

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO  
POR MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR - CILINDROS EM PLACAS PARA  
DORIPENEM PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL**

**FERNANDA FÜHR**

**Porto Alegre, 16 de Novembro de 2011.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO  
POR MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR - CILINDROS EM PLACAS PARA  
DORIPENEM PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL**

**FERNANDA FÜHR**

Trabalho de Conclusão de Curso

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval**

**COORIENTADOR: Msc. Clésio Soldatelli Paim**

**Porto Alegre, 16 de Novembro de 2011.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores, pelo conhecimento transmitido com muito empenho e dedicação. Em especial à Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação e por ser um exemplo profissional.

À Faculdade de Farmácia e ao Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico por disponibilizar acesso ao conhecimento e infra-estrutura, necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio e pelos momentos de descontração, em especial a Márcia e a Patrícia pela ajuda e ao Clésio, pela coorientação.

Às amigas Bárbara, Gabriela e Mariana, que além da ajuda estiveram presentes nos momentos de desespero para me dar um amparo.

E também as amigas de casa, Marina, Alice e Eliane, meu namorado, André, e meus pais, Osvaldo e Lucia, por vivenciarem e superarem comigo esta etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

<b>ABSTRACT</b> .....	07
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	08
<b>2 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	09
<b>2.1 Substâncias químicas</b> .....	09
<b>2.2 Material e equipamentos</b> .....	10
<b>2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	10
<b>2.4 Ensaio Microbiológico de Antibióticos</b> .....	11
2.4.1 <i>Preparo das soluções padrão de doripenem</i> .....	11
2.4.2 <i>Preparo das soluções amostra de doripenem</i> .....	11
2.4.3 <i>Microorganismo e preparação do inóculo</i> .....	11
2.4.4 <i>Método de difusão em Agar</i> .....	12
<b>2.5 Cálculos</b> .....	13
<b>2.6 Validação do método</b> .....	13
2.6.1 <i>Linearidade</i> .....	13
2.6.2 <i>Precisão</i> .....	13
2.6.3 <i>Exatidão</i> .....	14
2.6.4 <i>Especificidade</i> .....	14
2.6.5 <i>Robustez</i> .....	14
2.6.6 <i>Estabilidade das soluções padrão e amostra</i> .....	15
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>3.1 Estabilidade das soluções amostra e padrão</b> .....	16
<b>3.2 Linearidade</b> .....	16
<b>3.3 Precisão</b> .....	17
<b>3.4 Exatidão</b> .....	18
<b>3.5 Especificidade</b> .....	18
<b>3.6 Robustez</b> .....	19
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	19
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	20
<b>ANEXOS</b> .....	27
<b>ANEXO 1 – Normas de publicação da Revista Química Nova</b> .....	28

**Este manuscrito foi elaborado segundo as normas da Revista Química Nova apresentadas no Anexo 1.**

**Desenvolvimento e validação de doseamento microbiológico por método de difusão em ágar – cilindros em placas para doripenem pó para solução injetável**

Fernanda Führ\* (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Clésio S. Paim (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Elfrides E. S. Schapoval (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

\*Autor para correspondência:

Fernanda Führ

E-mail: [fe.fuhr@bol.com.br](mailto:fe.fuhr@bol.com.br)

**Development and validation of microbiological assay by agar diffusion method  
- cylinder plate for doripenem powder for injectable solution**

**ABSTRACT**

The carbapenems are a class of  $\beta$ -lactam antibiotics that present action against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Doripenem is a new carbapenem that has few published studies for the quantitative determination and there isn't monograph in the Official Codes. Therefore, this study aims to develop and validate microbiological assay for quality control of the drug powder for injectable solution. The parameters analyzed during validation were linearity ( $r=0.99999$ ), repeatability (RSD=1.74%), intermediate precision (RSD=3.12%), accuracy (98.90 to 101.51%), specificity and robustness. The results show that the method is suitable for quality control of doripenem powder for injectable solution.

**Keywords:** doripenem, microbiological assay, *Staphylococcus epidermidis*.

## 1 INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos são os fármacos mais empregados na terapêutica mundial, sendo também os mais utilizados de forma incorreta. Seu uso indevido acaba levando ao surgimento de micro-organismos que apresentam resistência aos antimicrobianos existentes, havendo a necessidade de desenvolver novos fármacos mais efetivos para o tratamento de doenças infecciosas.<sup>1</sup>

Em 1976, foi isolado de *Streptomyces cattleya* uma nova substância de ação antimicrobiana, a tienamicina, protótipo da classe das carbapenemas.<sup>2</sup>

As carbapenemas, classe de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, foram desenvolvidas para atuar contra bactérias Gram-negativas resistentes à penicilina.<sup>3</sup> Estes fármacos possuem um anel  $\beta$ -lactâmico ligado a um sistema de 5 membros, que as diferencia das penicilinas por possuir uma ligação dupla e por ter um átomo de carbono no lugar do átomo de enxofre na posição 1.<sup>4</sup>

As carbapenemas são mais resistentes à degradação por  $\beta$ -lactamases em comparação às penicilinas e cefalosporinas. Dentro da classe das carbapenemas alguns fármacos são suscetíveis à degradação pela 1-deidropeptidase, devendo ser administrado associado a um inibidor desta enzima, porém já estão sendo desenvolvidas carbapenemas que possuem resistência a essa degradação.<sup>2</sup>

Doripenem (Figura 1) é uma nova carbapenema que possui atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas.<sup>5</sup> Estudos *in vitro* demonstraram a alta atividade deste fármaco contra bactérias Gram-negativas.<sup>6,7</sup> O doripenem não apresenta efeitos convulsivantes, demonstrando vantagens em relação aos fármacos da classe.<sup>8,9</sup>



Inserir Figura 1

O medicamento Doribax<sup>®</sup> contém doripenem monoidratado e não possui adição de conservantes, foi aprovado pelo FDA em 2007. Sua administração é por via intravenosa e está disponível nas concentrações de 250 e 500 mg. É indicado para infecções intra-abdominais, do trato urinário, no entanto, seu uso ainda não foi aprovado para casos de pneumonia nosocomiais.<sup>5</sup>

Por ser um medicamento novo, o doripenem possui poucos estudos de determinação na forma farmacêutica pó para solução injetável. Os estudos existentes são por eletroforese capilar<sup>10</sup> e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).<sup>11</sup> No entanto, a literatura pesquisada não apresenta método para determinação de doripenem pó para solução injetável utilizando o ensaio microbiológico pelo método de cilindros em placas, sendo este o objetivo principal desse trabalho. A importância da validação do ensaio microbiológico baseia-se no fato do método determinar a atividade do antimicrobiano frente a determinado micro-organismo, ou seja, simulando o mecanismo que ocorre *in vivo*.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Substâncias químicas

A substância química de referência (SQR) utilizada foi um padrão secundário obtido da Ortho Mc-Neil (New Jersey, EUA), sua pureza foi determinada experimentalmente em 99,4%.

Foram adquiridos frascos-ampola de Doribax<sup>®</sup>, produzidos pela Ortho Mc-Neil (New Jersey, EUA), contendo o equivalente a 500 mg de doripenem pó para solução

injetável, estéril e identificados pelo lote 0064. A formulação constitui-se de doripenem monoidratado, sem a presença de adjuvante.

A água purificada foi obtida usando equipamento Milli-Q Plus<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA) e, posteriormente, esterilizada em autoclave. O cloreto de sódio foi obtido da Quimex (Rio de Janeiro, Brasil) e os meios número 1 e número 11 de Grove-Randall foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany).

## **2.2 Material e equipamentos**

Foi utilizado, para estudos de estabilidade, cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent<sup>®</sup> (Santa Clara, EUA) equipado com um sistema de bombas quaternárias modelo Q 1311A, auto-amostrador ALS-G1329A, forno TCC-G1316A, detector de fotodiodos G1315B e para controlar e analisar os dados foi empregado o software Chem Station Manager.

A transmitância do inóculo foi medida em espectrofotômetro Analyser<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). O diâmetro dos halos de inibição foi medido com paquímetro digital Mitutoyo<sup>®</sup> (Tóquio, Japão).

## **2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Nos estudos para avaliar a estabilidade e a degradação forçada das soluções amostra e padrão e estudos de degradação forçada um método previamente desenvolvido e validado por Mendez e colaboradores foi utilizado. A coluna empregada foi Phenomenex C-18 (150 x 4,6 mm; 5,0  $\mu\text{m}$ ), fase móvel tampão fosfato monobásico (pH 4,8) e acetonitrila (96:04, v/v), volume de injeção 20  $\mu\text{l}$ , vazão 1,0 ml/min, tempo de corrida de 12 minutos, comprimento de onda de análise 298 nm e temperatura 25 °C.<sup>11</sup>

## 2.4 Ensaio Microbiológico de Antibióticos

### 2.4.1 Preparo das soluções padrão de doripenem

O equivalente a 10 mg de doripenem (SQR) foi pesado e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 70 ml de água. Esta solução foi deixada em ultrassom por 10 minutos, e o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 100,0 µg/ml. Alíquotas de 250, 500 e 1.000 µl foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml nos quais o volume foi completado com água, obtendo-se soluções de 1,0; 2,0 e 4,0 µg/ml, (denominadas P1, P2 e P3, respectivamente) de doripenem.

### 2.4.2 Preparo das soluções amostra de doripenem

O equivalente a 10 mg de doripenem foi pesado e procedeu-se conforme o preparo das soluções padrão até obtenção de soluções nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 µg/ml (denominadas A1, A2 e A3, respectivamente).

### 2.4.3 Micro-organismo e preparação do inóculo

A cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foi obtida do INCQs (Rio de Janeiro, Brasil) e o micro-organismo, após reconstituição, foi mantido em meio número 1 de Grove-Randall. O procedimento de preparo do inóculo foi realizado conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição em Ensaio Microbiológicos de Antibióticos. O micro-organismo foi repicado para tubo contendo meio número 1 inclinado 24 horas antes do ensaio e mantido a  $35 \pm 2$  °C. Durante o ensaio foi preparada suspensão com este micro-organismo em solução estéril de cloreto de sódio 0,9%. Para padronizar a quantidade de micro-organismo a ser

utilizada foi medida a transmitância da suspensão, utilizando um espectrofotômetro ajustado com branco de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%, em 580 nm e caminho óptico de 10 mm, até que a transmitância atingisse  $25 \pm 2\%$ . Desta solução salina inoculada, foram retirados 2,0 ml para cada 100 ml de meio número 11, mantido em banho de aquecimento a  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ , obtendo-se inóculo a 2% para ser aplicado sobre a camada base.<sup>12</sup>

#### 2.4.4 Método de difusão em Agar

O método desenvolvido neste trabalho seguiu o delineamento 3 x 3 (3 concentrações de padrão e 3 concentrações de amostra por placa). Cada ensaio foi realizado utilizando seis placas.<sup>13</sup> A camada base, composta de 20 ml de meio número 11, foi adicionada em placa de Petry de 100 mm x 20 mm. Após solidificação, foram adicionados 5 ml de meio número 11 inoculado com o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* sobre a camada base. Deixou-se em repouso até solidificar a camada de inóculo e após colocou-se os cilindros. A cada cilindro foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  das soluções de forma que ficassem alternados padrão e amostra.

As placas foram incubadas à  $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Após o tempo de incubação os halos de inibição do crescimento microbiano foram cuidadosamente medidos com o auxílio de paquímetro. Todos os experimentos foram realizados em sala com cabine de fluxo laminar, e os materiais em contato com o micro-organismo foram descontaminados em autoclave e descartados, conforme Plano de Gerenciamento de Resíduos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

## 2.5 Cálculos

Elaborou-se gráfico de logaritmo da concentração *versus* o diâmetro do halo de inibição para obtenção da curva padrão e equação da reta. A análise estatística dos resultados foi feita por meio da análise da variância (ANOVA), avaliando-se a regressão, paralelismo e a linearidade de cada ensaio. A potência do doripenem pó para solução injetável foi estatisticamente calculada pelo método de linhas paralelas (delineamento 3 x 3).

## 2.6 Validação do método

A validação do método analítico foi realizada de acordo com a RE 899<sup>13</sup> e o ICH<sup>14</sup>, e os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.

A estabilidade das soluções padrão e amostra foram monitoradas por CLAE.

### 2.6.1 Linearidade

Foram desenvolvidas nove curvas padrão, três por dia, com os três níveis de concentração cada uma. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram calculados.

### 2.6.2 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade e precisão intermediária, e expressa como desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade foi avaliada com três ensaios realizados em um mesmo dia sob as mesmas condições, e a precisão intermediária pela análise em três dias diferentes.

### 2.6.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através da recuperação de quantidades conhecidas de padrão adicionadas às soluções amostras. A quantidade de padrão adicionada correspondeu a 10% da concentração nominal das soluções, correspondendo à 1,1; 2,2 e 4,4  $\mu\text{g/ml}$ . Os resultados da exatidão foram expressos em percentagem de recuperação.

### 2.6.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da verificação da interferência dos produtos de degradação obtidos por hidrólise básica. As amostras degradadas foram comparadas com soluções padrão de doripenem recém preparadas. Os resultados obtidos pelo ensaio microbiológico foram confrontados com os obtidos por CLAE (método descrito no item 2.3).

A degradação por hidrólise básica foi realizada a partir de uma solução de doripenem em NaOH 0,01M (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Após 5 minutos, uma alíquota desta solução foi retirada e neutralizada com HCl 0,01M, o volume foi completado com água até a obtenção das concentrações nominais de 1,0, 2,0 e 4,0  $\mu\text{g/ml}$ .

### 2.6.5 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada por meio da modificação na concentração do inóculo em  $\pm 0,2\%$  do valor nominal. Os resultados de teor destes ensaios foram comparados com os resultados do doseamento de doripenem obtidos durante a avaliação da precisão do método analítico.

### *2.6.6 Estabilidade das soluções padrão e amostra*

As amostras reconstituídas em água, solução tampão fosfato de potássio 1% pH 6,0 e solução tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 foram avaliadas quanto ao percentual residual de doripenem. O monitoramento foi realizado por 18 horas, utilizando método por CLAE previamente validado, conforme descrito no item 2.3.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O método de difusão em ágar é comumente utilizado na determinação da potência de antibióticos, este método relaciona o tamanho do halo de inibição de crescimento com a concentração da substância analisada em relação a uma solução padrão da mesma substância.<sup>15</sup>

Os métodos biológicos apresentam algumas vantagens como, por exemplo, o parâmetro medido pelo ensaio (inibição do crescimento) e as propriedades do fármaco são coincidentes, e não requer equipamentos onerosos.<sup>16</sup>

Segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição o delineamento do ensaio pode ser 2 x 2, 3 x 3 ou 5 x 1. O delineamento 3 x 3 foi escolhido para este ensaio, no qual, se analisam amostra e padrão concomitantemente, usando 3 concentrações (baixa, média e alta) de cada. As concentrações das soluções amostra e padrão utilizadas foram 1,0; 2,0 e 4,0 µg/ml. A definição foi realizada com base no tamanho, nitidez e linearidade entre as concentrações avaliadas.

Durante o desenvolvimento do método analítico foram avaliados diferentes fatores para a definição da condições ótimas do ensaio (Tabela 1).

Inserir Tabela 1

As condições experimentais que apresentavam halos bem definidos e nítidos para efetuar as medidas dos halos de inibição estão descritas na Tabela 2.

Inserir Tabela 2

### **3.1 Estabilidade das soluções amostra e padrão**

Os teores de fármaco encontrados na análise da estabilidade das soluções padrão e amostra de doripenem estão apresentados na Tabela 3.

Inserir Tabela 3

Os resultados demonstram que o fármaco possui maior estabilidade em água. Segundo Piontek e Jelinska o doripenem é suscetível à degradação catalisada pelos componentes de tampões comuns.<sup>17</sup> Em vista disso, o solvente selecionado para preparo das soluções para realização dos ensaios foi a água.

### **3.2 Linearidade**

A avaliação da linearidade foi realizada através da preparação de uma curva padrão de três pontos, correlacionando o log da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) com o diâmetro do halo de inibição produzido (mm). O intervalo de concentração utilizado para esta avaliação foi de 1,0 a 4,0  $\mu\text{g/ml}$ . Na Figura 2 está apresentada uma fotografia dos halos de inibição formados na análise de doripenem.

Inserir Figura 2



A análise de regressão linear forneceu a equação da reta  $y = 12,19x + 15,33$ , com um coeficiente de correlação de 0,99999 (Figura 3). O valor do coeficiente de correlação próximo a unidade demonstra que existe relação linear entre o diâmetro dos halos de inibição e log da concentração.

Inserir Figura 3

A análise da variância demonstrou que o método não apresenta desvio de linearidade e de paralelismo ( $p > 0,05$ ) e que há regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os ensaios realizados durante a validação do método analítico.

### **3.3 Precisão**

Os valores obtidos para determinação de doripenem por ensaio microbiológico estão apresentados na Tabela 4.

Inserir Tabela 4

Os resultados da análise da precisão foram expressos como DPR dos valores obtidos pela repetibilidade e precisão intermediária na determinação do doripenem. A repetibilidade foi verificada por meio de três ensaios em um mesmo dia, sob as mesmas condições, e a precisão intermediária teve seu DPR calculado com os resultados obtidos em três diferentes dias de análise. Os valores de DPR encontrados para repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 5%, indicando a precisão do método conforme a RE 899.<sup>13</sup>

### 3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas da substância química de referência adicionadas às soluções amostra. As percentagens de recuperação obtidas foram de 98,90, 100,50 e 101,51%, muito próximas aos valores reais das amostras.

### 3.5 Especificidade

A determinação de doripenem após degradação forçada em meio alcalino foi realizada por CLAE e comparada com a realizada pelo bioensaio. No ensaio microbiológico a diminuição da concentração de fármaco devido à degradação leva a uma redução do tamanho de halo produzido, quando não há interferência de produtos de degradação.

A degradação por hidrólise alcalina (NaOH 0,01 M por 5 minutos) levou a uma redução na concentração de doripenem de 71,1% quando analisado por CLAE. Enquanto que, sob as mesmas condições, no ensaio microbiológico a concentração diminuiu 76,9%.

Outras condições de degradação forçada não foram avaliadas, pois estudos realizados por CLAE<sup>11</sup> demonstram a estabilidade do fármaco em meio ácido, luz e temperatura.

É possível verificar que o fármaco sofre degradação em meio alcalino e que os produtos de degradação não apresentam atividade sobre *S. epidermidis*, o que torna o ensaio microbiológico seletivo para determinação do doripenem pó para solução injetável.

### 3.6 Robustez

Os valores obtidos nos ensaios em que alteraram-se as concentrações de inóculo em  $\pm 0,2\%$  foram comparados com os resultados obtidos para determinação da precisão do método microbiológico ( $\alpha = 0,05$ ). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Inserir Tabela 5

As modificações na concentração do inóculo não apresentaram diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ) na determinação de potência de doripenem pó para solução injetável, demonstrando a robustez do método analítico proposto.

## 4 CONCLUSÃO

No controle de qualidade de medicamentos é importante o emprego de métodos validados que forneçam resultados confiáveis. O ensaio microbiológico desenvolvido para doseamento de doripenem em pó para solução injetável mostrou ser linear, preciso, exato, robusto e específico, ou seja, constitui uma técnica alternativa para análise quantitativa deste fármaco. Além disso, quando comparado com métodos físico-químicos, o ensaio microbiológico permite a determinação da potência do antibiótico, avaliando *in vitro* o que pode ocorrer *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHAMBERS, H. F. Em *Goodman & Gilman As Bases da Farmacológicas da Terapêutica*. 10ª ed. Hardman J. G.; Limbird, L. E., eds; Mc-Graw Hill Interamericana do Brasil Ltda.: Rio de Janeiro, 2005. Cap. 43.
2. PATRICK, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4ª ed. Oxford University Press Inc.: New York, 2009. p. 451.
3. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Rang & Dale Farmacologia*. 6ª ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2007. p. 667 – 668.
4. PETRI, W. A. J. Em *Goodman & Gilman As Bases da Farmacológicas da Terapêutica*. 10ª ed. Hardman J. G.; Limbird, L. E., eds; Mc-Graw Hill Interamericana do Brasil Ltda.: Rio de Janeiro, 2005. Cap. 45.
5. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2007/022106lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/022106lbl.pdf)., acessada em Maio de 2011.
6. Christiansen, K. J.; Ip, M.; Ker, H. B.; Mendoza, M.; Hsu, L.; Kiratisin, P.; Chongthaleong, A.; Redjeki, I. S.; Quintana, A.; Flamm, R.; Garcia, J.; Cassettari, M.; Cooper, D.; Okolo, P.; Morrissey, I. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2010**, 36, 501.
7. Ge, Y.; Wikler, M. A.; Sahm, D. F.; Blosser-Middleton, R. S.; Karlowski, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1384.
8. Chahine, E. B.; Ferrill, M. J.; Poulakos, M. N. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2010**, 67, 2015.
9. Hioruchi, M.; Kimura, M.; Tokumura, M.; Hasebe, N.; Arai, T.; Abe, K. *Toxicology*. **2006**, 222, 114.
10. Michalska, K.; Pajchel, G.; Tyski, S. *J. Sep. Sci.* **2011**, 34, 475.

11. Mendez, A. S. L.; Mantovani, L.; Savago, C.; Silveira, V.; Garcia, C. V.; Schapoval, E. E. S. *Acta Chromatogr.*, no prelo.
12. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília, 2010. Volume 1, 5.5.3.3.
13. ANVISA. Resolução nº899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, 2003.
14. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use: Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology — Q2(R1), 2005.
15. PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2 ed. Atheneu: São Paulo, 2003. p. 261 – 279.
16. AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2 ed. Artmed: Porto Alegre, 2005. Cap. 40.
17. Piontek, J. C.; Jelinska, A. *Reac. Kinet. Mech. Cat.* **2011**, 102, 37.

**Figura 1.** Estrutura química do doripenem monohidratado.

**Figura 2.** Fotografia dos halos de inibição obtidos na análise de doripenem substância química de referência na concentração de 1,0 µg/ml (P1), 2,0 µg/ml (P2) e 4,0 µg/ml (P3) e de doripenem pó para solução injetável concentração de 1,0 µg/ml (A1), 2,0 µg/ml (A2) e 4,0 µg/ml (A3).

**Figura 3.** Curva padrão do doripenem obtida pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar - cilindros em placas.

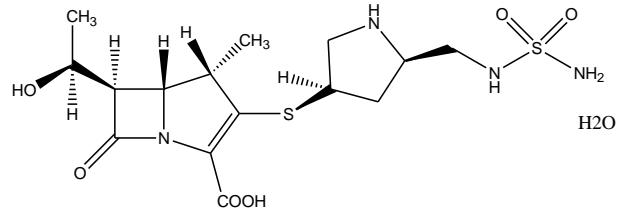


Figura 1

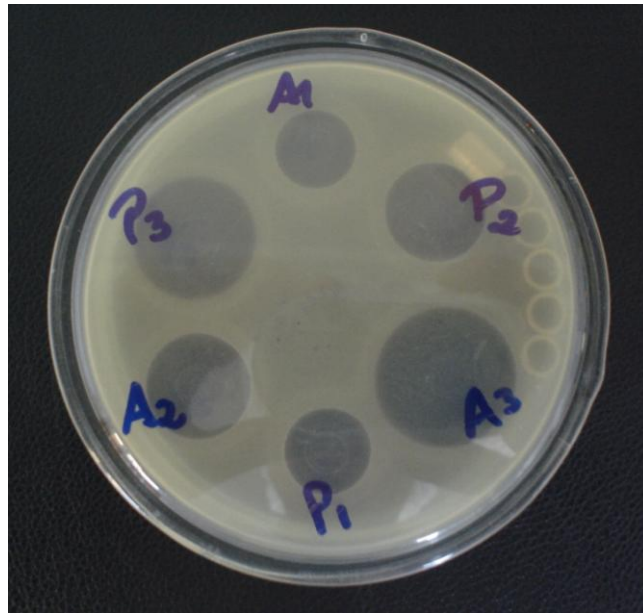


Figura 2

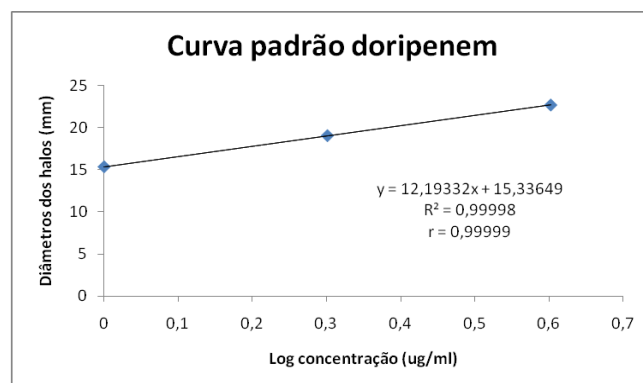


Figura 3

**Tabela 1.** Condições preliminares utilizadas no desenvolvimento do ensaio microbiológico para determinação da potência de doripenem pó para solução injetável.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)
Micro-organismos teste	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)
Meios de cultura	Meios nº 1 e nº 11 de Grove-Randall
Soluções diluente	Água, tampão fosfato pH 6,0 e pH 7,0
Concentrações do inóculo	1,0 e 2,0%

**Tabela 2.** Condições experimentais definidas para realização dos ensaios microbiológicos pelo método de difusão em ágar – cilindros em placas para determinação de doripenem pó para solução injetável.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
Micro-organismo teste	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)
Meio de cultura	Meio nº 11
Solução diluente	Água
Concentração do inóculo	2,0%



**Tabela 3.** Valores experimentais obtidos na determinação de doripenem em solução após 18 horas de preparo utilizando método por CLAE.

<b>Diluyente</b>	<b>Teor encontrado (%)</b>
Água	95,96
Tampão fosfato de potássio 1% pH 6,0	87,97
Tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0	92,79

**Tabela 4.** Valores experimentais obtidos para determinação de doripenem pó para solução injetável por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas.

<b>Amostra</b>	<b>Dia</b>	<b>Potência encontrada (%)*</b>	<b>Média (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
1		101,56		
2	1	101,29	102,09	1,14
3		103,42		
4		97,20		
5	2	95,17	96,18	1,06
6		96,17		
7		100,37		
8	3	96,78	99,98	3,03
9		102,80		
<b>Precisão intermediária</b>			<b>99,42</b>	<b>3,12</b>

\* Cada valor representa a média de seis placas.

**Tabela 5.** Resultados da robustez e análise estatística usando teste  $t$  para o doseamento microbiológico de doripenem pó para solução injetável.

<b>Parâmetros</b>	<b>Potência encontrada (%)*</b>	<b><math>t</math> calculado</b>	<b><math>t</math>-crítico (<math>\alpha = 0,05</math>)</b>
Concentração inóculo (2,2%)	97,61	0,32	2,26
	99,73		
Concentração inóculo (1,8%)	97,09	0,27	
	100,48		

\* Cada valor representa a média de seis placas.

**ANEXOS**

## **ANEXO 1 – Normas de publicação da Revista Química Nova**

## NORMAS DE PUBLICAÇÃO

**GERAL** - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Artigos de Revisão** (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão

ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

**PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS** - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (\*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

### Referências

#### **Revistas:**

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

**Patentes:**

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771 1979*. (CA 91:P193174v)
6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988*. (CA 110:P23729y)
7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3, 1999*.

**Livros:**com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Wiley: New York, 1988.

**Programas de computação (Softwares):**

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

**Teses:**

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

**Material apresentado em Congressos:**

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

**Páginas Internet:**

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

**Material não publicado:**

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a



nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

**SUBMISSÃO DOS ARTIGOS** – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbg.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo *.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

**Material Suplementar** – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

**MANUSCRITOS REVISADOS** – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

**VERSÃO FINAL** – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato .pdf não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões

especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr, eps, cdx ou opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.*

#### **Copyright ©2010 Sociedade Brasileira de Química**

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.