UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em soluções parenterais de grande volume (SPGV) carregados pelo copolímero Pluronic® F68. Emprego da proteína verde fluorescente (GFP) como biossensor da estabilidade de fármacos em SPGV.

Carolina Alves dos Santos

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo
2010

Carolina Alves dos Santos

Estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em soluções parenterais de grande volume (SPGV) carregados pelo copolímero Pluronic® F68. Emprego da proteína verde fluorescente (GFP) como biossensor da estabilidade de fármacos em SPGV.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

*À minha filha Ana Clara por me fazer sentir o amor mais genuíno, forte e poderoso;
Muito Obrigada por todos os carinhos, abraços, beijos e sorrisos incansáveis;
Amo-te com todo meu coração e com o mais profundo de minha alma.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Thereza Christina Vessoni Penna, pelo carinho, confiança, dedicação e por acreditar sempre no meu trabalho.

Aos professores Adalberto Pessoa Jr e Bronislaw Polakwicz pelo amparo nos momentos difíceis.

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico pelo incentivo e colaboração.

Ao Gabriel Borghesan Ribeiro, aluno de iniciação científica, que diretamente trabalhou e colaborou com o crescimento deste trabalho.

Ao amigo Marcos Camargo Knirsch por todo carinho, paciência, dedicação e cuidados constantes.

A amiga Ângela Faustino Jozala por estar sempre presente nestes sete anos de vitórias, frustrações, angustias e alegrias.

A amiga Laura de Oliveira Nascimento pela amizade e pelos “puxões de orelha”.

Aos funcionários do departamento, por toda ajuda.

Aos amigos e companheiros de laboratório, da pós-graduação e iniciação científica pela amizade e companheirismo.

A todos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

As agências de fomento Capes, Fapesp e CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
METODOLOGIA GERAL	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.0 Adição de fármacos as soluções parenterais de grande volume	5
1.1 Copolímeros anfifílicos de aplicação farmacêutica	7
1.2 Fármacos aminofilina e ceftazidima	10
1.3 Proteína Verde Fluorescente GFP	11

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA ETABILIDADE DOS FÁRMACOS CEFTAZIDIMA E AMINOFILINA EM SOLUÇÕES PARENTERAIS DE 0,9% NACL E 5% GLICOSE UTILIZANDO HPLC, NA AUSÊNCIA DO POLÍMERO INCORPORADO.

1.1 Introdução	13
1.2 Materiais e Métodos	15
1.2.1 Materiais	15
1.2.2 Métodos	16
1.2.2.1 Preparo das amostras	16
1.2.2.2 Metodologia analítica	16
1.2.2.3 Determinação dos valores de pH	16
1.2.3 Validação da metodologia analítica	17
1.2.3.1 Especificidade	17
1.2.3.2 Linearidade	17
1.2.3.3 Faixa de concentração do analito	17
1.2.3.4 Precisão	18
1.2.3.5 Acuracidade	18
1.2.3.6 Método indicativo de estabilidade	18
1.3 Resultados e Discussão	19
1.3.1 Avaliação da estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em SPGV 0,9% NaCl.	19
1.3.1.1 Especificidade	19
1.3.1.2 Linearidade e faixa de concentração do analito	20
1.3.1.3 Precisão	22
1.3.1.4 Acuracidade	22
1.3.1.5 Avaliação da metodologia para que esta possa ser utilizada como um indicativo da estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em SPGV de 5% glicose.	23
1.3.1.6 Avaliação da estabilidade da ceftazidima e aminofilina associadas em SPGV 0,9% NaCl	24
1.3.2 Avaliação da estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em SPGV	25

5% glicose	
1.3.2.1 Especificidade	25
1.3.2.2 Linearidade e faixa de concentração do analito	27
1.3.2.3 Precisão	28
1.3.2.4 Acuracidade	29
1.3.2.5 Avaliação da metodologia para que esta possa ser utilizada como um indicativo da estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em solução parenteral 5% Glicose.	30
1.3.2.6 Avaliação da estabilidade da ceftazidima e aminofilina associadas em soluções parenterais 5% Glicose.	31
1.4 Conclusões desta etapa	32

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO COPOLÍMERO PLURONIC F68 NA MANUTENÇÃO DA ESTABILIDADE DO FÁRMACO CEFTAZIDIMA EM SPGV DE 5% GLICOSE.

2.1 Introdução	33
2.2 Materiais e Métodos	35
2.2.1 Materiais	35
2.2.2 Métodos	36
2.2.2.1 Preparo da curva de calibração do fármaco ceftazidima	36
2.2.2.2 Preparo das amostras de ceftazidima + Pluronic® F68	36
2.2.2.3 Determinação dos valores de pH	36
2.3 Resultados e Discussão	37
2.3.1 Curva padrão de ceftazidima	37
2.3.2 Ceftazidima + Pluronic® F68% em SPGV de 5% glicose.	37
2.4 Conclusões desta etapa	41

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS FÁRMACOS CEFTAZIDIMA E AMINOFILINA EM SPGV DE 5% GLICOSE UTILIZANDO HPLC NA PRESENÇA DO POLÍMERO INCORPORADO.

3.1 Introdução	42
3.2 Materiais e Métodos	43
3.2.1 Preparo da Amostra	43
3.2.2 Metodologia Analítica	44
3.2.3 Determinação dos Valores de pH	44
3.2.4 Preparo da solução de Pluronic® F68	44
3.2.5 Membrana de ultrafiltração	45

3.3 Resultados e Discussão	45
3.4 Conclusões desta etapa	46

CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS FÁRMACOS CEFTAZIDIMA E AMINOFILINA EM SOLUÇÃO PARENTERAL PELA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DO POLÍMERO INCORPORADO

4.1 Introdução	47
4.2 Materiais e Métodos	49
4.2.1 Avaliação da eficiência antimicrobiana dos fármacos incorporados às soluções parenterais	49
4.2.2 Cepas Bacterianas	49
4.2.3 Preparo da Amostra	50
4.3 Resultados e Discussão	51
4.3.1 Avaliação da eficiência antimicrobiana das amostras frente ao microorganismo <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> em solução parenteral de 5% glicose.	51
4.4 Conclusões para esta etapa	56

CAPÍTULO V: AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) COMO BIOSSENSÓR DA ESTABILIDADE DE FÁRMACOS EM SOLUÇÕES DE 20% MANITOL, 0,9 % NaCl OU % GLICOSE.

5.1 Introdução	57
5.2 Materiais e Métodos	59
5.2.1 Materiais	59
5.2.2 Métodos para o desenvolvimento do potencial biossensor	60
5.2.2.1 Preparo das amostras	60
5.2.2.2 Avaliação da intensidade de fluorescência da proteína	61
5.2.2.3 Avaliação da estabilidade da GFP nas amostras	61
5.2.2.4 Degradação das amostras contendo os fármacos através da utilização de peróxido de hidrogênio	62
5.3 Resultados e Discussão	62
5.3.1 Curva de calibração para GFP	62
5.3.2 Avaliação da intensidade de fluorescência dos fármacos furosemida e aminofilina na faixa de valores de pH (10,0-11,0)	63
5.3.3 Avaliação da estabilidade da GFP nas soluções das amostras de pH entre (6,5-7,5) na presença dos fármacos furosemida e aminofilina	65

5.3.4 Comparação entre o aumento da concentração dos fármacos em soluções 20% manitol e mudanças na intensidade de fluorescência da GFP	66
5.3.5 Avaliação do comportamento da proteína verde fluorescente GFP, na solução 20% manitol, contendo os fármacos furosemida e aminofilina submetidos à degradação com peróxido de hidrogênio.	68
5.3.6 Avaliação do comportamento da proteína verde fluorescente GFP, na presença do fármaco aminofilina em solução de água para injeção (WFI), após degradação com peróxido de hidrogênio.	71
5.3.7 Avaliação do comportamento da proteína verde fluorescente GFP, na presença do fármaco ceftazidima em solução de água para injeção (WFI), na ausência e após degradação com peróxido de hidrogênio.	72
5.3.8 Avaliação do comportamento da proteína verde fluorescente GFP, na presença dos fármacos ceftazidima e aminofilina em solução de 5% glicose, na ausência de degradação.	74
5.4 Conclusões desta etapa	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	76
CONCLUSÃO GERAL	77
BIBLIOGRAFIA	78
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Identificação dos cromatogramas dos padrões em 0,9% NaCl e seus respectivos tempos de retenção. (pico 1: ceftazidima e pico2: aminofilina). 20
- Figura 2:** Curva de linearidade da aminofilina em solução 0,9%NaCl na presença do fármaco ceftazidima (pH 10,5±0,5), a linha cheia (Área=14788+116807*concentração de aminofilina, $R^2=0,99$). 21
- Figura 3:** Curva de linearidade da ceftazidima em solução de 0,9%NaCl na presença do fármaco aminofilina (pH 10,5±0,5), a linha cheia (Área=2E+06+79048*concentração de ceftazidima, $R^2=0,99$). 21
- Figura 4:** Cromatograma da amostra contendo os fármacos ceftazidima e aminofilina (1 Det A Ch1= 255nm e 2 Det A Ch2= 275nm). 23
- Figura 5:** Cromatograma da amostra submetida à degradação por peróxido de hidrogênio. 24
- Figura 6:** Identificação dos cromatogramas dos padrões em 5% Glicose e seus respectivos tempos de retenção. (pico 1: ceftazidima e pico2: aminofilina) 26
- Figura 7:** Curva de linearidade da aminofilina em solução 5% Glicose na presença do fármaco ceftazidima (pH 9,0±0,5), a linha cheia (Área=578858+117930*concentração de aminofilina, $R^2=0,99$). 27
- Figura 8:** Curva de linearidade da aminofilina em solução de 5% Glicose na presença do fármaco aminofilina (pH 9,0±0,5), a linha cheia (Área=653619+66598*concentração de ceftazidima, $R^2=0,99$). 28
- Figura 9:** Cromatograma da amostra contendo os fármacos ceftazidima e aminofilina, respectivamente 29
- Figura 10:** Cromatograma da amostra submetida à degradação por peróxido de hidrogênio. 30
- Figura 11:** Curva de calibração para a ceftazidima em solução parenteral de Glicose 5% (pH=6,8±0,5). De acordo com a equação da reta encontrada: Absorbância = 0,0132 * Concentração + 0,0193 temos que R = 0,9983 37
- Figura 12:** Gráfico de Absorbância versus Percentagem de Copolímero em t=0h. 38
- Figura 13:** Gráfico de Absorbância versus Percentagem de Copolímero das amostras em t= 6 h. 39
- Figura 14:** Gráfico de Absorbância versus Percentagem de Copolímero das amostras em t=24 h. 40
- Figura 15:** Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). 51
- Figura 16:** Estrutura em barril da proteína verde fluorescente. Ao lado, visualização da emissão de fluorescência em luz ultravioleta. 59
- Figura 17:** Curva de calibração para proteína verde fluorescente (GFP) diluída em água, representada pela linha escura (Abs= -130.95+102.29*concentração de GFP, $R^2=0.983$) e diluída em tampão TRIS-EDTA representada pela linha tracejada (Abs= -134.64+103.61*concentração de GFP, $R^2=0.985$). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cálculo de precisão através dos tempos de retenção dos fármacos ceftazidima ($\lambda=254\text{nm}$) e aminofilina ($\lambda=275\text{nm}$) em solução de 0,9% NaCl.	22
Tabela 2: Determinação da amostra e do padrão de aminofilina após o preparo, 2, 6 e 24hs em solução parenteral de 0,9% NaCl.	25
Tabela 3: Determinação da amostra e do padrão de ceftazidima após o preparo, 2, 6 e 24hs em solução parenteral de 0,9% NaCl.	25
Tabela 4: Cálculo de precisão através dos tempos de retenção dos fármacos ceftazidima ($\lambda=254\text{nm}$) e aminofilina ($\lambda=275\text{nm}$) em solução de 5% Glicose.	28
Tabela 5: Determinação da amostra e do padrão de aminofilina após o preparo, 2, 6 e 24hs em solução parenteral de 5% Glicose.	31
Tabela 6: Determinação da amostra e do padrão de ceftazidima após o preparo, 2, 6 e 24hs em solução parenteral de 5% Glicose.	31
Tabela 7: Propriedades físico-químicas do Pluronic®F68	35
Tabela 8: Concentração de ceftazidima (t=0h) em SPGV de 5% de glicose, na presença de F68 em diferentes proporções.	38
Tabela 9: Concentração de ceftazidima (t=6h) em SPGV de 5% de glicose, na presença de F68 em diferentes proporções	39
Tabela 10: Concentração de ceftazidima (t=24h) em SPGV de 5% de glicose, na presença de F68 em diferentes proporções	40
Tabela 11: Concentração dos componentes analisados na diluição sucessiva	50
Tabela 12: Determinação CMI para o microorganismo <i>Escherichia coli</i> em solução parenteral 5% glicose	54
Tabela 13: Determinação CMI para o microorganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em solução parenteral 5% glicose	55
Tabela 14: Intensidade de fluorescência da GFP em soluções parenterais de 0,9% NaCl ou 20% Manitol, em valores de pH das amostras (10-11)	64
Tabela 15: Intensidade de fluorescência da GFP em soluções parenterais de 0,9% NaCl e 20% Manitol, em valores de pH das amostras (6,5-7,5)	66
Tabela 16: Efeitos do aumento da concentração dos fármacos veiculados em solução de 20% manitol sobre a proteína GFP.	68
Tabela 17: Comportamento da GFP em solução parenteral 20% manitol, contendo os fármacos furosemida e aminofilina, individualmente e associados, quando estes foram submetidos à degradação e na ausência de degradação.	70
Tabela 18: Estabilidade da GFP na presença do fármaco aminofilina em água para injeção (WFI), após degradação com peróxido de hidrogênio.	72
Tabela 19: Comportamento da GFP na presença do fármaco ceftazidima em água para injeção (WFI), na ausência de degradação.	73
Tabela 20: Avaliação do comportamento da GFP na presença do fármaco ceftazidima em água para injeção (WFI), após degradação com peróxido de hidrogênio.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

SPGV- Soluções Parenterais de Grande Volume

GFP- Proteína Verde Fluorescente

OMS- Organização Mundial de Saúde

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

USP- United States Pharmacopoeia

UV- Ultravioleta

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IB- Indicador Biológico

PVC- Cloreto de Polivinila

PP- Polipropileno

kDa- Kilodaltons

Tyr- Tirosina

Gly- Glicina

Ser- Serina

SP- Soluções Parenterais

RESUMO

Santos, C.A. **Estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina em soluções parenterais de grande Volume (SPGV) carregados pelo copolímero Pluronic® F68. Emprego da proteína verde fluorescente (GFP) como biossensor da estabilidade de fármacos em SPGV.** 2010. 85f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Diante da extensa utilização de fármacos associados às soluções parenterais de grande volume (SPGV) e muitas vezes da impossibilidade da administração dos mesmos em diferentes veículos de infusão, sejam pela perda da estabilidade ou por insolubilidade destes, a utilização de copolímeros como carreadores de fármacos vêm a favorecer a associação destes às SPGV. Este trabalho visa avaliar a estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina nas SPGV carregados pelo copolímero Pluronic® F68 e o estudo da GFP como potencial biossensor da estabilidade de fármacos nas SPGV. A estabilidade dos fármacos ceftazidima (320ug/mL) e aminofilina (160ug/mL) em SPGV foi avaliada, na presença e na ausência de Pluronic® F68, através da utilização de HPLC logo após preparo e após período de 24hs, usando sistema Shimadzu LC10, LC-solution software, Shimadzu C18, fluxo 0,5mL/min, detecção em $\lambda=255\text{nm}$ (ceftazidima) e $\lambda=275\text{nm}$ (aminofilina), volume de injeção 20uL, 25°C. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada em amostras de ceftazidima (240ug/mL) na presença e na ausência de Pluronic® em SPGV de 5% glicose usando *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 9721 na concentração de 10^6UFC/mL . Pluronic® F68 foi utilizado nas amostras para avaliação da estabilidade dos fármacos ceftazidima e aminofilina na concentração 10% m/m. Resultados mostraram uma incompatibilidade entre a associação dos fármacos em SPGV de 5% glicose, com perda de concentração de 25% do fármaco ceftazidima na ausência de Pluronic®. Nos ensaios de CMI realizados com fármaco ceftazidima em SPGV de 5% glicose observou-se uma melhora dos valores de CMI quando o fármaco foi associado ao copolímero Pluronic® para ambos os microrganismos estudados.

O estudo da GFP mostrou que fatores como (i) as propriedades físico-químicas dos fármacos, (ii) valores de pH das soluções e (iii) interações entre a proteína e as SPGV, podem favorecer mudanças de intensidade de fluorescência da GFP (determinada em espectrofluorímetro $\lambda_{\text{ex}}=394\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=509\text{nm}$), favorecendo seu potencial emprego como biossensor da estabilidade de fármacos.

Palavras Chaves: Ceftazidima, Aminofilina, Pluronic® F68, Solução Parenteral de Grande Volume.

Abstract

Santos, C.A. **Stability of ceftazidime and aminophylline carried by Pluronic® F68 in parenteral solutions. Green Fluorescent Protein (GFP) as a biosensor for drug stability in parenteral solutions.** 2010. 85f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Drug association administered through parenteral solutions is a common hospital practice. Copolymers as carriers in parenteral solutions may allow originally unstable or insoluble drug combinations, or even improve their action. The aim of this work was to evaluate the stability of ceftazidime and aminophylline in parenteral solutions carried by Pluronic® F68, besides the application of the green fluorescent protein as a biosensor of drug stability. To evaluate the stability of ceftazidime (320 µg/mL) and aminophylline (160 µg/mL) carried by Pluronic® F68 (10%) in parenteral solutions, HPLC measurements were made immediately after the drug mixture preparation and after 24 hours, detected at $\lambda=255\text{nm}$ (ceftazidime) and $\lambda=275\text{nm}$ (aminophylline). In addition, minimal inhibitory concentration test (MIC) was used to determine the biological activity of ceftazidime (240 µg/mL) in 5% glucose parenteral solution, with or without Pluronic® F68 (10%). The strains tested by MIC were *E. coli* ATCC 25922 and *P.aeruginosa* ATCC 9721 (10^6UFC/mL). The HPLC experiments showed incompatibility of ceftazidime and aminophylline associated in 5% glucose parenteral solution, with 25% loss for ceftazidime without Pluronic® F68. MIC analysis for ceftazidime, with or without aminophylline, showed that lower antibiotic concentration values were required to inhibit *E. coli* and *P.aeruginosa* growth, when the copolymer Pluronic® F68 was present in the samples. It was also showed that physical chemical drugs alterations, pH values and protein-parenteral solution interactions can change GFP fluorescence intensity (detected by espectrofluorimeter $\lambda_{\text{ex}}=394\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=509\text{nm}$). These data endorse the potential of this protein as a biosensor of drug stability in parenteral solutions.

Keywords: Ceftazidime, Aminophylline, Pluronic® F68, Parenteral Solutions.