapso do leito cromatográfico, com conseqüente diminuição dos tempos de retenção dos analitos, e resulta em uma diminuição do tempo de vida da coluna (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; BORGES; EUERBY, 2013).

Atualmente, a ênfase nas pesquisas e nos desenvolvimentos de novas fases estacionárias para CLAE-FR está voltada para dois pontos principais: a estabilidade e a seletividade das fases estacionárias, ou seja, o aumento do tempo de vida das colunas cromatográficas em condições

adversas e o desenvolvimento de FE que possuam características específicas para uma substância ou para uma classe de substâncias (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Novas tecnologias de fase estacionária são lançadas todos os anos; encontram-se disponível comercialmente fases estacionárias com grupo polar embutido (GPE), nas quais um grupo polar é inserido na cadeia *n*-alquila e são capazes de estabelecer ligação de hidrogênio (SILVA et al., 2004; MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

As fases estacionárias com grupo polar embutido mantêm o caráter de fase reversa, mas apresentam seletividade distinta à fase estacionária alquila. São adequadas para diversos tipos de substâncias, especialmente para a separação de substâncias polares e básicos, com a vantagem de serem compatíveis com o uso de fases móveis altamente aquosas, podendo ser usadas com 100% de água sem ocorrer o colapso da fase estacionária, ou seja, a perda da sustentação das cadeias da fase ligada (SILVA et al., 2004; MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; BORGES; EUERBY, 2013).

Além das fases estacionárias reversas contendo grupos polares embutidos. Estão disponíveis comercialmente, as fases estericamente protegidas, que apresentam, além dos grupos polares embutidos, grupos volumosos como isopropila ou isobutila ligados diretamente ao átomo de silício. Um exemplo é a coluna ZORBAX Bonus-RP® da Agilent Technologies, que é recheada com uma fase do tipo reversa com grupos polares do tipo amida inseridos na cadeia *n*-alquila de quatorze átomos de carbono, além de grupos isopropila ligados diretamente ao átomo de silício (SILVA et al., 2004).

## **5.9. CROMATOGRAFIA EM FLUIDO SUPERCRÍTICO - CFS**

A cromatografia em fluido supercrítico (CFS) foi sugerida pela primeira vez em 1958 por James Lovelock. O intuito era melhorar a capacidade de diluição de substâncias em fase móvel, para facilitar a eluição de substâncias não voláteis (SMITH, 1999; TAYLOR, 2013). A técnica foi usada pela primeira vez por Ernst Klesper em 1962 e foi chamado de "cromatografia de gás de alta pressão" (GIDDINGS et al., 1968; SMITH, 1999; TAYLOR, 2013).

Em CFS, a fase móvel é geralmente constituída por um fluido supercrítico, ou seja, uma substância acima da sua pressão e temperatura crítica (SMITH, 1999). Vários diferentes fluidos foram investigados inicialmente, dentre estes, o dióxido de carbono se destacou como um favorito, devido as suas inúmeras vantagens tais como, parâmetros críticos leves, disponibilidade a baixo custo, ser transparente na região do UV e compatível com a maioria dos detectores, não ser inflamável ou tóxico, ser fácil de eliminar e ambientalmente amigável,

pois permite uma redução significativa do consumo de solventes orgânicos nos laboratórios (ABBOTT et al., 2008, ANTON; BACH; GEISER, 1991, WEST, 2013).

No entanto, para a separação da maioria das substâncias incluindo muitas preparações farmacêuticas, o poder de solvatação de dióxido de carbono não é suficiente para a eluição destas substâncias. A força de eluição pode ser um pouco, mas não muito, aumentada com alta pressão. Para aumentar a solubilidade dos solutos na fase móvel, modificadores orgânicos e aditivos podem ser adicionados resultando no melhoramento na resolução e propiciando a separação de analitos de diferentes polaridades (ABBOTT et al., 2008; ANTON; BACH; GEISER, 1991; WEST, 2013). O dióxido de carbono associado a pequenas proporções de metanol é, sem dúvida, a fase móvel mais utilizada em CFS.

A CFS apresenta um mecanismo multimodo quando o CO<sub>2</sub> é o principal ingrediente da fase móvel. Com isso, a técnica vem se destacando para a separação de substâncias quirais e em interações diastereoméricas com resultados de alta relevância (BRUNELLI et al., 2010; SMITH, 1999). Isso por que, a CFS oferece uma rápida separação de produtos enantioméricos em relação à CLAE, por causa da sua maior eficiência de separação por unidade de tempo, proporcionando melhor seletividade na separação de substâncias quirais com reduzido risco de racemização de analitos e decomposição térmica quando usado em baixa temperatura (TAYLOR, 2013).

Essa técnica analítica que até então é preferida para separações de substâncias quirais, também vem se destacando como uma técnica cromatográfica de primeira escolha para purificação de substâncias em grande escala. Isso por que, em CFS preparativa é possível conseguir separações rápidas e eficientes, conseguida com a alta vazão devido à baixa viscosidade da fase móvel (WEST, 2013). Soma-se ainda, ao fato de que a recuperação de solutos usando fases móveis baseadas em CO<sub>2</sub> é muito mais fácil dado que se diminui drasticamente o tempo de secagem em relação às fases móveis aquosas usadas em CLAE-FR. Com isso, o processo apresenta maior rendimento em menor tempo e maior produtividade em relação aos métodos de CLAE (BOLAÑOS et al., 2004; BRUNELLI et al., 2010; TAYLOR, 2013; WEST, 2013).

O dióxido de carbono acima de sua temperatura e pressão crítica (30 °C e 78 bars) resulta em um fluido apolar, com sua viscosidade mais semelhante à de um gás, solubilidade mais semelhante à fase líquida e difusividades aproximando à fase gasosa. Estas características resultam em baixas pressões de volta, mesmo com altas vazões, propiciando separações com maior eficiência em menor tempo de análise. Os solventes orgânicos metanol, etanol, isopropanol e ACN foram avaliados como modificadores de dióxido de carbono sob a mesma

condição experimental para a separação de quatro metabólitos de estrogênio. Metanol e etanol apresentaram a melhor separação, seguido de isopropanol, e finalmente a ACN. O metanol apresentou o menor tempo de separação, enquanto ACN foi o mais longo (ABBOTT et al., 2008). A proporção de modificador orgânico na CFS varia tipicamente de 5 a 50% (WEST, 2013).

O metanol é o solvente mais utilizado em CFS devido às suas muitas propriedades favoráveis, tais como, miscibilidade com CO<sub>2</sub>, melhor solubilidade das substâncias a serem analisadas, excelente transmissão de UV e contribui para a desativação de silanóis residuais da fase estacionária, resultando em redução do tempo de retenção, melhor eficiência e melhor simetria do pico cromatográfico. De acordo com o guia de seleção solventes verdes, metanol, etanol bem como acetona e água são considerados solventes ambientalmente amigáveis para aplicações em cromatografia. A seleção de solventes verdes deve ser considerada no desenvolvimento de métodos e, portanto, o metanol deve ser selecionado sobre a acetonitrila sempre que possível (BRUNELLI et al., 2008).

A CFS inicialmente estava focada exclusivamente para análise de substâncias apolares, e por muito tempo CFS foi considerada inadequada para analisar substâncias polares devido à imiscibilidade de CO<sub>2</sub> com amostras aquosas (ANTON; SIFFRIN, 1999). No entanto, tal fato parece deixar de ser um problema já que, atualmente a CFS tem sido aceita como um substituto ideal para cromatografia líquida de fase normal, por exibir retenção e reequilíbrio da coluna cromatográfica extremamente rápido; por permitir usar gradientes de eluição acentuados; tolerar uma quantidade significativa de água e pode ser usada com colunas cromatográficas longas (SMITH, 1999; TAYLOR, 2013). Substâncias mais polares que não são retidas por CLAE-FR são frequentemente bem separadas em CFS (BOLAÑOS et al., 2004; DISPAS et al., 2014), desde que a composição da fase móvel seja ajustada para assegurar a solubilidade suficiente das substâncias a serem analisadas (WEST, 2013).

Para análise de substâncias polares, a fase estacionária deve ser suficientemente polar para retê-las, e a fase móvel deve ser suficientemente polar para permitir uma boa solubilidade da substância (WEST, 2013). Portanto, uma porcentagem de modificador orgânico deve ser adicionada ao dióxido de carbono para conseguir a eluição de substâncias muito polares ou iônicas (ANTON; BACH; GEISER, 1991). A adição de co-solvente e aditivos tem como finalidade não só aumentar a solubilidade de analito, como também, possivelmente, mascarar "centros ativos" da fase estacionária que podem causar adsorção irreversível (WEST, 2013). Há varios trabalhos apresentados na literatura em que a CFS tem sido usada para análise de substâncias polares (GEISER et al., 1988; ENGELHARDT et al., 1989; FRANCE et al., 1991;

PYO; JU, 1994, GYLLENHAAL, 2006, MUKHERJEE; COOK, 2006; ZHENG et al., 2006b; PEREIRA et al., 2010; PHILIBERT; OLESIK, 2011; DISPAS et al., 2012; PUENTE et al., 2012, PYO, 2008; PATEL et al., 2012, 2014; MURAKAMI; THURBIDE, 2015).

É interessante ressaltar que a maioria das publicações em CFS não estão, na verdade, sob as condições supercríticas. A prática comum nos dias de hoje é se utilizar uma pressão acima da pressão crítica da fase móvel e uma temperatura abaixo da temperatura crítica da fase móvel, assim, o fluido resultante é referido como "subcrítico" (WEST, 2013).

As condições subcríticas parecem não ter uma grande influência no desempenho do sistema. No estado fluido subcrítico, a difusividade e viscosidade são menos favoráveis do que as ideais e se assemelham mais às condições de CLAE (BRUNELLI et al., 2010). Entretanto, as condições subcríticas em CFS têm sido úteis para a separação de substâncias polares e os resultados apresentados são encorajadores (LIU et al., 2002, OLESIK, 2015, PEREIRA et al., 2010, PERIAT et al., 2013; ZHENG et al., 2006a).

A condição subcrítica também é conhecida como cromatografia líquida de fluidez melhorada do termo em inglês *Enhanced-fluidity liquid chromatography - EFLC* ou *Gas expanded liquids* (GXLs). A fase móvel consiste em uma mistura de solventes orgânicos convencionais com uma pequena proporção de gás liquefeito. O dióxido de carbono é o mais comumente usado. Com isso é possível obter fase móvel com maior fluidez do que as fases móveis típicas. A adição de um gás liquefeito a um líquido convencional provoca a expansão do volume, e a fluidez da fase móvel aumenta substancialmente. Assim como em CFS, em cromatografia líquida de fluidez melhorada tipicamente usa-se o dióxido de carbono como gás liquefeito, mas outros gases liquefeitos também podem ser usados. Esta técnica vem sendo altamente útil para diversas aplicações cromatográficas (OLESIK, 2015).

A separação de aminoácidos quirais foi avaliada em condições subcríticas usando até 70% de metanol em fases estacionárias de glicopeptídeos macrocíclicos (LIU et al., 2002). A separação de nucleosídeos de RNA adenosina, uridina, citidina e guanosina foram separadas por cromatografia líquida de fluidez melhorada no modo de eluição por interação hidrofílica, usando coluna amida e fase móvel constituída de tampão de acetato de sódio 20 mM em metanol 90:10 e proporções crescentes de CO<sub>2</sub> para obtenção do aumento de retenção (TREADWAY; PHILIBERT; OLESIK, 2011). Ashraf-Khorassani e Taylor (2010) mostraram que as misturas de CO<sub>2</sub> com até 50% de álcool e 5% de água podem ser eficazes na separação das nucleobases, timina, uracilo, adenina, citosina (ASHRAF-KHORASSANI; TAYLOR, 2010; OLESIK, 2015).

Segundo uma previsão feita por Taylor em 2013 CFS, vem sendo empregado para a separação de diferentes analitos, polares ou apolares e iônicos variando apenas a fase móvel, tais como: CO<sub>2</sub> puro para a eluição de hidrocarbonetos, éteres e ésteres; CO<sub>2</sub> + metanol (ou acetonitrila para eluição de álcoois, amidas e anilina; CO<sub>2</sub> + metanol + ácido trifluoroacético (ou isopropil-amina) para a eluição dos ácidos ionizáveis e bases e CO<sub>2</sub> + metanol + acetato de amônio + água para eluição de anfóteros, peptídeos, vitaminas solúveis em água, hidratos de carbono e íons inorgânicos (TAYLOR, 2013).

Espécies ionizáveis representam a maioria das substâncias analisadas na indústria farmacêutica. Para eluir espécies iônicas e ionizáveis, aditivos ácidos, básicos ou neutros podem ser adicionados ao modificador orgânico para o melhoramento da resolução do pico cromatográfico. No entanto, trabalhos na literatura mostram que a eluição de espécie carregada é possível sem o uso de qualquer aditivo (BHOIR et al., 1999; ZHENG, 2005).

O pH estimado de fase móvel contendo misturas de álcool com CO<sub>2</sub> pode estar entre 4-5 (WEST, 2013; ZHENG et al., 2006b). Em tais condições ácidas, é provável que as substâncias mais ácidas estariam na sua forma aniônica, enquanto que as substâncias alcalinas estariam na sua forma catiônica. Neste caso, a adição de um aditivo ácido (como o ácido acético, ácido tricloroacético, ácido fórmico ou ácido cítrico) com um pKa inferior ao do analito pode restaurar o estado neutro de espécies ácidas, e protonam substâncias alcalinas, enquanto que os aditivos alcalinos (dietilamina, trietilamina ou isopropilamina) iriam restaurar o estado neutro de substâncias básicas, mas desprotonam as substâncias ácidas. A quantidade de aditivo recomendada é geralmente pequenas proporções de 0,1 a 2% (WEST, 2013).

O acetato de amônio tem sido o aditivo preferido devido à sua solubilidade na presença de solventes orgânicos, por substituir os aditivos alcalinos e ácidos comumente usados em CFS e ainda por ser compatível com a detecção por espectrometria de massas (BRUNELLI et al., 2009; CAZENAVE-GASSIOT et al., 2009; VENTURA; MURPHY; GOETZINGER, 2012; WEST, 2013; ZHENG, 2005).

### **5.9.1. Material**

O método foi desenvolvido em um sistema Jasco (Jasco Corporation<sup>®</sup>, Tóquio, Japão) equipado com os seguintes módulos: Jasco PU-2080-CO<sub>2</sub>-plus bomba de fornecimento de CO<sub>2</sub>; Jasco PU-2080-plus bomba de CLAE; AS-2059-SF-plus amostrador automático para CFS; UV-2070-plus detector UV-VIS com célula de fluxo de alta pressão; BP-2080-plus regulador de pressão de retorno automático; Caixa de interface LC-NET II / ADC e forno de coluna CO-2060. O *software* ChromomNAV foi utilizado para integrar as áreas de pico automaticamente.



A separação cromatográfica foi realizada em coluna ProntoSil 120-5-Piridina 250 x 4,6 mm, 5,0  $\mu\text{m}$  (Bischoff<sup>®</sup>). Outros aparelhos utilizados foram balança analítica BL120S (Sartorius<sup>®</sup>); micropipeta (Thermo Scientific<sup>®</sup>); membrana de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Grace<sup>®</sup>); lâmpada UV<sub>254</sub> nm UVGL-25 (UVP<sup>®</sup>); banho de ultra-som 2510E-MT (Branson<sup>®</sup>). Os produtos químicos utilizados foram ertapenem sódio 99,2% (n<sup>o</sup> EB004C1) e ERTM ingrediente farmacêutico ativo em pó liofilizado para solução injetável (n<sup>o</sup> 2178140) ambos gentilmente doados pela Merck Sharp & Dohme<sup>®</sup>. Todas as soluções e fases móveis utilizadas neste ensaio foram preparadas a partir de água ultrapura obtida a partir de purificador Milli-Q Plus (Millipore<sup>®</sup>, EUA) e todos os solventes utilizados foram de grau CLAE, metanol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), etanol 99,8% (Acros organics<sup>®</sup>), etanol absoluto desidratado (Biosolve<sup>®</sup>), etanol 96% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e todos os outros produtos químicos eram de grau analítico: acetato de amônio (Merck<sup>®</sup>); dietilamina (Fluka<sup>®</sup>); ácido fórmico 99% (Acros Organics<sup>®</sup>) e CO<sub>2</sub> de grau N48 a Air Liquide (Liege, Bélgica<sup>®</sup>).

### **5.9.2. Método**

O ensaio foi realizado usando um gradiente de eluição com a fase móvel A: CO<sub>2</sub> e B: uma mistura ternária de 70: 25: 5 metanol: etanol: água *v/v/v*. O gradiente iniciou com 1 minuto 60:40 A: B *v/v* para reter o ERTM seguido de rampa linear de 20 min a 35:65 A: B *v/v*. Esta composição permaneceu 4 minutos e depois voltou às condições iniciais durante mais 5 minutos. O volume da injeção foi de 5  $\mu\text{L}$ , as soluções foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de serem injetadas. A vazão foi de 1 mL min<sup>-1</sup>, usando detector UV a 230 nm, em temperatura de 20 °C. O regulador de contrapressão foi ajustado em 17,5 MPa (175 Bar). Este método foi conduzido no Departamento de Química Orgânica e Macromolecular na Faculdade de Ciências da Universidade de Gante.

#### **5.9.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR**

Uma solução estoque foi preparada transferindo 50 mg de ERTM SQR (descritos no item 4.1.), para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com água purificada para a obtenção de solução com concentração de 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas de 1 mL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com a água purificada para obtenção da concentração de trabalho de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **5.9.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola, com peso médio de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em um recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, massa equivalente a 50 mg de ERTM SQR foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com água purificada para a obtenção de solução com concentração de 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas de 1 mL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com a água purificada para obtenção da concentração de trabalho de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **5.9.2.3. Preparo da fase móvel**

As fases móveis foram constituídas por proporções de metanol, etanol de grau CLAE e água purificada, estes solventes foram filtrados em membrana filtrante de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), sob vácuo e desgaseificados no banho de ultrassom 2510E-MT (Branson<sup>®</sup>) durante 30 minutos antes do uso. O CO<sub>2</sub> de grau N48 (Liege, Bélgica<sup>®</sup>) foi liberado por tubulações conectadas ao equipamento e a sua vazão foi controlada pela bomba de fornecimento de CO<sub>2</sub> - Jasco PU-2080-CO2-plus.

### **5.9.3. Resultados e discussão**

Um pré-requisito óbvio para a análise de uma substância por CFS é ter solubilidade suficiente no meio supercrítico. Embora esta característica possa muitas vezes ser aumentada pela adição de um modificador orgânico, isto leva a uma deterioração considerável das propriedades cinéticas favoráveis do dióxido de carbono supercrítico quando o teor de modificador excede 20% (STEUER; BAUMANN; ERNI, 1990). De modo geral em CFS, sugere-se que a substância de interesse deve ter uma solubilidade de pelo menos 1 mg mL<sup>-1</sup> no solvente orgânico para ser passível de separação (ANTON; SIFFRIN, 1999; WEST, 2013).

Essa era até então, uma limitação da técnica para muitas aplicações farmacêuticas, já que a grande maioria dos fármacos são moléculas polares. No entanto, alguns trabalhos publicados na literatura demonstraram que é possível separar substâncias de alta polaridade, fazendo injeções direta de amostras aquosas (GYLLENHAAL, 2006, MUKHERJEE; COOK, 2006), bem como, usar uma pequena porcentagem de água como aditivo e/ou co-solvente na fase móvel (GEISER et al., 1988; ENGELHARDT et al., 1989; FRANCE et al., 1991; PYO, JU, 1994, GYLLENHAAL, 2006, MUKHERJEE; COOK, 2006; ZHENG et al., 2006b; PEREIRA et al., 2010; PHILIBERT; OLESIK, 2011; DISPAS et al., 2012; PUENTE et al., 2012, PYO, 2008; PATEL et al., 2012, 2014; MURAKAMI; THURBIDE, 2015).

Estas possibilidades foram avaliadas experimentalmente e os resultados apresentaram ora divergentes, ora condizentes com a literatura, para análise de ERTM, que é uma substância polar. Estes resultados são discutidos ao decorrer do texto sempre fazendo analogia à literatura disponível quando possível.

Ensaio preliminares foram realizados para avaliar os parâmetros e desenvolver um método confiável. O uso de água em CFS deve ser usado com cautela devido à baixa miscibilidade com CO<sub>2</sub>. Amostras aquosas foram injetadas diretamente no equipamento e foram comparadas com soluções em que uma solução estoque foi preparada em água e diluída para a mesma concentração em metanol. O diluente escolhido foi a água devido a melhor solubilidade do fármaco neste solvente.

As colunas mais comumente usadas em CFS são as colunas constituídas de sílica pura sem qualquer ligante assim como no modo de eluição por CIH. A fase móvel constituída de etanol e CO<sub>2</sub> para o uso em CIH tem sido descrita na literatura para a separação de nucleobases com o mesmo desempenho da fase móvel composta por acetonitrila e água (PEREIRA et al., 2010). Fase móvel constituída de álcool: água, com a adição de CO<sub>2</sub> pode melhorar significativamente o desempenho cromatográfico e além disso, tanto o CO<sub>2</sub> como álcool são considerados amigos do ambiente (OLESIK, 2015). Com isso, CFS-CIH tem se mostrado um novo nicho para aplicações, não só para separação de analito polares e ionizáveis como também, para a separação de substâncias quirais, biomarcadores e metabólitos (TAYLOR, 2013).

O modo de eluição CFS-CIH foi investigado neste trabalho para a avaliação de ertapenem sódio. As colunas usadas foram Kinetex CIH 100 A 100 x 4,6 mm, 2,6 µm Phenomenex<sup>®</sup> e Poroshell 120 CIH T3 100 x 3,0 mm, 2,7 µm Agilent<sup>®</sup>. Diferentes proporções de CO<sub>2</sub> e metanol combinados em diferentes tipos de gradientes foram testados, mas não houve retenção adequada em ambas as colunas.

As fases estacionárias usadas tradicionalmente em CIH como triazol ou amida, as fases estacionárias de sílica ligada concebidas para a fase normal CLAE como aminopropil, cianopropil, diol, bem como, as fases estacionárias C<sub>18</sub> com grupos polares incorporados ou grupos de bloqueio da extremidade hidrofílicos, podem ser usadas em CFS, a fim de permitir a retenção de substâncias polares (ASHRAF-KHORASSANI; TAYLOR; SEEST, 2012; ASHRAF-KHORASSANI; TAYLOR, 2010; BRUNELLI et al., 2008a; LESELLIER; WEST, 2015; PATEL et al., 2012; TAYLOR, 2013; WANG; ASHRAF-KHORASSANI; TAYLOR, 2003; WEST; LESELLIER, 2006; WEST, 2013; ZHENG et al., 2006b).

Assim como em CLAE, a fase estacionária é de extrema importância para garantir a seletividade em CFS. Diferentes fases estacionárias aplicadas em CFS foram desenvolvidas ao

longo dos anos, mas as fases estacionárias de sílica nua (*bare silica*) continuam sendo uma excelente escolha para CFS. Além disso, todas as colunas de CLAE também podem ser usadas em CFS, propiciando ao analista uma vasta gama de opções de colunas (BRUNELLI et al., 2010).

A coluna etilpiridina é sem dúvida uma das fases favoritas em CFS e tem ganhado popularidade para aplicações farmacêuticas (BRUNELLI et al., 2009, 2008b; CAZENAVE-GASSIOT et al., 2009; DISPAS et al., 2012; PERIAT et al., 2013). Segundo ZHENG et al. (2006) é provável que nas fases estacionárias contendo ligantes básicos, tais como aminopropil e etilpiridina, a fase móvel apresente características iônicas devido à reação da mistura de álcool com o dióxido de carbono (ZHENG et al., 2006a). Com o passar dos anos, os fornecedores estão mais comprometidos com o avanço da tecnologia e novas colunas cromatográficas voltadas para CFS têm sido desenvolvidas.

Além das fases estacionárias já mencionadas, testadas no modo de eluição CIH, foram avaliadas colunas comumente usadas em cromatografia em fase reversa que teoricamente apresentam características favoráveis para a retenção da substância polar em estudo, tais como: XSelect HSS T3 150 x 4,6 mm, 5 µm Waters®; Zorbax Bonus – RP 150 x 4,6 mm, 5 µm Agilent®; Zorbax SB-Aq 150 x 4,6 mm, 5 µm Agilent®; XBridge Phenyl 100 x 4,6 mm, 3,5 µm Waters®; Luna C<sub>18</sub> 100 A 50 x 4,6 mm, 5 µm Phenomenex®; Gemini C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm, 5 µm Phenomenex®. As fases estacionárias tipicamente usadas em cromatografia em fluido supercrítico também foram avaliadas: Ciano 60 A 250 x 2,0 mm, 5 µm Princetom®; Amino 60 A 150 x 3,0 mm, 5 µm Princetom®; Diol 60 A 250 x 4,6 mm, 5 µm Princetom®; DPN 100 A 250 x 4,6 mm, 5 µm Princetom®; PPU 100 A 250 x 4,6 mm, 5 µm Princetom®; Pyridine 60 A 250 x 4,6 mm, 3 µm Princetom®; 2-ethylpyridine 60 A 250 x 4,6 mm, 3 µm Princetom®; ProntoSil 120-5-Pyridine 250 x 4,6 mm, 5 µm Bischoff®.

Dentre as fases estacionárias acima citadas, a coluna XSelect HSS e a XBridge phenyl não apresentaram retenção adequada; na coluna DPN ocorreu forte retenção e devido a isso formou cauda no pico cromatográfico. Retenção irreversível da substância ocorreu nas colunas ciano e amino, sendo necessário uma intensiva lavagem da coluna para sua regeneração. Todas as outras colunas demonstraram alguma retenção. Os dois melhores resultados encontrados foram com as colunas 2-ethylpyridine Princetom® e a coluna ProntoSil 120-5-Pyridine. Dentre estas fases estacionárias, a coluna ProntoSil 120-5-Pyridine foi a escolhida por ter maior tamanho e partícula e com isso apresentar melhor linha de base.

É verdade que o nível de ruído é maior em CFS, isso ocorre devido a alterações de índice de refração relacionada à densidade do fluido supercrítico altamente compressíveis (STEUER;

BAUMANN; ERNI, 1990). Por algum tempo, métodos usando gradiente de eluição em CFS foram desencorajados, por que a dinâmica mistura de CO<sub>2</sub> supercrítico com um modificador orgânico gera frequentemente à instabilidade da linha de base e à irreprodutibilidade do processo de mistura (BRUNELLI et al., 2009).

Além disso, a técnica de CFS mostrou ser muito menos sensível do que CLAE. No entanto, para o controle qualidade do ingrediente farmacêutico ativo na formulação farmacêutica a sensibilidade não é uma questão importante porque a concentração alvo pode ser fixado de acordo com a sensibilidade da técnica (DISPAS et al., 2014).

O ERTM é uma molécula que está geralmente ionizada, pois apresenta pKa ácidos, básicos e anfóteros, sendo assim, diferentes tipos de aditivos foram avaliados: ácido fórmico de 0,1 a 0,3%; dietilamina 0,1 %; formiato de amônio preparado diretamente em metanol; acetado de amônio 10 mM preparado diretamente em metanol e preparado em 10 mL de água e reconstituído em quantidade suficiente para 1000 mL de metanol. No entanto, dependendo do comprimento de onda usado, os aditivos de fase móvel podem ser detectados causando distúrbio da linha de base, o que interferem negativamente para visualização dos picos cromatográficos. Além disso, os aditivos testados não foram capazes de promover melhorias significativas e por isso foram dispensados.

A água também vem sendo usada como um aditivo, apesar da sua miscibilidade limitada em CO<sub>2</sub>. Não há um consenso da quantidade máxima de água que pode ser usada na composição da fase móvel em CFS. Enquanto que para uns a proporção de água na fase móvel deve ser o suficiente para melhorar a forma do pico (de 0,5 a 5%), para outros pode variar entre 0,1 a 10%. Na eluição de substâncias altamente polares proporções de água de 5 a 30% foram usadas (WEST, 2013).

Contudo, a água deve ser usada com cautela em CFS. Proporções de 5%, 10% e 15% de água foram testadas no método e verificou-se que até 10% de água pode ser usado para a obtenção de melhor resolução do pico cromatográfico. No percentual de 15% de água levou à formação de artefatos espúrios e um alto sinal de pressão independente da concentração do analito, o que pode ser devido à imiscibilidade de água na presença de CO<sub>2</sub>.

Apesar de o etanol ser frequentemente preferido em relação ao metanol pela sua natureza considerada ainda mais verde, o ERTM não é solúvel neste solvente, o que limitou o seu uso na fase móvel constituída apenas em CO<sub>2</sub> e etanol para este caso em específico. A fase móvel metanol e CO<sub>2</sub> e pequenas proporções de água como aditivo é considerada ideal para promover a separação de substâncias polares, no entanto neste trabalho os picos cromatográficos não apresentaram a resolução desejada. Enquanto que, a fase móvel etanol e

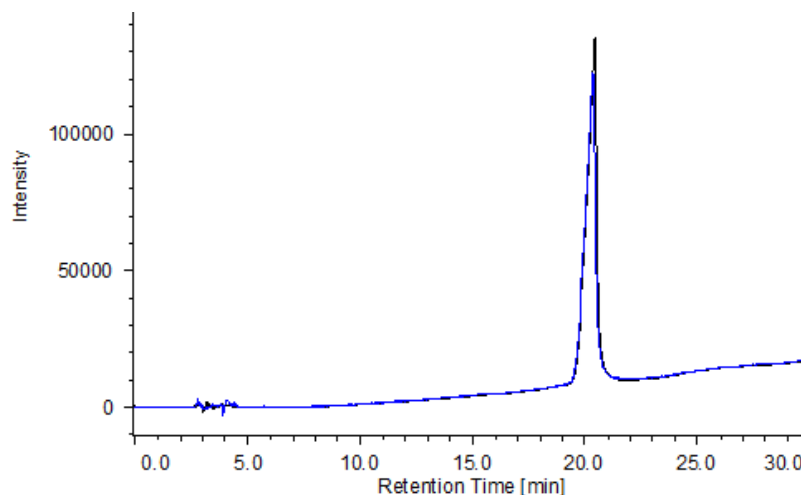
CO<sub>2</sub> e pequenas proporções de água apresentou picos cromatográficos com excelente resolução e número de pratos, mas o *cutoff* do etanol (210 nm) é um pouco mais alto do que o do metanol (205 nm) e devido a isso a linha de base é apresentada como uma rampa proporcional ao gradiente de eluição.

Com isso, uma mistura ternária de metanol:etanol:água (65: 30: 5 v/v/v) foi a combinação perfeita como solvente de arraste para a obtenção de resultados adequados. Diferentes gradientes foram testados a fim de se obter boa seletividade. O gradiente sugerido iniciou com 1 minuto de A:B 60:40 (v/v) para reter o ERTM, sendo A: CO<sub>2</sub> e B: mistura ternária de metanol:etanol:água (65: 30: 5 v/v/v) seguido de rampa linear de 20 min até a obtenção de A: B 35:65 (v/v), que é a quantidade de solvente orgânico suficiente para eluição de todas as substâncias; o gradiente de eluição permaneceu nesta composição por 4 minutos para lavagem da coluna e então retornou às condições iniciais, onde permaneceu mais 5 minutos para estabilização da coluna e preparo para próxima injeção.

Diferentes temperaturas foram avaliadas na faixa de 20 a 70 °C. O aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel e com isso menor pressão é alcançada. No entanto o aumento da temperatura influencia negativamente na intensidade do pico cromatográfico, o que corrobora com a menção de Anton, Bach e Geiser, (1991) que descreve que substâncias polares podem ser analisadas a alta concentração de modificador orgânico, alta densidade e baixa temperatura (ANTON; BACH; GEISER, 1991).

A contrapressão também foi avaliada para o desenvolvimento do método, o regulador de contrapressão foi programado em 100, 150 e 175 bars. A pressão escolhida para se obter melhor seletividade entre os possíveis produtos de degradação foi 175 bars. Com isso, o método foi desenvolvido e o tempo de retenção para ERTM foi de 21 minutos. Os cromatogramas de ERTM SQR e ERTM pó liofilizado para solução injetável foram analisados sob a mesma concentração e foram comparados (Figura 21).

**Figura 21-** Cromatogramas sobrepostos de ERTM SQR (preto) e de ERTM pó liofilizado para solução injetável (azul), ambos na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; fase móvel A:  $\text{CO}_2$  e B: mistura ternária de 65: 30: 5 metanol:etanol:água v/v/v, sob gradiente de eluição; fase estacionária: ProntoSil 120-5-Pyridine 4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  Bischoff®; método de CFS.



### 5.9.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico

O teste de conformidade do sistema cromatográfico foi conduzido para avaliar a reprodutibilidade do método. Foram preparadas e analisadas dez soluções de ERTM SQR na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os parâmetros como área de pico, tempo de retenção ( $t_R$ ), número de pratos (N) e desvio padrão relativo (DPR%) foram calculados e seu limite de aceitação foi analisado de acordo com a revisão dos parâmetros de aceitação para teste de conformidade do sistema cromatográfico proposta por Bose em 2014. Os resultados estão apresentados na Tabela 16 e ilustrados na Figura 22.

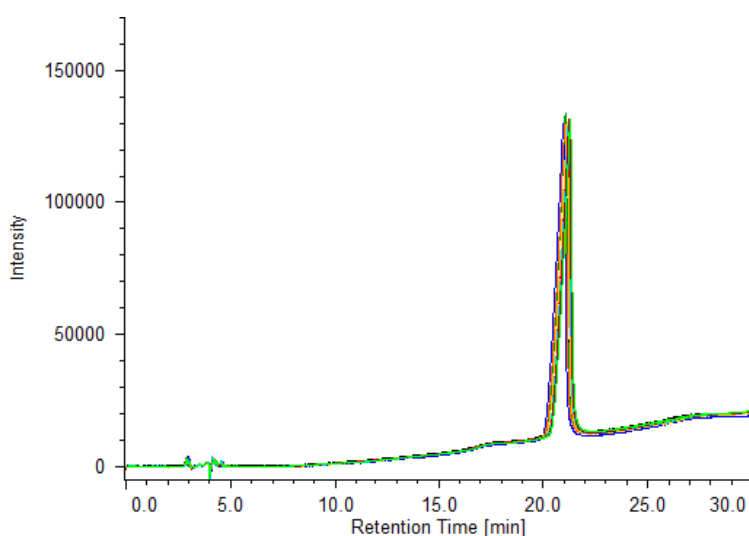
**Tabela 16 -** Conformidade do sistema, para determinação de ERTM por CFS

Parâmetros avaliados				
	$t_R$	Área	$k'$	N
	21,01	3859998	9,12	38452,60
	20,92	3857351	9,08	38123,86
	21,10	3797747	9,16	38782,74
	21,02	3838318	9,12	38489,21
	20,95	3744120	9,09	38233,28
	21,09	3780238	9,16	38745,99
	21,17	3709715	9,20	39040,49
	21,17	3738920	9,20	39040,49
	21,19	3750339	9,21	39114,29
	21,25	3722219	9,23	39336,11
Média	21,09	3779897	0,48	38735,91
DPR	0,52	1,48	0,58	1,04

DPR= Desvio padrão relativo

Os resultados do teste de conformidade do sistema cromatográfico foram consistentes com a literatura. Considera-se adequado o DPR menor que 2,0 % para a área do pico e tempo de retenção, o fator de retenção "k" inferior a 2 e o número dos pratos "N" acima de 2000 (BOSE, 2014). O teste indica que os parâmetros cromatográficos selecionados são capazes de quantificar o ERTM.

**Figura 22-** Conformidade do sistema - Sobreposição de dez cromatogramas ERTM em pó liofilizado para solução injetável em concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>.



Sabe-se que os laboratórios farmacêuticos dispõem de técnicas bem estabelecidas tais como, CLAE e CG para a separação de substância. Embora CLAE e CG atenderem a maioria das exigências e serem os métodos de escolha para esta finalidade, ambas têm algumas desvantagens e limitações. Por exemplo, a CLAE requer o uso de solventes orgânicos que podem ser tóxicos, caros, prejudiciais ao meio ambiente e pode requerer procedimentos especiais para sua eliminação segura. A CG é limitada a pequenas substâncias voláteis e termicamente estáveis (ABBOTT et al., 2008). A CFS apresenta uma eficiência muito menor do que em CG, mas geralmente mais do que em CLAE, com fases estacionárias idênticas, em vazões mais elevadas (WEST, 2013). A CFS é uma técnica de separação rápida que combina as propriedades de CLAE e CG com a vantagem de ser uma técnica economicamente viável e ambientalmente favorável (ABBOTT et al., 2008).

Em CFS, a densidade pode ser usada para alterar a seletividade rapidamente e de forma muito eficaz. Este efeito pode ser explorado pelo uso de gradientes de pressão, os quais podem ainda ser combinados com gradientes de modificadores orgânicos que permitem a simultânea separação de espécies polares e não polares (STEUER; BAUMANN; ERNI, 1990).



A CLAE é considerada o método mais versátil, mas a CFS possui mais possibilidades de modificação seletividade, sendo possível trabalhar com gradiente de fase móvel, gradiente de temperatura, gradiente de pressão de retorno, gradiente de vazão ou ainda uma combinação destes gradientes. A CFS apresenta como característica peculiar a sua seletividade única. O CO<sub>2</sub> aumenta a seletividade de modo que a separação pode ser acelerada (BRUNELLI et al., 2010). Em alguns casos, a CFS se sobressai à tradicional CLAE-FR, por apresentar uma vasta gama de fases estacionárias polares com diferentes seletividades, em que é possível obter ganhos de eficiência de picos semelhantes aos observados em cromatografia gasosa. Na CLAE-FR quase todo o trabalho é realizado numa variante de uma única fase estacionária (C<sub>18</sub>). Além disso, as separações em CFS podem ser executadas a velocidades de vazão muito mais elevadas do que na CLAE (TAYLOR, 2013).

Como uma técnica ortogonal, a CFS não está em competição com a consolidada técnica de CLAE, mas sim como um método adicional alternativo, a fim de aumentar as possibilidades de separação analítica para as diferentes substâncias. Assim sendo, este trabalho permitiu avaliar e propor um novo método de análise de ERTM no controle de qualidade.

### **5.10. ELETROFORESE CAPILAR**

A eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração de substâncias carregadas eletricamente, que estão presentes em um eletrólito dentro de um capilar de sílica fundida, ao qual um campo elétrico é aplicado. Esta técnica tem como diferencial a vantagem de se usar pequenas quantidades de amostras e reagentes, gerando pequenas quantidades de resíduos e conseqüentemente propiciando um menor custo quando comparada às técnicas convencionais de CLAE. Além disso, apresenta alta eficiência em baixo tempo de análise e na maioria das vezes não necessita de nenhum solvente orgânico, podendo ser enquadrada como uma técnica “verde” (ZHANG; ZHANG; LIU, 2013).

A sílica fundida na superfície interna do capilar apresenta um caráter fracamente ácido devido aos grupos silanóis (-SiOH), esses grupos encontram-se ionizados na presença de soluções aquosas tornando a superfície do capilar negativamente carregada. Quando um campo elétrico é aplicado, uma corrente de íons é gerada em direção ao eletrodo de carga oposta, gerando um fluxo eletrosmótico (FEO) em direção ao polo negativo (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A eletroforese capilar é uma técnica versátil que tem ampla aplicação, podendo ser usadas para separar diferentes tipos de molécula. Para isso, se dispõe de uma variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em um único capilar para separar diversas

substâncias. A eletroforese capilar de zona ou também conhecida como eletroforese de solução livre é o modo de operação mais utilizado. Em condições normais, o fluxo é proveniente do eletrodo de carga positiva para o eletrodo de carga negativa promovendo a separação de cátions, ânions e moléculas neutras em uma única corrida (TAVARES, 1997; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A limitação da técnica eletroforética em solução livre é a impossibilidade de separar várias moléculas neutras com massas moleculares semelhantes em uma mesma análise. Isso por que, as moléculas neutras são empurradas pelo fluxo eletrosmótico chegando ao detector no mesmo tempo de migração. Esse tipo de separação é possível usando a cromatografia eletrocínética micelar. Já a separação de moléculas de caráter iônico e alta massa molecular como proteínas e ácidos nucleicos pode ser feita por diferenças de tamanho relativo usando eletroforese capilar em gel (TAVARES, 1997). Esta é uma característica que difere a eletroforese das outras técnicas, pois o DNA humano envolve cerca de 3 bilhões de nucleotídeos e somente a eletroforese tem resolução suficiente para este tipo de separação associada à alta velocidade de análises, o que permite o sequenciamento de milhares de nucleotídeos em um único dia (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Na cromatografia eletrocínética os capilares são recheados com octadecilsilano ( $C_{18}$ ) assim como as colunas de CLAE e a separação é feita através do fluxo eletrosmótico ao longo do capilar. A técnica de isotacoforese capilar pode ser empregada tanto para moléculas catiônicas quanto para moléculas aniônicas, desde que separadamente. Nesta técnica a molécula é inserida entre dois eletrólitos heterogêneos cuja mobilidade iônica é criteriosamente selecionada, para os solutos básicos, o modo catiônico é o mais indicado, enquanto que o modo aniônico é recomendado para solutos ácidos (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). A eletroforese capilar por focalização isoelétrica limita-se à separação de substâncias anfotéricas em um gradiente de pH. Para gerar um gradiente de pH no interior do capilar é utilizada uma mistura de substâncias anfotéricas, contendo grupos ácidos e alcalinos (TAVARES, 1997).

As equações que descrevem os mecanismos de ação, difusão, resolução, eficiência, tempo de migração em eletroforese capilar são amplamente conhecidas e estão disponíveis na literatura (TAVARES, 1997; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). A técnica de eletroforese capilar tem sido sugerida para análise de rotina do controle de qualidade de fármacos na sua forma farmacêutica (AGUIAR; GAITANI; BORGES, 2011; FÜHR et al., 2013; MICHALSKA; PAJCHEL; TYSK, 2011; KOGAWA et al., 2014), com isso, um método por eletroforese capilar para avaliação de ERTM pó liofilizado para solução injetável é proposto.

### 5.10.1. Material

O método foi realizado em sistema de eletroforese capilar P/ACE<sup>®</sup>MDQ (Beckman Coulter<sup>®</sup>) com detector UV, capilar revestido de sílica fundida com diâmetro interno de 75 µm e comprimento efetivo de 30 cm. O eletrólito utilizado foi tampão fosfato de sódio 10 mM a pH 7 foi utilizado. A lavagem do capilar foi realizada com solução de NaOH nas concentrações de 1 M e 0,1 M, HCl 0,1 M, bem como água purificada obtida através de equipamento Milli-Q<sup>®</sup> Plus (Millipore<sup>®</sup>, EUA). Além disso, foram utilizados ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2., balança analítica modelo SECURA 2250-1S (Sartorius<sup>®</sup>, Goettingen, Alemanha). Os reagentes utilizados para a degradação foram ácido clorídrico 0,01 M (Qhemis<sup>®</sup>), hidróxido de sódio 0,01 M (Cinética<sup>®</sup>) e peróxido de hidrogênio 0,03 % (Vetec<sup>®</sup>). Todas as soluções foram filtradas em membrana de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>) e foram desgaseificadas em banho ultrassônico modelo 2510E-MT (Branson<sup>®</sup>, Danbury, EUA).

### 5.10.2. Método

O método de eletroforese capilar foi realizado usando solução tamponante de fosfato de sódio 10 mM a pH 7 como eletrólito; previamente a cada análise o capilar foi lavado com esse eletrólito por 2 min. As análises foram realizadas usando 15 kV de voltagem e tempo de injeção de 5 segundos. A temperatura do cartucho foi de 25 °C e o comprimento de onda do detector foi ajustado em 214 nm. As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C). A solução diluente, o eletrólito, as soluções usadas para promover a degradação, bem como, os adjuvantes hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio nas proporções equivalentes às da forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável INVANZ<sup>®</sup> do Laboratório Farmacêutico Merck Sharp & Dohme, foram avaliadas como “branco” ou seja, solução sem qualquer vestígio de ERTM para avaliar possíveis picos interferentes durante a análise. O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes BRASIL (2003) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão. Este método foi conduzido no Laboratório do Grupo de Pesquisa de Análise Farmacêutica na Universidade KU Lovaina, na Bélgica.

#### 5.10.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR

Foi pesada a massa de 10 mg de ERTM SQR (descritos no item 4.1.) e transferida para balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com a água purificada para a obtenção

de solução com concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 70, 80, 90, 100, 110 e  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **5.10.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola, cujo peso médio foi de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, massa equivalente a 10 mg de ERTM foi pesada e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, para a obtenção de solução com concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 70, 80, 90, 100, 110 e  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **5.10.2.3. Preparo do eletrólito**

Para o preparo da solução tamponante fosfato de potássio 10 mM pH 7, 136 mg de fosfato de potássio dibásico e 40 mg de fosfato de potássio monobásico foram dissolvidos em água purificada suficiente para 100 mL. Quando necessário, o pH foi ajustado para 7 usando ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M como o recomendado pela FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010).

### **5.10.3. Resultados e discussão**

Ensaio preliminares foram realizados para avaliar os parâmetros que associados proporcionassem um método confiável. A definição do comprimento do capilar é importante, uma vez que a mobilidade e o tempo de migração são definidos pelo comprimento efetivo (o comprimento do ponto de injeção até ponto de detecção), enquanto que campo elétrico é definido pelo comprimento total. Optou-se por trabalhar inicialmente com capilar de 40 cm de comprimento total e 30 cm de comprimento efetivo, caso necessário, esse comprimento poderia ser ajustado, no entanto esse comprimento foi adequado.

Diferentes soluções tamponantes, em diferente pHs foram testados como eletrólito. De forma geral, os sistemas tamponantes são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao pKa, mais ou menos em uma unidade. Com isso, algumas opções de soluções tamponantes foram cogitadas a serem testadas como eletrólito. Essas condições estão apresentadas na Tabela 17.

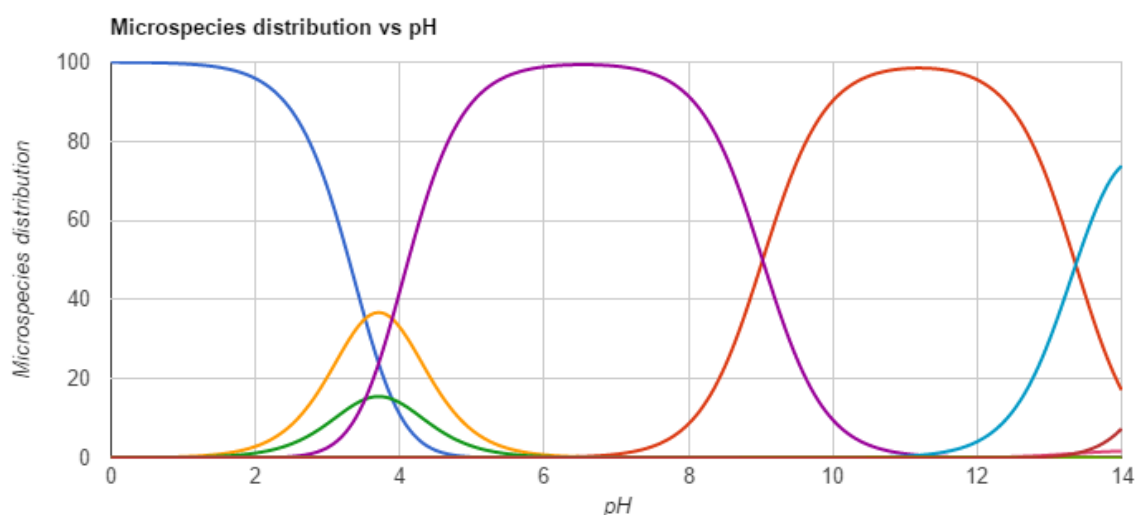
**Tabela 17** - Intervalo de pH em que as soluções tamponantes são eficientes de acordo com seu pKa

Eletrólito	pKa	Eficiência - Faixa de pH
Acetato	4,76	3,76 – 5,76
Borato	9,24	8,24 – 10,24
Citrato	4,10	3,10 – 5,10
Fosfato	2,12	1,12 – 3,12
	7,21	6,21 – 8,21

Em capilares de sílica fundida, o pH de trabalho pode variar de 2 e 11, no entanto, deve-se ainda levar em consideração a estabilidade da molécula nessa faixa de pH e o seu pKa para então, escolher o eletrólito adequado. Isso por que, quando a separação envolve moléculas com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética da molécula depende do pH do eletrólito. Neste caso, o termo mobilidade efetiva, o qual incorpora o produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH deve ser considerada.

Assim sendo, o controle do pH é aconselhável e a escolha de uma solução tamponante adequada tem implicações diretas na otimização da separação. Dessa forma, usou-se o *software* online *Chemicalize* para avaliar a distribuição de microespécies *versus* pH e assim definir o eletrólito que esteja na melhor faixa de pH a ser usada (Figura 23).

**Figura 23** - Esquema de apresentação da microespécies *versus* pH para ERTM segundo a plataforma *online Chemicalize*.



Na análise de microespécies em cada pH para ERTM verificou-se que a possibilidade de trabalhar em pH em torno de 7 ou 11. Por isso, as soluções tamponantes de fosfato e borato foram escolhidas para os testes iniciais.

O tampão borato é um dos mais usados em eletroforese capilar; é preferido por possuir íons grandes, de baixa mobilidade e pode ser usado em altas concentrações, sem a desvantagem de gerar calor excessivo. Entretanto, apresenta a inconveniência de absorver mais na região do UV em comparação ao tampão fosfato. Além disso, não é aconselhado usar um eletrólito com pH próximo ao pH de trabalho limite, para preservar o capilar e garantir a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que, pH altamente alcalinos promovem a dissolução da sílica presente no capilar. Com isso, o tampão borato pH 10 e o tampão fosfato pH 7 foram os escolhidos para a análise de ERTM.

Como era esperado, o eletroferograma de ERTM usando o tampão borato pH 10 apresentou bandas distorcidas, com cauda frontal provavelmente por que a mobilidade do ânion da molécula é diferente da mobilidade do ânion do eletrólito. O tampão fosfato apresentou um pico simétrico e por isso foi escolhido para o desenvolvimento do método.

A alta concentração do eletrólito e a voltagem aplicada podem comprometer a separação pelo excesso de calor decorrente do efeito de Joule. O aquecimento de Joule consiste na formação de um gradiente de temperatura que gera uma corrente dentro do capilar causando a mistura das bandas já separadas e resultando na dispersão do pico. Este efeito pode ser minimizado pela aplicação de voltagens adequadas e uso de soluções tamponantes com concentração mais baixa, aliado a um bom controle de temperatura. No entanto, soluções tamponantes com baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção das moléculas na parede do capilar, ocasionando alargamento e distorção dos picos no eletroferograma. Além disso, em baixas concentrações, o fluxo eletrosmótico pode se tornar errático, o que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração e conseqüentemente prejudica a identificação e quantificação da substância em análise. A alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos altos, pois gera um aquecimento mínimo, além disso, o formato de capilar propicia uma dissipação eficiente do calor gerado. A vantagem de se usar voltagens elevadas é um ganho de resolução e eficiência, assim como a diminuição do tempo de análise (TAVARES, 1997).

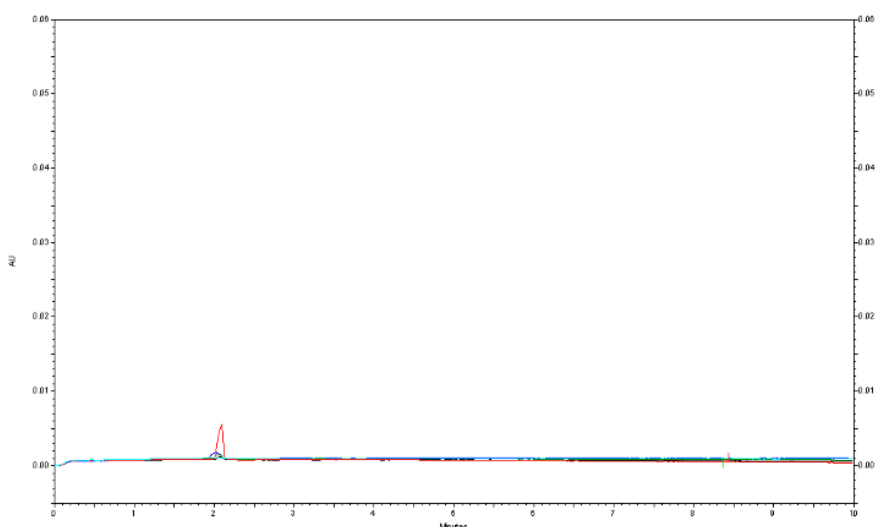
A concentração do eletrólito e a voltagem do equipamento foram ajustadas a fim se obter uma corrente não superior a 50  $\mu\text{A}$ , faixa em que o equipamento foi previamente validado para uso, embora teoricamente tenha capacidade para trabalhar em até 300  $\mu\text{A}$ . Com isso, a concentração do tampão fosfato foi definida em 10 mM com a voltagem de 15 kV. A temperatura no cartucho contendo o capilar foi controlada a 25 °C.

O fluxo eletrosmótico (FEO) é altamente dependente do pH do eletrólito. A parede do capilar de sílica contém grupos silanóis que são altamente ionizados quando em contato com

soluções de pH altos, gerando uma superfície carregada negativamente. A fim de manter a eletro neutralidade, uma camada de cátions se aproxima e então, uma dupla camada é formada na parede do capilar. Isto gera uma diferença de potencial muito próxima à parede que é conhecido como potencial zeta. Quando uma diferença de potencial é aplicada, o movimento de íons resulta no movimento das espécies em direção ao detector. Abaixo de pH 4, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o FEO não é significativo, enquanto que acima de pH 9 os silanóis ficam completamente ionizados e portanto o FEO é alto. O potencial zeta é também dependente da força iônica da solução tampão, um aumento da força iônica resulta na compressão da dupla camada e consequentemente uma redução do FEO (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

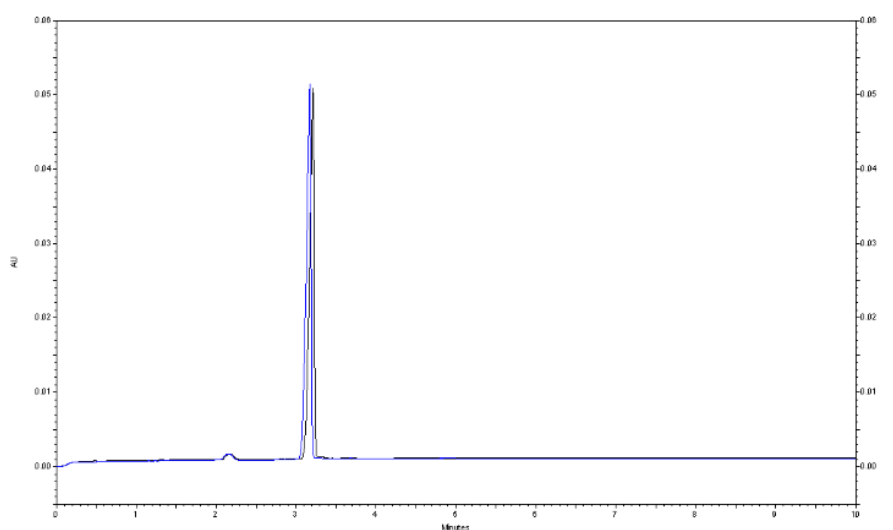
O FEO pode apresentar um pico no eletroferograma no tempo de migração “morto”, isso pode ser verificado utilizando um marcador neutro como dimetilsulfóxido, acetona ou por uma “solução branco” como o próprio eletrólito. Os adjuvantes hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio, bem como as soluções usadas para promover a degradação do fármaco e o eletrólito sem qualquer vestígio de ERTM foram avaliados como “branco” para verificar o tempo de migração “morto” e avaliar quaisquer outros possíveis picos interferentes durante a análise. Deste modo, verificou-se que o FEO apresenta uma pequena oscilação da linha de base em 2 min, tempo em que as soluções degradantes apresentam um pequeno pico no eletroferograma, o pico mais significativo apresentado em vermelho no eletroferograma da Figura 24 corresponde à solução peróxido em hidrogênio 0,3% usada para promover a degradação forçada do fármaco em análise.

**Figura 24-** Eletroferograma do eletrólito, adjuvantes e soluções degradantes sem quaisquer vestígios de ERTM



Desta forma, verificou-se que não há nenhuma interferência das soluções degradantes e/ ou dos adjuvantes contidos na forma farmacêutica para a quantificação de ERTM pelo o método proposto, já que o tempo de migração de ERTM é de 3,2 min. A análise qualitativa realizada pela comparação dos eletroferogramas de ERTM SQR *versus* ERTM pó liofilizado para solução injetável, apresentaram o mesmo tempo de migração Figura 25.

**Figura 25** – Eletroferogramas sobrepostos de ERTM SQR (azul) *versus* ERTM pó liofilizado para solução injetável (preto)



#### 5.10.3.1. Conformidade do sistema eletroferográfico

A conformidade do sistema eletroferográfico foi verificada pela replicata de dez soluções de ERTM SQR na concentração de trabalho de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os parâmetros tais como fator de retenção, número de pratos, tempo de retenção e a área do pico foram avaliados de acordo com item 3.9.1. anteriormente descrito.

Na Tabela 18 encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros, fator de retenção e número de pratos, bem como área e tempo de retenção apresentado para ERTM.



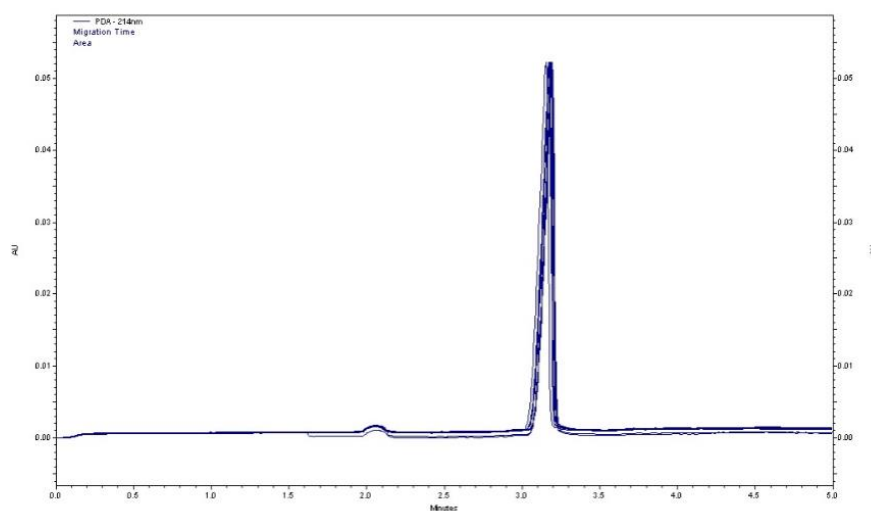
**Tabela 18** - Parâmetros avaliados na análise de conformidade do sistema, para determinação de ERTM por eletroforese capilar

	Área	Tempo de Retenção - $t_r$ (min)	Fator de Retenção - $k'$ (> 2,0)	Número de Pratos - N (> 2000)
1	200747	3,17	3,17	11120
2	206731	3,20	3,20	10947
3	206201	3,19	3,19	11045
4	205646	3,19	3,19	10895
5	203986	3,19	3,19	10824
6	205936	3,21	3,21	10624
7	207729	3,23	3,23	10537
8	200253	3,23	3,23	11046
9	205686	3,23	3,23	10782
10	204768	3,20	3,20	10868
Média	204768	3,20	3,20	10868
DPR	1,21	0,64	0,64	1,71

DPR= Desvio padrão relativo

Os dez eletroferogramas usados na avaliação da conformidade do sistema para ERTM foram sobrepostos e estão apresentados Figura 26.

**Figura 26** - Eletroferogramas de ERTM SQR 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobrepostos, para determinação da conformidade do sistema do método de eletroforese capilar.



Assim como a cromatografia a eletroforese capilar é uma técnica de separação que pode ser usada para uma ampla gama de substâncias. Embora não seja tão usada como as técnicas cromatográficas, a eletroforese capilar se destaca devido ao alto poder de separação com pequenas quantidades de amostra e reagentes, gerar pouco resíduos, baixa toxicidade, além de ter baixo custo por análise e reduzido tempo de análise quando comparado a CLAE. Apesar

disso, ainda hoje a eletroforese capilar não é amplamente aceita na indústria como um método analítico de rotina, sendo mais aceita no meio acadêmico que sugere a técnica como uma técnica de separação complementar às técnicas convencionais.

## 6. ANÁLISE QUANTITATIVA

### 6.1. Espectrofotometria na região do infravermelho

A técnica de identificação de substâncias por espectrofotometria no infravermelho médio é considerada um ensaio de identificação por excelência, visto que é capaz de distinguir substâncias semelhantes, com pequenas diferenças estruturais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A radiação infravermelha é a porção situada entre as regiões do visível e das micro-ondas no espectro eletromagnético, e se divide em três regiões próximo, médio e distante. No entanto, a região vibracional do infravermelho médio, entre  $400\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$  é a mais utilizada para fins de identificação de substâncias (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PAVIA et al., 2010).

A espectrofotometria no infravermelho é fundamentada na absorção de luz gerada pela energia dos níveis vibracionais das ligações químicas da molécula. Ao incidir um feixe de radiação infravermelha pela amostra, a quantidade de energia absorvida em cada comprimento de onda é registrada e um espectro é construído, com "número de onda" em  $\text{cm}^{-1}$  no eixo horizontal e transmitância em % no eixo vertical. Como as bandas apresentadas nesse espectro estão associadas a frequências vibracionais da molécula ao serem analisadas, informações importantes podem ser concluídas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

Esta técnica, que há muitos anos vem sendo usada para identificação de substâncias, atualmente também é empregada com sucesso para a quantificação de substâncias, e já é reconhecida mundialmente pelas suas inúmeras vantagens que a tornam em destaque nos dias atuais. Isso por que se trata de uma técnica ecologicamente amigável, ou seja, não utiliza solventes orgânicos que são considerados grandes vilões para o meio ambiente, as amostras em pó são geralmente preparadas em moldes de pastilhas de KBr e, desta maneira, não geram resíduos. Com isso, alia-se os benefícios para o meio ambiente, com a economia para a indústria relacionada aos custos com solventes e reagentes, além de se diminuir a quantidade de efluentes gerados para serem tratados. Além disso, apresenta inúmeras vantagens em relação a outros métodos físico-químicos, tais como, não necessitar de extração da amostra, ser apropriada para fármacos de baixa solubilidade, e possuir curto tempo de análise (MORENO; SALGADO, 2012a).

São poucos os trabalhos que usam a região do infravermelho médio para a quantificação de substâncias (MATKOVIC et al., 2004; FAROUK; MOUSSA; AZZAZY, 2011; SHERAZI; ALI; MAHESAR, 2011; MORENO; SALGADO, 2012a; TÓTOLI; SALGADO, 2012; VIEIRA; SALGADO, 2012). Alguns trabalhos na literatura usam a região do infravermelho

próximo para essa finalidade (CHONG et al., 2009; DONG et al., 2011; FONTEYNE et al., 2014; PORFIRE et al., 2015).

Não foi encontrado na literatura, até o momento, artigos com método de análise para quantificação de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho. Com isso, este trabalho vem propor um método analítico para quantificação de ERTM em pó para solução injetável por espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier para contribuir para que essa técnica possa ser utilizada em análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

### **6.1.1. Material**

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu® (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, brometo de potássio – KBr grau analítico Synth® (São Paulo, Brasil) e estufa modelo 702.780 (Quimis®, SP, Brasil). O ERTM SQR e o ERTM em pó liofilizado para solução injetável utilizados foram descritos nos itens 4.1. e 4.2.

### **6.1.2. Método**

O ERTM SQR foi previamente dessecado por 1 h a 105 °C, bem como, KBr pulverizado, ambos foram pesados e misturados em um gral de ágata, onde foram triturados e posteriormente acondicionados em um molde especial, no qual foram prensados a vácuo sob pressão de 80 kN, formando discos transparentes. O mesmo procedimento foi realizado para ERTM em pó liofilizado para solução injetável. A leitura da pastilha de KBr contendo o fármaco foi realizada em transmitância no espectrofotômetro Shimadzu, com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, na região espectral compreendida entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com intervalos de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Após a análise dos espectros obtidos, a banda referente à carbonila da molécula de ERTM, na região espectral compreendida entre 1720 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , foi selecionada com auxílio do *software IR Solution* para a análise quantitativa.

#### **6.1.2.1. Preparo das pastilhas de ERTM SQR**

Foram tomadas massas de pó de 1 mg de ERTM (100 mg da diluição 1:100 em KBr) e devidamente homogeneizadas com 100 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 200 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

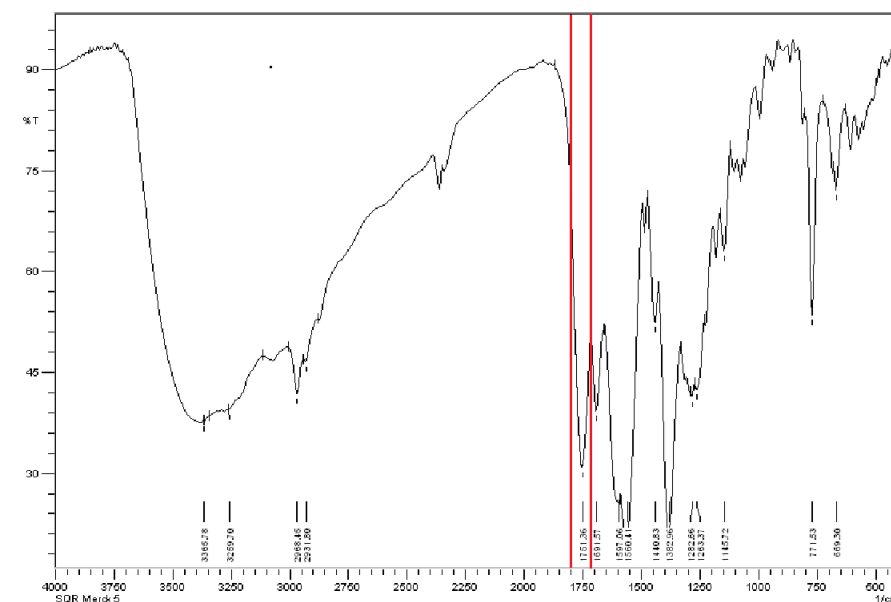
### 6.1.2.2. Preparo das pastilhas de ERTM em pó liofilizado para solução injetável

Os conteúdos de cinco frascos-ampola de ERTM em pó para solução injetável foram misturados. Desta mistura, foram tomadas massas de pó equivalentes a 1 mg de ERTM (100,0 mg da diluição 1:100 em KBr) e devidamente homogeneizadas com 100 mg de brometo de potássio, perfazendo massa total da pastilha de 200 mg. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

### 6.1.3. Resultados e discussão

O espectro de absorção no infravermelho típico de ERTM e seus adjuvantes foi anteriormente apresentado e discutido no item 5.6. A análise qualitativa demonstrou que os espectros de ERTM SQR e ERTM pó liofilizado para solução injetável são condizentes e que os adjuvantes presentes na amostra na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável não interfere na quantificação de ERTM desde que a banda referente à carbonila da molécula na região espectral compreendida entre 1720 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , seja selecionada para a quantificação. Esta banda teve sua altura quantificada em termos de absorvância (Figura 27).

**Figura 27-** Espectro de absorção por infravermelho de ERTM SQR com a delimitação da região espectral compreendida na análise quantitativa



### 6.1.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável

A concentração de ERTM na amostra e o seu teor percentual foi calculado a partir da quantificação da altura da banda, em termos de absorvância referente à carbonila da molécula na região espectral compreendida entre 1720 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Para isso, usou-se as Equações 6 e 7,

anteriormente descritas no item 3.9.2. O doseamento de ERTM substância química de referência *versus* amostra na forma farmacêutica foi realizado em triplicata decorrente de três dias consecutivos. O teor médio encontrado foi de 100,83 % e o DPR 1,17 %.

#### **6.1.3.2. Validação do método**

O método foi validado pela determinação dos parâmetros de linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (ICH, 2005; USP 38, 2015; BRASIL, 2017) e apresentado no item 3.9.

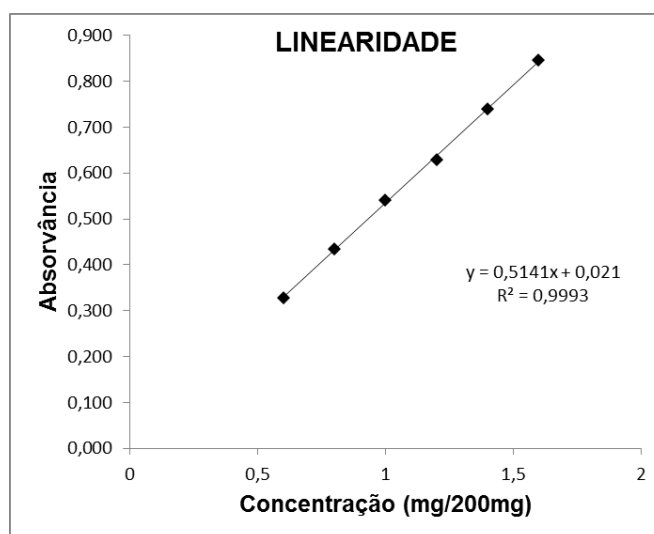
##### **6.1.3.2.1. Linearidade**

Para verificar a linearidade do método, pastilhas de KBr na concentração de 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 e 1,6 mg de ERTM SQR foram confeccionadas. Massas equivalentes a 60, 80, 100, 120, 140 e 160 mg de ERTM SQR previamente diluída em brometo de potássio a 1:100 p/p, foram pesadas e diluídas em brometo de potássio suficiente para a obtenção de pastilhas de 200 mg. Os pós referentes a cada concentração foram misturados e triturados até a obtenção de uma mistura homogênea. Posteriormente, foram acondicionados em um molde especial e pastilhas em uma prensa mecânica a vácuo sob pressão de 80 kN por 10 minutos, para formar discos translúcidos transparentes. Por fim, foram submetidos à leitura no espectrofotômetro Shimadzu.

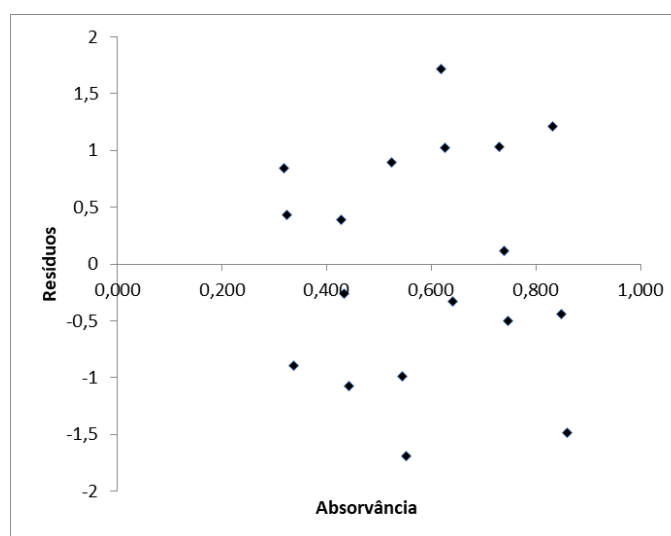
As seis concentrações de ERTM SQR foram avaliadas em três dias diferentes e uma curva analítica foi construída. A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados e a avaliação estatística foi feita pela ANOVA.

A curva de analítica para ERTM SRQ foi construída através da disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações, como representado na Figura 28, a homocedasticidade dos dados foi avaliada pela análise dos resíduos (Figura 29).

**Figura 28** - Curva analítica de ERTM pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.



**Figura 29**- Análise de resíduos para ERTM pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho



Os valores das absorvâncias obtidas para a curva analítica de ERTM SQR estão demonstrados na Tabela 19.

**Tabela 19** - Valores das absorvâncias referentes a ERTM SRQ para a construção da curva analítica através do método de espectrofotometria na região do infravermelho

Concentração (mg/200 mg)	Absorvância <sup>a</sup>	Absorvância média	DPR <sup>b</sup> (%)
0,6	0,320	0,327	2,93
	0,338		
	0,324		
0,8	0,428	0,435	1,77
	0,443		
	0,435		
1,0	0,553	0,541	2,60
	0,545		
	0,526		
1,2	0,642	0,630	1,74
	0,620		
	0,627		
1,4	0,747	0,739	1,10
	0,730		
	0,740		
1,6	0,849	0,847	1,69
	0,832		
	0,860		

<sup>a</sup>Valor médio de três determinações; <sup>b</sup>DPR: desvio padrão relativo

A ANOVA referente à curva analítica de ERTM SQR está apresentada na Tabela 20.

**Tabela 20-** Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,555	0,111	<b>902,981*</b>	<b>3,106</b>
Regressão linear	1	0,555	0,555	<b>4508,424*</b>	<b>4,747</b>
Desvio da linearidade	4	0,001	0,000	<b>1,620</b>	<b>3,259</b>
Resíduo	12	0,001	0,000	---	---
Total	17	0,557	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$



### 6.1.3.2.2. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados conforme descrito na literatura (ICH, 2005) e apresentado nas Equações 8 e 9 do item 3.9.3. O valor calculado para o limite de detecção foi de 0,16 mg/200 mg e o limite de quantificação foi de 0,49 mg/200 mg.

### 6.1.3.2.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade (intradia) e a precisão intermediária (interdias e entre analistas) estão descritas no item 3.9.6. A repetibilidade foi verificada pela análise de sete pastilhas de ERTM SQR na concentração de 1 mg/pastilha no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. A precisão intermediária, por sua vez, foi avaliada pelos doseamentos de ERTM substância química de referência *versus* amostra na forma farmacêutica em triplicata decorrente de três dias consecutivos e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados foram avaliados com base nos valores de DPR%. A precisão por repetibilidade forneceu um valor de DPR% de 1,74 % a precisão intermediária é apresentada na Tabela 21.

**Tabela 21-** Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho

Dia	Precisão interdias			Precisão entre-analistas			
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)	Analista	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	99,51			1	100,59		
2	101,20	100,83	1,17	2	102,49	101,54	1,32
3	101,78						

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

### 6.1.3.2.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de adição, como descritas no item 3.9.7., no qual quantidade conhecida de ERTM SQR foi adicionada à quantidade conhecida de amostra. A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 22, em triplicata.

**Tabela 22-** Preparo das pastilhas para o teste de recuperação do método por espectrofotométrico na região do infravermelho

	ERTM amostra (mg) <sup>a</sup>	ERTM SQR (mg) <sup>a</sup>	Quantidade de KBr <sup>b</sup> (mg)	Concentração teórica final (mg/pastilha)	%
<b>Amostra</b>	60	-----	140	0,60	-----
<b>R1</b>	60	20	120	0,80	80 %
<b>R2</b>	60	40	100	1,00	100 %
<b>R3</b>	60	60	80	1,20	120 %
<b>SQR</b>	-----	60	140	0,60	-----

<sup>a</sup>Diluição 1:100, p/p em KBr; <sup>b</sup>Quantidade suficiente para o preparo de pastilhas com massa total de 200 mg

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 10, apresentada no item 3.9.7. e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23-** Determinação da exatidão do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho

	ERTM SQR adicionado (mg)	ERTM SQR encontrado <sup>a</sup> (mg)	Recuperação <sup>a</sup> (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
<b>R1</b>	20	19	95,64		
<b>R2</b>	40	39	97,77	97,60	1,92
<b>R3</b>	60	60	99,38		

<sup>a</sup>média de três determinações; <sup>b</sup>DPR = desvio padrão relativo. Pastilhas de 200 mg preparadas por diluição 1/100.

#### 6.1.3.2.5. Robustez

A robustez do método foi avaliada por pequenas variações dos parâmetros de trabalho, com a finalidade de se verificar a confiabilidade da análise, diante de pequenas variações das suas condições de trabalho. Os seguintes parâmetros foram alterados: força de compressão 75, 80 e 85 kN, marca do brometo de potássio Synth e Vetec e tempo de compressão das pastilhas 9, 10 e 11 minutos. As respostas obtidas foram avaliadas individualmente quanto ao DPR% entre os doseamentos de SQR *versus* amostra, como descrito no item 3.9.8. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24.

**Tabela 24** - Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do infravermelho

Variável	Faixa investigada	ERTM (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>a</sup> (%)
Força compressão das pastilhas	75 kN	100,70	100,71	0,48
	80 kN	101,20		
	85 kN	100,24		
Marca do KBr	Synth <sup>®</sup>	101,78	101,29	0,69
	Vetec <sup>®</sup>	100,79		
Tempo de compressão das pastilhas	9 min	100,59	101,65	0,98
	10 min	101,78		
	11 min	102,57		

<sup>a</sup>DPR = desvio padrão relativo

A espectrofotometria no infravermelho baseia-se na observação das vibrações de moléculas que são excitadas por um feixe de radiação na zona do infravermelho. Através do exame da luz transmitida, é possível verificar a quantidade de energia que foi absorvida em cada comprimento de onda na forma de espectros característicos para cada substância. Com uma análise detalhada das bandas de absorção e da comparação com espectros da substância química de referência, se obtém dados seguros de identificação e podem ser quantificados (PAVIA et al., 2010).

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma técnica de análise rápida e tem sido adotada como uma ferramenta analítica em vários campos da ciência, sendo cada vez mais aceita pelas suas inúmeras vantagens em relação aos outros métodos, por ser uma técnica “verde” diminuindo os impactos ambientais já que não utiliza solventes orgânicos, sendo uma excelente alternativa para indústrias conseguirem reduzir ou eliminar a geração de resíduos químicos em seus processos de rotina. Além disso, trata-se de uma técnica que requer mínimo ou nenhum pré tratamento da amostra, fornece precisão comparável a outros métodos e ainda auxilia na detecção de falsificação e de impurezas (FAROUK; MOUSSA; AZZAZY, 2011; CORREA; SALGADO, 2014).

A curva analítica para ERTM SRQ foi construída pela disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações, mostrando linearidade adequada na faixa entre 0,6 a 1,6 mg/pastilha. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,9993 e o coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9996, indicando a linearidade do método. Além disso, a análise estatística dos resultados (Tabela 20) demonstrou que não existe desvio de linearidade

significativo, a um nível de significância de 5%, já que, para este parâmetro, o F calculado de 1,62 foi inferior ao F tabelado 3,26.

A precisão por repetibilidade apresentou DPR de 1,74% e na precisão intermediária interdias foi de 1,17% e a entre analistas foi 1,32%, as quais se encontram abaixo dos 5% recomendados pela RDC nº 166, de 2017 (BRASIL, 2017). A exatidão foi realizada por recuperação; o teor médio recuperado foi de 97,60% com DPR de 1,92%. A robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações dos parâmetros estabelecidos no método, como força de compressão, marca do brometo de potássio e tempo de compressão das pastilhas. Os resultados de teores, bem como DPR%, demonstrados na Tabela 24 são considerados adequados, comprovando que pequenas modificações destes parâmetros não influenciam de modo significativo na análise do fármaco.

Por fim, os limites de detecção e de quantificação, calculados para determinar a sensibilidade do método, foram 0,16 mg/200 mg e 0,49 mg/200 mg, respectivamente. Os valores obtidos indicam a confiabilidade do método para detectar e quantificar a ERTM em pó para solução injetável. O teor médio de ERTM determinado no medicamento foi de 100,83%, o qual é considerado adequado pela sua proximidade ao valor de referência (100%), no entanto ainda não há monografia delimitando as especificações para esta substância.

O método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de métodos analíticos (ICH, 2005; BRASIL, 2017). Desta forma, o método de espectrofotometria na região do infravermelho é capaz de quantificar ERTM em pó liofilizado para solução injetável, podendo ser usado como análise de rotina do controle de qualidade deste fármaco com as vantagens de ser um método prático, rápido e seletivo, além de necessitar de pequenas quantidades de amostra, não gerar resíduos de solventes orgânicos a serem tratados, aliados aos benefícios ambientais por se tratar de uma técnica ecologicamente correta.

## **6.2. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA**

A análise quantitativa na região ultravioleta tem como princípio a relação direta existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância. É calculada matematicamente pela Lei de Lambert-Beer, em que a absorção de radiação em determinado comprimento de onda é mensurada quando atravessa uma amostra, pois há uma relação exponencial entre a transmissão de luz, a espessura da camada do meio absorvente e a concentração da solução. A absorvância dada pelos espectros eletromagnéticos é obtida através da equação de Lambert-Beer (Equação 12) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

**Equação 12**

Em que:

*A* - absorvância*I*<sub>0</sub> - intensidade da radiação monocromática que incide na amostra*I* - intensidade da radiação que emerge da amostra*ε* - absortividade molar, uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente*c* - concentração da espécie absorvente (mol/L)*b* - distância percorrida pelo feixe através da amostra (cm).

A espectrofotometria na região do ultravioleta ocorre pela absorção de energia que ao ser quantizada, conduz a passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado e, portanto, dependem da estrutura eletrônica da molécula, solvente, temperatura e comprimento de onda da radiação (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

### 6.2.1. Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-1800, cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, o solvente foi a água purificada (Milli-Q®).

### 6.2.2. Método

Alíquotas da solução mãe de ERTM SQR contendo 200 µg mL<sup>-1</sup>, descritas no item 6.2.2.1., foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada. O mesmo procedimento foi realizado para ERTM pó liofilizado para solução injetável, descritas no item 6.2.2.2. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda máximo de 297 nm. A SQR e a amostra utilizadas foram descritas nos itens 4.1. e 4.2. Para zerar o equipamento utilizou como branco a água purificada. O método foi validado de acordo com o preconizado pela literatura e apresentado no item 3.9.

#### 6.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR

Massas de 20 mg de ERTM SQR previamente dessecadas por 1 h a 105 °C foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água purificada, obtendo-se a solução mãe na concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup>.

### **6.2.2.2. Preparo da solução de ERTM em pó liofilizado para solução injetável**

Massa equivalente a 20 mg de ERTM pó liofilizado para solução injetável foi devidamente pesada a partir de um *pool* de amostras de cinco frascos-ampola, previamente dessecado por 1 h a 105 °C. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água purificada, para a obtenção da solução mãe de 200 µg mL<sup>-1</sup>.

### **6.2.3. Resultados e discussão**

As características do espectro de absorção da solução de ERTM, utilizando água purificada como solvente, foi anteriormente apresentado na Figura 11 e discutida no item 5.7.3.

#### **6.2.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável**

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 297 nm. O doseamento de ERTM foi realizado em triplicata nas concentrações de 21 µg mL<sup>-1</sup>, em termos de absorvância. O seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 6 e 7 descritas no item 3.9.2. O teor médio encontrado foi de 100,29 % e o DPR de 0,46 %.

#### **6.2.3.2. Validação do método**

O método foi validado pela determinação dos parâmetros de linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (ICH, 2005; USP 38, 2015; BRASIL, 2017) e apresentado no item 3.9.

##### **6.2.3.2.1. Curva de Ringbom**

A curva de Ringbom foi obtida com o objetivo de estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região UV apresenta linearidade. Alíquotas a partir da solução-mãe, foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL cujos volumes foram completados com água purificada, obtendo concentrações crescentes de 3 a 80 µg mL<sup>-1</sup> de ERTM, como apresentado na Tabela 25. As leituras foram feitas em comprimento de onda de 297 nm.

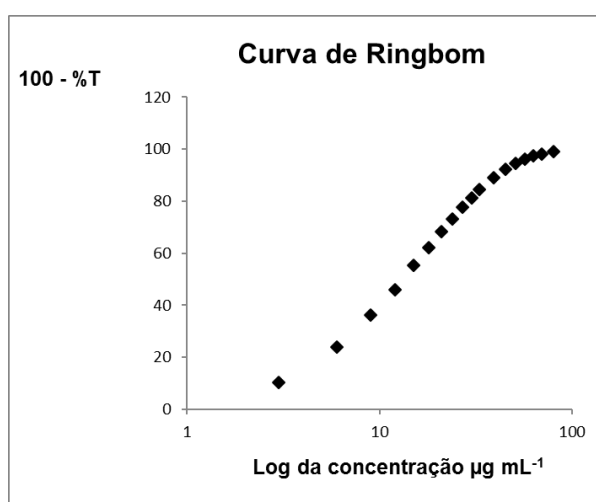
**Tabela 25-** Obtenção da curva de Ringbom de ERTM por espectrofotometria no UV

Pontos	Volume da Solução de ERTM (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	Concentração teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>
1	150	3
2	300	6
3	450	9
4	600	12
5	750	15
6	900	18
7	1050	21
8	1200	24
9	1350	27
10	1500	30
11	1650	33
12	1950	39
13	2250	45
14	2550	51
15	2850	57
16	3150	63
17	3500	70
18	4000	80

<sup>a</sup>Balão volumétrico de 10 mL

Para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta as medidas de absorvância das amostras foram convertidas em transmitância. Estes dados *versus* o log da concentração ERTM são apresentados graficamente na Figura 30 e Tabela 26.

**Figura 30 -** Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para ERTM SQR no comprimento de onda de 297 nm.



**Tabela 26** - Construção da curva de Ringbom por espectrofotometria na região do UV para ERTM SQR

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média Absorvâncias <sup>a</sup>	10 abs.	%T (100/10 abs.)	100 - % T <sup>b</sup>
3	0,047	1,114	89,743	10,257
6	0,119	1,315	76,033	23,967
9	0,195	1,567	63,826	36,174
12	0,268	1,854	53,951	46,049
15	0,349	2,234	44,771	55,229
18	0,421	2,636	37,931	62,069
21	0,500	3,162	31,623	68,377
24	0,570	3,715	26,915	73,085
27	0,654	4,508	22,182	77,818
30	0,724	5,297	18,880	81,120
33	0,806	6,397	15,631	84,369
39	0,956	9,036	11,066	88,934
45	1,107	12,794	7,816	92,184
51	1,266	18,450	5,420	94,580
57	1,424	26,546	3,767	96,233
63	1,575	37,584	2,661	97,339
70	1,737	54,576	1,832	98,168
80	1,992	98,175	1,019	98,981

<sup>a</sup>em triplicada; <sup>b</sup>Balão volumétrico de 10 mL

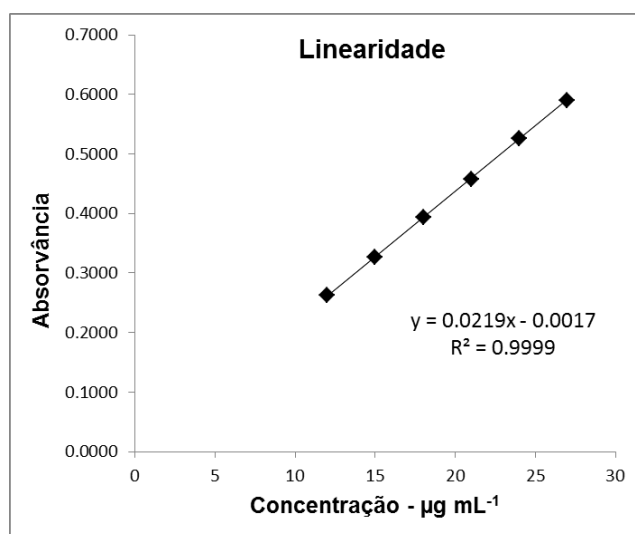
#### 6.2.3.2.2. Linearidade

Para a obtenção da curva analítica de ERTM, transferiram-se alíquotas de 0,60; 0,75; 0,90; 1,05 e 1,2 e 1,35 mL, da solução descrita no item 6.2.2.1., para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentrações finais de 12, 15, 18, 21, 24 e 27  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 297 nm, utilizando água purificada como branco. A linearidade do método foi obtida pela análise de três curvas analíticas em três dias diferentes.

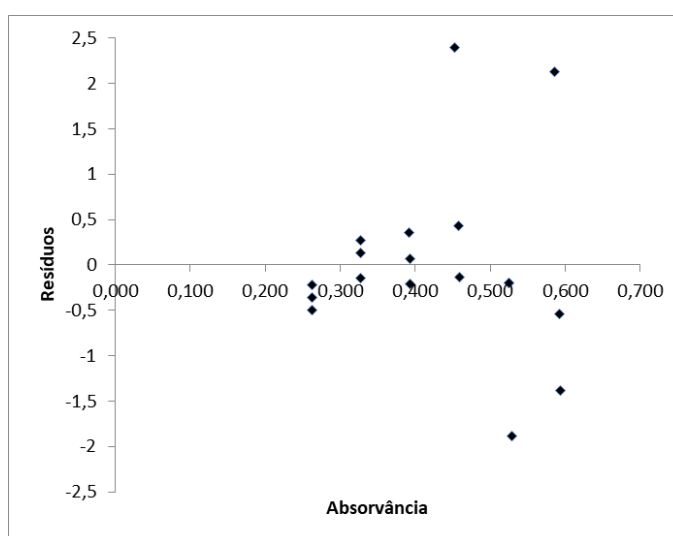
Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA). As concentrações usadas para a construção da curva analítica estão representadas graficamente na Figura 31 e apresentadas na Tabela 27. A homocedasticidade dos dados foi avaliada pela análise dos resíduos (Figura 32).



**Figura 31** - Curva analítica de ERTM SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV



**Figura 32** - Análise de resíduos para ERTM pelo método espectrofotométrico na região do UV



**Tabela 27** - Valores de absorvância determinados para a curva analítica de ERTM SQR pelo método espectrofotométrico na região do UV a 297 nm

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorvância <sup>a</sup> n=3	Absorvância média $\pm$ DP <sup>b</sup>	DPR <sup>c</sup> (%)
12	0,263	0,262 $\pm$ 0,000	0,127
	0,262		
	0,262		
15	0,327	0,327 $\pm$ 0,001	0,156
	0,328		
	0,327		
18	0,394	0,393 $\pm$ 0,001	0,170
	0,392		
	0,393		
21	0,453	0,457 $\pm$ 0,003	0,690
	0,458		
	0,459		
24	0,525	0,527 $\pm$ 0,002	0,438
	0,525		
	0,529		
27	0,592	0,591 $\pm$ 0,004	0,737
	0,586		
	0,594		

<sup>a</sup>Valor médio de três determinações/ <sup>b</sup>DP= Desvio padrão/ <sup>c</sup>DPR= Desvio padrão relativo

A curva analítica de ERTM SQR foi calculada por análise de variância (ANOVA) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 28.

**Tabela 28**- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,227	0,045	7798,749*	3,106
Regressão linear	1	0,227	0,227	38988,602*	4,747
Desvio de linearidade	4	0,000	0,000	1,286	3,259
Resíduo	12	0,000	0,000	---	---
Total	17	0,227	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$

### 6.2.3.2.3. Limite de detecção e Limite de quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada pelos limites de detecção e de quantificação que foram calculados de acordo com o preconizado na literatura

(ICH, 2005). O cálculo foi realizado segundo as Equações 8 e 9, descritas no item 3.9.4. Os valores obtidos para LD e LQ foram  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

#### 6.2.3.2.4. Precisão

A precisão do método foi realizada por ensaios de repetibilidade e precisão intermediária anteriormente discutidas no item 3.9.6. A precisão do método foi determinada pela da repetibilidade (intradia), expressando-se o resultado com base no DPR. Sete soluções de ERTM SQR preparadas na concentração de  $21 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram submetidas a análises sucessivas e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 0,82 %.

A precisão intermediária foi avaliada por doseamento de soluções de ERTM SQR *versus* amostra em pó liofilizado para solução injetável, na concentração de  $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ , executadas por diferentes analistas e por doseamento em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais e os resultados foram avaliados pelo DPR% dos teores obtidos (Tabela 29).

**Tabela 29-** Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por espectrofotométrico na região do UV

Dia	Precisão interdias			Precisão entre-analistas			
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)	Analista	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	100,22			1	100,89		
2	100,78	100,29	0,46	2	100,13	100,51	0,53
3	99,87						

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

#### 6.2.3.2.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método de adição, no qual quantidade conhecida de SQR é adicionada à amostra. A recuperação foi realizada em três diferentes concentrações, R1, R2 e R3, equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração média. A percentagem de ERTM recuperado foi calculada matematicamente por recuperação (Equação 10, item 3.9.7.). Para o preparo das soluções do teste de recuperações, volumes de 240  $\mu\text{L}$  (R1), 450  $\mu\text{L}$  (R2) e 660  $\mu\text{L}$  (R3) da solução SQR ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável preparada na mesma concentração e completadas com água purificada para juntas perfazerem a concentração desejada. Desta forma, as seguintes concentrações foram

obtidas: R1: 16,80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 80% de percentual médio, R2: 21,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 100% de percentual médio e R3: 25,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 120% de percentual médio. A quantidade de SQR adicionada para avaliar a exatidão pelo teste de recuperação é apresentado na Tabela 30.

**Tabela 30** - Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método de espectrofotometria na região do UV

	ERTM amostra ( $\mu\text{g}$ )	ERTM SQR ( $\mu\text{g}$ )	Concentração teórica ( $\mu\text{g}$ )	%
<b>Amostra</b>	12,00	-----	12,0	-----
<b>R1</b>	12,00	4,80	16,8	80
<b>R2</b>	12,00	9,00	21,0	100
<b>R3</b>	12,00	13,20	25,2	120
<b>SQR</b>	-----	12,00	12,0	-----

Os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico são apresentados na Tabela 31.

**Tabela 31** - Determinação da exatidão do método analítico por espectrofotometria na região do UV de ERTM

	ERTM SQR Adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ERTM concentração encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>a</sup> (%)
<b>R1</b>	4,80	4,87	101,39		
<b>R2</b>	9,00	9,23	102,57	102,61	1,21
<b>R3</b>	13,20	13,71	103,87		

<sup>a</sup>DPR= Desvio padrão relativo

#### 6.2.3.2.6. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos teores obtidos variando-se o comprimento de onda (296, 297 e 298 nm), o equipamento usado (UV-Vis – mini-1240 Shimadzu e UV-Vis – 1800 Shimadzu) e a fonte de obtenção de água purificada de diferentes laboratórios (227, 228 e 246); os resultados foram avaliados pelos DPR dos teores obtidos para cada parâmetro alterado. Os doseamentos obtiveram teores semelhantes para os parâmetros alterados, com DRP inferior a 2 %, comprovando a robustez do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme apresentado na Tabela 32.

**Tabela 32** - Avaliação da robustez do método analítico para análise de ERTM por espectrofotometria na região do UV

Variável	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
296 nm	100,93		
297 nm	100,34	100,81	0,42
298 nm	101,16		
Equipamento 1	100,24		
Equipamento 2	100,21	100,23	0,02
Fonte de água 1	100,91		
Fonte de água 2	100,19	100,55	0,51

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

O método espectrofotométrico foi desenvolvido e validado utilizando água purificada como solvente, baseando-se na intensidade de absorção dos cromóforos presentes no fármaco com este solvente. Apresenta como vantagens ser um método rápido, prático e reprodutível, de simplicidade no preparo das amostras, baixo custo e fácil descarte, não agredindo o meio ambiente e sendo seguro ao operador.

Através da análise da curva de Ringbom, a melhor faixa de concentração foi selecionada para o método. Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de ERTM SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, no intervalo utilizado. Foram plotados gráficos da concentração *versus* absorvância, os quais demonstraram haver linearidade adequada na faixa de 12 a 27  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A equação da reta para o método foi  $y = 0,0219x - 0,0017$ , com coeficiente de determinação de 0,9999.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados baseados nas curvas analíticas produzidas em diferentes dias. Os valores encontrados para limites de detecção e quantificação foram 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,77  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, o que demonstra que a faixa utilizada se encontra acima dos limites e, portanto, com valores adequados de concentração.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias e entre analistas). O valor experimental obtido na análise intradia apresentou DPR de 0,82% para análise de sete replicatas de ERTM SQR realizada no mesmo dia e sob as mesmas condições. Na precisão interdia, as análises foram realizadas em dias diferentes obtendo-se teor médio de 100,29% e DPR de 0,46%. A precisão entre analistas apresentou teor médio de 100,51% e DPR de 0,53%. A exatidão foi avaliada pelo método da adição e calculada matematicamente por recuperação. Os resultados obtidos são considerados adequados uma vez que se encontram próximos a 100%.

A robustez do método foi avaliada pela alteração do comprimento de onda de análise, do equipamento de análise e da fonte de obtenção de água purificada. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na quantificação da amostra, demonstrando que o método é robusto para estes tipos de variações. O método espectrofotométrico proposto cumpriu todos os requisitos exigidos pelos órgãos oficiais (ICH, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP 38, 2015), apresentando linearidade, precisão, exatidão e robustez. Além disso, também é considerado um método “verde”, dado que não utiliza solventes orgânicos. Esta técnica é amplamente utilizada em análise quantitativa, devido à sua simplicidade, facilidade de execução, reprodutibilidade, aliadas ao custo reduzido, ao menor tempo de análise podendo ser empregado para doseamento de ERTM em pó liofilizado para solução injetável no controle de qualidade de rotina.

### **6.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE**

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica bem estabelecida e sem dúvida a mais utilizada. Isso por que, é uma técnica versátil que ser empregada em diferentes modos de eluição (normal, reverso e por interação hidrofílica) para promover a separação de diferentes substâncias.

#### **6.3.1. CROMATOGRAFIA COM INTERAÇÃO HIDROFÍLICA - CIH**

A cromatografia com interação hidrofílica (CIH) baseia-se em uma fase estacionária polar, associada a uma fase móvel orgânica (acetonitrila, metanol e/ou etanol) com pequenas proporções de água. Estudos na literatura apontam que a cromatografia com interação hidrofílica é a técnica cromatográfica mais adequada para substâncias ionizadas e de alta polaridade (ALPERT, 1990; MCCALLEY, 2007; LANÇAS, 2010; HECKENDORF et al., 2013), sendo o ERTM uma molécula com estas características.

Diferentes parâmetros cromatográficos foram testados com objetivo de encontrar condições favoráveis, como anteriormente apresentadas e discutidas no item 5.8.1.4. para o desenvolvimento do método. O método foi validado e é adequado para a quantificação de ERTM na forma farmacêutica pó para solução injetável por CIH.

##### **6.3.1.1. Material**

O método por cromatografia com interação hidrofílica foi realizado em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Shimadzu (CLUE) equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-AHT, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de

onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com *software* LC Solution<sup>®</sup>. A análise do fármaco em estudo foi realizada isocraticamente em coluna CIH Kinetex 2,6 µm (4,6 x 100 mm) Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, EUA). O ERTM SQR e o ERTM pó liofilizado para solução injetável, usados foram descritos nos itens 4.1. e 4.2. Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água purificada obtida através de equipamento Milli-Q<sup>®</sup> Plus (Millipore<sup>®</sup>EUA). Todos os solventes orgânicos utilizados na preparação das fases móveis possuíam grau CLAE, diferentes marcas de solventes orgânicos foram usadas, tais como acetonitrila (J.T. Baker<sup>®</sup>, Tedia<sup>®</sup> e LiChrosolv<sup>®</sup>), etanol (Panreac<sup>®</sup>) e metanol (Vetec<sup>®</sup>). Os reagentes utilizados para a degradação foram ácido clorídrico 0,01 M (Qhemis<sup>®</sup>), hidróxido de sódio 0,01 M (Cinetica<sup>®</sup>) e peróxido de hidrogênio 0,03% (Vetec<sup>®</sup>). As soluções foram filtradas em membrana de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>) e foram degaseificada sem banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique<sup>®</sup>, SP, Brasil).

### **6.3.1.2. Método**

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação de ERTM foram apresentadas na Tabela 10, item 5.8.1.4. A fase móvel foi preparada segundo o item 6.3.1.2.3.; a vazão da fase móvel foi de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume de 20 µL as soluções de ERTM preparadas nos itens 6.3.1.2.1 e 6.3.1.2.2. foi injetado em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Shimadzu<sup>®</sup>. A análise do fármaco foi realizada isocraticamente em colunas CIH Kinetex 2,6 µm (4,6 x 100 mm) Phenomenex<sup>®</sup> com detector UV, no comprimento de onda de 297 nm. O ensaio foi realizado em temperatura de 25 °C.

O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes BRASIL (2017) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão. Este método foi conduzido no Departamento de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB.

#### **6.3.1.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR**

Foi pesada a massa de 10 mg de ERTM SQR (descritos no item 4.1.), e transferida para balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com a água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com metanol para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 70, 80, 90, 100, 110 e 120 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **6.3.1.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola, cujo peso médio foi de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, massa equivalente a 10 mg de ERTM foi pesada e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, e o volume foi completado com metanol para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 70, 80, 90, 100, 110 e 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.3.2.1.3. Preparo da fase móvel**

A fase móvel escolhida consistiu de ACN (J.T. Baker<sup>®</sup>) e água purificada (Milli-Q<sup>®</sup>) na proporção de 88:12 v/v, com 0,1 % de ácido fórmico (Synth<sup>®</sup>) pH 2,5. A fase móvel foi filtrada em membrana filtrante de *nylon* com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), sob vácuo usando bomba Prismatec<sup>®</sup> modelo 121 e desgaseificada no ultrassom Unique Ultrasonic Cleaner Modelo USC – 2850A durante 30 minutos antes do uso.

#### **6.3.1.3. Resultados e discussão**

O cromatograma típico de ERTM obtido pelo método proposto foi apresentado na Figura 13, item 5.8.1.4. e demonstrou que a amostra de ERTM sódico em pó liofilizado para solução injetável está condizente com o ERTM SQR no tempo de retenção de 5,7 minutos.

#### **6.3.1.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável**

O doseamento de ERTM foi realizado em termos de absorvância da área do pico, nas concentrações de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em triplicata e o seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 6 e 7, descritas no item 3.9.2. O teor médio encontrado foi de 99,10 % e DPR de 1,04 %.

#### **6.3.1.3.2. Conformidade do sistema cromatográfico**

O ICH (2005) estabelece teste de conformidade do sistema cromatográfico como parte prévia ao processo de validação. O teste é uma etapa essencial para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estão aptos para a validação do método. O teste de conformidade do sistema foi anteriormente apresentado e discutido na seção qualitativa, item 5.8.1.5. em que se deu a escolha desses parâmetros.



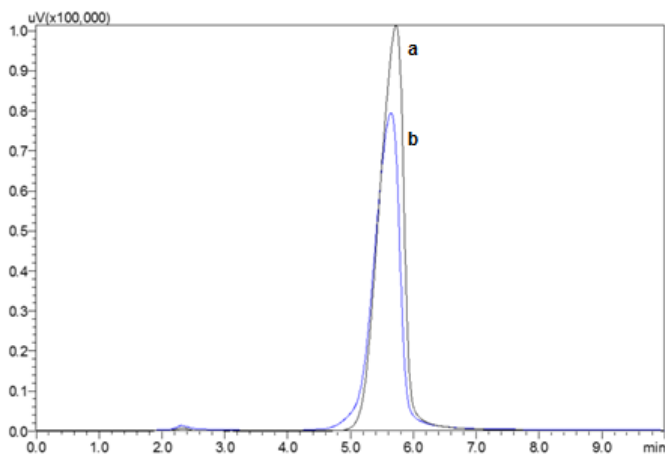
### **6.3.1.3.3. Validação do método**

O método foi validado pela determinação dos parâmetros de linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (ICH, 2005; USP 38, 2015; BRASIL, 2017) e apresentado no item 3.9.

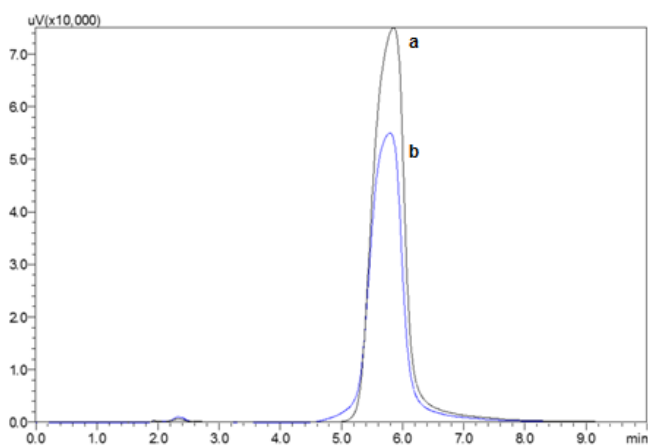
#### **6.3.1.3.3.1. Seletividade e estudos de degradação forçada**

A seletividade do método foi determinada submetendo a solução amostra de ERTM em pó para solução injetável à degradação acelerada por condições ácida, alcalina, neutra, oxidativa e fotolítica. As soluções analisadas foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  reconstituídas em água. Alíquotas desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, que foram completados com a solução previamente preparada em metanol para concentração final de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , concentração em que as amostras foram injetadas no equipamento. A solução amostra foi preparada em HCl 0,01 M para a hidrólise ácida, NaOH 0,01 M para a hidrólise alcalina e em peróxido de hidrogênio 0,03 % para a hidrólise oxidativa. A fotodegradação foi induzida através da exposição da solução amostra em metanol à luz ultravioleta (UVC<sub>254</sub> nm) por 24 horas. Todas as análises foram feitas em temperatura ambiente 25 °C  $\pm$  2 °C. Para a degradação neutra amostra foi preparada em metanol e a solução foi submetida à exposição em temperatura de 50 °C, em banho de aquecimento, por 24 horas. Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de ERTM, no entanto picos adicionais não foram observados. As Figuras 33 a 37 apresentam os cromatogramas obtidos após as degradações ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica, respectivamente, onde é possível visualizar o decréscimo da área do pico indicando a sua degradação. O pico principal de ERTM é apresentado no tempo de retenção de 5,7 minutos.

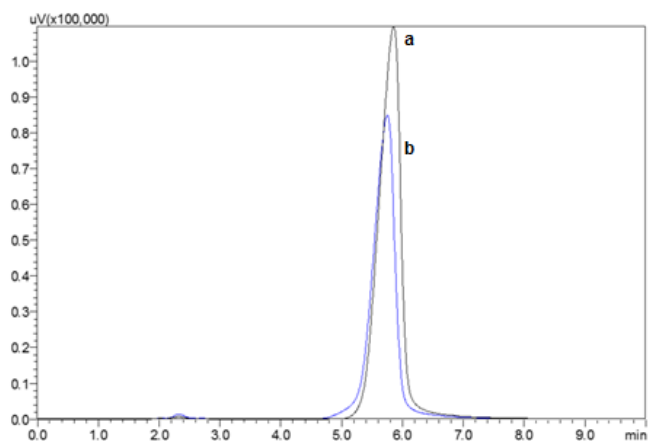
**Figura 33-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação ácida (HCl  $0,01 \text{ M}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para o método por CIH.



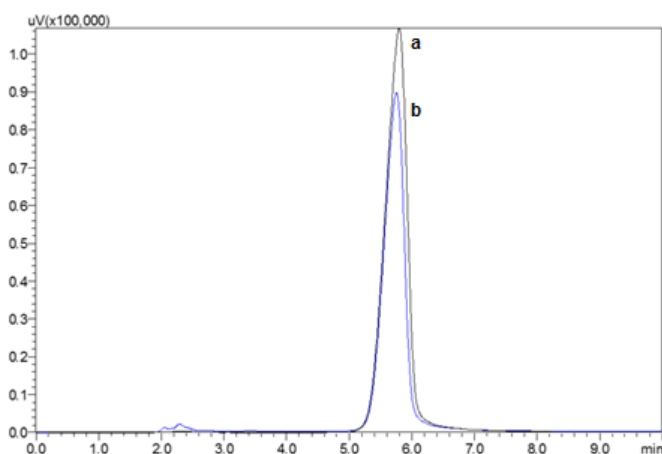
**Figura 34-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 2,50 h (azul), sob degradação alcalina (NaOH  $0,01 \text{ M}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para o método por CIH.



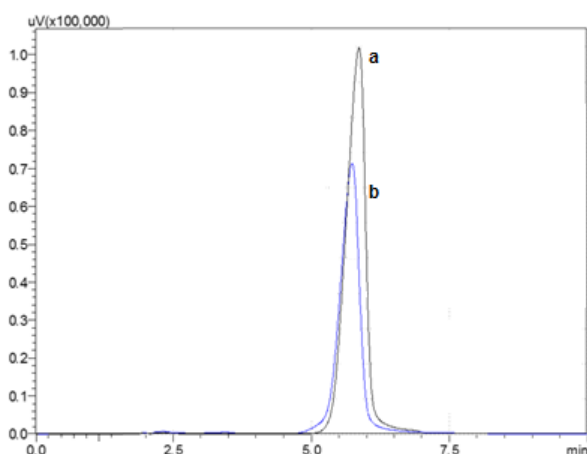
**Figura 35-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação oxidativa ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,03\%$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para o método por CIH.



**Figura 36-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 6 h (azul), sob degradação fotolítica (luz UV 254) a  $25^\circ\text{C}$  para o método por CIH.



**Figura 37-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação neutra (água) a  $25^\circ\text{C}$  para o método por CIH.



#### 6.3.1.3.3.2. Linearidade

Para a construção da curva analítica, foi pesada a massa de 25 mg de ERTM SQR e transferida para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com a água purificada, para a obtenção de solução com concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução estoque foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e completadas com metanol para a obtenção das soluções nas concentrações de  $70\text{-}120 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Três curvas foram preparadas e analisadas durante três dias.

A equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear. Teste estatístico de análise de variância (ANOVA) foi empregado para avaliação dos resultados obtidos.

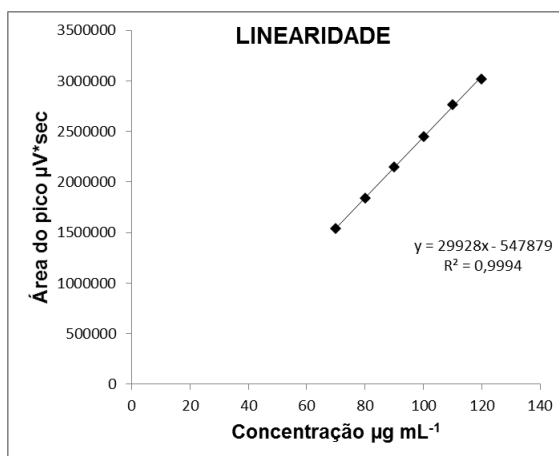
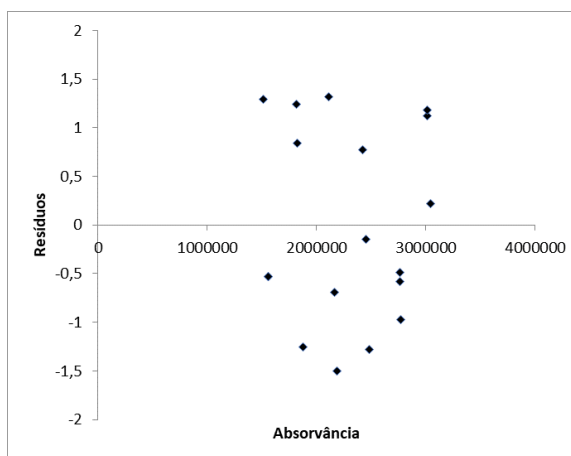
Na Tabela 33 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de ERTM SQR.

**Tabela 33-** Valores das áreas referentes aos picos de ERTM SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico por CIH

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Áreas <sup>a</sup> (AU)	Área média $\pm$ DP <sup>b</sup>	DPR <sup>c</sup> (%)
70	1510057	1543028,89 $\pm$ 28554,49	1,85
	1559509		
	1559521		
80	1822258	1837596,33 $\pm$ 36372,77	1,98
	1879126		
	1811405		
90	2109385	2153117,89 $\pm$ 39410,63	1,83
	2185883		
	2164086		
100	2424400	2451303,89 $\pm$ 27922,03	1,14
	2480143		
	2449368		
110	2771894	2763902,67 $\pm$ 7049,36	0,26
	2758568		
	2761246		
120	3014886	3022544,56 $\pm$ 14606,21	0,48
	3039387		
	3013360		

<sup>a</sup>Valor médio de três determinações/ <sup>b</sup>DP = Desvio padrão/ <sup>c</sup>DPR= Desvio padrão relativo

Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foi plotado em relação à respectiva concentração, observando-se linearidade adequada na faixa de 70-120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , conforme ilustrado na Figura 38 e o gráfico de dispersão dos resíduos é apresentado na Figura 39.

**Figura 38-** Curva analítica de ERTM, obtida pelo método CIH.**Figura 39-** Análise de resíduos para ERTM pelo método por CIH.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ERTM SQR é apresentada na Tabela 34.

**Tabela 34-** Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método por CIH

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	4705291573109	941058314621	1192,67*	3,11
Regressão linear	1	4699193364056	4699193364056	5955,62*	4,75
Desvio da linearidade	4	6098209052	1524552263	1,93	3,26
Resíduo	12	9468418919	789034909	---	---
Total	17	4714759992029	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$

### 6.3.1.3.3.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados segundo preconizado na literatura (ICH, 2005), que se baseiam no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. As soluções foram analisadas experimentalmente em triplicata e calculadas pelas Equações 8 e 9, previamente descritas no item 3.9.4. O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico foi  $7,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por sua vez, o LQ calculado foi  $23,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 6.3.1.3.3.4. Precisão

A precisão do método foi determinada como previamente descrita no item 3.9.6. pela repetibilidade (intradia), em que sete soluções de ERTM SQR preparadas na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram submetidas a análises sucessivas, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista que forneceu DPR de 1,80%. A precisão intermediária foi avaliada em diferentes dias (interdias) e por diferentes analistas. A solução de ERTM SQR e de pó liofilizado para solução injetável na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas e analisadas por doseamento em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais. Enquanto que, na precisão entre analistas as soluções de ERTM SQR e de pó liofilizado para solução injetável na concentração  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas e analisadas, por dois diferentes analistas, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados são apresentados na Tabela 35.

**Tabela 35-** Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por CIH

Dia	Precisão interdias			Precisão entre-analistas			
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)	Analista	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	99,14			1	100,11		
2	98,04	99,10	1,04	2	100,02	100,07	0,06
3	100,11						

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

### 6.3.1.3.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método de adição, no qual quantidade conhecida de SQR é adicionada à amostra. A recuperação foi realizada em 3 diferentes concentrações, R1, R2 e R3, equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração média. A percentagem de ERTM recuperado foi calculada matematicamente por recuperação (Equação

10, item 3.9.7.). Para o preparo das soluções do teste de recuperações, volumes de 100  $\mu\text{L}$  (R1), 300  $\mu\text{L}$  (R2) e 500  $\mu\text{L}$  (R3) da solução SQR ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável preparada na mesma concentração e completadas com metanol para juntas perfazerem a concentração desejada. Desta forma, as seguintes concentrações foram obtidas: R1:  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 80% de percentual médio, R2:  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 100% de percentual médio e R3:  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 120% de percentual médio. A quantidade de SQR adicionada para avaliar a exatidão pelo teste de recuperação é apresentada na Tabela 36.

**Tabela 36-** Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método CIH

	ERTM amostra ( $\mu\text{g}$ )	ERTM SQR ( $\mu\text{g}$ )	Concentração teórica ( $\mu\text{g}$ )	%
<b>Amostra</b>	70	-----	70	-----
<b>R1</b>	70	10	80	80
<b>R2</b>	70	30	100	100
<b>R3</b>	70	40	120	120
<b>SQR</b>	-----	70	70	-----

Assim, determinou-se a exatidão do método pela análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida e os resultados experimentais, que correspondem à porcentagem média de 99,18 %, encontram-se na Tabela 37.

**Tabela 37-** Exatidão do método analítico para análise ERTM por CIH

	ERTM SQR adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ERTM SQR encontrado <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
R1	10	9,95	99,46		
R2	30	29,12	97,06	99,18	2,01
R3	50	49,73	99,46		

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

#### 6.3.1.3.3.6. Robustez

Neste trabalho, a robustez do método foi testada quanto à influência de pequenas variações dos parâmetros pré-definidos como: marca do solvente orgânico, vazão da fase móvel, quantidade de aditivo na fase móvel, fonte de obtenção de água, volume de injeção, comprimento de onda e temperatura do forno. A robustez foi avaliada em triplicata de injeções de soluções de ERTM SQR *versus* ERTM em pó liofilizado para solução injetável na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em diferentes condições. Para determinar a influência das

variações de cada parâmetro no resultado final, a média do doseamento, realizada em triplicata correspondente aos parâmetros normais, foi comparada às médias dos doseamentos correspondentes aos níveis alterados. As diferentes condições foram avaliadas simultaneamente pelo modelo fatorial Plackett-Burman e os resultados obtidos foram calculados usando a metodologia proposta por Youden, Steiner (1975) como discutido anteriormente no item 3.9.8.

As variáveis devem ser condizentes com a realidade prática e os níveis devem refletir a variação que pode ser geralmente observada. Os parâmetros e os níveis de variação testados são apresentados na Tabela 38.

**Tabela 38-** Fatores selecionados e níveis de variabilidade para o método por CIH

Parâmetros	Unidade	Limite	Condição variada (-1)	Condição normal (0)	Condição variada (1)
A. Marca da ACN	----	----	LiChorosov	J.T.Baker	Tedia
B. Vazão da fase móvel	mL min <sup>-1</sup>	0,1	0,49	0,50	0,51
C. Quantidade de aditivo	%	0,01	0,09	0,10	0,11
D. Fonte de água	----	----	Lab. 2	Lab. 1	Lab. 2
E. Proporção da FM	%	1	87:13	88:12	89:11
F. Comprimento de onda	nm	1	296 nm	297 nm	298 nm
G. Temperatura do forno	°C	1	24	25	26

-1= Nível inferior; 0= Nível Normal e 1= Nível superior.

O efeito médio de cada variável é a diferença média entre as observações determinadas nos níveis extremos e aqueles determinados no nível ideal em módulo. Os efeitos resultantes dos parâmetros alterados foram avaliados segundo a Equação 11 e, foram comparados aos valores obtidos como referência de 0,81 para os níveis inferiores (-1) e 1,23 para os níveis superiores (1). Nenhum efeito apresentou resultado significativo, indicando que o método proposto é robusto. Os teores encontrados nas condições normais e alteradas de cada fator são apresentados na Tabela 39.

**Tabela 39-** Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman por CIH

Parâmetros	(-1)	Teor de -1 (%) <sup>a,b</sup>	(1)	Teor de 1 (%) <sup>a,b</sup>
Marca da ACN	LiChorosov	101,13–101,00=  0,13	Tedia	100,77 – 101,22 =  0,46
Vazão da fase móvel (mL min <sup>-1</sup> )	0,49	101,00–101,12=  0,11	0,51	101,04 – 100,95 =  0,09
Quantidade de aditivo (%)	0,09	100,50–101,62=  1,12	0,11	100,69 – 101,30 =  0,62
Fonte de água	Lab. 2	101,28–100,84=  0,44	Lab. 3	101,06 – 100,93 =  0,14
Proporção da FM (%)	87:13	101,13–100,99=  0,14	89:11	100,87 – 101,12 =  0,25
Comprimento de onda (nm)	296	100,81–101,31=  0,50	298	100,97 – 101,02 =  0,04
Temperatura do forno	24	100,59–101,53=  0,95	26	100,65 – 101,34 =  0,69

<sup>a</sup>Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas

<sup>b</sup>Critérios de referência calculados: |1,23| para o teste -1 e |0,81| para o teste 1



Neste trabalho foi validado um método por CIH, com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção, preconizados em guias internacionais (FDA, 2004; ICH, 2005). Antes da validação, realizaram-se os testes de conformidade do sistema cromatográfico (*system suitability*) que são essenciais para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estejam aptos para a validação do método. Os dados obtidos na verificação da conformidade do sistema cromatográfico (Tabela 11) mostraram que o sistema se apresentou eficiente para o desenvolvimento do método cromatográfico, sendo adequado para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura (FDA, 2004, USP 38, 2015), a qual sugere que a assimetria do pico deve ser inferior a 20% ou seja de 0,80 a 1,20, o número de pratos superior a 2000 e o DPR para os parâmetros testados < 2%. Portanto, o método proposto cumpre os requisitos preconizados na literatura oficial, podendo ser empregado para análise de ERTM na indústria farmacêutica.

O tempo de corrida necessário para análise é de 5,7 min, proporcionando, desta maneira, uma rápida determinação do fármaco, que é um atributo fundamental para sua aplicabilidade no controle de qualidade na indústria farmacêutica.

O estudo da degradação forçada da amostra de ERTM foi determinado submetendo amostras de ERTM a condições de estresse alcalino, ácido, neutro, oxidativo e fotolítico, para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação de ERTM. A hidrólise ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica foram realizadas em temperatura ambiente  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de ERTM, quando comparado ao pico do fármaco no momento de preparo. Esse decréscimo foi observado por um período suficiente para a degradação de 10-30%, tal como recomendado pela RDC 58 de 2013 da Anvisa (BRASIL, 2013). Embora a degradação foi confirmada pelo decréscimo da área do pico, não foram visualizados picos adicionais significativos indicativos de possíveis produtos de degradação nas concentrações testadas.

A hidrólise oxidativa proporcionou um decréscimo de 22,76 % da área do pico em 12 horas. No entanto, vale ressaltar que o teste foi realizado em soluções diluídas de peróxido de hidrogênio (0,03%), isso por que, em concentrações maiores, a degradação é instantânea e muito forte degradando mais que 30% da área do pico logo após ao preparo. O pico do peróxido de hidrogênio praticamente não é observado devido à sua baixa concentração. Solução de peróxido de hidrogênio a 3% foi injetada para a confirmação de que o seu pico não elui no mesmo tempo de retenção do ERTM, não interferindo na sua quantificação.

Na condição neutra, observou-se um decréscimo de 24,02 % em 12 horas, enquanto na condição fotolítica em que a amostra foi exposta à luz UVC 254 nm observou-se um decréscimo de 22,64 % em 6 horas de análise. A condição ácida foi realizada com ácido clorídrico a 0,01 M e o decréscimo da área do pico foi 17,57 % em 12 horas de análise. Por fim, a condição mais acentuada foi a alcalina, em que um decréscimo de 24,50 % foi observado em 2,50 horas de análise.

Na condição alcalina, observou a deformação da simetria do pico, o que é justificável pois sabe-se que nestas condições, a alteração do pH causa a ionização da molécula. Portanto pesquisas sobre a degradação forçada de um fármaco são muito importantes para a compreensão do comportamento químico e estabilidade da molécula, dado que a qualidade do fármaco pode variar no tempo de armazenamento decorrente da influência dos fatores ambientais.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas, que foram construídas a partir de seis concentrações de soluções de ERTM SQR. As áreas dos picos apresentadas nos cromatogramas foram plotadas em um gráfico *versus* a concentração de ERTM, a fim de se obter a curva analítica que apresentou um coeficiente de correlação de 0,9997, mostrando-se linear na faixa de 70-120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (coeficiente de determinação  $r^2 = 0,9994$ ).

O conteúdo de ERTM nas amostras analisadas foi de 99,10%. Análises estatísticas de variância (ANOVA) foram realizadas e os resultados apresentados apontaram que não há desvios significativos de linearidade e, portanto, o método é linear.

Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) foram de 7,08 e 23,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, e indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade ERTM pó para solução injetável na faixa linear estabelecida. A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação, com uma média de 99,18%.

A análise da robustez foi realizada usando o modelo de Plackett-Burman, em que as alterações dos parâmetros analíticos ocorrem simultaneamente (Tabela 3). Neste modelo experimental, os resultados são avaliados pela comparação da diferença em módulo dos teores obtidos nas condições normais frente aos teores obtidos nas condições alteradas para cada parâmetro em relação ao valor de referência calculado utilizando a Equação 11. O método apresentou ser robusto, pois não proporcionou nenhum efeito considerado significativo em comparação com o valor de referência, no entanto, dois parâmetros se destacam por apresentar valores muito próximos ao limite de aceitação, indicando que estes devem ser controlados para não interferir nas análises. Esses fatores foram a quantidade de aditivo na fase móvel, que está diretamente relacionada ao pH da fase móvel e a temperatura do forno; os que também estão

associados a pequenas alterações no tempo de retenção do fármaco, o que já era esperado por se tratar de uma molécula parcialmente ionizada.

O método proposto neste trabalho apresentou um tempo de retenção adequado para a análise na indústria, apresenta uma fase móvel simples, em que o uso de solução tampão foi evitado. Dentre as desvantagens de se utilizar solução tampão, destacam-se: exigir preparo prévio à análise, pois seu armazenamento mesmo sob refrigeração pode ocasionar o aparecimento de fungos; são geralmente os responsáveis pelo aumento da pressão, propiciando entupimentos que podem comprometer a funcionalidade do equipamento e ainda, danificar as colunas cromatográficas diminuindo seu tempo de vida útil. Esses fatores representam um alto custo para a indústria farmacêutica.

O método cromatográfico proposto mostrou-se adequado e vantajoso apresentando simplicidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, limites de detecção e de quantificação satisfatórios, além de conformidade do sistema, portanto pode ser empregado para a análise quantitativa de ERTM na indústria farmacêutica, contribuindo para melhorar o controle de qualidade e para assegurar a eficácia terapêutica.

### **6.3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE FASE REVERSA - CLAE-FR**

Os estudos para desenvolvimento do método analítico por CLAE - FR foram embasados em trabalhos disponíveis na literatura (TOZO; SALGADO, 2006; LOPES; SALGADO, 2008; MORENO; SALGADO, 2008; LOPES; SALGADO, 2009; BONFILIO et al., 2009; CAZEDEY et al., 2011; VIEIRA; SALGADO, 2011; SILVA; SALGADO, 2012).

Diferentes parâmetros cromatográficos foram testados com objetivo de encontrar condições favoráveis, como anteriormente apresentadas no item 5.8.2.4. e um novo método foi desenvolvido e validado para a quantificação de ERTM na forma farmacêutica pó para solução injetável por CLAE - FR.

#### **6.3.2.1. Material**

Para a realização do método foram utilizados ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2. Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água ultrapura obtida através de equipamento Milli-Q® Plus (Milipore®, EUA). O solvente orgânico etanol grau CLAE Panreac® foi utilizado na preparação das fases móveis. Os reagentes utilizados para a degradação foram ácido clorídrico 0,01 M (Qhemis®), hidróxido de sódio 0,01 M (Cinetica®), peróxido de hidrogênio 0,03% (Vetec Química Fina®). As soluções foram filtradas em membrana de *nylon* com poro de

0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), e foram desgaseificadas em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique<sup>®</sup>, SP, Brasil). Para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de fase reversa foi utilizado equipamento Waters<sup>®</sup>, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, EUA), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne Breeze<sup>®</sup>, CA, EUA). A análise do fármaco em estudo foi realizada isocriticamente em coluna Zorbax Bonus-RP 5  $\mu\text{m}$  (250 mm x 4,6 mm) Agilent<sup>®</sup>. O ensaio foi realizado em vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , no comprimento de onda de 297 nm. As áreas dos picos foram integradas usando o programa de *software* Empower. Também foram utilizados banho-maria modelo Q334M (Quimis<sup>®</sup>, SP, Brasil) e balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo<sup>®</sup>, Suíça).

### **6.3.2.2. Método**

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação de ERTM foram apresentadas na Tabela 13. A fase móvel constituída de água: etanol (80:20 *v/v*); pH 2,5 ajustado com ácido fórmico 0,1%, foi preparada segundo o item 6.3.2.2.3. O volume de 20  $\mu\text{L}$  de solução de ERTM nas concentrações de trabalho (6.3.2.2.1. e 6.3.2.2.2) foi injetado no cromatógrafo a líquido em vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . A análise do fármaco foi realizada isocriticamente em coluna Zorbax Bonus-RP5  $\mu\text{m}$  (250 mm x 4,6 mm) com detector UV, no comprimento de onda de 297 nm. O ensaio foi realizado em temperatura ambiente de 25 °C.

#### **6.3.2.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR**

A massa equivalente a 10 mg de ERTM SQR foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, que foram completados com água para gerar soluções com a concentração da faixa de trabalho correspondente a 40, 60, 80, 100, 120 e 140  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.3.2.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos ampola com peso médio de 1,46 g de ERTM pó liofilizado para solução injetável, foi adicionado a um recipiente adequado. A partir deste *pool* de amostras, a massa de 10 mg de ERTM foi pesada e transferida para balão volumétrico de 50 mL para a obtenção de solução com concentração de 200,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e foram completados com água para

obtenção das soluções com a concentração da faixa de trabalho correspondente a 40, 60, 80, 100, 120 e 140  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.3.2.2.3. Preparo da fase móvel**

A fase móvel escolhida consistiu de água purificada (Milli-Q<sup>®</sup>) e etanol (Panreac<sup>®</sup>) na proporção de 80:20 v/v, pH ajustado para 2,6 com 0,1% ácido fórmico (Synth<sup>®</sup>). A fase móvel foi filtrada em membrana de *nylon* com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), sob vácuo e desgaseificada banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique<sup>®</sup>, SP, Brasil), durante 30 minutos antes do uso.

#### **6.3.2.3. Resultados e discussão**

O cromatograma típico de ERTM obtido pelo método proposto foi apresentado na Figura 18 item 5.8.2.4. e demonstrou que a amostra de ERTM sódico em pó liofilizado para solução injetável está condizente com o ERTM SQR no tempo de retenção de 4 minutos.

##### **6.3.2.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável**

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em cromatógrafo no comprimento de onda de 297 nm. O doseamento de ERTM foi quantificado em triplicata em termos de absorvância da área do pico, nas concentrações de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 6 e 7, descritas no item 3.9.2. O teor médio encontrado foi de 99,54% e DPR 0,73%.

##### **6.3.2.3.2. Conformidade do sistema cromatográfico**

O ICH (2005) estabelece o teste de conformidade do sistema cromatográfico como parte do processo de validação. O teste é uma etapa essencial para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estão aptos para a validação do método; a conformidade do sistema cromatográfico foi anteriormente apresentada e discutida na seção qualitativa, item 5.8.2.5. em que se deu a escolha destes parâmetros.

##### **6.3.2.3.3. Validação do método**

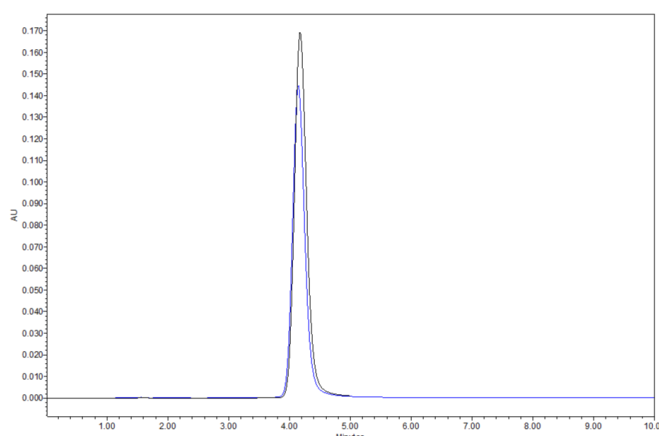
O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes BRASIL (2017) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão.

### 6.3.2.3.3.1. Seletividade e estudos de degradação forçada

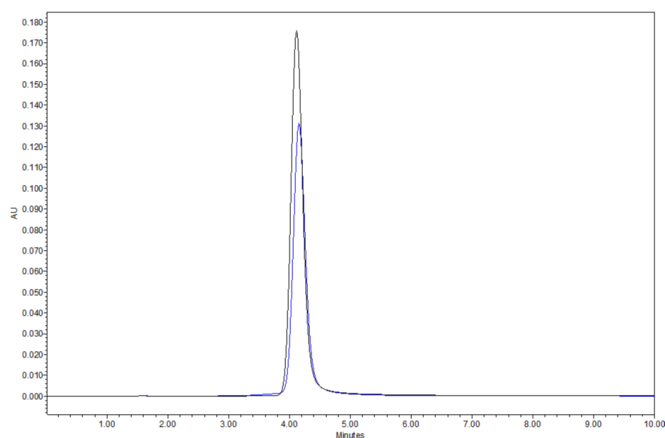
A seletividade do método foi determinada submetendo a solução amostra de ERTM em pó liofilizado para solução injetável ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) à degradação acelerada por condições ácida, alcalina, neutra, oxidativa e fotolítica, para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação da ERTM. Uma solução-mãe de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada em água purificada e as amostras foram diluídas em solução degradante, obtendo concentração final de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , concentração em que as amostras foram injetadas no equipamento.

A soluções degradantes foram HCl  $0,01 M$  para a hidrólise ácida, NaOH  $0,01 M$  para a hidrólise alcalina e peróxido de hidrogênio  $0,03 \%$  para a hidrólise oxidativa. A degradação neutra foi realizada submetendo a solução amostra de ERTM na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preparada em água purificada sob exposição à temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , em banho de aquecimento, por 12 horas e a fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta (UVC  $254 \text{ nm}$ ) em temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ ) por 48 horas. Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de ERTM, no entanto picos adicionais não foram observados. As Figuras 40 a 44 apresentam os cromatogramas obtidos após as degradações ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica, respectivamente, onde é possível visualizar o decréscimo da área do pico indicando a sua degradação. O pico principal de ERTM é apresentado no tempo de retenção de 4 minutos.

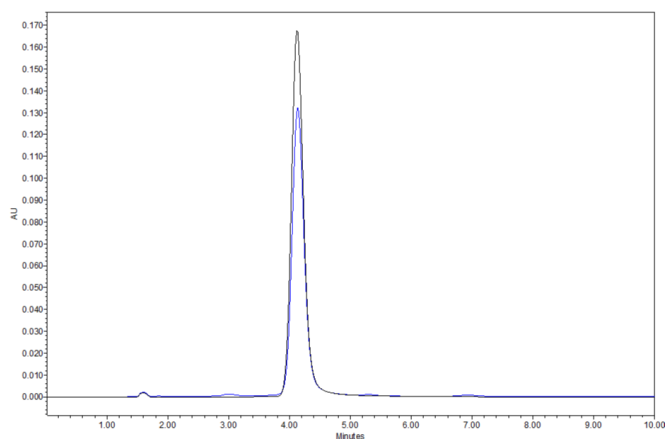
**Figura 40-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 3 h (azul), sob degradação ácida (HCl  $0,01 M$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , para o método por CLAE-FR.



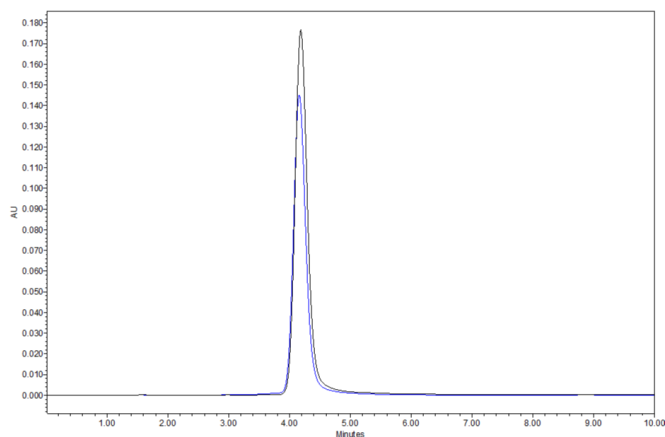
**Figura 41-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 1,50 h (azul), sob degradação alcalina (NaOH 0,01 M) a  $25^\circ\text{C}$ , para o método por CLAE-FR.



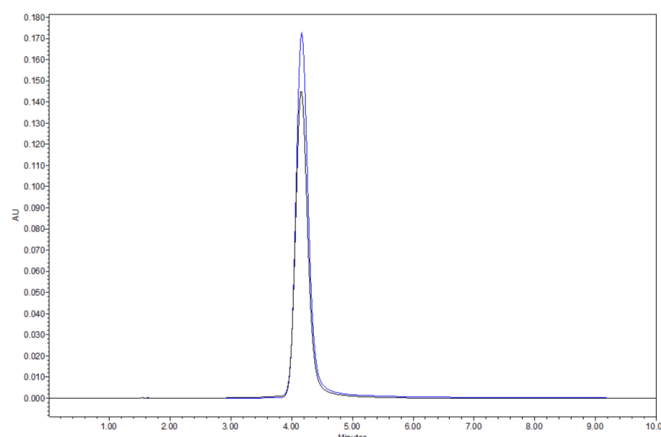
**Figura 42-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 1,50 h (azul), sob degradação oxidativa ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03%) a  $25^\circ\text{C}$ , para o método por CLAE-FR.



**Figura 43-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 12 h (azul), sob degradação neutra (água) a  $50^\circ\text{C}$ , para o método por CLAE-FR.



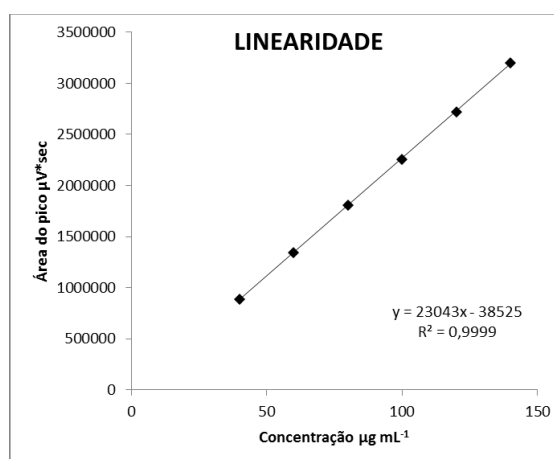
**Figura 44-** Cromatograma de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (azul) e após 12 h (preto), sob degradação fotolítica (luz UVC  $254 \text{ nm}$ )  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , para o método por CLAE-FR.



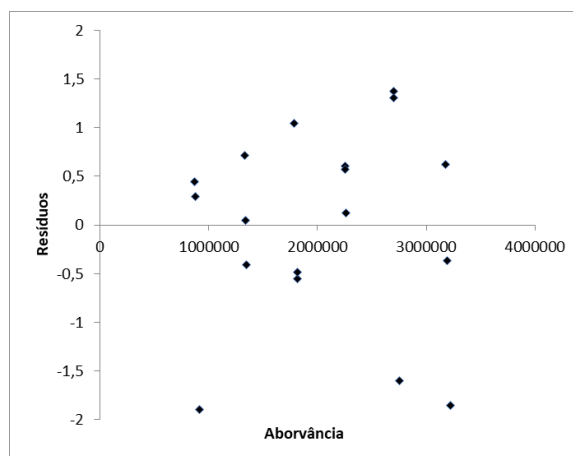
#### 6.3.2.3.3.2. Linearidade

A partir da solução-estoque de ERTM SQR na concentração de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com água purificada para a obtenção das concentrações de trabalho de 40; 60; 80; 100; 120 e  $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As curvas analíticas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) foi empregado para avaliação dos resultados obtidos. Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foi plotado em relação à respectiva concentração, observando-se linearidade na faixa de 40 -  $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ , conforme ilustrado na Figura 45 e seus resíduos na Figura 46.

**Figura 45-** Curva analítica de ERTM, obtida pelo método CLAE-FR.





**Figura 46-** Análise de resíduos para ERTM pelo método CLAE-FR.

Na Tabela 40 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de ERTM SQR.

**Tabela 40-** Valores das áreas referentes aos picos de ERTM SQR para construção da curva analítica para o método CLAE-FR

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Áreas <sup>a</sup> (AU)	Área média $\pm$ DP <sup>b</sup>	DPR <sup>c</sup> (%)
40	874811,33	889491,11 $\pm$ 23141,77	2,60
	877494,00		
	916168,00		
60	1331028,67	1341595,00 $\pm$ 9983,23	0,74
	1342887,00		
	1350869,33		
80	1786354,00	1804736,00 $\pm$ 15929,76	0,88
	1814504,67		
	1813349,33		
100	2263642,67	2258189,78 $\pm$ 4730,42	0,21
	2255187,00		
	2255739,67		
120	2702653,67	2720595,11 $\pm$ 30044,25	1,10
	2703851,33		
	2755280,33		
140	3176984,33	3197405,22 $\pm$ 22057,70	0,69
	3220798,33		
	3194433,00		

<sup>a</sup>Valor médio de três determinações/ <sup>b</sup>DP = Desvio padrão/ <sup>c</sup>DPR= Desvio padrão relativo

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ERTM SQR é apresentada na Tabela 41.

**Tabela 41-** Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método por CLAE - FR

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	11151186532014	2230237306402	5816,65*	3,11
Regressão linear	1	11149758817751	1114975881775 1	29079,50*	4,75
Desvio da Linearidade	4	1427714262,70	356928565	0,93	3,26
Resíduo	12	4601079492	383423291	---	---
Total	17	11155787611507	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$

#### 6.3.2.3.3.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados segundo Equações 8 e 9, descritas no item 3.9.4. e estão de acordo com o preconizado na literatura (ICH, 2005). A menor concentração detectada por esse método analítico foi 3,11  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o ERTM pode ser quantificado a partir de 9,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 6.3.2.3.3.4. Precisão

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do DPR percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) como previamente descritas no item 3.9.6.

Para a determinação da repetibilidade, sete soluções de ERTM SQR preparadas na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 2,20%. A determinação da precisão intermediária foi realizada pelo DPR dos teores obtidos em três dias consecutivos e por dois diferentes analistas. Os resultados são apresentados na Tabela 42.

**Tabela 42-** Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por CLAE - FR

Dia	Precisão interdias			Analista	Precisão entre-analistas		
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)		Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	99,86			A	102,98		
2	98,71	99,54	0,73	B	100,05	101,52	2,04
3	100,05						

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

### 6.3.2.3.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método de adição, no qual quantidade conhecida de SQR é adicionada à amostra. A recuperação foi realizada em três diferentes concentrações, R1, R2 e R3, equivalentes a 80, 100 e 120% da concentração média. A percentagem de ERTM recuperado foi calculada matematicamente por recuperação (Equação 10, item 3.9.7.). Para o preparo das soluções do teste de recuperações, volumes de 2000 µL (R1), 3000 µL (R2) e 4000 µL (R3) da solução SQR (200 µg mL<sup>-1</sup>) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 2000 µL da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável preparada na mesma concentração e completadas com água purificada para juntas perfazerem a concentração desejada. Desta forma, as seguintes concentrações foram obtidas: R1: 80 µg mL<sup>-1</sup>, representando amostra de 80% de percentual médio, R2: 100 µg mL<sup>-1</sup>, representando amostra de 100% de percentual médio e R3: 120 µg mL<sup>-1</sup>, representando amostra de 120% de percentual médio. A quantidade de SQR adicionada para avaliar a exatidão pelo teste de recuperação é apresentada na Tabela 43.

**Tabela 43-** Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método CLAE - FR

	ERTM amostra (µg)	ERTM SQR (µg)	Concentração teórica (µg)	%
<b>Amostra</b>	40	-----	40	-----
<b>R1</b>	40	40	80	80
<b>R2</b>	40	60	100	100
<b>R3</b>	40	80	120	120
<b>SQR</b>	-----	40	40	-----

A análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida corresponde à percentagem média de 99,81% (Tabela 44).

**Tabela 44-** Exatidão do método analítico para análise ERTM por CLAE – FR

	ERTM SQR adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ERTM SQR encontrado <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
<b>R1</b>	40,00	40,08	100,20		
<b>R2</b>	60,00	60,11	100,19	99,81	0,66
<b>R3</b>	80,00	79,24	99,05		

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

### 6.3.2.3.3.6. Robustez

A robustez do método foi testada quanto à influência de pequenas variações dos parâmetros pré-definidos, tais como marca do solvente etanol, vazão da fase móvel, quantidade de aditivo na fase móvel, fonte de obtenção de água, proporção da fase móvel, comprimento de onda e temperatura da sala. A robustez foi avaliada em triplicata de injeções de soluções de ERTM SQR *versus* ERTM em pó liofilizado para solução injetável na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em diferentes condições. Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média do doseamento, realizado em triplicata correspondente aos parâmetros normais, foi comparada às médias dos doseamentos correspondentes aos níveis alterados. As diferentes condições foram avaliadas simultaneamente pelo modelo fatorial Plackett-Burman e os resultados obtidos foram calculados usando a metodologia proposta por Youden, Steiner (1975), como discutido anteriormente no item 3.9.8.

A escolha dos parâmetros e os níveis em que devem ser testados são muito importantes para obtenção de um teste de robustez confiável. As variáveis devem ser condizentes com a realidade prática e os níveis devem refletir a variação que pode ser geralmente observada. Os parâmetros e os níveis de variação testados são apresentados na Tabela 45.

**Tabela 45-** Parâmetros selecionados e níveis de variabilidade para CLAE – FR

Parâmetros	Unidade	Limite	Condição variada (-1)	Condição normal (0)	Condição variada (1)
A. Marca do etanol	-----	-----	J. T. Baker®	Panreac®	Tedia®
B. Vazão da fase móvel	$\text{mL min}^{-1}$	0,01	0,99	1,00	1,01
C. Quantidade de aditivo na FM	%	0,01	0,09	0,10	0,11
D. Fonte de água	-----	-----	Lab. 2	Lab. 1	Lab. 3
E. Proporção da FM (v/v)	%	1	79:21	80:20	81:19
F. Comprimento de onda	nm	1	296 nm	297 nm	298 nm
G. Temperatura da sala	°C	1	19	20	21

-1= Nível inferior; 0= Nível Normal e 1 Nível superior.

O efeito médio de cada variável é a diferença média entre as observações determinadas nos níveis extremos e aqueles determinados no nível ideal em módulo. Os efeitos resultantes dos parâmetros alterados foram avaliados segundo a Equação 11 e, foram comparados aos valores obtidos como referência de 0,81 para os níveis inferiores (-1) e 1,23 para os níveis superiores (1). Nenhum efeito apresentou resultado significativo, indicando que o método proposto é robusto. Os teores encontrados nas condições normais e alteradas de cada fator são apresentados na Tabela 46.

**Tabela 46-** Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman, CLAE – FR

Parâmetros	(-1)	Teor de -1 (%) <sup>a,b</sup>	(1)	Teor de 1 (%) <sup>a,b</sup>
Marca da Etanol	J.T.Baker	99,75 – 99,63=  0,12	Tedia	97,39 – 96,65 =  0,74
Vazão da fase móvel (mL min <sup>-1</sup> )	0,99	100,06 – 98,72=  1,34	1,01	97,55 – 96,49 =  1,05
Quantidade de aditivo na FM	0,09	98,48 – 100,30=  1,82	0,11	97,88 – 96,18 =  1,73
Fonte de água	Lab. 2	99,46 – 99,32=  0,14	Lab. 3	97,32 – 96,72 =  0,60
Proporção da FM v/v (%)	79:21	98,85 – 99,94=  1,09	81:19	96,47 – 97,57 =  1,10
Comprimento de onda (nm)	296	99,65 – 99,13=  0,52	298	97,32 – 96,72 =  0,60
Temperatura da sala	19	100,55 – 98,24=  2,31	21	98,04 – 96,00 =  2,04

<sup>a</sup>Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas;

<sup>b</sup>Critérios de referência calculados: |2,48| para o teste -1 e |2,61| para o teste 1

Neste trabalho foi validado um método cromatográfico, com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção, preconizados em guias internacionais (FDA, 2004; ICH, 2005). Antes da validação, realizaram-se os testes de conformidade do sistema cromatográfico (*system suitability*) que são essenciais para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estejam aptos para a validação do método. Os dados obtidos na verificação da conformidade do sistema cromatográfico (Tabela 14) mostraram que o sistema se apresentou eficiente para o desenvolvimento do método cromatográfico, sendo adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura (FDA, 2004, USP 38, 2015), a qual sugere número de pratos > 2000 e o DPR para os parâmetros testados < 2%. Portanto, o método proposto cumpre os requisitos preconizados na literatura oficial, podendo ser empregado para análise de ERTM na indústria farmacêutica.

O tempo de corrida necessária para análise é de 4 min, proporcionando, desta maneira, uma rápida determinação do fármaco, que é um atributo fundamental para sua aplicabilidade no controle de qualidade na indústria farmacêutica.

O estudo da degradação forçada da amostra de ERTM foi determinado submetendo amostras de ERTM a condições de estresse alcalino, ácido, neutro, oxidativo e fotolítico, para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação de ERTM. A hidrólise

alcalina, ácida, oxidativa foram realizadas à temperatura 25 °C e a degradação neutra foi realizada em banho à temperatura 50 °C. O fármaco em estudo mostrou que em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico de ERTM, quando comparado ao pico do fármaco no momento de preparo, no entanto, não foram visualizados picos adicionais significativos referente a possíveis produtos de degradação.

A hidrólise neutra apresentou degradação de 19,14 % em 12 horas de análise. O fármaco foi menos estável em condições alcalina (NaOH 0,01 M), degradou 24,75 % em 1,50 horas de análise. Nas condições ácida e oxidativa apresentou decréscimo 15,80 % em 3 horas e 21,13% em 1,50 hora, respectivamente. Enquanto que na degradação fotolítica, em que a amostra foi submetida à exposição de luz UVC 254 nm, observou-se um decréscimo de 16,56% em 12 horas de análise.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas, que foram construídas a partir de seis concentrações de padrões de ERTM. As áreas dos picos apresentadas nos cromatogramas foram plotadas em um gráfico *versus* a concentração de ERTM, a fim de se obter a curva analítica que apresentou um coeficiente de determinação significativo mostrando-se linear na faixa de 40-140 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0,9999$ ). O conteúdo de ERTM nas amostras analisadas foi de, 99,54%, é considerado satisfatório pela sua proximidade a 100%, pois até o momento não existe monografia de ertapenem nos compêndios oficiais. Análises estatísticas de variância (ANOVA) foram realizadas e os resultados apresentados apontaram que não há desvios significativos de linearidade e, portanto, o método é linear.

A precisão entre analistas foi analisada por doseamento e os teores obtidos foram de 100,98% (analista 1) e 100,05% (analista 2), com DPR entre eles de 2,04. Além disso, os valores de DPR referente às áreas dos picos cromatográficos obtidos nas análises de precisão intradia e interdia foi de 2,20% e 0,73% respectivamente, sendo estes inferiores ao preconizado na literatura (menor ou igual a 5%), o que indica a precisão do método proposto (BRASIL, 2017).

Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) foram de 3,11 e 9,41 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, e indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade ERTM pó para solução injetável na faixa linear estabelecida. A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação, com uma média de 99,81%.

A robustez foi comprovada pelo modelo de Plackett-Burman, em que as alterações dos parâmetros analíticos ocorrem simultaneamente (Tabela 10), e não apresentou nenhum efeito considerado significativo em comparação com o valor de referência calculado utilizando a

Equação 11. Os parâmetros proporção do aditivo na fase móvel e a temperatura da sala devem ser bem controlados para não interferirem nas análises.

O desenvolvimento de metodologias cromatográficas priorizando menor tempo de análise e que sejam economicamente viáveis são de suma importância nos dias atuais. O método proposto neste trabalho apresentou um tempo de retenção adequado para a análise na indústria, além de se usar etanol como o solvente orgânico. São muitos os ganhos para a indústria e para o meio ambiente de se usar etanol na fase móvel e estes já foram previamente discutidas no desenvolvimento deste método (item 5.8.2.4). O método cromatográfico proposto mostrou-se adequado e vantajoso apresentando simplicidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, limites de detecção e de quantificação satisfatórios, além de conformidade do sistema, portanto pode ser empregado para a análise quantitativa de ERTM na indústria farmacêutica, contribuindo para melhorar o controle de qualidade, e ainda com a vantagem de não gerar resíduos tóxicos a serem tratados pela indústria farmacêutica, além de ser uma excelente alternativa para o meio ambiente.

#### **6.4. CROMATOGRAFIA EM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (CFS)**

A cromatografia em fluidos supercríticos tem sido usada de forma bem-sucedida na análise de produtos farmacêuticos com diferentes propriedades químicas na separação de amostras biológicas, hormônios, lipídios, substâncias farmacêuticas ativas e os seus enantiômeros. A técnica se destaca por apresentar alto rendimento, ser fácil de usar, ser econômica e quando combinadas com métodos de detecção, tais como a MS, proporcionar resultados altamente precisos e exatos com alta sensibilidade (ABBOTT et al., 2008).

A CFS-MS foi utilizada para inúmeras aplicações da Pfizer, que relata o uso da técnica para a análise e purificação de alto rendimento de diversas substâncias farmacêuticas. Apenas com a combinação de modificadores orgânicos adicionados ao CO<sub>2</sub> foi possível analisar uma gama mais ampla de substâncias do que era inicialmente imaginado e permitiu resolver todos os problemas quirais apresentados. A técnica foi usada no desenvolvimento de medicamentos, na identificação e purificação de substâncias, na avaliação de pureza, na análise de proteínas e peptídeos, nos estudos de farmacocinética, em uma variedade de aplicações protônicas, entre outros. Com isso, segundo a Pfizer em um período de quatro anos, mais de um milhão substâncias foram analisadas por CFS-MS sem prejuízo dos equipamentos. A técnica foi então encorajada como sendo uma técnica robusta que provou ser uma ferramenta útil e rápida para diversas áreas de aplicação o que é ideal para controle de qualidade devido à sua alta velocidade de análise (BOLAÑOS et al., 2004).

Apesar de suas vantagens aparentes, a CFS apresentou altos e baixos desde a sua descoberta e ainda hoje não é comumente usada na análise de rotina de fármacos. Mas é uma técnica já estabelecida para separar produtos quirais e para purificação de alto desempenho.

Na indústria farmacêutica, a validação do procedimento analítico é necessária antes da sua utilização no laboratório de controle de qualidade. Assim como em CLAE-FR, os requisitos relativos a confiabilidade, precisão e sensibilidade demonstram ser adequados para CFS. A performance quantitativa em CFS tem sido avaliada e tem demonstrado estar em conformidade com as recomendações da USP e ICH (ANTON; BACH; GEISER, 1991; ANTON; SIFFRIN, 1999; ICH, 2005; ABBOTT et al., 2008; DISPAS et al., 2014, USP 38, 2015).

Em 2009 Brunelli e colaboradores apresentaram um notável trabalho em que um método usando um gradiente de eluição foi validado para a separação de uma mistura de 22 substâncias de diferentes polaridades com boa resolução de pico em menos de 20 minutos. O trabalho mostra que os critérios de aceitação de validação podem ser cumpridas e sendo assim, deve haver um lugar para CFS na análise farmacêutica (BRUNELLI et al., 2009). No entanto, para demonstrar a validação de seu método, foi apresentado a quantificação de traços de tiourea presentes na formulação, uma substância cancerígena, e portanto a sua quantificação é de extrema importância. Desai e colaboradores (2012) apresentaram uma validação de acordo com parâmetros do ICH para análise de substâncias polares. Embora este seja realmente um excelente trabalho, o seu método não apresenta o estudo de degradação forçada que indica a estabilidade do método que é um requisito obrigatório pelas diretrizes farmacopeicas e do ICH, 2005. A robustez da técnica CFS, que até então, parecia ser um problema, também vem sendo discutida na literatura (DISPAS et al., 2014).

Com isso, além de uma validação abrangendo todas as exigências do ICH (2005), o nosso estudo apresenta uma ampla análise de robustez sobre esta técnica. Para isso, foi utilizada uma matriz fatorial desenvolvida por Plackett-Burman que tem sido aplicada para a avaliação da robustez em técnicas cromatográficas (BERZAS et al., 2004; CARINI et al., 2012; GARCÍA et al., 2004; LI, RASMUSSEN, 2003; LIN et al., 2005; MULHOLLAND; WATERHOUSE, 1987; NGUYET et al., 2003; NOVOKMET et al., 2012; PAIM et al., 2008; PEDROSO; SALGADO, 2014; SONG; PUTCHA, 2001; SUN; SU, 2002). Até o presente momento não há na literatura nenhum método de CFS para quantificação de ERTM que é uma substância polar. Assim, este estudo teve como finalidade investigar a possibilidade de desenvolver um método indicativo de estabilidade para análise de ERTM, bem como, avaliar se a técnica é uma ferramenta adequada para análise de rotina deste fármaco na indústria farmacêutica.



### 6.4.1. Material

O método foi desenvolvido em um sistema Jasco (Jasco Corporation<sup>®</sup>, Tóquio, Japão) equipado com os seguintes módulos: Jasco PU-2080-CO<sub>2</sub>-plus bomba de fornecimento de CO<sub>2</sub>; Jasco PU-2080-plus bomba de CLAE; AS-2059-SF-plus amostrador automático para CFS; UV-2070-plus detector UV-VIS com célula de fluxo de alta pressão; BP-2080-plus regulador de pressão de retorno automático; Caixa de interface LC-NET II / ADC e forno de coluna CO-2060. O *software* ChromomNAV foi utilizado para integrar as áreas de pico automaticamente. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna ProntoSil 120-5-Piridina 250 x 4,6 mm, 5,0 µm de(Bischoff<sup>®</sup>). Outros aparelhos utilizados foram: balança analítica BL120S (Sartorius<sup>®</sup>); micropipeta (Thermo Scientific<sup>®</sup>); membrana de nylon com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Grace<sup>®</sup>); lâmpada UV<sub>254</sub> nm UVGL-25 (UVP<sup>®</sup>); banho de ultrassom 2510E-MT (Branson<sup>®</sup>). Os produtos químicos utilizados foram ERTM 99,2% (n° EB004C1) e ERTM ingrediente farmacêutico ativo em pó liofilizado para solução injetável (n° 2178140), ambos gentilmente doados pela Merck Sharp & Dohme<sup>®</sup>. Todas as soluções e fases móveis utilizadas neste ensaio foram preparadas a partir de água ultrapura obtida a partir de um Milli-Q Plus (Millipore<sup>®</sup>, EUA) e todos os solventes utilizados foram de grau CLAE, metanol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), etanol 99,8% (Acros Organics<sup>®</sup>), etanol absoluto desidratado (Biosolve<sup>®</sup>), Etanol 96% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e todos os outros produtos químicos eram de grau analítico: acetato de amônio (Merck<sup>®</sup>); dietilamina (Fluka<sup>®</sup>); ácido fórmico 99% (Acros Organics<sup>®</sup>); ácido clorídrico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>); peróxido de hidrogênio 35% (Acros Organics<sup>®</sup>); hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e CO<sub>2</sub> de grau N48 à ar líquido (Liege, Bélgica<sup>®</sup>).

### 6.4.2. Método

O ensaio foi realizado usando um gradiente de eluição com a fase móvel A: CO<sub>2</sub> e B: uma mistura ternária de 70: 25: 5 metanol: etanol: água v/v/v. O gradiente iniciou com 1 minuto 60:40 A: B v/v para reter o ERTM seguido de uma rampa linear de 20 min a 35:65 A: B v/v. Esta composição permaneceu 4 minutos e depois voltou às condições iniciais durante mais 5 minutos. O volume da injeção foi de 5 µL, as soluções foram filtradas através de um filtro de 0,45 µm antes de serem injetadas. A vazão foi de 1 mL min<sup>-1</sup>, usando detector UV a 230 nm, em temperatura de 20 °C. O regulador de contrapressão foi ajustado em 17,5 MPa (175 Bar). Este método foi conduzido no Departamento de Química Orgânica e Macromolecular na Faculdade de Ciências da Universidade de Gante.

#### **6.4.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR**

Uma solução estoque foi preparada transferindo 50 mg de ERTM SQR (descritos no item 4.1.), para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com água ultrapura para a obtenção de solução com concentração de 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 200 a 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.4.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola, com peso médio de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em um recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, massa equivalente a 50 mg de ERTM SQR foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com água purificada para a obtenção de solução com concentração de 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água purificada para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 200 a 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.4.2.3. Preparo da fase móvel**

A fase móvel foi constituída por proporções de metanol, etanol de grau CLAE e água purificada, estes solventes foram filtrados em membrana filtrante de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>), sob vácuo e degaseificada no banho de ultrassom 2510E-MT (Bransonic<sup>®</sup>) durante 30 minutos antes do uso. O  $\text{CO}_2$  de grau N48 (Liege, Bélgica<sup>®</sup>) foi liberado por tubulações conectadas ao equipamento e a sua vazão foi controlada pela bomba de fornecimento de  $\text{CO}_2$  - Jasco PU-2080- $\text{CO}_2$ -plus.

### **6.4.3. Resultados e discussão**

O cromatograma típico de ERTM obtido pelo método proposto foi apresentado na Figura 21 item 5.9.3. e demonstrou que a amostra de ERTM sódico em pó liofilizado para solução injetável está condizente com o ERTM SQR no tempo de retenção de 21 minutos.

#### **6.4.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável**

O doseamento de ERTM foi quantificado em triplicata em termos de absorvância da área do pico, nas concentrações de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 6 e 7, descritas no item 3.9.2. O teor médio encontrado foi de 99,91 % e DPR de 0,71 %.

#### **6.4.3.2. Conformidade do sistema cromatográfico**

O ICH (2005) estabelece o teste de conformidade do sistema cromatográfico como parte do processo de validação. O teste é uma etapa essencial para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados estão aptos para a validação do método; a conformidade do sistema cromatográfico foi anteriormente apresentada e discutida na seção qualitativa, item 5.9.3.1. em que se deu a escolha desses parâmetros.

#### **6.4.3.3. Validação do método**

O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes brasileiras e internacionais (IUPAC, 2002; BRASIL, 2017; ICH, 2005; FDA, 2015). Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão.

##### **6.4.3.3.1. Seletividade por estudo da degradação forçada**

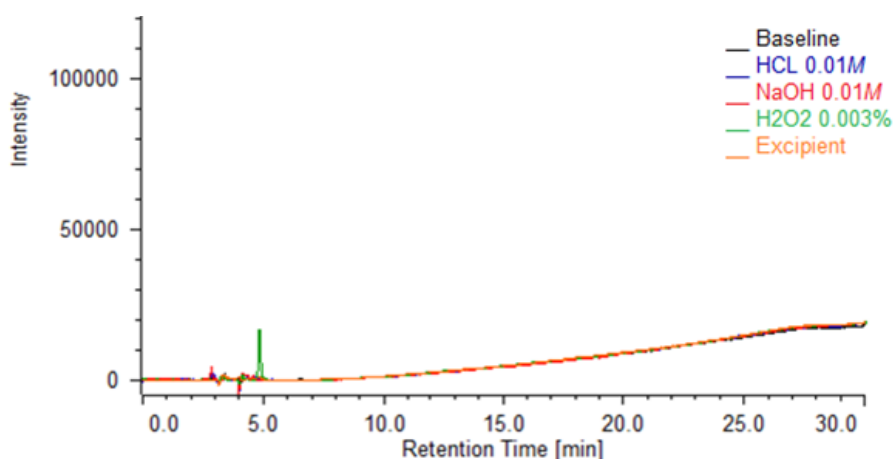
O estudo de degradação forçada foi realizado pela exposição de ERTM pó liofilizado para solução injetável em condições de degradação acelerada por estresse ácido, alcalino, neutro, oxidativo, térmico e fotolítico. Para desta forma, verificar se possíveis produtos de degradação podem interferir na quantificação ERTM. As soluções usadas para promover a hidrólise ácida, alcalina e oxidativa foram HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 %. Concomitantemente, também foi injetada uma amostra de controle (ERTM dissolvido em água apenas) para comparação.

O estudo de estresse fotolítico foi realizado expondo ERTM SQR em pó liofilizado para solução injetável sob luz UV 254 nm. Uma amostra de ERTM envolta em papel alumínio foi usada como controle escuro para que não houvesse interferentes decorrentes ao tempo de exposição e temperatura decorrente da lâmpada (a sala foi mantida na temperatura de 25 °C durante todo o período do estudo). Ambas as amostras de ERTM, a amostra exposta e a amostra de controle escuro foram colocadas separadamente em placas de vidro do tipo Petri, na quais, foram espalhadas para uma espessura não superior a 3 mm, de acordo com as diretrizes ICH. Para o estresse térmico, uma alíquota de ERTM pó liofilizado para solução injetável foi colocada em estufa a 60 °C e analisada de hora em hora. As amostras foram avaliadas até a obtenção de 10 a 30%, de degradações e/ou um período máximo de 5 dias, no caso do estresse fotolítico o tempo máximo recomendado é de 14 dias, como recomendado na literatura, pois acima disso podem ser gerados produtos de degradação secundários que não são de interesse

em nosso estudo. Os estudos de estresse foram realizados de acordo com as diretrizes da ICH RDC 58 e Blessy e colaboradores, 2014 (ICH, 2005; ANVISA, 2013; BLESSY et al., 2014).

As soluções utilizadas para promover a degradação também foram analisadas a fim de verificar que estas substâncias não coeluem juntamente com o ERTM podendo interferir na sua quantificação. Dentre estas soluções, apenas o peróxido de hidrogénio apresentou um pico no início do cromatograma próximo do "volume morto" ( $t_R = 5$  minutos). Os adjuvantes, hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio também foram avaliados como "branco". Deste modo, verificou-se que não há interferência das soluções degradantes e/ ou dos adjuvantes contidos na forma farmacêutica para a quantificação de ERTM pelo o método proposto (Figura 47).

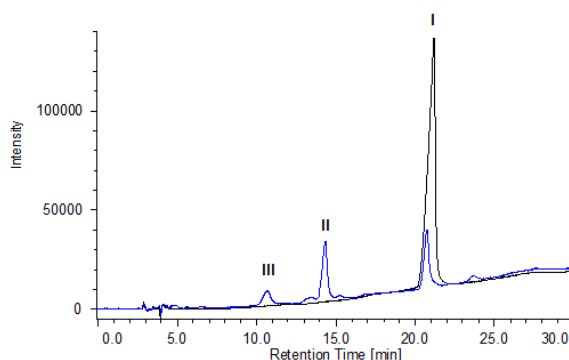
**Figura 47-** Cromatogramas das soluções usadas para promover a degradação e adjuvantes sem qualquer vestígio de ERTM, pelo método CFS.



No estudo de degradação forçada o decréscimo da área do pico de ERTM foi observado quando comparado à área do pico de ERTM logo após o preparo sem a presença da solução degradante. Não foram observados picos adicionais significativos que poderiam interferir na quantificação de ERTM durante a degradação de até 30%.

A degradação oxidativa é intensamente reativa e mesmo diluída em 0,3 % levou à degradação de mais de 30% imediatamente após a preparação, 82,68% em 24 horas de análise quando a amostra foi preparada em água e 56,36% quando a amostra foi preparada em metanol. A degradação oxidativa foi a única que apresentou produtos de degradação, no entanto esses não coeluem junto ao pico de ERTM, e portanto, não interferem com a sua quantificação. Nas outras condições degradantes não foram observados produtos interferentes (Figura 48).

**Figura 48-** Cromatograma da degradação oxidativa ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03%), sobreposição do pico de ERTM sem degradação e após 24 horas de degradação, pelo método CFS.

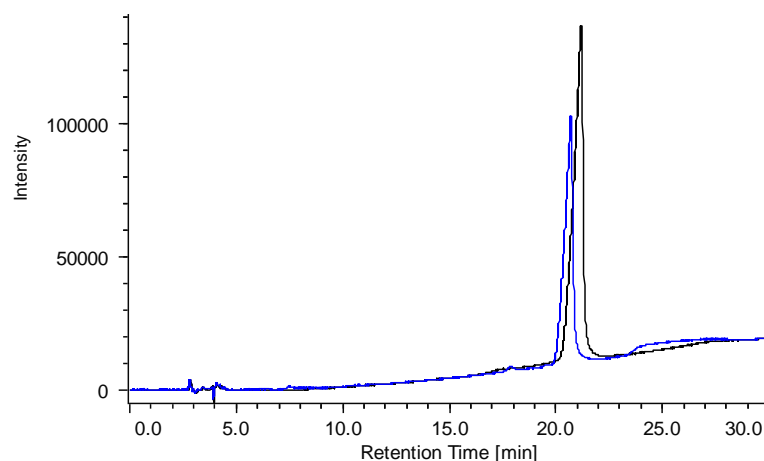


A degradação oxidativa foi mais intensa, seguida pela degradação térmica, alcalina, ácida, neutra e fotolítica, respectivamente. Os parâmetros que resultaram na degradação de cerca de 30% são apresentados na Tabela 47 e nas Figuras 49 a 55.

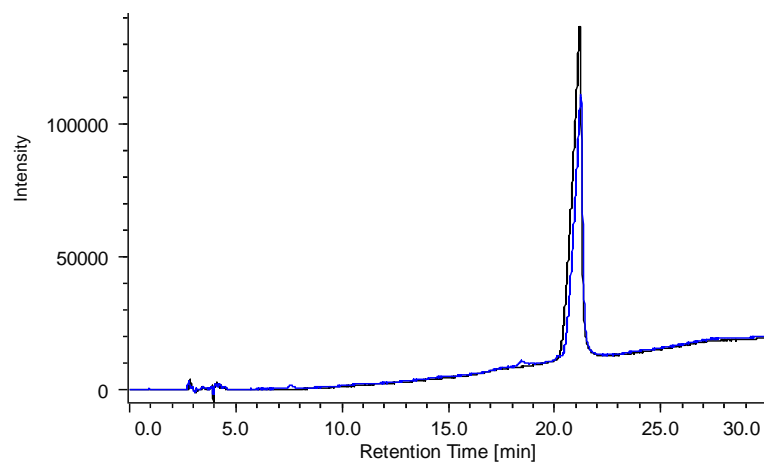
**Tabela 47-** Percentuais obtidos no estudo de degradação forçada para ERTM pelo método CFS

Parâmetros	Tempo	Quantidade degradada (%)
$\text{H}_2\text{O}_2$ 0,03%	Imediatamente após a preparação	42,43
Térmica 60 °C	1 h	44,72
Neutra 60 °C	2 h	35,12
Neutra 40 °C	24 h	26,29
$\text{NaOH}$ 0,01 M	36 h	29,89
$\text{HCl}$ 0,01 M	120 h	26,86
Neutra 25 °C	120 h	30,24
$\text{UVC}_{254}$	14 dias	15,62

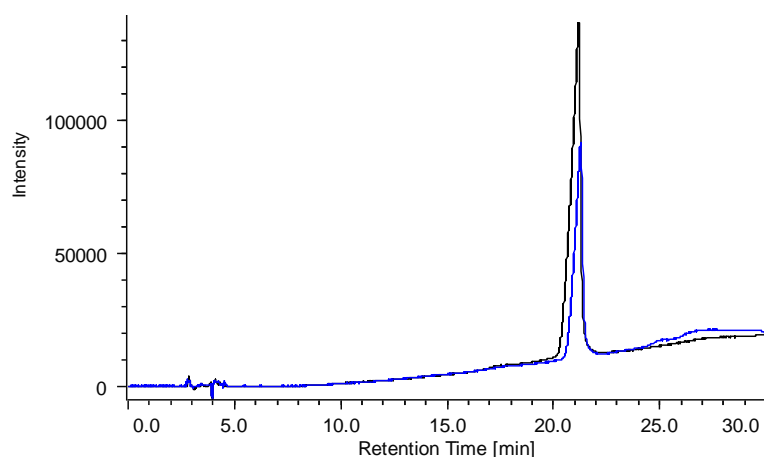
**Figura 49-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 36 h (azul), sob degradação alcalina ( $\text{NaOH}$  0,01 M) a 25 °C, para o método por CFS.



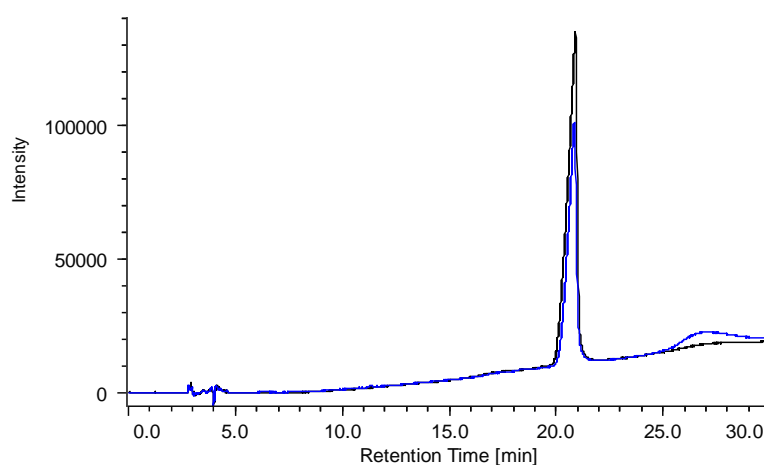
**Figura 50-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 120 h (azul), sob degradação ácida (HCl  $0,01 \text{ M}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , para o método por CFS.



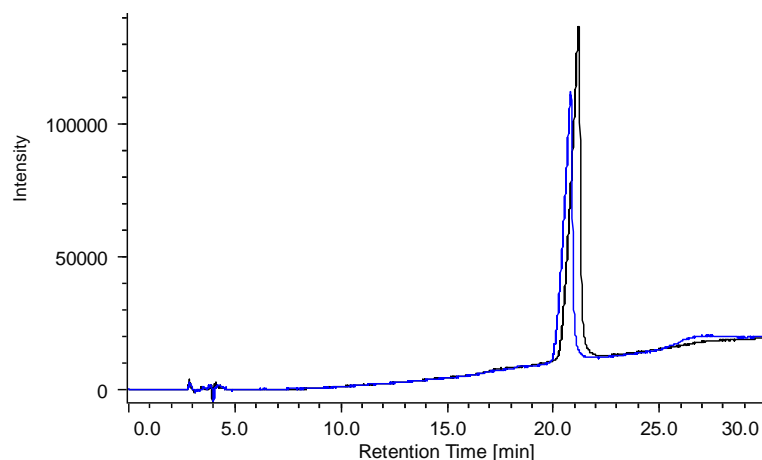
**Figura 51-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 1 h (azul), sob degradação térmica a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , para o método por CFS.



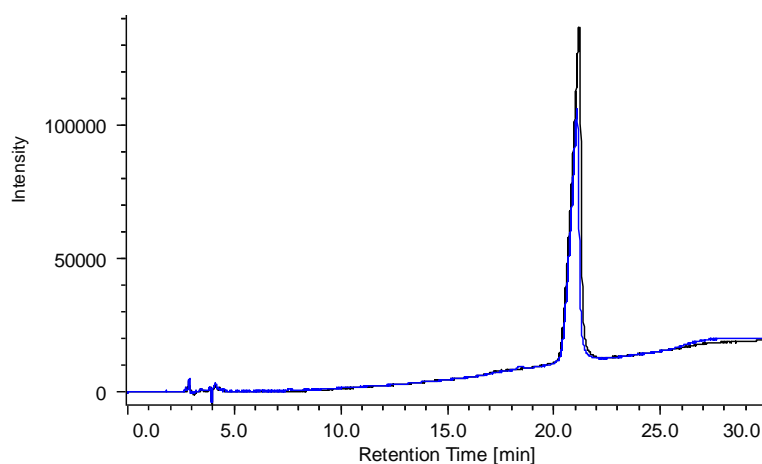
**Figura 52-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 2 h (azul), sob degradação neutra (água) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , para o método por CFS.



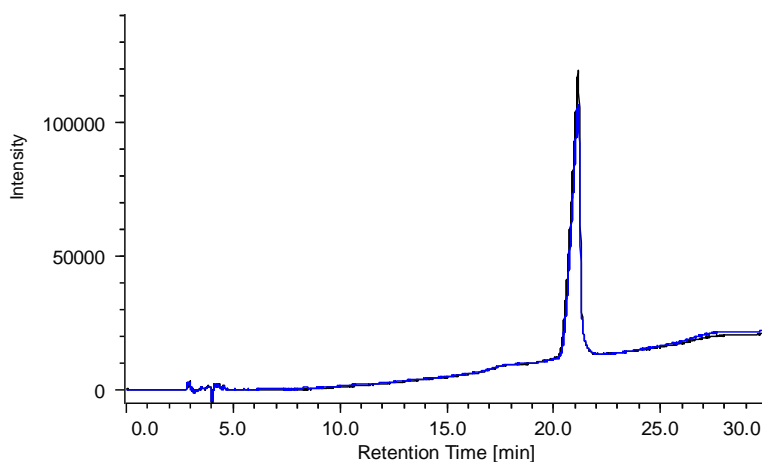
**Figura 53-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 24 h (azul), sob degradação neutra (água) a  $40^\circ\text{C}$ , para o método por CFS.



**Figura 54-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 120 h (azul), sob degradação neutra (água) a  $25^\circ\text{C}$ , para o método por CFS.



**Figura 55-** Cromatogramas de ERTM  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  tempo zero (preto) e após 14 dias (azul), sob degradação fotolítica (luz UVC<sub>254</sub> nm)  $25^\circ\text{C}$ , para o método por CFS.



#### 6.4.3.3.2. Limites de detecção e de quantificação

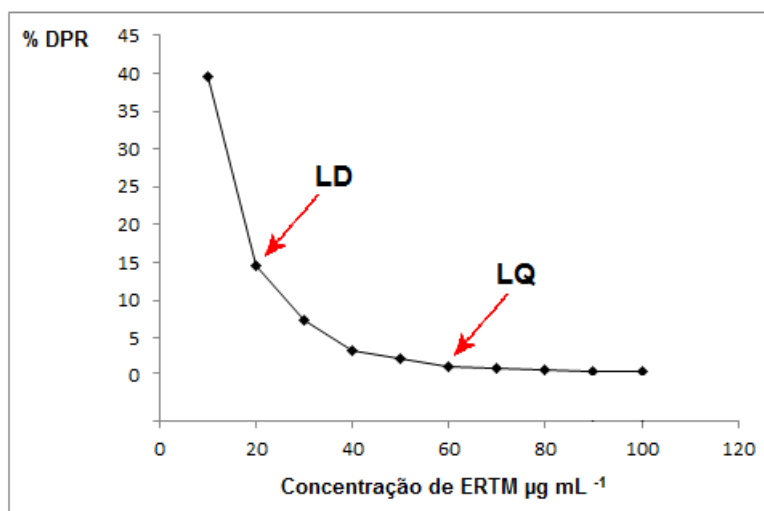
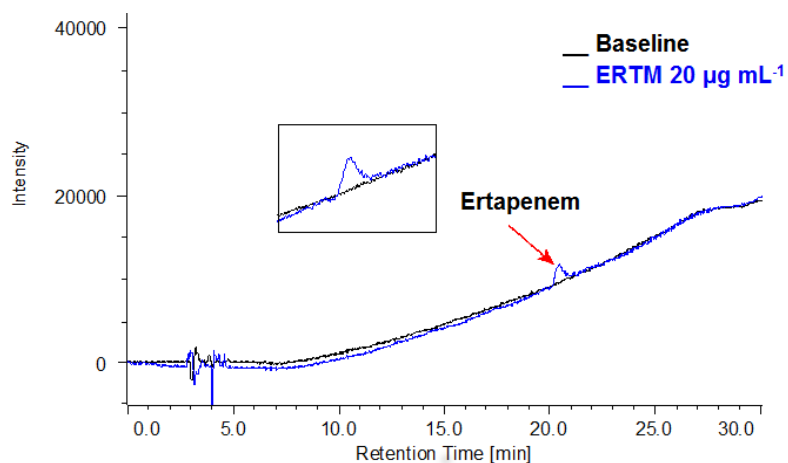
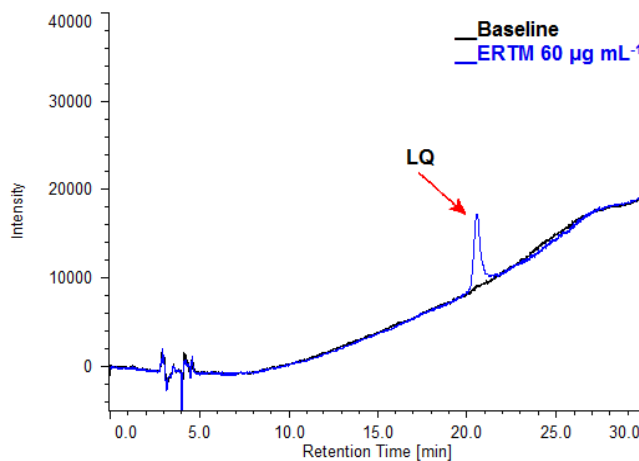
O LD e LQ foram determinados injetando triplicata de soluções em concentrações crescentes de ERTM, preparadas por diluição seriada. O LD foi determinado pela observação do “*signal-to-noise ratio*”(sinal-ruído) de  $s/n > 3$  para LD e  $s/n > 10$  associado ao DPR% da área do pico em triplicata  $< 2$  para LQ, como recomendado por Snyder, Kirkland, Dolan, 2010, para avaliação das condições cromatográficas. Os resultados encontrados para LD e LD são apresentados na Tabela 48 e ilustrados nas Figuras 56 a 58.

**Tabela 48-** Limites de detecção e de quantificação para ERTM pelo método de CFS

ERTM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	área	% DPR
10	19908	39,56
	10516	
	10572	
20	33821	14,55
	44254	
	43865	
30	80453	7,45
	84942	
	73198	
40	120996	3,43
	127822	
	120126	
50	141423	2,27
	144873	
	135783	
60	209558	1,17
	205487	
	205230	
70	238542	0,96
	235501	
	234116	
80	297492	0,76
	294438	
	293119	
90	309236	0,68
	306612	
	305085	
100	345872	0,56
	345732	
	342483	

\*DPR – Desvio padrão relativo



**Figura 56-** Limites de detecção e de quantificação para ERTM pelo método de CFS.**Figura 57-** Determinação do limite de detecção de ERTM em pó liofilizado para solução injetável no método CFS.**Figura 58-** Determinação do limite de quantificação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável no método CFS.

O LD e o LQ também podem ser verificados usando a curva analítica feita em triplicata e calculados segundo preconizado pela ICH, 2005, que se baseiam no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, apresentados nas Equações 8 e 9 do item 3.9.4. Neste caso, os valores foram de  $20,69 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $62,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para detecção e limite de quantificação, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com o método proposto por Snyder, Kirkland, Dolan (2010).

É verdade que o limite de detecção e quantificação de CFS é maior do que as técnicas cromatográficas tradicionais. No entanto, é válido mencionar que o método não pretende quantificar ERTM em matrizes complexas, sendo sua aplicabilidade focada para a quantificação da substância em forma farmacêutica, podendo assim, usar quantidades maiores, que proporcionam resultados mais precisos e robustos.

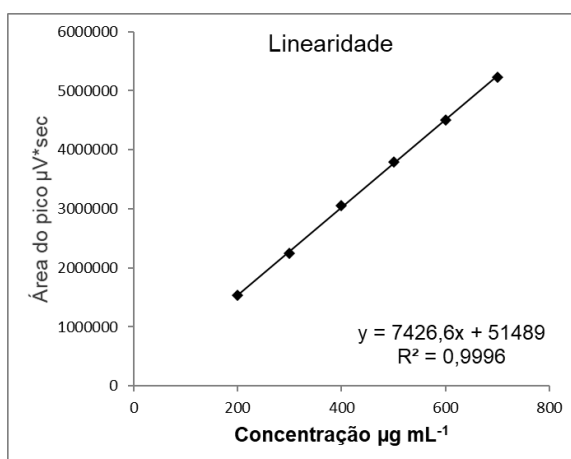
#### 6.4.3.3.3. Linearidade

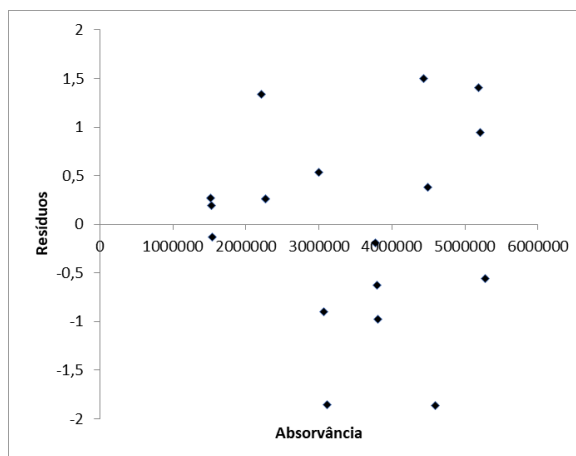
A linearidade foi avaliada pela análise de regressão da curva analítica que foi construída traçando os valores médios das áreas no pico cromatográfico obtidas experimentalmente em relação às suas respectivas concentrações. O ensaio foi realizado em triplicata em três dias diferentes. A avaliação estatística foi realizada pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA.

A curva de analítica para ERTM SRQ foi construída através da disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações.

O resultado foi representado pela equação  $y = 7426,6x + 51489$ , e  $R^2 = 0,9996$ , como representado na Figura 59. A homocedasticidade dos dados foi avaliada pela análise dos resíduos (Figura 60).

**Figura 59-** Curva analítica de ERTM, obtida pelo o método CFS.



**Figura 60** - Análise de resíduos para ERTM pelo método CFS.

Os valores das absorvâncias obtidas para a curva analítica de ERTM SQR estão demonstrados na Tabela 49.

**Tabela 49-** Valores das absorvâncias referentes a ERTM SRQ para a construção da curva analítica através do método de CFS

Concentração	Absorvância <sup>a</sup>	Absorvância média	DPR <sup>b</sup> (%)
200	1540408	1529031	0,65
	1525140		
	1521546		
300	2265287	2248164	1,32
	2213873		
	2265333		
400	3064698	3057039	1,89
	2995932		
	3110486		
500	3812158	3793985	0,50
	3795462		
	3774335		
600	4598113	4508589	1,82
	4437087		
	4490566		
700	5207486	5224029	0,94
	5279275		
	5185326		

<sup>a</sup>Valor médio de três determinações; <sup>b</sup>DPR: desvio padrão relativo

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ERTM SQR está apresentada na Tabela 50.

**Tabela 50-** Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método por CFS

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	28967672436945	5793534487389	2518,20*	3,11
Regressão linear	1	28944914260407	28944914260407	12581,13*	4,75
Desvio da linearidade	4	22758176538	5689544134	2,47	3,26
Resíduo	12	27607939784	2300661648	---	---
Total	17	28995280376730	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$

#### 6.4.3.3.4. Precisão

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do DPR percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) como previamente descritas no item 3.9.6.

Para a determinação da repetibilidade, sete soluções de ERTM SQR foram submetidas a análises sucessivas realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 1,48%. A determinação da precisão intermediária foi realizada pelo DPR dos teores obtidos em três dias consecutivos e pela comparação de análises realizadas por diferentes analistas, conforme apresentado na Tabela 51.

**Tabela 51-** Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por CFS

Dia	Precisão interdias			Analista	Precisão entre-analistas		
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)		Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	99,29			A	99,82		
2	98,76	99,91	0,71	B	98,30	99,06	1,09
3	100,68						

#### 6.4.3.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método de adição, no qual quantidade conhecida de SQR é adicionada à amostra. A recuperação foi realizada em três diferentes concentrações, R1, R2 e R3, equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração média. A percentagem de ERTM recuperado foi calculada matematicamente por recuperação (Equação

10, item 3.9.7.). Para o preparo das soluções do teste de recuperações, volumes de 200  $\mu\text{L}$  (R1), 300  $\mu\text{L}$  (R2) e 400  $\mu\text{L}$  (R3) da solução SQR ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável preparada na mesma concentração e completadas com água purificada para juntas perfazerem a concentração desejada. Desta forma, as seguintes concentrações foram obtidas: R1:  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 80% de percentual médio, R2:  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 100% de percentual médio e R3:  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 120% de percentual médio. A quantidade de SQR adicionada para avaliar a exatidão pelo teste de recuperação é apresentado na Tabela 52.

**Tabela 52-** Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método CFS

	ERTM amostra ( $\mu\text{g}$ )	ERTM SQR ( $\mu\text{g}$ )	Concentração teórica ( $\mu\text{g}$ )	%
<b>Amostra</b>	200	-----	200	-----
<b>R1</b>	200	200	400	80
<b>R2</b>	200	300	500	100
<b>R3</b>	200	400	600	120
<b>SQR</b>	-----	200	200	-----

A análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida correspondem à porcentagem média de  $99,57\% \pm 1,70\%$  (Tabela 53).

**Tabela 53-** Exatidão do método analítico para análise ERTM por CFS

	ERTM SQR adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ERTM SQR encontrado <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
<b>R1</b>	200	196,54	98,27		
<b>R2</b>	300	296,91	98,97	99,57	0,70
<b>R3</b>	400	405,92	101,48		

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

Com isso, a exatidão do método aponta que o método proposto tem capacidade de gerar resultados reprodutíveis com uma baixa variação de resposta entre ensaios independentes.

#### 6.4.3.3.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada fazendo pequenas alterações aos parâmetros simultaneamente para mostrar que a validade do método é mantida. Para isso, doseamentos de soluções de ERTM SQR *versus* amostras contendo  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram realizados em triplicata de acordo com o planejamento fatorial de Plackett-Burman, anteriormente apresentado no item 3.9.8.

A escolha dos parâmetros e os níveis em que devem ser testados são muito importantes para obtenção de um teste de robustez confiável. As variáveis devem ser condizentes com a realidade prática e os níveis devem refletir a variação que pode ser geralmente observada. Os parâmetros e os níveis de variação testados são apresentados na Tabela 54.

**Tabela 54-** Parâmetros selecionados e níveis de variabilidade para CFS

Parâmetros	Unidade	Limite	Condição variada (-1)	Condição normal (0)	Condição variada (1)
A. Marca do etanol	-----	-----	Sigma®	Acros®	Biosolve®
B. Vazão da fase móvel	mL min <sup>-1</sup>	0,1	0,9	1,00	1,1
C. Quantidade de aditivo	%	0,1	4,9	5	5,1
D. Volume de injeção	mL	0,1	4,9	5	5,1
E. Regulador de contrapressão	bar	1	174	175	176
F. Comprimento de onda	nm	1	229	230	231
G. Temperatura do forno	°C	1	19	20	21

-1= Nível inferior; 0= Nível Normal e 1 Nível superior.

Para determinar a influência das alterações em cada parâmetro no resultado, comparou-se a média da dosagem realizada em ensaios em triplicata correspondentes a intervalos normais com à média da dosagem correspondente aos níveis modificados. O efeito médio de cada variável é a diferença média entre as observações feitas nos níveis modificados e as feitas no nível ótimo. O desvio de cada fator foi calculado usando a metodologia proposta por Youden e Steiner (1975). As concentrações encontradas em condições normais e alteradas para cada fator são apresentadas na Tabela 55.

**Tabela 55-** Teor resultante de cada variação obtido no teste de Plackett-Burman, CFS

Parâmetro	(-1)	Teor de -1 (%) <sup>a,b</sup>	(1)	Teor de 1 (%) <sup>a,b</sup>
Marca do etanol	Sigma®	99,66 – 102,71=  3,05	Biosolve®	100,86 – 100,27=  0,59
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,99	100,79 – 101,59=  0,79	1,01	100,14 – 100,99=  0,86
Quantidade de aditivo	4,9%	101,07 – 101,31=  0,24	5,1%	100,39 – 100,74=  0,35
Volume de injeção	4,9	101,30 – 101,08=  0,22	5,1	100,97 – 100,16=  0,81
Regulador de contrapressão (bar)	174	101,19 – 101,18=  0,01	175	100,37 – 100,77=  0,40
Comprimento de onda (nm)	229	101,41 – 100,97=  0,44	231	100,48 – 100,65=  0,18
Temperatura do forno (°C)	19	101,35 – 101,03=  0,31	21	99,83 – 101,30=  1,47

<sup>a</sup>Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas;

<sup>b</sup>Critérios de referência calculados: |2,43| para o teste -1 e |1,55| para o teste 1

Os efeitos resultantes dos parâmetros alterados foram avaliados em comparação com os valores obtidos como referência para o teste. Os resultados apresentam pequenas diferença de

teores que não interferem com a quantificação do ERTM. É interessante notar que foi possível quantificar ERTM utilizando etanol desidratado absoluto Biosolve<sup>®</sup> em comparação com etanol 99,8% Acros<sup>®</sup> grau CLAE. Isto permite o uso de um etanol de baixo custo para o laboratório, sem prejuízo da análise. Os resultados indicaram a validade do método é mantida, mesmo com pequenas variações nas suas condições de trabalho.

Os resultados da validação do método para a análise do ERTM mostraram que o método desenvolvido por CFS é apropriado para quantificar o ERTM em pó liofilizado para solução injetável. A técnica atende aos requisitos das recomendações do ICH, e portanto, é uma ferramenta apropriada para a análise de rotina na indústria farmacêutica.

Ao longo dos anos, a CFS teve bons e maus momentos, embora apresente inúmeras vantagens que a torna uma técnica interessante, como um rápido equilíbrio da coluna cromatográfica devido às suas propriedades físicas propiciarem uma melhor transferência de massa associadas à alta vazão; as várias possibilidades de combinações de parâmetros para a obtenção da seletividade desejada como alterações da densidade do modificador, pressão, vazão, temperatura, adição de aditivos ao solvente orgânico, bem como, gradientes de pressão, densidade ou quantidade de modificador orgânico que podem ser usado sem grandes declives da linha de base devido à transparência do dióxido de carbono em detector ultravioleta - UV, quando se usa baixo teor de modificador orgânico na fase móvel. Ainda hoje, não é uma técnica usada para a análise de fármacos no controle de qualidade de rotina farmacêutica.

Nos últimos anos, a química verde tem se destacado e ganhado impulso dentro das universidades, indústrias farmacêuticas e órgãos ambientalistas. Revistas e *websites* têm se dedicado a encorajar a química verde uma vez que, procura reduzir e, se possível, eliminar a origem da poluição para proteger a saúde humana e o meio ambiente.

No entanto, isso não é uma tarefa fácil e são muitas as discussões a respeito. Técnicas cromatográficas que usam CO<sub>2</sub> como fase móvel contribuem para a ecologização das separações, muitas pessoas podem se questionar como isso é possível, se o dióxido de carbono também está ligado ao aquecimento global. Mas o CO<sub>2</sub> usado em CFS é recuperado da atmosfera. Além disso, para os processos de preparação, o CO<sub>2</sub> é reciclado. Pode se observar que as conferências internacionais de cromatografia em fluidos supercríticos são organizadas por “grupos de química verde”, o que corrobora esta ideia. Trocar solventes e aditivos tóxicos em cromatografia também tem sido aceito como química verde (BRUNELLI et al., 2010; VANHOENACKER et al., 2010).

Com a introdução de novas fases estacionárias associados a aditivos de fase móvel uma ampla gama de substâncias são passíveis de separação por CFS, com isso, a CFS tem se

mostrado uma opção viável para separação de substâncias de diferentes polaridades e em diversas áreas devido à sua ortogonalidade em relação às técnicas tradicionais.

Atualmente, a popularidade da técnica por CFS está aumentando devido a seu caráter verde. A CFS é considerada um método ambientalmente amigável para minimizar o uso de solventes orgânicos e aditivos tóxicos, minimizando problemas com a eliminação de resíduos e o risco de exposição dos trabalhadores de laboratório. A CFS tem se destacado devido ao alto desempenho, eficiência e versatilidade que faz de CFS o complemento para cromatografia líquida de fase reversa e cromatografia com interação hidrofílica. Técnicas consideradas "verdes" vêm sendo apreciada e um futuro promissor para CFS é esperado. Em breve a CFS terá o seu lugar no controle de qualidade de rotina farmacêutica.

Este trabalho procurou compilar e discutir alguns dos interessantes resultados apresentados para aumentar a consciência dos benefícios significativos desta técnica e um método analítico para análise de rotina de ertapenem sódio foi desenvolvido por CFS. O método cromatográfico proposto apresentou limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez como preconizado pelos regulamentos vigentes (ICH, 2005). Além disso, é uma excelente alternativa para o ambiente.

## **6.5. ELETROFORESE CAPILAR**

Eletroforese capilar é uma técnica de separação versátil que pode ser usada para uma ampla gama de substâncias. A técnica consiste na migração de espécies carregadas eletricamente, presentes em uma solução eletrolítica dentro de um capilar, ao qual, um campo elétrico é aplicado gerando uma corrente no seu interior. A separação de substâncias ocorre pela diferença da mobilidade eletroforética. Todo íon em solução possui uma mobilidade que é característica para cada íon. Essa mobilidade é determinada pela força elétrica que as espécies ionizadas, moléculas ou partículas, sofrem, balanceada com as forças de fricção geradas pela passagem das espécies pelo meio (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito. Assim sendo, o controle do pH é aconselhável e a escolha de uma solução tampão adequada têm implicações diretas na otimização da separação (TAVARES, 1997). Os parâmetros escolhidos para o desenvolvimento do método pela técnica de eletroforese capilar foram apresentados e discutidos no item 5.10.3. A técnica de eletroforese capilar vem sendo utilizada para a separação de fármacos, neste trabalho é proposto um método para análise de rotina de ERTM.



### 6.5.1. Material

O método foi realizado em sistema de eletroforese capilar P/ACE<sup>®</sup> MDQ (Beckman Coulter<sup>®</sup>) com detector UV, capilar revestido de sílica fundida com diâmetro interno de 75 µm e comprimento efetivo de 30 cm. O eletrólito usado foi tampão fosfato de sódio 10 mM a pH 7. Para a realização do método foi utilizada balança analítica modelo SECURA2250-1S (Sartorius<sup>®</sup>, Goettingen - Alemanha); ERTM SQR e ERTM pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1. e 4.2. A lavagem do capilar foi realizada com solução de NaOH nas concentrações de 1 M e 0,1 M, HCl 0.1 M bem como água purificada obtida através de equipamento Milli-Q<sup>®</sup> Plus (Millipore<sup>®</sup>, E.U.A). Os reagentes utilizados para a degradação foram ácido clorídrico 0,01 M (Qhemis<sup>®</sup>), hidróxido de sódio 0,01 M (Cinetica<sup>®</sup>) e peróxido de hidrogênio 0,03 % (Vetec<sup>®</sup>). Todas as soluções foram filtradas em membrana de *nylon* com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>) e foram desgaseificadas em banho ultrassônico modelo 2510E-MT (Branson<sup>®</sup>, Danbury - CT EUA).

### 6.5.2. Método

O eletrólito utilizado no método de eletroforese capilar foi tampão fosfato de sódio 10 mM a pH 7; voltagem 15 KV; tempo de introdução da amostra de 5 segundos e a lavagem do capilar prévia a cada análise foi de 2 minutos. A temperatura do cartucho e do amostrador foi de 25 °C e o comprimento de onda do detector foi ajustado em 214 nm. A solução diluente, o eletrólito, as soluções usadas para promover a degradação, bem como, os adjuvantes hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio na proporções equivalente a da forma farmacêutica em pó liofilizado para solução injetável INVANZ<sup>®</sup> do Laboratório Farmacêutico Merck Sharp & Dohme, foram avaliadas como “branco” ou seja, solução sem qualquer vestígio de ERTM para avaliar possíveis picos interferentes durante a análise. O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes BRASIL (2017) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão. Este método foi conduzido no Laboratório do Grupo de Pesquisa de Análise Farmacêutica na Universidade KU Lovaina, na Bélgica.

#### 6.5.2.1. Preparo da solução de ERTM SQR

Foi pesada a massa de 10 mg de ERTM SQR (descrito no item 4.1.), e transferida para balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com água purificada, para a obtenção de solução com concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Alíquotas desta solução foram transferidas para

balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com metanol para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 70, 80, 90, 100, 110 e 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.5.2.2. Preparo da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

O conteúdo de cinco frascos-ampola, cujo peso médio foi de 1,440 g de ERTM em pó para solução injetável (descritos no item 4.2.), foi acondicionado em recipiente para formação de um *pool* de amostras. A partir deste *pool*, massa equivalente a 10 mg de ERTM foi pesada e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água, para a obtenção de solução com concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, e o volume foi completado com metanol para obtenção das concentrações de trabalho correspondentes a 70, 80, 90, 100, 110 e 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **6.5.2.3. Preparo do eletrólito**

A solução tampão fosfato de potássio 10 mM a pH 7 foi preparada segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), em que 136 mg de fosfato de potássio dibásico e 40 mg de fosfato de potássio monobásico foram dissolvidos em água purificada suficiente para 100 mL. Quando necessário, o pH foi ajustado para 7 usando ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

#### **6.5.3. Resultados e discussão**

O eletroferograma típico de ERTM obtido pelo método proposto foi apresentado na Figura 25 item 5.10.3 e demonstrou que a amostra de ERTM sódico em pó liofilizado para solução injetável está condizente com o ERTM SQR no tempo de retenção de 3,15 minutos.

##### **6.5.3.1. Cálculo do teor de ERTM em pó liofilizado para solução injetável**

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em cromatógrafo no comprimento de onda de 214 nm. O doseamento de ERTM foi quantificado em triplicata em termos de absorvância da área do pico, nas concentrações de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o seu teor foi calculado matematicamente segundo as Equações 6 e 7 descritas no item 3.9.2. O teor médio encontrado foi de 99,94 % com DPR 0,85 %.

##### **6.5.3.2. Conformidade do sistema eletroferográfico**

O ICH (2005) estabelece teste de conformidade do sistema eletroferográfico como parte prévia ao processo de validação. O teste é uma etapa essencial para assegurar que os parâmetros

eletroferográfico selecionados estão aptos para a validação do método. O teste de conformidade do sistema foi anteriormente apresentado e discutido na seção qualitativa, item 5.10.4, em que se deu a escolha desses parâmetros.

### **6.5.3.3. Validação do método**

O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes BRASIL (2017) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão.

#### **6.5.3.3.1. Seletividade por estudo da degradação forçada**

O estudo do estresse foi determinado submetendo a solução ERTM pó liofilizado para solução injetável ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) à degradação acelerada por estresse alcalino, ácido, neutro, oxidativo, térmico e fotolítico para avaliar possíveis interferências dos produtos de degradação na sua quantificação. As hidrólises ácida e alcalina foram realizadas em HCl 0,01 M e NaOH 0,01 M, respectivamente. No estudo de estresse oxidativo, uma solução de amostra de ERTM pó liofilizado para solução injetável foi preparada usando peróxido de hidrogênio 0,03% (p/p) em água como diluente. Essas soluções foram avaliadas por 5 dias, concomitantemente a uma amostra controle (ERTM pó liofilizado para solução injetável dissolvido em água) para comparação. O estresse fotolítico de ERTM foi conseguido expondo uma amostra de ERTM pó liofilizado para solução injetável à luz UV<sub>254</sub> nm. A amostra ERTM pó liofilizado para solução injetável foi espalhada em um vidro de relógio a uma espessura não superior a 3 mm de acordo com as diretrizes do ICH, o mesmo foi feito para o “controle escuro” (amostra de ERTM protegida em papel alumínio), ambas foram submetidas às mesmas condições de modo a garantir que não houvesse interferências decorrentes ao tempo de exposição e temperatura decorrente da lâmpada (a sala foi mantida na temperatura de 25 °C durante todo o período do estudo). Ambas as amostras foram avaliadas durante 5 dias. Para o estudo de estresse térmico do estado sólido, uma amostra de ERTM pó liofilizado para solução injetável foi colocada em estufa a 50 °C e analisada de hora em hora.

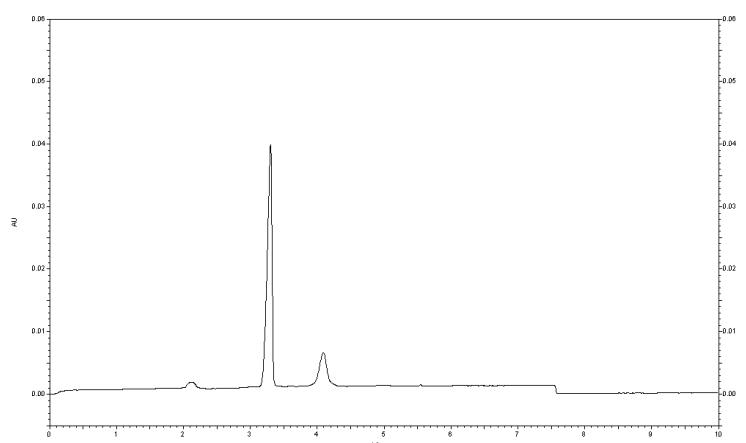
As amostras foram avaliadas até a obtenção de 10 a 30%, de degradações e/ou um período máximo de 5 dias, com exceção do estresse fotolítico que pode ser avaliado por até 14 dias, como recomendado na literatura. Acima desta porcentagem, produtos de degradação secundários podem ser gerados e estes não são de interesse em nosso estudo. Os estudos de estresse foram realizados de acordo com as diretrizes da ICH (2005); ANVISA (2013) e Blessy

e colaboradores (2014). Os resultados de degradação são apresentados na Tabela 56 e nas Figuras 61 a 66.

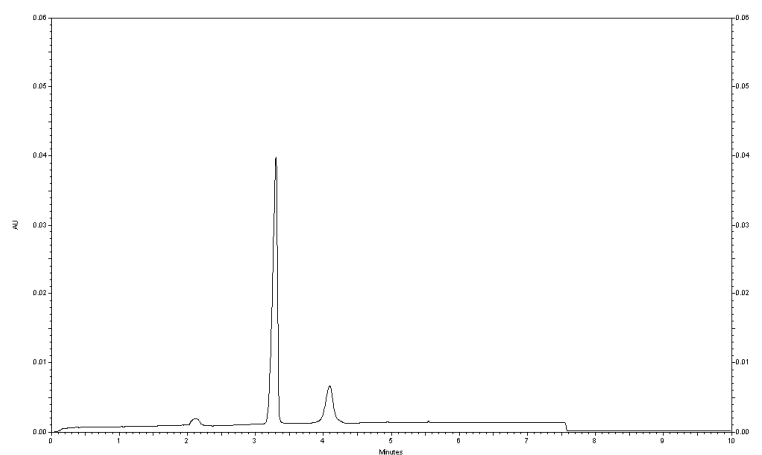
**Tabela 56-** Percentuais obtidos no estudo de degradação forçada para ERTM pelo método eletroforese capilar

Parâmetros	Tempo	Quantidade degradada (%)
Neutra	2 dias	24,39
NaOH 0,01 M	3 horas	20,85
HCl 0,01 M	15 min	23,43
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03 %	45 min	23,24
Térmica 50 °C	3 horas	21,12
UVC <sub>254</sub>	5 dias	22,47

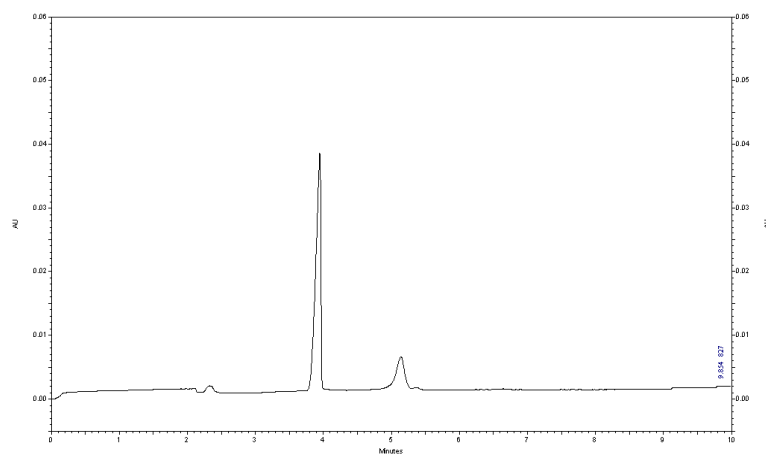
**Figura 61-** Eletroferograma de ERTM no estudo de degradação neutra à temperatura ambiente (25 °C), após 120 horas, pelo método de eletroforese capilar.



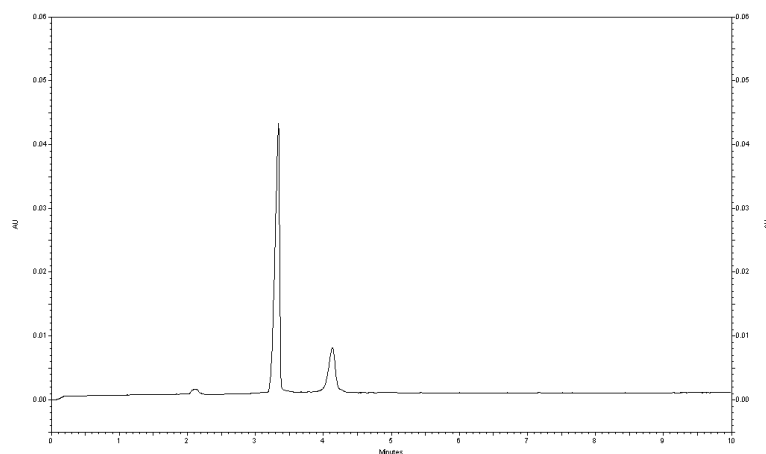
**Figura 62-** Eletroferograma de ERTM no estresse fotolítico (UVC<sub>254</sub>), após 14 dias, pelo método de eletroforese capilar



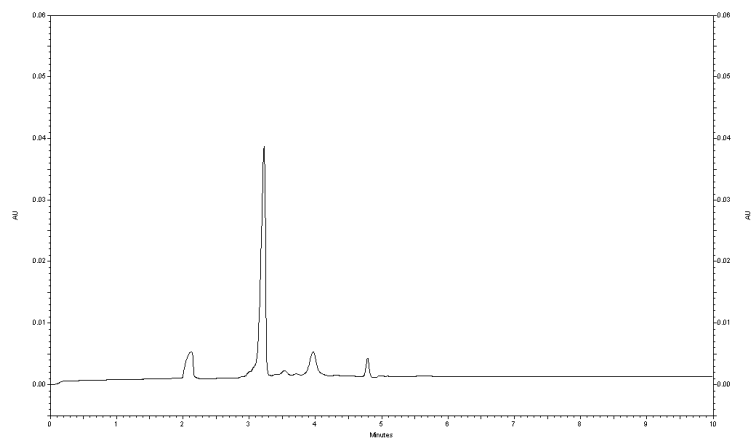
**Figura 63-** Eletroferograma de ERTM na degradação ácida (HCl 0,01 M), após 120 horas, pelo método de eletroforese capilar.



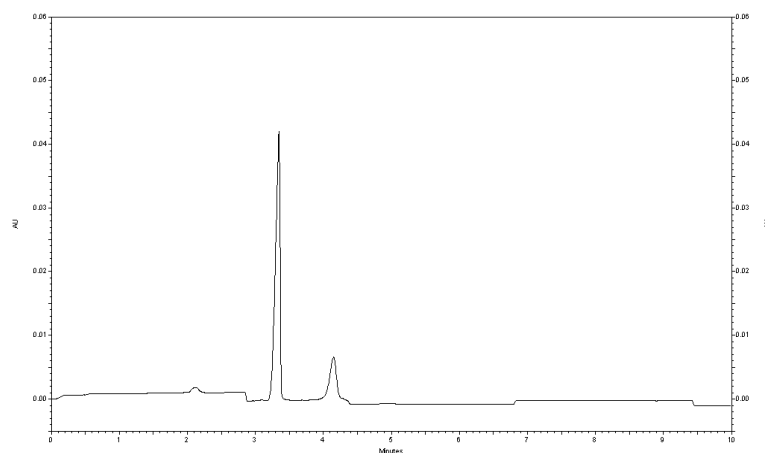
**Figura 64-** Eletroferograma de ERTM na degradação alcalina (NaOH 0,001 M), após 36 horas, pelo método de eletroforese capilar.



**Figura 65-** Eletroferograma de ERTM na degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%), após 24 horas, pelo método de eletroforese capilar.



**Figura 66-** Eletroferograma de ERTM no estresse térmico (50 °C), após 1 hora, pelo método de eletroforese capilar

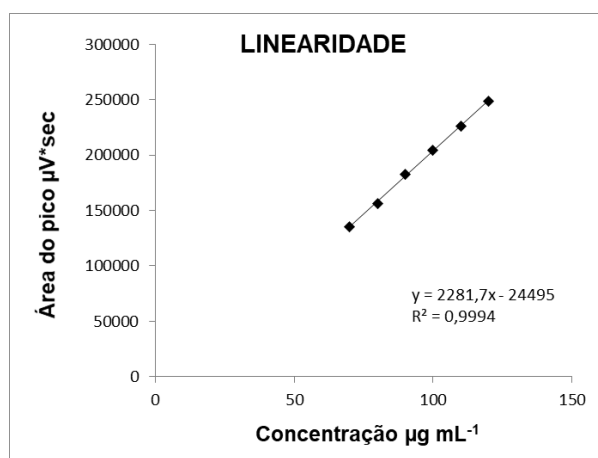


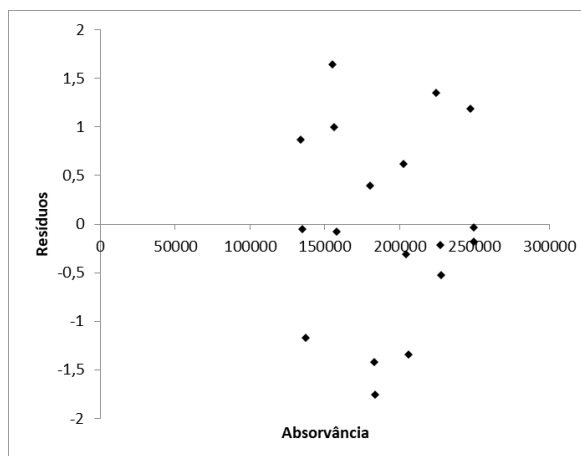
#### 6.5.3.3.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela análise de regressão da curva analítica que foi construída traçando os valores médios das áreas no pico eletroferográfico obtidas experimentalmente em relação às suas respectivas concentrações. O ensaio foi realizado em triplicata em três dias diferentes. A avaliação estatística foi realizada pelo método dos mínimos quadrados e ANOVA.

A curva de analítica para ERTM SRQ foi construída através da disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações. O resultado foi representado pela equação  $y = 2281,7x - 24495$ , com  $R^2 = 0,9994$ , como representado na Figura 67 e o gráfico de resíduos da análise de ERTM na Figura 68.

**Figura 67 -** Curva analítica de ERTM pelo método eletroforese capilar.



**Figura 68** - Análise de resíduos para ERTM pelo método eletroforese capilar.

Os valores das absorvâncias obtidas para a curva analítica de ERTM SQR estão demonstrados na Tabela 57.

**Tabela 57-** Valores das absorvâncias referentes a ERTM SRQ para a construção da curva analítica através do método de eletroforese capilar

Concentração	Absorvância <sup>1</sup>	Absorvância média	DPR <sup>2</sup> (%)
70	133634	135316	1,29
	135207		
	137107		
80	156275	156522	0,95
	158109		
	155180		
90	180156	182413	1,08
	183827		
	183258		
100	202641	204281	0,82
	205979		
	204223		
110	224246	226199	0,76
	227441		
	226910		
120	247387	248854	0,51
	249463		
	249711		

<sup>1</sup> Valor médio de três determinações; <sup>2</sup>DPR: desvio padrão relativo

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de ERTM SQR é apresentada na Tabela 58.

**Tabela 58** - Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de ERTM SQR, utilizando o método de eletroforese capilar

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	27348000160	5469600032	<b>1993,04*</b>	<b>3,11</b>
Regressão linear	1	27315622241	27315622241	<b>9953,42*</b>	<b>4,75</b>
Desvio da linearidade	4	32377918	8094479	<b>2,95</b>	<b>3,26</b>
Resíduo	12	32932159	2744346	---	---
Total	17	27380932319	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$

#### 6.5.3.3.3. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados segundo Equações 8 e 9 descritas no item 3.9.4. e estão de acordo com o preconizado na literatura (ICH, 2005). A menor concentração detectada por esse método analítico foi  $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$  e pode ser quantificada a partir de  $2,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 6.5.3.3.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada segundo o item 3.9.6. A repetibilidade (intradia) foi verificada pela análise consecutiva de sete soluções de ERTM SQR preparadas na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, que forneceu DPR de 1,62%. A precisão intermediária foi avaliada em diferentes dias (interdias) e por diferentes analistas, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados são apresentados na Tabela 59.



**Tabela 59-** Precisão intermediária do método analítico para análise de ERTM por eletroforese capilar

Dia	Precisão interdias			Precisão entre-analistas			
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)	Analista	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	100,84			1	100,84		
2	99,83	99,94 %	0,85	2	99,40	100,12	1,02
3	99,15						

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

### 6.5.3.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método de adição, no qual quantidade conhecida de SQR é adicionada à amostra. A recuperação foi realizada em três diferentes concentrações, R1, R2 e R3, equivalentes a 80, 100 e 120 % da concentração média. A percentagem de ERTM recuperado foi calculada matematicamente por recuperação (Equação 11, item 3.9.7.). Para o preparo das soluções do teste de recuperações, volumes de 100 µL (R1), 300 µL (R2) e 500 µL (R3) da solução SQR (1000 µg mL<sup>-1</sup>) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 700 µL da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável preparada na mesma concentração e completadas com água purificada para juntas perfazerem a concentração desejada. Desta forma, as seguintes concentrações foram obtidas: R1: 80 µg mL<sup>-1</sup>, representando amostra de 80% de percentual médio, R2: 100 µg mL<sup>-1</sup>, representando amostra de 100% de percentual médio e R3 120 µg mL<sup>-1</sup>, representando amostra de 120% de percentual médio. A quantidade de SQR adicionada para avaliar a exatidão pelo teste de recuperação é apresentada na Tabela 60.

**Tabela 60-** Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição do método eletroforese capilar

	ERTM amostra (µg)	ERTM SQR (µg)	Concentração teórica (µg)	%
<b>Amostra</b>	70	-----	70	-----
<b>R1</b>	70	10	80	80
<b>R2</b>	70	30	100	100
<b>R3</b>	70	50	120	120
<b>SQR</b>	-----	70	70	-----

Os resultados experimentais para a exatidão do método e encontram-se na Tabela 61.

**Tabela 61** - Exatidão do método analítico para análise ERTM por eletroforese capilar

	ERTM SQR adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ERTM SQR encontrado <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
R1	80	79,86	99,83		
R2	100	100,08	100,08	100,59	1,09
R3	120	122,21	101,84		

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

#### 6.5.3.3.6. Robustez

A robustez do método foi testada quanto à influência de pequenas variações dos parâmetros pré-definidos: concentração da solução tamponante, voltagem, comprimento de onda, tempo de introdução da amostra, lavagem do capilar, temperatura do cartucho e temperatura do amostrador. A robustez foi avaliada pelo doseamento de ERTM SQR *versus* ERTM pó liofilizado em triplicata na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média do doseamento, realizado em triplicata correspondente aos parâmetros normais, foi comparada às médias dos doseamentos correspondentes aos níveis alterados. As diferentes condições foram avaliadas simultaneamente pelo modelo fatorial Plackett-Burman e os resultados obtidos foram calculados usando a metodologia proposta por Youden e Steiner (1975), como discutido anteriormente no item 3.9.8.

A escolha dos parâmetros e os níveis em que devem ser testados são muito importantes para obtenção de um teste de robustez confiável. As variáveis devem ser condizentes com a realidade prática e os níveis devem refletir a variação que pode ser geralmente observada. Os parâmetros e os níveis de variação testados são apresentados na Tabela 62.

**Tabela 62**- Parâmetros selecionados e níveis de variabilidade para eletroforese capilar

Parâmetros	Unidade	Limite	Condição		
			variada (-1)	Condição normal (0)	Condição variada (1)
A. Concentração tampão	mM	1	9	10	11
B. Voltagem	kV	1	14	15	16
C. Comprimento de onda	nm	1	213	214	215
D. Tempo de introdução da amostra	s	1	4	5	6
E. Lavagem do capilar	min	1	1	2	3
F. Temperatura do cartucho	°C	1	24	25	26
G. Temperatura do amostrador	°C	1	24	25	26

-1 = Nível inferior; 0 = Nível Normal e 1 Nível superior.

O efeito médio de cada variável é a diferença média entre as observações determinadas nos níveis extremos e aqueles determinados no nível ideal em módulo. Os efeitos resultantes dos parâmetros alterados foram avaliados segundo a Equação 11 e, foram comparados aos valores obtidos como referência de 1,31 para os níveis inferiores (-1) e 0,80 para os níveis superiores (1). Nenhum efeito apresentou resultado significativo, indicando que o método proposto é robusto. Os teores encontrados nas condições normais e alterações de cada fator são apresentados na Tabela 63.

**Tabela 63** - Teor resultante de cada variação obtido no modelo de Plackett-Burman em eletroforese capilar

Parâmetro	(-1)	Teor do teste -1 (%) <sup>a,b</sup>	(1)	Teor do teste 1 (%) <sup>a,b</sup>
A. Concentração tampão (mM)	9	100,49 – 100,20 =  0,29	11	100,84 – 100,22 =  0,62
B. Voltagem (kV)	14	100,66 – 100,03 =  0,63	16	100,02 – 101,04 =  1,03
C. Comprimento de onda (nm)	213	100,35 – 100,34 =  0,01	215	100,62 – 100,44 =  0,17
D. Tempo de introdução da amostra (s)	4	100,31 – 100,39 =  0,08	6	101,03 – 100,03 =  1,01
E. Lavagem do capilar (min)	1	100,68 – 100,02 =  0,66	3	100,49 – 100,57 =  0,08
F. Temperatura do cartucho °C	24	101,23 – 100,46 =  0,23	26	100,73 – 100,33 =  0,40
G. Temperatura do amostrador °C	24	100,15 – 100,54 =  0,40	26	100,23 – 100,82 =  0,59

<sup>a</sup>Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas;

<sup>b</sup>Critérios de referência calculados: |0,80| para o teste -1 e |1,31| para o teste 1.

O teste de conformidade do sistema foi realizado previamente a validação para assegurar que os parâmetros selecionados eram adequados. A verificação da conformidade do sistema eletroforético foi anteriormente apresentada e discutida no item 5.10.4. O método de eletroforese capilar proposto para a quantificação de ERTM em análise de rotina foi validado com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção, como preconizado nos guias internacionais (FDA, 2004; ICH, 2005).

O tempo de migração de ERTM foi de 3,2 min proporcionando, desta maneira, uma rápida determinação do fármaco. A seletividade foi determinada submetendo amostras de ERTM a condições de estresse por degradação forçada em meio alcalino, ácido, neutro, oxidativo e fotolítico. Não foram visualizados produtos que possam interferir na quantificação do fármaco.

A linearidade foi avaliada pela construção de curva analítica em triplicata, que apresentou a equação da reta  $y = 2281,7 x - 24495$ , com  $R^2$  de 0,9994. Análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada e os resultados apresentados apontam que não há desvios significativos de linearidade e, portanto, o método é linear na faixa de 70-120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

O conteúdo de ERTM nas amostras analisadas foi de 99,94%, com DPR = 0,85%. A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação, a porcentagem média recuperada foi de 100,59% com DPR = 1,09%. A robustez foi avaliada pelo modelo fatorial de Plackett-Burman, em que pequenas alterações dos parâmetros analíticos ocorrem simultaneamente, nenhum efeito alterado apresentou resultado considerado significativo quando comparado com o valor de referência, demonstrando assim que o método é robusto. A precisão do método foi avaliada segundo a repetibilidade e a precisão intermediária, os teores obtidos entre os doseamentos em triplicata de ERTM SQR *versus* ERTM em pó liofilizado para solução injetável, apresentaram DPR% < 2.

Os resultados da validação do método são condizentes com o preconizado na literatura e descritos anteriormente no item 3.9. Com isso, um método alternativo aos métodos cromatográficos foi desenvolvido, com as vantagens de usar quantidades reduzidas de amostra, ter baixo tempo de análise e não usar nenhum tipo de solvente orgânico ou tóxico, sendo seguro para o analista e não gerar resíduos tóxicos a serem tratados pela indústria farmacêutica. A eletroforese capilar é considerada uma técnica analítica verde por não causar danos ao o meio ambiente. O método eletroforético proposto apresentou, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequados segundo as diretrizes vigentes, portanto pode ser empregado para a análise quantitativa de ERTM na indústria farmacêutica.

## **6.6. ENSAIO MICROBIOLÓGICO PELO MÉTODO TURBIDIMÉTRICO**

A avaliação do percentual médio do antimicrobiano foi avaliada pelo método turbidimétrico. O método baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez da suspensão de micro-organismos sensíveis ao agente antimicrobiano, ambos contidos em meio de cultura líquido. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Neste contexto, foi desenvolvido e validado método microbiológico turbidimétrico para avaliação do percentual médio de ERTM pó liofilizado para solução injetável.

### **6.6.1. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos**

Diversos testes preliminares foram realizados para padronização das condições a serem utilizadas no método. Variaram-se parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 64).

**Tabela 64** - Parâmetros estudados para a avaliação do percentual médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL1027 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1851 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10535 IAL 2393 <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 IAL 636
Meios de cultura	Caldo <i>Brain Heart Infusion</i> - BHI Caldo caseína-soja Caldo <i>Müller Hinton</i>
Tempo de incubação	4 horas
Temperatura de incubação	35 °C
Concentração do inóculo	1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0%
Solução diluente	água purificada; tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0
Concentrações das soluções de amostra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 (Razão = 2) 3,0; 6,0; 12,0; 24,0; 48,0; 96,0 (Razão = 2) 8,0; 12,0; 18,0; 27,0 (Razão = 1,5) 10,0; 15,0; 22,5 (Razão = 1,5) 12,0; 16,8; 23,53 (Razão = 1,4) 12,0; 15,6; 20,28 (Razão = 1,3) 12,8; 16,0; 20,00 (Razão = 1,2)

### 6.6.2. Execução do ensaio

Os parâmetros estabelecidos para a realização do doseamento microbiológico estão apresentados na Tabela 65.

**Tabela 65** - Parâmetros padronizados para avaliação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1851
Meio de cultura	caldo <i>Brain Heart Infusion</i> - BHI
Tempo de incubação	4 h
Temperatura de incubação	35 °C
Concentração do inóculo	8%
Solução diluente	Água purificada
Concentrações das soluções ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	12,8; 16,0; 20,00 (R 1,2)

### 6.6.3. Material

No doseamento microbiológico foi utilizado o meio de cultura ágar caseína-soja - Acumedia Manufacturers® para repique de manutenção da cepa do micro-organismo e caldo *Brain Heart Infusion* - BHI - Oxoid® para a realização do ensaio. Além disso, foram utilizados água purificada, ponteiras e tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura,

contendo o meio de cultura e devidamente fechados com tampão de algodão envolvido em gaze, foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Lufenco, SP, Brasil) por 15 minutos a 121 °C. Para a incubação, foram utilizados incubador Shaker modelo MA420 (Marconi, SP, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás, SP, Brasil). Formaldeído grau analítico (Qhemis) foi usado para interromper o crescimento dos micro-organismos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro modelo DU 530 (Beckman Coulter, CA, EUA). Também foram usados micropipetador eppendorf® de 100-1000 µL, balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo, Suíça) e balança semi analítica modelo B160 (Micronal, SP, Brasil).

#### **6.6.4. Método**

Para a realização do ensaio microbiológico, tubos de ensaio contendo caldo BHI foram autoclavados, soluções ERTM sódico pó liofilizado para solução injetável em diferentes concentrações foram preparadas e o inóculo foi padronizado em 580 nm com transmitância de  $25 \pm 2\%$ . Adicionaram-se, em cada tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI esterilizado, 200 µL de solução da amostra e 800 µL do inóculo padronizado em 580 nm com transmitância de  $25 \pm 2\%$ . Um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI esterilizado foi usado como controle negativo. Um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI esterilizado e 800 µL do inóculo padronizado em 580 nm com transmitância de  $25 \pm 2\%$ , sem a adição da solução amostra de ERTM foi usado como controle positivo. Todos os tubos de ensaio foram acondicionados em banho de aquecimento com agitador orbital, com 32 rotações por minuto à temperatura de  $35,0 \text{ °C} \pm 2,0 \text{ °C}$ , por 4 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se o crescimento microbiano com adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% em todos os tubos. Determinou-se a turbidez de cada solução pela absorvância dada em espectrofotômetro a 530 nm. O equipamento foi zerado com o controle negativo (tubo contendo 10,0 mL de caldo e 500 µL de formaldeído 12%).

O método foi validado segundo o item 3.9 que está de acordo com as diretrizes BRASIL (2003) e ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), robustez e exatidão.

#### **6.6.4.1. Preparo do meio de cultura**

O meio de cultura foi preparado conforme indicado em seu respectivo rótulo, sendo dissolvido em água purificada sob aquecimento. Dez mililitros foram distribuídos em todos os tubos de ensaio e foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos.

#### **6.6.4.2. Preparo do inóculo**

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi repicado em caldo BHI e incubado por 20 horas, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C. Posteriormente, o inóculo foi padronizado com transmitância de 25,0 ± 2,0% em espectrofotômetro a 580 nm, como preconizado na FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010).

#### **6.6.4.3. Preparo das soluções de ERTM SQR**

Foram transferidos 10,00 mg de ERTM SQR para balão volumétrico de 50 mL, obtendo solução de 200 µg mL<sup>-1</sup>. Desta solução, alíquotas de 640; 800 e 1000 µL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção das concentrações de 12,8; 16,0 e 20,0 µg mL<sup>-1</sup>, sendo representadas como P1, P2 e P3, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em água purificada.

#### **6.6.4.4. Preparo das soluções de ERTM pó liofilizado para solução injetável**

A massa equivalente a 10 mg de ERTM pó liofilizado para solução injetável foi devidamente pesada a partir de um *pool* de amostras de 5 frascos-ampola, previamente dessecado por 1 h a 105 °C. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água purificada, obtendo a solução mãe de 200 µg mL<sup>-1</sup>. Desta solução, alíquotas de 640; 800 e 1000 µL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para a obtenção das concentrações de 12,8; 16,0 e 20,0 µg mL<sup>-1</sup>, sendo representadas como A1, A2 e A3, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em água purificada.

#### **6.6.5. Resultados e discussão**

Diferentes doses de ERTM e diferentes micro-organismos foram testados, a fim de se obter a faixa linear adequada ao desenvolvimento do método turbidimétrico para quantificação de ertapenem sódio em pó liofilizado para solução injetável. Dentre os micro-organismos testados, optou-se, por trabalhar com o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, isso por que, verificou-se que o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150 não apresentou bom crescimento, indicando controles positivos baixos, e o micro-organismo *Kocuria rhizophila*

ATCC 9341 IAL 636 apresentou formação de grumos microbianos que interferiram nas análises não propiciando resultados uniformes e reprodutíveis. O micro-organismo *Staphylococcus aureus* apresentou ótimos resultados mostrando crescimento linear e reprodutível.

#### 6.6.5.1. Cálculo do percentual médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável

O percentual médio do medicamento foi calculado pela equação de HEWITT (2004) (Equação 13). A equação utiliza as médias das leituras de absorvância das soluções obtidas com as três doses de ERTM SQR e pó liofilizado para solução injetável, realizados em triplicata e analisados em cada ensaio.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

$$M = F/b \quad b = E/I$$

Em que:

$$F = 1/3 [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) - (\bar{P}1 + \bar{P}2 + \bar{P}3)]$$

I = logaritmo da razão das doses

$$E = 1/4 [(\bar{A}3 + \bar{P}3) - (\bar{A}1 + \bar{P}1)]$$

#### 6.6.5.2. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos parâmetros de linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez, de acordo com o preconizado pela literatura (ICH, 2005; USP 38, 2015; BRASIL, 2017) e apresentado no item 3.9.

##### 6.6.5.2.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de curva analítica a partir da média de três ensaios em três dias diferentes utilizando-se o delineamento 3 x 3, segundo o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A reta foi construída em gráfico logaritmo da concentração *versus* a média das absorvâncias de cada uma das concentrações da SQR. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

O método apresentou linearidade nas concentrações 12,80; 16,00 e 20,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , as quais permitiram doseamentos de amostras com percentual médio em torno de 100% com adequado paralelismo em relação à reta da SQR. Os valores de absorvância obtidos para as



soluções em diferentes concentrações de ERTM SQR e em pó liofilizado para solução injetável durante avaliação da linearidade do método encontram-se na Tabela 66.

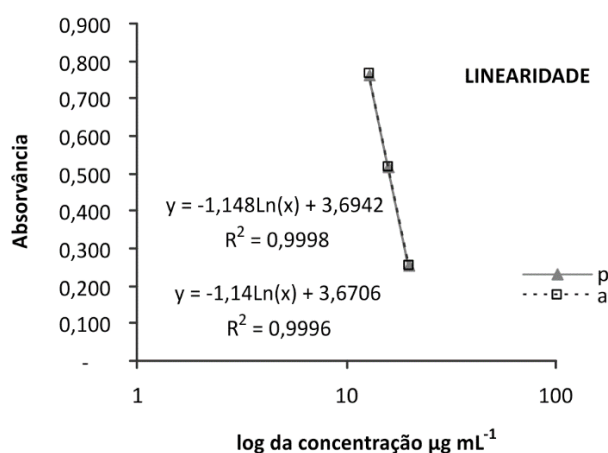
**Tabela 66** - Absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade do ensaio microbiológico para avaliação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável por método turbidimétrico

	Absorvâncias <sup>a</sup>					
	P1 12,8 µg	P2 16,0 µg	P3 20,0 µg	A1 12,8 µg	A2 16,0 µg	A3 20,0 µg
	0,769	0,517	0,255	0,772	0,519	0,254
	0,767	0,522	0,250	0,774	0,514	0,247
	0,747	0,509	0,251	0,750	0,513	0,259
<b>Média<sup>a</sup></b>	0,761	0,516	0,252	0,765	0,515	0,253
<b>DPR<sup>b</sup></b>	1,65	1,23	1,05	1,79	0,64	2,31

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

A curva analítica de ertapenem SQR e amostra (Figura 69) foram determinadas pelo método dos mínimos quadrados apresentaram a equações da reta de:  $y = -140 \ln(x) + 3,6706$ , com coeficiente de correlação  $R^2$  igual a 0,9996 para a ertapenem SQR e  $y = -1,148 \ln(x) + 3,6942$ , com  $R^2$  de 0,9998 para o fármaco em pó liofilizado para solução injetável.

**Figura 69** - Curvas analíticas de soluções de ertapenem SQR e pó liofilizado para solução injetável, em concentrações de 12,80; 16,00 e 20,00 µg mL<sup>-1</sup>, obtidas pelo método microbiológico turbidimétrico.



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de ERTM é mostrada na Tabela 67.

**Tabela 67-** Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de ERTM, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Preparação	1	0,00001	0,00001	0,18	4,96
Regressão	1	0,78200	0,78200	13989,28*	4,96
Desvio de Paralelismo	1	0,00001	0,00001	0,17	4,96
Quadrático	1	0,00024	0,00024	4,21	4,96
Diferença de Quadrático	1	0,00001	0,00001	0,19	4,96
Entre doses	5	0,78227	0,15645	2798,80*	3,33
Entre tubos	2	0,00032	0,00016	2,83	4,10
Dentro (erro)	10	0,00056	0,00006	---	---
Total	17	0,78314	---	---	---

\*Significativo para  $p < 0,05$

#### 6.6.5.2.2. Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). A precisão por repetibilidade foi avaliada pelo DPR de sete tubos com ERTM SQR na concentração mediana da curva analítica ( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 1,25%.

Para a determinação da precisão intermediária, três curvas analíticas foram construídas em diferentes dias. Os ensaios experimentais também foram realizados por diferentes analistas. Os resultados são apresentados na Tabela 68.

**Tabela 68-** Precisão intermediária do método turbidimétrico para ertapenem em pó liofilizado para solução injetável

Dia	Precisão interdias			Precisão entre-analistas			
	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)	Analista	Teor <sup>a</sup> (%)	Teor médio (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
1	99,89			1	99,46		
2	100,11	99,87 %	0,26	2	99,26	99,36	0,15
3	99,59						

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

#### 6.6.5.2.3. Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de adição e calculada pela quantidade recuperada (Equação 10 do item 3.9.7.). Para a realização deste ensaio, preparou-se uma solução de ERTM SQR, com concentração de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o preparo das soluções para

avaliação das recuperações, volumes de 20  $\mu\text{L}$  (R1), 185  $\mu\text{L}$  (R2) e 350  $\mu\text{L}$  (R3) da solução SQR (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionados 640  $\mu\text{L}$  da solução de ERTM pó liofilizado para solução injetável preparado na mesma concentração que a SQR e completadas com água purificada. Desta forma, as seguintes concentrações foram obtidas: R1 = 13,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 80% de percentual médio, R2 = 16,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 100% de percentual médio e R3 = 19,80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando amostra de 120% de percentual médio, conforme apresentado na Tabela 69.

**Tabela 69** - Quantidade de ERTM adicionada no teste de adição para o ensaio turbidimétrico

	ERTM amostra ( $\mu\text{g}$ )	ERTM SQR ( $\mu\text{g}$ )	Concentração teórica ( $\mu\text{g}$ )	%
<b>Amostra</b>	12,80	-----	12,80	-----
<b>R1</b>	12,80	0,40	13,20	80
<b>R2</b>	12,80	3,70	16,50	100
<b>R3</b>	12,80	7,00	19,80	120
<b>SQR</b>	-----	12,80	12,80	-----

O valor médio recuperado no teste de adição foi de 98,20%. A Tabela 70 apresenta os resultados obtidos no teste de recuperação.

**Tabela 70** - Exatidão do método turbidimétrico para determinação de ERTM pelo teste de adição

	ERTM SQR adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ERTM SQR encontrado <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
<b>R1</b>	0,40	0,39	97,35		
<b>R2</b>	3,70	3,64	98,48	98,20	0,77
<b>R3</b>	7,00	6,91	98,78		

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

#### 6.6.5.2.4. Robustez

A robustez do ensaio microbiológico foi avaliada através de modificações nas condições estabelecidas, tais como: comprimento de onda de leitura dos tubos (528, 530, 532 nm), marca do meio de cultura utilizado (BHI - Oxoid<sup>®</sup> e BHI - BD-Bacto<sup>®</sup>) e instrumento de leitura (espectrofotômetro modelo DU 530 e espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-1800). Realizou-se a análise do percentual médio das amostras de ERTM em condições normais e alteradas paralelamente, avaliando a interferência das modificações no resultado final. As

alterações realizadas não provocaram mudanças significativas nos resultados de percentual médio das amostras de ERTM pó liofilizado para solução injetável doseada pelo método. Os DPRs entre os teores foram inferiores a 1 %, comprovando a robustez do método proposto para os parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 71.

**Tabela 71-** Avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de ERTM em pó liofilizado para solução injetável

Variável	Parâmetro Alterado	ERTM <sup>a</sup> (%)	Média (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
Comprimento de onda (nm)	528	99,23	99,70	0,55
	530	100,31		
	532	99,56		
Equipamento de leitura	DU 530	99,17	99,65	0,67
	Shimadzu, UV-Vis-1800	100,12		
Marca do meio de cultura	Oxoid <sup>®</sup>	99,61	99,37	0,35
	BD- Bacto <sup>®</sup>	99,12		

<sup>a</sup>Média de três determinações; <sup>b</sup>DPR= Desvio padrão relativo

Os ensaios físico-químicos são mais rápidos e práticos do que os ensaios microbiológicos. No entanto, os ensaios microbiológicos são fundamentais para avaliar a atividade de um agente antimicrobiano. Neste contexto, o ensaio turbidimétrico é um método adequado, simples e principalmente rápido, quando comparado aos tradicionais ensaios por difusão em ágar. O método por difusão em ágar tem, dentre as suas limitações, a dificuldade de difusibilidade de alguns fármacos no meio de cultura sólido e ainda, a reatividade entre o meio de cultura e o fármaco em determinados casos (SILVA, 2015). No ensaio por difusão em ágar é imprescindível que se tenha um crescimento microbiano homogêneo, para formação de halos de inibição regulares e bem delimitados, com diâmetro adequado para validação. Tais fatores interferentes são diminuídos no método turbidimétrico, dado que o ensaio é realizado em caldo como meio de cultura.

O método foi desenvolvido usando cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que propiciou resultados precisos e reprodutíveis. Na validação do método microbiológico turbidimétrico, a linearidade do método foi comprovada pelos coeficientes de correlação de 0,9996 e 0,9998 para ertapenem SQR e pó liofilizado para solução injetável, respectivamente. Além disso, a análise de variância demonstrou significativa regressão e ausência de desvios da linearidade e paralelismo nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes angulares das retas obtidas com SQR e pó liofilizado para solução

injetável não diferiram estatisticamente, demonstrando sua eficiência. Os resultados obtidos para precisão intermediária apresentaram percentual médio de 99,36% para análises entre-analistas com DRP de 0,15% e 99,87 para análise interdia com DRP de 0,26%. Já na precisão por repetitividade (intradia), a absorvância média de 7 replicatas foi de 0,492 com DRP de 1,25%. Com isso, os resultados apresentados apontam que o método é preciso. No estudo da exatidão, determinada pelo método de adição, obteve-se resultado médio de 98,20%, o qual comprovou a capacidade do método de determinar o percentual médio de modo exato. As pequenas alterações efetuadas nos parâmetros do método durante a avaliação da robustez, como variação do comprimento de onda, marca do meio de cultura e instrumento de leitura utilizados, não causaram efeitos significativos.

Todos os parâmetros avaliados na validação do método foram satisfatórios, bem como os resultados de regressão e paralelismo. As análises estatísticas não apresentaram diferenças significativas entre o F calculado e o F tabelado. Este trabalho vem propor um método simples, rápido e de viável execução, para a avaliação de percentual médio de ertapenem em pó liofilizado para solução injetável, que mostrou ser seguro e está de acordo com o estabelecido em guias nacionais e internacionais.

## 7. ANÁLISE COMPARATIVA

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para determinação de ERTM em pó liofilizado para solução injetável, foi realizada análise estatística dos teores médios de ERTM obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA).

### 7.1. Resultados

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de ERTM em pó liofilizado para solução injetável, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 72.

**Tabela 72-** Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos sete métodos validados

Amostra	IR	UV	CLAE CIH	CLAE FR	CFS	EC	Turbidimétrico
1	99,51	100,22	99,14	99,86	99,29	100,84	99,89
2	101,20	100,78	98,04	98,71	98,76	99,83	100,11
3	101,78	99,87	100,11	100,05	100,68	99,15	99,59
<b>Teor médio</b>	100,83	100,29	99,10	99,54	99,58	99,94	99,86
<b><sup>a</sup>% DPR</b>	1,17	0,46	1,05	0,73	1,00	0,85	0,26

<sup>a</sup>DPR – Desvio padrão relativo

A Tabela 73 apresenta o resultado de ANOVA, decorrente do teor médio de ERTM pó liofilizado para solução injetável obtido para cada método.

**Tabela 73-** Análise da variância dos teores médios de ERTM pó liofilizado para solução injetável

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
<b>Tratamentos</b>	5,69	6	0,95	0,33	2,85
<b>Resíduo</b>	9,95	14	0,71		
<b>Total</b>	15,64	20			

### 7.2 Discussão

Os resultados obtidos através de ANOVA demonstram não haver diferença significativa entre os teores determinados nos diferentes métodos validados em um nível de significância de 5%. Desta forma, os métodos desenvolvidos são equivalentes e adequados para a determinação quantitativa do fármaco, ainda que cada método possua suas próprias características, podem ser intercambiáveis. Todos os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamentos oficiais. Os métodos espectrofotométricos são simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas não são específicos para determinar e quantificar possíveis produtos de

degradação na amostra. A técnica por infravermelho é uma técnica bem estabelecida para análise qualitativa e neste trabalho demonstrou ser também adequada para análise quantitativa. Os métodos cromatográfico e eletroforético são métodos específicos e apropriados para determinação de produtos de degradação e impurezas. O ensaio microbiológico é o único que avalia a atividade de ERTM pó liofilizado para solução injetável frente a um micro-organismo, devendo ser usado em conjunto aos métodos físicos, a fim de assegurar a eficácia terapêutica de antimicrobianos.

Diferentes técnicas analíticas podem ser usadas para análise farmacêutica de rotina. Muitas dessas técnicas têm a mesma finalidade, embora elas tenham suas características peculiares. As vantagens e desvantagens de cada técnica foram discutidas ao decorrer de cada item, cabe a empresa e/ou analista avaliar qual é a técnica mais adequada de acordo com o uso pretendido e os recursos disponíveis. Novas tecnologias analíticas continuam a ser desenvolvidas e o custo benefício deve ser avaliado para a escolha do que é mais apropriado. Por fim, este trabalho contempla sete métodos desenvolvidos e validados que, além de estabelecerem bases de correlação físico-química e biológica, contribuem para aprimorar o controle de qualidade, dados analíticos confiáveis são fundamentais para assegurar a eficácia terapêutica dos produtos comercializados.

**8. CONCLUSÕES**

- ✓ O ERTM foi caracterizado qualitativamente, quanto ao seu aspecto físico; solubilidade; teor de umidade; ponto de fusão; cromatografia em camada delgada; espectrofotometria nas regiões do infravermelho, ultravioleta e por CLAE.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise para ERTM injetável por espectrofotometria na região ultravioleta, utilizando como solvente água purificada, na faixa de concentração de 12 a 27  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise para ERTM injetável por espectrofotometria na região do infravermelho em pastilhas de KBr, na faixa de concentração de 0,6 a 1,6 mg/200 mg.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise para ERTM injetável por cromatografia com interação hidrofílica, utilizando ACN:água (88:12 v/v) 0,1% de ácido fórmico pH 2,5 como fase móvel, na faixa de concentração de 70 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que apresentou tempo de retenção de 5,7 minutos.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise de ERTM injetável por cromatografia líquida de fase reversa, utilizando água: etanol (80:20 v/v) com 0,1% de ácido fórmico pH 2,5 como fase móvel, na faixa de concentração de 40 a 140  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que apresentou tempo de retenção de 4,0 minutos.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise de ERTM injetável por cromatografia em fluido supercrítico, utilizando como fase móvel A:  $\text{CO}_2$  e B: uma mistura ternária de 70: 25: 5 metanol: etanol: água v/v/v em gradiente de eluição com 1 minuto 60:40 A: B v/v para reter o ERTM seguido de rampa linear de 20 min a 35:65 A: B v/v. Esta composição permaneceu 4 minutos e depois voltou às condições iniciais durante mais 5 minutos. O volume da injeção foi de 5  $\mu\text{L}$ , as soluções foram filtradas através de um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de serem injetadas. A vazão foi de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , usando detector UV a 230 nm, em temperatura de 20 °C. O regulador de contrapressão foi ajustado em 17,5 MPa (175 Bar). A faixa de concentração foi de 70 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e apresentou tempo de retenção de 21,0 minutos.



## Conclusões

---

- ✓ Foi desenvolvido e validado um método de análise de ERTM injetável por eletroforese capilar usando tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7 e 15 kV de voltagem, na faixa de concentração de 70 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que apresentou tempo de retenção de 3,15 minutos.
- ✓ Foi desenvolvido e validado um método microbiológico por turbidimetria, capaz de determinar a percentual médio de ERTM em pó liofilizado para solução injetável frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1851 e apresentou parâmetros de validação adequados, nas concentrações 12,8; 16,0; 20,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- ✓ Foi realizada a análise comparativa entre os métodos desenvolvidos que demonstrou que os métodos são equivalentes e adequados para a determinação quantitativa do fármaco.

**REFERÊNCIAS**

- ABBOTT, E.; VEENSTRA, T.D.; ISSAQ, H.J. Clinical and pharmaceutical applications of packed-column supercritical fluid chromatography. **Journal of Separation Science**, v.31, n.8, p.1223-1230, 2008.
- ABDEL-MOETY, E.M.; ELRAGEHY, N.A.; HASSAN, N.Y.; REZK, M.R. Selective determination of ertapenem and imipenem in the presence of their degradants. **Journal of Chromatographic Science**, v.48, n.8, p.624-630, 2010.
- AGUIAR, F.A.; GAITANI, C.M.; BORGES, K.B. Capillary electrophoresis method for the determination of isradipine enantiomers: Stability studies and pharmaceutical formulation analysis. **Electrophoresis**, v.32, n.19, p. 2673-2682, 2011.
- ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v.499, p.177-196, 1990.
- ANASTAS, P.T.; WARNER, J.C. Green Chemistry: Theory and Practice. New York: Oxford University Press, 1998 p.30.
- ANASTAS, P.T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.29, p.167-175, 1999.
- ANTON, K.; BACH, M.; GEISER, A. Supercritical fluid chromatography in the routine stability control of antipruritic preparations. **Journal of Chromatography**, v.553, n.1-2, p.71-79, 1991.
- ANTON, K.; SIFFRIN, C. Packed-column SFC in the pharmaceutical industry: GMP aspects. **Analisis**, v.27, n.8, p.691-701, 1999.
- ANVISA. Bulário eletrônico. INVANZ<sup>®</sup> Merck Sharp & Dohme. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25925-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25925-1-0].PDF). Acesso em: 04 de julho de 2017.
- ANVISA, 2013. Resolução - RDC N<sup>o</sup> 58, de 20 de dezembro de 2013. Agência Nacional Vigilância Sanitária 1-5.
- AOAC, 2002. Official methods of analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg.
- ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T. Subcritical fluid chromatography of water soluble nucleobases on various polar stationary phases facilitated with alcohol-modified CO<sub>2</sub> and water as the polar additive. **Journal of Separation Science**, v.33, n.11, p.1682-1691, 2010.
- ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T.; SEEST, E. Screening strategies for achiral supercritical fluid chromatography employing hydrophilic interaction liquid chromatography-like parameters. **Journal of Chromatography A**, v.1229, p.237-248, 2012.
- ASHRAF-KHORASSANI, M.; YAN, Q.; AKIN, A.; RILEY, F.; AURIGEMMA, C.; TAYLOR, L.T. Feasibility of correlating separation of ternary mixtures of neutral analytes via

*Referências*

---

thin layer chromatography with supercritical fluid chromatography in support of green flash separations. **Journal of Chromatography A**, v.1418, p.210-217, 2015.

ASSASSI, A.L.; ROY, C.E.; PEROVITCH, P.; AUZERIE, J.; HAMON, T.; GAUDIN, K. Green analytical method development for statin analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1380, p.104-111, 2015.

BERZAS, J.J.; GUIBERTEAU, C.; VILLASEÑOR, M.J.; RODRÍGUEZ, V. Development of a capillary gas chromatographic procedure for determining selective serotonin reuptake inhibitors: Validation study and experimental design to evaluate the robustness of method. **Analytica Chimica Acta**, v.519, n.1, p.219-230, 2004.

BHOIR, I.C.; PATIL, S.T.; SUNDARESAN, M. Application of packed column supercritical fluid chromatography to the simultaneous determination of seven anticonvulsant drugs. **Talanta**, v.48, n.5, p.1179-1189, 1999.

BIRNBAUM, J.; KAHAN, F.M.; KROPP, H.; MACDONALD, J.S. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. **American Journal of Medicine**, v.78, n.6A, p.3-21, 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 of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.3, p.159-165, 2014.

BOLAÑOS, B.; GREIG, M.; VENTURA, M.; FARRELL, W.; AURIGEMMA, C.M.; LI, H.; QUENZER, T.L.; TIVEL, K.; BYLUND, J.M.R.; TRAN, P.; PHAM, C.; PHILLIPSON, D. SFC/MS in drug discovery at Pfizer, La Jolla. **International Journal Mass Spectrometry**, v.238, n.2, p.85-97, 2004.

BONFILIO, R.; TARLEY, C.R.T.; PEREIRA, G.R.; SALGADO, H.R.N.; ARAÚJO, M.B. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, v.80, p.236-241, 2009.

BORGES, E.M. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v.53, n.4, p.580-597, 2014.

BORGES, E.M.; EUERBY, M.R. An appraisal of the chemical and thermal stability of silica based reversed-phase liquid chromatographic stationary phases employed within the pharmaceutical environment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.77, p.100-115, 2013.

BORGES, E.M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C.H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, v.35, n.5, p.993-1003, 2012.

BORGES, E.M.; ROSTAGNO, M.A.; MEIRELES, M.A.A. Sub-2  $\mu\text{m}$  fully porous and partially porous (core-shell) stationary phases for reversed phase liquid chromatography. **RSC Advances**, v.4, n.44, p.22875-22887, 2014.

BOSE, A. HPLC Calibration process parameters in terms of system suitability test. **Austin**

## Referências

---

**Chromatography**, v.1, n.2, p.1-4, 2014.

BREILH, D.; TEXIER-MAUGEIN, J.; ALLAOUCHICHE, B.; SAUX, M.C.; BOSELLI, E. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v.25, n.1, p.1-17, 2013.

BRUNELLI, C.; DUNKLE, M.; MORRIS, S.; SANDRA, P. Development of a generic gradient SFC method for application in drug discovery and development. **Chromatography Today**, p.5-8, 2009.

BRUNELLI, C.; PEREIRA, A.; DUNKLE, M.; DAVID, F.; SANDRA, P. Green chromatography (part 2): the role of CG and SFC. **LCGC Europe**, v.23, n.8, p.396-401, 2010.

BRUNELLI, C.; ZHAO, Y.; BROWN, M.H.; SANDRA, P. Development of a supercritical fluid chromatography high-resolution separation method suitable for pharmaceuticals using cyanopropyl silica. **Journal of Chromatography A**, v.1185, n.1, p.263-272, 2008.

BP. BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 136 de 29 de maio de 2003a**. Dispõe sobre registro de medicamentos novo. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003a.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003b**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº1, de 29 de julho de 2005**. Guia para realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 1 de agosto 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em: 04 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta pública nº 11, de 23 de janeiro de 2012. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/042a338049f229df96d7bfaa19e2217c/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%B0+11+GGMED.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em 04 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013**. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de dezembro de 2013.

BRANDS, J.M.K.; CROCKER, S.L.; CVETOVICH, R.; FISHER, S.E.; JOBSON, R.; MAHAJAN, J. A.; ORELLA, C.; SIDLER, R.D.; WARD, D.M.; WENSLOW, M.R.; WILLIAMS, M.J. **Crystalline forms of ertapenem sodium**. WO 2003026572 A2, 3 abr. 2003.

BREILH, D.; TEXIER-MAUGEIN, J.; ALLAOUCHICHE, B.; SAUX, M.C.; BOSELLI, E. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v.25, n.1, p.1-17, 2013.

*Referências*

---

BRISCOE, S.E.; MCWHINNEY, B.C.; LIPMAN, J.; ROBERTS, J.A.; UNGERER, J.P.J. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.907, p.178-184, 2012.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: AMGH, 2012. 2079p.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.402, n.1, p.231-247, 2012.

CARINI, J.P.; KAISER, S.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. Development, optimisation and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs. **Phytochemical Analysis**, v.24, n.3, p.193-200, 2012.

CASS, Q.B.; DEGANI, L.G. **Desenvolvimento de métodos por CLAE: fundamentos, estratégia e validação**. São Carlos: EDUFSCar, 2012. 77p

CAZEDEY, E.C.L.; OTHMAN, A.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. A validated stability-indicating LC method for orbifloxacin in the presence of degradation products. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, n.3, p.1-6, 2011.

CAZENAVE-GASSIOT, A.; BOUGHTFLOWER, R.; CALDWELL, J.; HITZEL, L.; HOLYOAK, C.; LANE, S.; OAKLEY, P.; PULLEN, F.; RICHARDSON, S.; LANGLEY, G.J. Effect of increasing concentration of ammonium acetate as an additive in supercritical fluid chromatography using CO<sub>2</sub>-methanol mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.36, p.6441-6450, 2009.

CDER – Center for Drug Evaluation and Research (USA) [Internet]. **Guidance for Industry Q3C: Tables and List**. Revision 2. 2012. 10p. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073395.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2017.

CHONG, X.M.; HU, C.Q.; FENG, Y.C.; PANG, H.H. Construction of a universal model for non-invasive identification of penicillins for injection using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v.51, n.2, p.313-317, 2009.

CIELECKA-PIONTEK, J.; ZAJAC, M.; JELINSKA, A. A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, n.1, p.52-57, 2008.

CIELECKA-PIONTEK, J.; MICHALSKA, K.; ZALEWSKI, P.; JELIŃSKA, A. Recent advances in stability studies of carbapenems. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, n.4, p.213-227, 2011.

CONSORTTI, L.P.; SALGADO, H.R.N. Green method for quantification of sodium cefotaxime in lyophilized powder by infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences & Emerging Drugs**, v.5, p.1-6, 2017.

*Referências*

---

- COTTAGNOUD, P.; PFISTER, M.; COTTAGNOUD, M.; ACOSTA, F.; TAUBER, M.G. Activities of ertapenem, a new long-acting carbapenem, against penicillin-sensitive or -resistant pneumococci in experimental meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.6, p.1943-1947, 2003.
- CROCKER, L.S.; WANG, Y.; MCCAULEY, J.A. Determination of the Optimum pH for Isolation of a Compound with Multiple p K a's from Aqueous-Organic Solvent Mixtures. **Organic Process Research & Development**, v.5, p.77-79, 2001.
- CUE, B.W.; ZHANG, J. Green Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry: Recent Case Studies. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v.2, n.4, p.193-211, 2009.
- CUNHA, B.A. Ertapenem a review of its microbiologic, pharmacokinetic and clinical aspects. **Drugs of Today**, v.38, n.3, p.195-213, 2002.
- DAILLY, E.; BOUQUIE, R.; DESLANDES, G.; JOLLIET, P.; LE FLOCH, R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v.879, n.15-16, p.1137-1142, 2011.
- D'AVOLIO, A.; BAIETTO, L.; DE ROSA, F.G.; GARAZZINO, S.; SCIANDRA, M.; SICCARDI, M.; BONORA, S.; DI PERRI, G. A simple and fast method for quantification of ertapenem using meropenem as internal standard in human plasma in a clinical setting. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.30, n.1, p.90-94, 2008.
- DEMIRALAY, E.Ç.; KOÇ, D.; DALDAL, Y.D.; ÇAKIR, C. Determination of chromatographic and spectrophotometric dissociation constants of some beta lactam antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.71, p.139-143, 2012.
- DEMIRALAY, E.Ç.; KOÇ, D.; DALDAL, D.Y.; ALSANCAK, G.; OZKAN, S.A. Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine. **Biomedical Chromatography**, v.28, n. 5, p.660-666, 2013.
- DESAI, P.P.; PATEL, N.R.; SHERIKAR, O.D.; MEHTA, P.J. Development and validation of packed column supercritical fluid chromatographic technique for quantification of chlorzoxazone, paracetamol and aceclofenac in their individual and combined dosage forms. **Journal of Chromatographic Science**, v.50, n.9, p.769-774, 2012.
- DISPAS, A.; LEBRUN, P.; SASSIAT, P.; ZIEMONS, E.; THIÉBAUT, D.; VIAL, J.; HUBERT, P. Innovative green supercritical fluid chromatography development for the determination of polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v.1256, p.253-260, 2012.
- DISPAS, A.; LEBRUN, P.; ZIEMONS, E.; MARINI, R.; ROZET, E.; HUBERT, P. Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: From method development to validation. **Journal of Chromatography A**, v.1353, p.78-88, 2014.
- DONG, J.X.; ZHOU, W.B.; FENG, Y.C.; SONG, D.Q.; HU, C.Q. Quantitative calibration models for the determination of azithromycin and decladinosylazithromycin in azithromycin

## Referências

---

injection powder by using diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.19, n.4, p.265-275, 2011.

DRUG BANK Open data drug & Drug target database. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/>. Acessado em: 04 de julho de 2017.

DURÓN, R.R.; ALMAGUER, L.C.; CAVAZOS ROCHA, N.C.C.; FLORES, P.S.; TORRES, N.A. Comparison of high-performance liquid chromatographic and thin-layer chromatographic methods for determination of aloin in herbal products containing *Aloe vera*. **Journal of AOAC International**, v.91, n.6, 1265-1270, 2008.

EL-GAMAL, M.I.; BRAHIM, I.; HISHAM, N.; ALADDIN, R.; MOHAMMED, H.; BAHAAELDIN, A. Recent updates of carbapenem antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.131, May, p.185-1955, 2017.

EL-HADY, D.A.; ALBISHRI, H.M.; RENGARAJAN, R. Eco-friendly ionic liquid assisted capillary electrophoresis and  $\alpha$ -acid glycoprotein assisted liquid chromatography for simultaneous determination of anticancer drugs in human fluids. **Biomedical Chromatography**, v.29, p.925-934, 2015.

ELIZAROVA, T.E.; SHTYLEVA, S.V.; PLETENEVA, T.V. Using near-infrared spectrophotometry for the identification of pharmaceuticals and drugs. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.42, n.7, 432-434, 2008.

ENGELHARDT, H.; GROSS, A.; MERTENS, R.; PETERSEN, M. High-performance liquid chromatographic columns and stationary phases in supercritical-fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.477, n.1, p.169-183, 1989.

EP. EUROPEAN Pharmacopoeia. 7.ed. Council of Europe, 2010.

FAROUK, F.; MOUSSA, B.A.; AZZAZY, H.M.E.S. Fourier transform infrared spectroscopy for in-process inspection, counterfeit detection and quality control of anti-diabetic drugs. **Spectroscopy**, v.26, n.4-5, p.297-309, 2011.

FB. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <http://abiquifi.org.br/legislacao/farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf>. Acessado em: 04 de julho de 2017.

FP. FARMACOPEIA Portuguesa. 8. ed. Lisboa: Infarmed, 2005.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2004.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analytical Procedures and Methods Validation**. 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso em: 15 março 2013.

FDA, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for

*Referências*

---

Industry 2015.

FIGUEIREDO, A.L.; SALGADO, H.R.N. Validation of a green analytical method for the quantitative analysis of antimicrobial aztreonam in lyophilized powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **EC Microbiology**, v.8, p.254-265, 2017.

FONTEYNE, M.; ARRUABARRENA, J.; BEER, J.; HELLINGS, M.; VAN D.K.T.; BURGGRAEVE, A.; VERVAET, C.; REMON, J.P.; BEER, T. NIR spectroscopic method for the in-line moisture assessment during drying in a six-segmented fluid bed dryer of a continuous tablet production line: Validation of quantifying abilities and uncertainty assessment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.100, November, p.21-27, 2014.

FRANCE, J.E.; SNYDER, J.M.; KING, J.W. Packed-microbe supercritical fluid chromatography with flame ionization detection of abused vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v.540, p.271-278, 1991.

FÜHR, 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, n.6, p.244-251, 2013.

GALUSZKA, A.; KONIECZKA, P.; MIGASZEWSKI, Z.M.; NAMIÉSNIK, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.37, p.61-72, 2012.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIÉSNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.50, p.78-84, 2013.

GANDHI, M.; YANG, Q.; BACCHETTI, P.; HUANG, Y. Short communication: a low-cost method for analyzing nevirapine levels in hair as a marker of adherence in resource-limited settings. **Aids Research and Human Retroviruses**, v.30, n.1, p.25-28, 2014.

GARCÍA, I.; SARABIA, L.; ORTIZ, M.C.; ALDAMA, J.M. Robustness of the extraction step when parallel factor analysis (PARAFAC) is used to quantify sulfonamides in kidney by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD). **Analyst**, v.129, n.8, p.766-771, 2004.

GARRIGUES, S.; ARMENTA, S.; GUARDIA, M. Green strategies for decontamination of analytical wastes. **Trends in Analytical Chemistry**, v.29, n.7, p.592-601, 2010.

GEISER, F.O.; YOCKLOVICH, S.G.; LURCOTT, S.M.; GUTHRIE, J.W.; LEVY, E.J. Water as a stationary phase modifier in packed-column supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.459, p.173-181, 1988.

GIDDINGS, J.C.; MYERS, M.N.; MCLAREN, L.; KELLER, R. High pressure gas chromatography of nonvolatile species. Compressed gas is used to cause migration of intractable solutes. **Science**, v.162, n.3849, p.67-73, 1968.

GUARDIA, M.D.; ARMENTA, S. Green analytical methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.404, p.625-626, 2012.



## Referências

---

Guidance for Drugs in USA Food and Drugs Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> Acessado em 04 de julho de 2017).

GOLDSTEIN, E.J.C.; CITRON, D.M.; MERRIAM, C.V.; WARREN, Y.; TYRRELL, K.L. Comparative *in vitro* activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.9, p.2389–2394, 2000.

GORDIEN, J.B.; BOSELLI, E.; FLEUREAU, C.; ALLAOUCHICHE, B.; JANVIER, G.; LALAUE, O.; SAUX, M.C.; BREILH, D. Determination of free ertapenem in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.830, n.2, p.218-223, 2006.

GUPTA, N.; LIMBAGO, B.M.; PATEL, J.B.; KALLEN, A.J. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. **Journal of Chromatographic Science**, v.53, n.1, p.60-67, 2011.

GYLLENHAAL, O. Packed column supercritical fluid chromatography of sodium stearyl fumarate aqueous suspension. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v.40, n.4, p.971-974, 2006.

HASSAN, N.Y.; ABDEL-MOETY, E.M.; ELRAGEHY, N.A.; REZK, M.R. Selective determination of ertapenem in the presence of its degradation product. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.72A, n.5, p.915-921, 2009.

HAMMOND, M. L. Ertapenem: a group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n.S2, p.ii7-ii9, 2004

HECKENDORF, A.; KRULL, I. S.; RATHORE, A. HILIC and its applications for biotechnology, Part I. **LCGC North America**, v.31, n.12, p.998-1007, 2013.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2004. p.18-21.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q<sub>2</sub> (R<sub>1</sub>). Geneva, 2005.

IUPAC, 2002. HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS, Pure and Applied Chemistry.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.692, n.1-2, p.1-25, 2011.

KARAM, G.; CHASTRE, J.; WILCOX, M.H.; VINCENT, J.L. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v.20, n.1, p.136, 2016.

*Referências*

---

- KAWACHI, Y.; IKEGAMI, T.; TAKUBO, H.; IKEGAMI, Y.; MIYAMOTO, M.; TANAKA, N. Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.35, p.5903-5919, 2011.
- KITCHEN, C.J.; MUSSON, D.G.; FISHER, A.L. Column-switching technique for the sensitive determination of ertapenem in human cerebrospinal fluid using liquid chromatography and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v.799, n.1, p.9-14, 2004.
- KOAL, T.; DETERS, M.; RESCH, K.; KAEVER, V. Quantification of the carbapenem antibiotic ertapenem in human plasma by a validated liquid chromatography–mass spectrometry method. **Clinica Chimica Acta**, v.364, n.1-2, p.239-245, 2006.
- KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Spectrophotometry in infrared region: a new, low cost and green way to analyze tablets of rifaximin. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.13, p.1-5, 2017.
- KOGAWA, A.C.; MELLO, N. P.; SALGADO, H.R.N. Quantification of doxycycline in raw material by an eco-friendly method of infrared spectroscopy. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v.4, 2016, p.463.
- KOGAWA, A.C.; AGUIAR, F.A.; GAITANI C.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of darunavir in tablets and comparison with the of infrared absorption spectroscopic method. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.6, p.283-297, 2014.
- KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tabets. **Physical Chemistry**, v.3, n.1, p.1-6, 2013.
- KOEL, M.; BORISSOVA, M.; VAHER, M.; KALJURAND, M. Developments in the application of Green Chemistry principles to food analysis Capillary electrophoresis for the analysis of ingredients in food products. **Focus on food analysis-Supplementto AgroFOOD industry hi-tech**, v.22, n.5, p.27-29, 2011.
- KOEL, M.; KALJURAND, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.78, n.11, p.1993-2002, 2006.
- LA MARCA, G.; GIOCALIERE, E.; VILLANELLI, F.; MALVAGIA, S.; FUNGHINI, S.; OMBRONE, D.; FILIPPI, L.; GAUDIO, M.; MARTINO, M.; GALLI, L. Development of an UPLC–MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.61, March, p.108-113, 2012.
- LANÇAS, F.M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”?. **Scientia Chromatographica**, v.1, n.1, p.51-60, 2009.
- LANÇAS, F.M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v.2, n.1, p.49-57, 2010.

*Referências*

---

- LEFEUVRE, S.; VENISSE, N.; MARCHAND, S.; BACHELET, M.; COUET, W. A simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of ertapenem in microdialysate. **Journal of Chromatography B**, v.862, n.1-2, p.242-245, 2008.
- LEGRAND, T.; CHUN, S.; REY, E.; BLANCHET, B.; ZAHAR, J.; LANTERNIER, F.; PONS, G.; JULLIEN, V. Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.875, n.2, p.551-556, 2008.
- LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C. “Green chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v.26, n.1, p.123-129, 2003.
- LESELLIER, E.; WEST, C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography - A critical review. **Journal of Chromatography A**, v.1382, p.2-46, 2015.
- LI, W.; RASMUSSEN, H.T. Strategy for developing and optimizing liquid chromatography methods in pharmaceutical development using computer-assisted screening and Plackett-Burman experimental design. **Journal of Chromatography A**, v.1016, n.2, p.165-180, 2003.
- LIN, C.H.; WU, H.L.; HUANG, Y.L. Microdialysis sampling coupled to on-line high-performance liquid chromatography for determination of arbutin in whitening cosmetics. **Journal of Chromatography B**, v.829, n.1-2, p.149-152, 2005.
- LIU, Y.; BERTHOD, A.; MITCHELL, C.R.; XIAO, T.L.; ZHANG, B.; ARMSTRONG, D.W. Super/subcritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v.978, n.1-2, p.185–204, 2002.
- LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Development of a validated stability-indicating LC assay and stress degradation studies of linezolid in tablets. **Chromatographia Supplement**, v.69, p.S129-S135, 2009.
- LOPES, C.C.G.O; SALGADO, H.R.N. Performance characteristics of bioassay UV-spectrophotometry and high performance liquid chromatographic determination of gatifloxacin in tablets. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1831-1835, 2008.
- LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670-673, 2004.
- MAJUMDAR, A.; MUSSON, D.; BIRK, K.; KITCHEN, C.; HOLLAND, S.; MCCREA, J.; MISTRY, G.; HENSNEY, M.; XI, L.; LI, S.; HAESSEN, R.; BLUM, R.; LINS, R.; GREENBERG, H.; WALDMAN, S.; DEUTSCH, P.; ROGERS, J. Pharmacokinetics of ertapenem in healthy young volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.11, p.3506-3511, 2002.
- MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1559-1568, 2010.

*Referências*

---

MATKOVIC, S.R.; VALE, G.M.; GALLE, M.; BRIAND, L.E. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopía infrarroja. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n.4, p.527-532, 2004.

MCCALLEY, D.V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? **Journal of Chromatography A**, v.1171, n.1-2, p.46-55, 2007.

MCQUADE, M.; NOSTRAND, V.; SCHARITER, J.; KANIKE, J.; FORSYTH, R. Stability and compatibility of reconstituted ertapenem with commonly used i.v. infusion and coinfusion solutions. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.61, n.1, p.38-45, 2004.

MCWHINNEY, B.C.; WALLIS, S.C.; HILLISTER, T.; ROBERTS, J.A.; LIPMAN, J.; UNGERER, J.P.J. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.878, n.22, p.2039-2043, 2010.

MENDEZ, A.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2003.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v.3, n.1, p.15-21, 2016.

MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSK, S. Determination of doripenem and related substances in medicinal product using capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 34, n.4, p. 475-482, 2011.

MIN, L.; JUDY, O.; EMILY X. CHEN, E.M.; CAUCHON, N. Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.12, p.2362-2370, 2009.

MING, J.; KUN, L.; JIAN L.V; YUXIU, M.; YING S.; ZAN, X.; XUEBIN, Z. **Crystalline form of ertapenem sodium and preparation method therefor**. WO 2012089058 A1, 22 dez. 2011.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v.2, n.1, p.6-11, 2012.

MORENO A.H.; SALGADO H.R.N. Development of a new high-performance liquid chromatographic method for determination of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v.91, n.4, p.739-743, 2008.

MUKHERJEE, P.S. Validation of direct assay of an aqueous formulation of a drug compound AZY by chiral supercritical fluid chromatography (SFC). **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v.43, n.2, p.464-470, 2007.

MUKHERJEE, P.S.; COOK, S.E. A feasibility study on direct assay of an aqueous formulation by chiral supercritical fluid chromatography (SFC). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.4, p.1287-1292, 2006.

*Referências*

---

MULHOLLAND, M.; WATERHOUSE, J. Development and evaluation of an automated procedure for the ruggedness testing of chromatographic conditions in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.395, p.539-551, 1987.

MUNDKOWSKI, R.G.; MAJCHER-PESZYNSKA, J.; BURKHARDT, O.; WELTE, T.; DREWELOW, B. A new simple HPLC assay for the quantification of ertapenem in human plasma, lung tissue, and broncho-alveolar lavage fluid. **Journal of Chromatography B**, v.832, n.2, p.231-235, 2006.

MUSSON, D.; BIRK, K.; CAIRNS, A.; MAJUMDAR, A.; ROGERS, J. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of a new carbapenem antibiotics. L-749,345, in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v.720, n.1-2, p.99-106, 1998.

MUSSON, D.G.; BIRK, K.L.; KITCHEN, C.J.; ZHANG, J.; HSIEH, J.Y.K.; FANG, W.; MAJUMDAR, A.K.; ROGERS, J.D. Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.783, n.1, p.1-9, 2003.

MUSSON, D.G.; KITCHEN, C.J.; HSIEH, J.Y.K.; BIRK, K.L. Modified high-performance liquid chromatographic method for the determination of ertapenem in human urine: enhanced selectivity and automation. **Journal of Chromatography B**, v.779, n.2, p.341-346, 2002.

MURAKAMI, J.N.; THURBIDE, K.B. Packed column supercritical fluid chromatography using stainless steel particles and water as a stationary phase. **Analytical Chemistry**, v.87, n.18, p.9429-9435, 2015.

NATISHAN, T. K.; SAJONZ, P. Acetate and chloride determination by ion exchange hplc with indirect photometric detection and its application to a  $\beta$ -methylcarbapenem antibiotic. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.24, n.17, 2001.

NATISHAN, T.K.; WU, Y. Residual solvents determination in the antibiotic L-749,345 by static headspace gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.800, n.2, p.275-281, 1998.

NATORI, J.S.H.; TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a green analytical method for determination of norfloxacin in raw material by Fourier-Transform Infrared Spectrophotometry (FT-IR). **Journal of AOAC International**, v.9, p.1533-1536, 2016.

NGUYET, A.N.M.; TALLIEU, L.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J.; MASSART, D.L.; VANDER HEYDEN, Y. Validation of an HPLC method on short columns to assay ketoconazole and formaldehyde in shampoo. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, n.1, p.1-19, 2003.

NIX, D.E.; MATTHIAS, K.R.; FERGUSON, E.C. Effect of ertapenem protein binding on killing of bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.9, p.3419-3424, 2004.

## Referências

---

- NOLASCO, F.R.; TAVARES, G.A.; BENDASSOLLI, J.A. Implantação de programas de gerenciamento de resíduos químicos laboratoriais em universidades: análise crítica e recomendações. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, p. 118-124, 2006.
- NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! **Trends in Molecular Medicine**, v.18, n.5, p.263-273, 2012.
- NOVOKMET, M.; PUČIĆ, M.; REDŽIĆ, I.; MUŽINIĆ, A.; GORNIK, O. Robustness testing of the high throughput HPLC-based analysis of plasma N-glycans. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v.1820, n.9, p.1399–1404, 2012.
- OLESIK, S.V. Enhanced-fluidity liquid chromatography: connecting the dots between supercritical fluid chromatography, conventional subcritical fluid chromatography, and HPLC. **LCGC Europe**, v.33, n.4, p.24-30, 2015.
- PAGE, S.H.; MALIK, A.; SUMPTER, S.R.; LEE, M.L. Demonstration of a linear composition gradient during water saturation of CO<sub>2</sub> in supercritical fluid chromatography. **Chromatographia**, v.37, n.1-2, p.93-97, 1993.
- PAIM, C.S.; GONÇALVES, H.; LANGE, A.; MIRON, D.; STEPPE, M. Validation of UV spectrophotometric method for quantitative determination of entacapone in tablets using experimental design of Plackett-Burman for robustness evaluation and comparison with HPLC. **Analytical Letters**, v.41, n.4, p.571-581, 2008.
- PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1277, n.1, p.91-104, 2013.
- PAL, A.; TRIPATHI, A. An *in silico* approach for understanding the molecular evolution of clinically important metallo-beta-lactamases. **Infection Genetics and Evolution**, v.20, December, p.39-47, 2013.
- PATEL, M.A.; HARDINK, M.A.; WRISELY, L.; RILEY, F.W.; HUDALLA, C.J.; ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T. Evolution of strategies to achieve baseline separation of ten anionic, water-soluble sulfated estrogens via achiral packed column supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1370, p.240-245, 2014.
- PATEL, M.A.; RILEY, F.; ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T. Supercritical fluid chromatographic resolution of water soluble isomeric carboxyl/amine terminated peptides facilitated via mobile phase water and ion pair formation. **Journal of Chromatography A**, v.1233, p.85-90, 2012.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectrofotometria**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.
- PENA-PEREIRA, F.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. **Green Chemistry**, v.17, p.3687-3705, 2015.

*Referências*

---

PEDROSO, T.M.; MEDEIROS, A.C.D.; SALGADO, H.R.N. RP-CIH x HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. **Talanta**, v.160, p. 745–753, 2016.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. A critical review of analytical methods for ertapenem sodium. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.45, n.4, p.1-10, 2015.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium pharmaceutical dosage form by high performance liquid chromatography to be applied for quality control in pharmaceutical industry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, n.1, p.213-223, 2014.

PEREIRA, A.S.; DAVID, F.; VANHOENACKER, G.; SANDRA, P. The acetonitrile shortage: Is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes? **Journal of Separation Science**, v.32, n.12, p.2001-2007, 2009.

PEREIRA, A.S.; GIRÓN, A.J.; ADMASU, E.; SANDRA, P. Green hydrophilic interaction chromatography using ethanol–water–carbon dioxide mixtures. **Journal of Separation Science**, v.33, n.6-7, p.834-837, 2010.

PERIAT, A.; PERRENOUD, A.G.G.; GUILLARME, D. Evaluation of various chromatographic approaches for the retention of hydrophilic compounds and MS compatibility. **Journal of Separation Science**, v.36, n.19, p.3141-3151, 2013.

PERRENOUD, A.G.G.; BOCCARD, J.; VEUTHEY, J.L.; GUILLARME, D. Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: Attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility. **Journal of Chromatography A**, v.1262, p.205-213, 2012.

PHATTANAWASIN, P.; SOTANAPHUN, U.; SRIPHONG, L.; KANCHANAPHIBOOL, I. Stability-indicating TLC–image analysis method for quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Planar Chromatography Modern TLC**, v.24, n.1, p.30-34, 2011.

PHILIBERT, G.S.; OLESIK, S.V. Characterization of enhanced-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography for the separation of nucleosides and nucleotides. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.45, p.8222-8230, 2011.

PICKERING, M.; BROWN, S. Quantification and validation of HPLC-UV and LC-MS assays for therapeutic drug monitoring of ertapenem in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v.27, n.5, p.568-574, 2012.

PORFIRE, A.; MUNTEAN, D.; ACHIM, M.; VLASE, L.; TOMUTA, I. Simultaneous quantification of simvastatin and excipients in liposomes using near infrared spectroscopy and chemometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.107, March, p.40-49, 2015.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v.16, p.4546-4551, 2014.

*Referências*

---

- PUENTE, M.L.; SOTO-YARRITU, P.L.; ANTA, C. Placing supercritical fluid chromatography one step ahead of reversed-phase high performance liquid chromatography in the achiral purification arena: A hydrophilic interaction chromatography cross-linked diol chemistry as a new generic stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v.1250, p.172-181,2012.
- PYO, D. Supercritical fluid chromatographic separation of polyethylene glycol polymer. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.29, n.1, p.231-233, 2008.
- PYO, D.; JU, D., Use of various filters for generating modified supercritical fluid mobile phases. **Chromatographia**, v.38, n.1-2, p.79-82, 1994.
- QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys**, [Internet], p.1-9, 2001. Material Didático Eletrônico disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Artigo-Chemkeys-Eletroforese-Capilar.pdf> Acessado em 04 de julho de 2017.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 829p.
- RAVIKIRAN, T.N.; PRASAD, Y.R.; ANOOP, K. Green chemistry. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.4, p.353-367, 2015.
- RECHELO, B.S.; FERNANDES, F.H.A.; KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. New environmentally friendly method for quantification of cefazolin sodium. **European Chemical Bulletin**, v.6, p.238-245, 2017.
- REDDY, B.S.; KUMAR, N.S.; REDDY, K.M.; ISLAM, A.; SIVAKUMARAN, M. New polymorphic forms of ertapenem sodium. **India Patent Application**, IN 2011CH00342 A 20121019, 2012.
- RODRIGUES, D.F.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a green analytical method of RP-HPLC for quantification of cefepime hydrochloride in pharmaceutical dosage form: simple, sensitive and economic. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.12, p.306-314, 2016.
- ROSCHANGAR, F.; SHELDON, R.A.; SENANAYAKE, C.H. Overcoming barriers to green chemistry in the pharmaceutical industry – the Green Aspiration Level™ concept. **Green Chemistry**, v.17, p.752-768, 2015.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London, Pharmaceutical Press, 2009. 917p.
- ROY, J.; SAHA, P.; SULTANA, S.; KENYON, A.S. Rapid screening of marketed paracetamol tablets: use of thin-layer chromatography and a semiquantitative spot test. **Bulletin of the World Health Organization**, v.75, n.1, p.19-22, 1997.
- SAJONZ, P.; NATISHAN, T.; WU, Y.; WILLIAMS, J.; PIPIK, B.; DIMICHELE, L.; NOVAK, T.; PITZENBERGER, DUBOST, D.; ALMARSSON, O. Preparation, isolation, and characterization of dimeric degradation products of the 1 $\beta$ -methylcarbapenem antibiotics,



*Referências*

---

ertapenem. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.24, n.19, p.2999-3015, 2001.

SAJONZ, P.; NATISHAN, T.K.; WU, Y.; MCGACHY, N.T.; TORA, D. Development and validation of a sensitive and robust Wipe-Test method for the detection and quantification of the antibiotic ertapenem and its primary degradates in a pharmaceutical manufacturing environment. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.5, p.713-725, 2005.

SAJONZ, P.; WU, Y.; NATISHAN, T.K.; MCGACHY, N.T.; DETORA, D. Challenges in the analytical method development and validation for an unstable active pharmaceutical ingredient. **Journal of Chromatographic Science**, v.44, n.3, p.132-140, 2006.

SAKATA, H.; KUROKI, H.; OUCHI, K.; TAJIMA, T.; IWATA, S. Pediatric community-acquired pneumonia treated with a three-day course of tebipenem pivoxil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.23, n.5, p.307-311, 2017.

SANSEVERINO, A.M. Síntese orgânica limpa. **Química Nova**, v.23, p.102-107, 2000.

SCHLUTER, H.; JANKOWSKI, J.; MICHAEL, K. Displacement chromatography. **Journal of Chromatography Library**, v.1, p. 505–524, 1999.

SHAH, P.M.; ISAACS, R.D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.4, p.538-542, 2003.

SHEN, Y.; CHEN, B.; BEEK, T.A. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. **Green Chemistry**, v.17, p.4073-4081, 2015.

SHERAZI, S.T.H; ALI, M.; MAHESAR, S.A. Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v.55, n.1, p.115-118, 2011.

SHI, Y.; XIE, Z.; ZHANG, Y.R.; WANG, E.N.; ZHU, S.J. Determination of ertapenem sodium and its related substances by RP-HPLC gradient elution method. **Zhongguo Kangshengsu Zazhi**, v.37, n.10, S2, p.776-778, 2012.

SILVA, C.R.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.27, n.2, p.270-276, 2004.

SILVA, L.M.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to potency evaluation of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Microbiological Methods**, v. 110, p. 49-53, 2015.

SILVA, L.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Chromatographic Science**, v.0, p.1-8, 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.K.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490p.

*Referências*

---

SMITH, R.M. Supercritical fluids in separation science - The dreams, the reality and the future. **Journal of Chromatography A**, v.856, n.1-2, p.83-115, 1999.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2010.

SOLTANI, M.; MACGOWAN, A.P.; LOVERING, A.M. Assay of ertapenem in human serum by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.27, n.2, p.165-167, 2006.

SONG, Q.; PUTCHA, L. Quantitation of promethazine and metabolites in urine samples using on-line solid-phase extraction and column-switching. **Journal of Chromatography B**, v.763, n.1-2, p.9-20, 2001.

SPUDEIT, D.A.; DOLZAN, M.D.; MICKE, G.A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n.4, p. 287-297, 2012.

STAREK, M.; LASKAWSKI, S.; DABROWSKA, M. Identification and quantitative determination of nabumetone in pharmaceutical preparations by TLC-densitometry. **Journal of Planar Chromatography Modern TLC**, v.24, n.6, p.513-519, 2011.

STAREK, M.; KRZEK, J. TLC Chromatographic densitometric assay of ibuprofen and its impurities. **Journal of Chromatographic Science**, v.48, n.10, p.825-829, 2010.

STEUER, W.; BAUMANN, J.; ERNI, F. Separation of ionic drug substances by supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.500, p.469-479, 1990.

SWEETMAN, S.C. Ed. **Martindale. The complete drug reference**. 37. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 4142p.

SUN, S.W.; SU, H.T. Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, n.5, p.881-894, 2002.

TACHEA, F.; UDRESCU, S.; ALBU, F.; MICALE, F.; MEDVEDOVICI, A. Greening pharmaceutical applications of liquid chromatography through using propylene carbonate-ethanol mixtures instead of acetonitrile as organic modifier in the mobile phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.75, p.230-238, 2013.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TAYLOR, L.T. Packed column supercritical fluid chromatography of hydrophilic analytes via water-rich modifiers. **Journal of Chromatography A**, v.196-204, p.1250, 2012.

TAYLOR, L.T. Past, current, and future directions in supercritical fluid chromatography. **LCGC EUROPE**, v.31, n.4, p.44-49, 2013.

*Referências*

---

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. 15th ed. New York: Merck Co, 2013.

THOMSON, K.S. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.4, p.1019-1025, 2010.

TICE, A.D. Ertapenem: a new opportunity for outpatient parenteral antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.S2, p.ii83–ii86, 2004.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development, optimization and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. **Journal of AOAC International**, v.98, p.1276-1285, 2015.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an economic, environmental friendly and stability-indicating analytical method for determination of ampicillin sodium for injection by RP-HPLC. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.1928-1943, 2014a.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development of an innovative, ecological and stability-indicating analytical method for semiquantitative analysis of ampicillin sodium for injection by thin layer chromatography (TLC). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.1944-1957, 2014b.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v.2, n.6, p.103-108, 2012.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development of an innovative, ecological and stability-indicating analytical method for semiquantitative analysis of ampicillin sodium for injection by thin layer chromatography (TLC). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.6, p.1944-1957, 2014.

TOZO, G.C.G; SALGADO, H.R.N. Determination of lomefloxacin in tablet preparations by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.89, n.5, p.1305-1308, 2006.

TRAN, C.M.; TANAKA, K.; YAMAGISHI, Y.; GOTO, T.; MIKAMO, H.; WATANABE, K. *In vitro* antimicrobial activity of razupenem (SMP-601, PTZ-601) against anaerobic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.5, p.2398-2402, 2011.

TREADWAY, J.W.; PHILIBERT, G.S.; OLESIK, S.V. Enhanced fluidity liquid chromatography for hydrophilic interaction separation of nucleosides. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.35, p.5897-5902, 2011.

USP 38. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 33). 38. ed. Pharmabooks, Rockville, MD: United States Pharmacopoeia Convention, 2015.

VAILAYA, A.; SAJONZ, P.; SUDAH, O.; CAPODANNO, V.; HELMY, R., ANTIA, F.D. Exploiting pH mismatch in preparative high-performance liquid chromatographic recovery of ertapenem from mother liquor streams. **Journal of Chromatography A**, v.1079, n.1-2, p.80-91, 2005.

*Referências*

---

VANHOENACKER, G.; SANDRA, P.; DAVID, F.; SANDRA, K.; PEREIRA, A. Green chromatography (part 1): Introduction and liquid chromatography, **LCGC EUROPA**, v.23, n.5, p.242-259, 2010.

VENTURA, M.; MURPHY, B.; GOETZINGER, W. Ammonia as a preferred additive in chiral and achiral applications of supercritical fluid chromatography for small, drug-like molecules. **Journal of Chromatography A**, v.1220, p.147-155, 2012.

VIEIRA, D.C.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of cefuroxime sodium in powder for injection by infrared spectroscopy. **Advances in Analytical Chemistry**, v.2, n.6, p.80-87, 2012.

VIEIRA, D.C.M.; SALGADO H.R.N. Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical products. **Journal of Chromatographic Science**, v.49, p.508-511, 2011.

WANG, Z.; ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T. Design for on-line coupling of supercritical fluid extraction with liquid chromatography: Quantitative analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in a solid matrix. **Advances in Analytical Chemistry**, v.75, n.16, p.3979-3985, 2003.

WELTON, T. Solvents and sustainable chemistry. **Proceedings of the Royal Society A**, v.471, n.2183, p.1-26, 2015.

WEST, C. How good is SFC for polar analytes? **Chromatography Today**, v.6, n.2, p.22-24, 2013.

WEST, C.; KHATER, S.; LESELLIER, E. Characterization and use of hydrophilic interaction liquid chromatography type stationary phases in supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1250, p.182-195, 2012.

WEST, C.; LESELLIER, E. Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model: III. Polar stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v.1110, n.1-2, p.200-213, 2006.

XIE, Z.; BAI, M.; WANG, M.; WANG, E.; HAO, W.; SHI, Y. Determination of ertapenem for injection and its related substances by HPLC. **Zhongguo Xiandai Yingyong Yaxue**, v.29, n.5, p.431-433, 2012.

XUAN, D.; BANEVICIUS, M.; CAPITANO, B.; KIM, M.K.; NIGHTINGALE, C.; NICOLAU, D. Pharmacodynamic assessment of ertapenem (MK-0826) against *streptococcus pneumoniae* in a murine neutropenic thigh infection model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.9, p.2990-2995, 2002.

YANG, Y.; STRICKLAND, Z.; KAPALAVAVI, B.; MARPLE, R. GAMSKY, C. Industrial application of green chromatography—I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase. **Talanta**, v.84, p.169-174, 2011.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. The Association of Official Analytical Chemistry. Washington, 1975.

*Referências*

---

ZAJAC, M.; CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A. Development and validation of UV spectrophotometric and RP HPLC methods for determination of ertapenem during stability studies. **Chemia Analityczna**, v.51, n.5, p.761-770, 2006.

ZHANG, J.; CUE, B.W. **Green Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry: Recent Case Studies** In: Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry. Published Online, John Wiley & Sons, 29 MAY 2012, p.631-658.

ZHANG, X.B.; FENG, Y.C.; HU, C.Q. Feasibility and extension of universal quantitative models for moisture content determination in beta-lactam powder injections by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v.630, n.2, p.131-140, 2008.

ZHANG, Z.; ZHANG, F.; LIU, Y. Recent advances in enhancing the sensitivity and resolution of capillary electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v.51, n.7, p.666-683, 2013.

ZHAO, Z.; QIN, X.; REED, R. Identification by LC/MS<sup>n</sup> of degradates of a novel carbapenem antibiotics in an aqueous matrix. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, n.1-2, p.173-181, 2002.

ZHENG, J.; TAYLOR, L.T.; PINKSTON, J.D.; MANGELS, M.L. Effect of ionic additives on the elution of sodium aryl sulfonates in supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1082, n.2, p.220-229, 2005.

ZHENG, J.; PINKSTON, J.D.; ZOUTENDAM, P.H.; TAYLOR, L.T. Feasibility of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry of polypeptides with up to 40-mers. **Analytical Chemistry**, v.78, n.5, p.1535-1545, 2006a.

ZHENG, J.; TAYLOR, L.T.; PINKSTON, J.D. Elution of cationic species with/without ion pair reagents from polar stationary phases via SFC. **Chromatographia**, v.63, n.5-6, p.267-276, 2006b.

.

*Trabalhos Realizados***TRABALHOS REALIZADOS**

Esta tese foi realizada no laboratório do Departamento de Fármacos e Medicamentos por Tahisa Marcela Pedroso, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado.

*Disciplinas cursadas*

No período do doutorado oito disciplinas foram realizadas (Tabela 74).

**Tabela 74-** Disciplinas cursada no período de doutorado

<b>Disciplinas</b>	<b>Nº de Créditos</b>	<b>Conceito</b>
Metodologia da Investigação Científica	2	A
Tópicos Especiais: Elaboração e editoração de artigo científico	2	A
Ensaio de Atividade Antimicrobiana	4	A
Validação de Métodos Analíticos	4	A
Ciclo de Seminários Científicos	2	A
Planejamento e Análise Estatística	8	A
Desenvolvimento de métodos por CLAE: Fundamentos, Estratégias e Validação	5	A
Polimorfismo em Fármacos e Medicamentos	3	A

*Artigos publicados*

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. A critical review of analytical methods for determination of ertapenem sodium. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.46, p. 15-21, 2016.

PEDROSO, T.M.; MEDEIROS, A.C.D.; SALGADO, H.R.N. RP-CIH x HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. **Talanta**, v.160, p. 745–753, 2016.

*Artigos em fase de submissão:*

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Low cost and environmentally friendly method using UV-spectrophotometric method for quantifying ertapenem sodium in quality control.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. A rapid, versatile and useful turbidimetric bioassay for quantifying ertapenem sodium in quality control.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. A green alternative for quantifying ertapenem sodium using infrared spectroscopy.

PEDROSO, T.M.; LYNEN, F. SALGADO, H.R.N. Carbon dioxide a green alternative for quantifying ertapenem sodium in pharmaceutical quality control by supercritical fluid chromatography.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Application of the principles of green chemistry for the development of a method for analysing ertapenem sodium by capillary electrophoresis

## *Trabalhos Realizados*

---

### ***Trabalhos apresentados em eventos no período do doutorado:***

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development of stability-indicating thin layer chromatography for evaluation of ertapenem sodium powder for injection. In: **XV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO**, realizado em setembro de 2014, na cidade de Cartagena de Índias na Colômbia.

RECHELO, B.S.; PEDROSO, T.M.; KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Analysis of antimicrobial activity of cefazolin sodium from high performance liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. In: **XV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO**, realizado em setembro de 2014, na cidade de Cartagena de Índias – Colômbia.

\*Trabalho premiado: Uno de los mejores trabajos en modalidad poster, tras obtener la máxima calificación posible por parte de los evaluadores del XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines - COLACRO, Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. A new UV spectrophotometric method of ertapenem sodium. In: **Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas – RICIFA**, realizado em setembro de 2014, na cidade de Córdoba na Argentina.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of cefazolin sodium by infrared spectroscopy method. In: **Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas – RICIFA**, realizado em setembro de 2014, na cidade de Córdoba – Argentina.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a turbidimetric bioassay to determine the potency of ertapenem sodium. In: **18<sup>th</sup> International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacology - ICPSP 2016**, realizado em janeiro de 2016, na cidade de Paris na França.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of ertapenem sodium by infrared spectroscopy method. In: **Green & Sustainable Chemistry Conference**, realizado em abril de 2016, na cidade de Berlin na Alemanha.

PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Analytical Techniques for quantifying the ertapenem sodium with a look at green chemistry In: **7<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques**, realizado em Setembro de 2016, na cidade de Orlando – Flórida, nos Estados Unidos.

### ***Curso de aprimoramento:***

Short Course on Hyphenated Techniques in **Supercritical Fluid Chromatography No 14th International Symposium on Hyphenated Technique in Chromatography and Separation Technology**, realizado em Janeiro, 2016, na cidade de Ghent na Bélgica.