

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
ÁREA: PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS

**ABORDAGEM FARMACOCINÉTICA -FARMACODINÂMICA (PK/PD) EM
PACIENTES SÉPTICOS GRANDES QUEIMADOS: AVALIAÇÃO DO
MEROPENEM EM ADULTOS JOVENS APÓS 1g q8h, INFUSÃO ESTENDIDA.**

Claudia Garcia Messiano

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Orientadora:

Profa. Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
ÁREA: PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS

**ABORDAGEM FARMACOCINÉTICA -FARMACODINÂMICA (PK/PD) EM
PACIENTES SÉPTICOS GRANDES QUEIMADOS: AVALIAÇÃO DO
MEROPENEM EM ADULTOS JOVENS APÓS 1g q8h, INFUSÃO ESTENDIDA.**

Claudia Garcia Messiano

Versão Original

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas na
Universidade de São Paulo para obtenção do grau de
MESTRE**

Profa. Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos

São Paulo
2020

**ABORDAGEM FARMACOCINÉTICA -FARMACODINÂMICA (PK/PD) EM
PACIENTES SÉPTICOS GRANDES QUEIMADOS: AVALIAÇÃO DO
MEROPENEM EM ADULTOS JOVENS APÓS 1g q8h, INFUSÃO ESTENDIDA.**

Comissão Julgadora

da

Dissertação /Tese para obtenção de créditos para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Silvia R. C. J. Santos

orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, 30 de dezembro de 2020

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Messiano, Claudia Garcia

M585a Abordagem farmacocinética -farmacodinâmica (PK/PD) em pacientes sépticos grandes queimados: avaliação do meropenem em adultos jovens após 1g q8h, infusão estendida / Claudia Garcia Messiano. São Paulo, 2020. 110p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Orientador: Santos, Silvia Regina Cavani Jorge

1. Farmacocinética, Abordagem PK/PD. 2. Meropenem, infusão estendida. 3. Choque séptico. 4. Pacientes queimados sépticos. 5. Controle terapêutico. I. T. II. Santos, Silvia Regina Cavani Jorge

São Paulo
2020

Agradecimentos

A Profa. Dra. Sílvia R. C. J. Santos, orientadora dedicada, que nos ensina de modo incansável a sermos persistentes no aprendizado contínuo para nosso desenvolvimento profissional.

A todos os Profs. Drs., que ministram as disciplinas, contribuindo para a formação de novos mestres e doutores.

Ao Departamento de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

A equipe técnica do Laboratório de Farmacocinética Clínica por colaborar com a realização da minha pesquisa.

RESUMO

MESSIANO, CLAUDIA G. Abordagem Farmacocinética-Farmacodinâmica (PK/PD) em Pacientes Sépticos Grandes Queimados: Avaliação do Meropenem em adultos jovens após 1g q8h, Infusão Estendida (MESTRADO) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2020.

Introdução: O Meropenem é um carbapenêmico de amplo espectro, prescrito na terapia do choque séptico nos pacientes graves adultos de UTI, com infecções graves causadas por patógenos Gram-negativos susceptíveis. **Objetivo:** Avaliar a efetividade do Meropenem em pacientes sépticos queimados, investigar a farmacocinética na fase precoce e na fase tardia durante o curso do choque séptico e o impacto no desfecho clínico. **Ética, Casuística e Procedimentos:** Aprovação ética, registro CAAE07525118.3.0000.0068; nenhum conflito de interesse declarado foi obtido dos autores. Após assinatura do TCLE pelo responsável legal, o paciente foi incluído no protocolo. Investigou-se a população de 15 pacientes sépticos grandes queimados, adultos de ambos os gêneros (10 M/ 5F) com função renal preservada (Clcr > 50 ml/min). As características demográficas da população de pacientes incluídos foram idade de 37(33 -41) anos, 71(59,5 - 80,0) kg e índice de massa corpórea de 24,3(20,6-24,7) kg/m², medianas (interquartil). Registrou-se o escore SAPS*3 54(47-59) de admissão dos pacientes na UTI; a superfície corpórea total queimada foi de 33% (18,3-34,4), SCTQ medianas (interquartil). A lesão inalatória e o uso de vasopressores foram registrados em 12/15 pacientes após trauma térmico/ elétrico (10/5). Após intubação orotraqueal, a ventilação mecânica foi registrada em 13/15 pacientes. A terapia empírica do choque séptico com Meropenem no regime de 1g q8h, por infusão estendida de 3 horas, foi iniciada após a coleta das culturas. Realizou-se coleta seriada de amostras sanguíneas para dosagem sérica do antimicrobiano por cromatografia líquida. Aplicou-se o modelo aberto monocompartimental para estudo da farmacocinética e estimativa dos parâmetros, meia vida biológica, depuração total corporal e volume de distribuição. A abordagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) foi baseada na dosagem sérica do Meropenem e na taxa de eliminação, para estimativa do índice de predição de efetividade ($f \Delta \square T > CIM$), considerando o novo alvo terapêutico de 100% $f \Delta \square T > CIM$. Utilizou-se estatística não paramétrica pela aplicação do teste de *Wilcoxon* para dados pareados e testes de correlação linear. **Resultados e Discussão:** Registrou-se alteração dos parâmetros farmacocinéticos nos pacientes sépticos investigados frente aos dados reportados para voluntários sadios. Evidenciou-se redução na taxa de eliminação e da depuração total corporal; o prolongamento da meia vida biológica ocorreu pelo aumento do volume de distribuição. Estas alterações impactaram estendendo a cobertura do Meropenem, na fase precoce do choque séptico, contra os patógenos de susceptibilidade intermediária com CIM 4 mg/L. **Conclusão:** A cobertura do Meropenem foi garantida contra os patógenos isolados até CIM 2 mg/L para todos os pacientes. Adicionalmente, ocorreu a erradicação de patógenos de susceptibilidade intermediária CIM 4 mg/L, pela cobertura que foi atingida apenas na fase precoce do choque séptico. Então, a abordagem PK / PD contribui para a obtenção do resultado.

Palavras-Chave: pacientes grandes queimados; efetividade do Meropenem; abordagem PK/PD; alteração da PK impacta a farmacodinâmica; PK -fase precoce *versus* fase tardia do choque séptico.

ABSTRACT

MESSIANO, CLAUDIA G. Pharmacokinetic -Pharmacodynamic Approach (PK/PD) In Septic Burn Young Adult Patients: Meropenem 1g q8h, extended infusion. (MESTRADO) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

Background: Meropenem is a carbapenêmic, agent largely prescribed to septic patients in the Intensive Care Units with severe infections caused by Gram-negative susceptible strains. **Objective:** To evaluate Meropenem effectiveness in ICU septic burn patients and to investigate pharmacokinetic changes that could impact the desired outcome by eradication of Gram-negative strains of intermediate susceptibility. **Ethics, Casuistry and Methods:** Ethical approval register CAEE 07525118.3.0000.0068 was obtained; no conflicts of interest to declare were obtained from all authors. Fifteen burn adult patients of both genders (10 M/ 5F) with preserved renal function ($Cl_{cr} > 50$ ml/min) were investigated after TCLE signed. Demographic characteristics of patients included were: 37(33 -41) years, 71(59.5- 80.0) kg, 24.3 (20.6-24.7) kg/m² body mass index, medians (quartiles). ICU patients admission was based on SAPS*3 score of 54(47-59), 33% (18.3-34.4) TBSA medians (quartiles). Inhalation injury and vasopressors requirements were in 12/15 patients after fire/electricity (10/5, proportion). Mechanical ventilation was necessary in 13/15 patients. Antimicrobial therapy of septic shock with meropenem 1g q8h 3 hours infusion started, after cultures collection. A serial of blood samples was collected from the central catheter after a minimum of 48 hours of Meropenem therapy for drug serum measurements by liquid chromatography. One compartment open model was applied to estimate PK data related to the elimination rate constant, biological half-life, total body clearance and volume of distribution PK/PD approach was based on serum trough levels and elimination rate constant to estimate the predictive index of drug effectiveness (% $f_{\Delta T} > CIM$), based on the new PK/PD target 100% $f_{\Delta T} > CIM$. Non parametric statistics was applied, Wilcoxon test for paired data and linear correlations. **Results:** Pharmacokinetic changes occurred in septic burn patients investigated by comparison with results reported in healthy volunteers as follows by the reduction on elimination rate constant and also on total body clearance, in spite of preserved renal function for all patients included. In addition, a prolongation of biological half-life occurred as a consequence of increases on volume of distribution. Pharmacodynamics was impacted by PK changes only at the earlier period of septic shock, once pathogens isolated of intermediate susceptibility up to MIC 4 mg/L were eradicated. **Conclusion:** Meropenem effectiveness was guaranteed against Gram-negative up to MIC 2 mg/L strains isolated for all patients. In addition, eradication of pathogens of intermediate susceptibility MIC 4 mg/L strains occurred only at the earlier period of septic shock. Then, PK/PD approach contributes to desired outcome achievement.

Key-Words: Severe burn septic patients; Meropenem effectiveness PK/PD approach; PK changes impacts pharmacodynamics; PK at the earlier *versus* late period of septic shock

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Gráfico “Lund and Browder	18
Figura 2 –	Estrutura Química 3D Tridimensional - Merrem ®- Meropenem tri-hidratado	31
Figura 3 –	Estrutura Química 2D Bidimensional - Merrem ®- Meropenem tri-hidratado	32
Figura 4 –	Abordagem PK-PD	35
Figura 5 –	Desenho do Estudo	38
Figura 6 –	Cobertura do Meropenem em pacientes queimados após 1g q8h, infusão de 3 horas, pela comparação da fase precoce com a fase tardia do choque séptico.....	50
Figura 7 –	Farmacocinética do Meropenem em pacientes sépticos grandes queimados, comparados a farmacocinética reportada em voluntários sadios.....	51
Figura 8 –	Proporcionalidade das alterações entre o volume aparente e a meia-vida biológica do meropenem em pacientes grandes queimados mostrou correlação linear durante o choque séptico, fase precoce e tardia.....	52
Figura 9 –	Proporcionalidade entre a taxa de eliminação e o vale sérico do meropenem em pacientes grandes queimados mostrou correlação linear durante o choque séptico, fase precoce e tardia.....	53
Figura 10 –	Proporcionalidade entre a depuração total corporal e a disponibilidade sistêmica do meropenem infundido (ASC^{ss0-8}) em pacientes grandes queimados	54
Figura 11 –	Depuração total corporal do meropenem reduzida nos pacientes grandes queimados durante o choque séptico, apesar da filtração glomerular preservada nas fases precoce e tardia do choque séptico	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação da Lesões do grau de lesões por queimaduras	16
Quadro 2 – Avaliação segundo o diagrama de Lund & Browder	17
Quadro 3 – Fatos importantes para Prevenção de Queimaduras Graves	19
Quadro 4 – Fórmula de <i>Parkland</i>	26
Quadro 5 – Critérios de Inclusão de Pacientes no Estudo	39
Quadro 6 – Critérios de Exclusão de Pacientes no Estudo	40
Quadro 7 – Prescrição de Meropenem aos pacientes críticos de UTI. Pacientes com função renal preservada	41
Quadro 8 – Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos após Infusões Múltiplas	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Base demográfica, características clínicas e econômicas de hospitalizações do Brasil entre 2000 e 2014	20
Tabela 2 –	Infecções mais comuns relacionadas ao tempo de internação após queimadura	27
Tabela 3 –	Características demográficas dos pacientes investigados	43
Tabela 4 –	Características Clínicas dos Pacientes Queimados na Admissão da UTI	44
Tabela 5 –	Dosagem Sérica dos Biomarcadores Inflamatórios	45
Tabela 6 –	Dados clínicos de internação dos pacientes investigados	46
Tabela 7 –	Análise estatística do perfil farmacocinético	47
Tabela 8 –	Índice de efetividade do Meropenem para alvo recomendado 100% $\Delta T > CIM$ no (TDM ₁ -fase precoce) <i>versus</i> (TDM ₂ fase tardia)	48
Tabela 9 –	Perfil clínico-laboratorial - Biomarcadores Necessidade de vasopressores	48
Tabela 10 –	Alterações da farmacocinética do Meropenem. Dose empírica 1 g8h – infusão estendida 3 horas	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC ^{SS} τ	Área sob a curva no estado de equilíbrio, intervalo de dose
Cl _{cr}	<i>Clearance</i> da creatinina
CAPPESQ	Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa
CIM	Concentração inibitória mínima
Scr	Creatinina sérica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL _T	Depuração total plasmática
PK/PD	Farmacocinética-Farmacodinâmica
F	Feminino
G	Força -G (Unidade de força centrífuga relativa)
g	Grama
°C	Grau Celsius
h	Hora
IMC	Índice de massa corpórea
IQ	Interquartil
L	Litro
LN	Logaritmo neperiano
M	Masculino
µg	Micrograma
µl	Microlitro
mg	Miligrama
ml	Mililitros
mm ³	Milímetro cúbico
min	Minutos
NAP	Não aplicável
ND	Não determinado
O ₂	Oxigênio
%fΔ T > CIM	Porcentagem de tempo em que a fração livre do antimicrobiano permanece no intervalo de dose acima da CIM do patógeno
pH	Potencial hidrogênio
PTA	Probabilidade de atingir o alvo terapêutico

PCR	Proteína C-Reativa
kg	Quilograma
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
SFB	Soro fetal bovino
SCTQ	Superfície corpórea total queimada
τ	“tau” (intervalo de dose na terapia de doses múltiplas)
kel	Taxa de eliminação
ko	Taxa de infusão
Tinf	Tempo de infusão
$T_{(1/2)\beta}$	Tempo de Meia-vida Biológica
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
tid	Time interdose (intervalo de dose)
TBSA	<i>Total Burn Surface Area</i> (Superfície total corpórea queimada)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI-Q	Unidade de Terapia Intensiva de Queimaduras
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
Vd	Volume aparente de distribuição
Vd ^{ss}	Volume aparente de distribuição no estado de equilíbrio
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 QUEIMADURAS	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA	18
1.3 FISIOPATOLOGIA DA QUEIMADURA	21
1.4 DEFINIÇÕES PARA SEPSE E CHOQUE SÉPTICO-TERCEIRO CONSENSO INTERNACIONAL (2016)	22
1.4.1 Critérios clínicos para identificação de seps	22
1.4.1.1 Epidemiologia da seps	23
1.4.2 Seps em pacientes queimados	23
1.4.3 Biomarcadores	24
1.4.4 Choque hipovolêmico	25
1.4.5 Infecções bacterianas - pacientes grandes queimados	26
1.5 ANTIMICROBIANOS	28
1.5.1 Meropenem tri-hidratado (MERONEM®) Antimicrobiano Carbapenêmico	29
1.6 ESTRUTURA QUÍMICA	30
1.6.1 Nome Químico Meropenem - 96036-03-2	30
1.6.1.1 Fórmula Molecular – C₁₇H₃₁N₃O₈S	30
1.6.1.2 Peso Molecular: 437.5 g/mol	30
1.6.1.3 Nome Comercial- Merrem® - Meropenem tri-hidratado	30
1.6.1.4 Estrutura Química 3 D (Tridimensional) - Meropenem Tri-Hidratado ..	31
1.6.1.5 Estrutura Química 2 D (Bidimensional) - Meropenem Tri- Hidratado	32
1.6.2 Indicações de uso – posologia	32
1.6.3 Toxicidade	32
1.6.4 Características farmacocinéticas do Meropenem	33
1.6.5 Características farmacodinâmicas do Meropenem	33
1.6.6 Interações medicamentosas do Meropenem	34
1.7 ABORDAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA (PK/PD)	34
1.7.1 Cálculo do Índice de efetividade do Meropenem 100% $f \Delta T > CIM$ equação.....	35
1.8 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS (TDM)	35
2 OBJETIVO	37

3 CASUÍSTICA	38
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	38
3.1.2 Desenho do estudo	38
3.2 MÉTODO	38
3.2.1 Critérios de inclusão de pacientes para o estudo	39
3.2.2 Critérios de exclusão de pacientes para o estudo	40
3.2.3 Local do estudo	40
3.2.4 Coleta de dados demográficos, clínico e laboratorial dos pacientes	40
3.2.5 Cálculo da creatinina sérica e Clearance da Creatinina	40
3.3 MEDICAÇÕES, REGIME DE DOSE E ADMINISTRAÇÃO	41
3.4 COLETAS SERIADAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E ENCAMINHAMENTO AO LABORATÓRIO BIOANALÍTICO	41
3.4.1 Modelo farmacocinético: coleta seriada	41
3.5 ETAPA ANALÍTICA	41
3.6 ETAPA ESTATÍSTICA	42
3.6.1 Modelagem farmacocinética	42
3.6.2 Estudo populacional e análise estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	43
4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	44
4.3 BIOMARCADORES - RENAL E INFLAMATÓRIO	45
4.4 HISTÓRICO CLÍNICO DE INTERNAÇÃO	46
4.5 PERFIL FARMACOCINÉTICO NO CHOQUE SÉPTICO	46
4.6 ÍNDICE DE EFETIVIDADE DA TERAPIA COM MEROPENEM	47
4.6.1 Equação para o cálculo do índice de efetividade do Meropenem	48
4.7 FUNÇÃO RENAL E SÍNDROME INFLAMATÓRIA RESPOSTA SISTÊMICA ..	48
4.8 PERFIL FARMACOCINÉTICO	49
4.9 EFETIVIDADE DO MEROPENEM	49
4.10 ALTERAÇÕES DA FARMACOCINÉTICA DO MEROPENEM COMPARADA AOS VALORES DE REFERÊNCIA REPORTADOS EM VOLUNTÁRIOS SADIOS	50
4.11 IMPACTOS DO VOLUME DE DISTRIBUIÇÃO DO MEROPENEM	51
4.12 NÍVEIS SÉRICOS E TAXA DE ELIMINAÇÃO DO MEROPENEM	53
4.13 DEPURAÇÃO TOTAL CORPORAL <i>versus</i> SIRS	54

4.14 DEPURAÇÃO TOTAL CORPORAL <i>versus</i> CLEARANCE DA CREATININA	55
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE I – Etapa Analítica – Método Bioanalítico	68
ANEXO I – TCLE	75
ANEXO II – Estimativa da Superfície Corporal Total Queimada	79
ANEXO III – Validação de Métodos Analíticos	81
ANEXO IV – Resolução-RE N° 899, de 29 de maio de 2003.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUEIMADURAS

A queimadura é uma lesão na pele ou em outro tecido orgânico causado principalmente por calor, radiação, radioatividade, eletricidade, atrito ou contato com produtos químicos. Os danos respiratórios graves, resultantes de inalação, também são considerados queimaduras (WHO, 2018).

Na assistência ao tratamento de queimaduras graves avalia-se a superfície do corpo afetada pela queimadura (SCQT%), a profundidade da lesão, a extensão do agravo, o agente causador e as circunstâncias em que ocorreram as queimaduras. O prognóstico da queimadura é influenciado pela profundidade da lesão e pela extensão da superfície corpórea queimada. A avaliação do grau da queimadura, não é simples de ser realizada, para avaliar corretamente o grau de profundidade da queimadura é necessário fazer estudo histopatológico (biópsia). O agente causal, o tempo de exposição e as condições prévias do paciente são determinantes para identificar o grau de profundidade da queimadura. O quadro 01 descreve a classificação das lesões:

Quadro 1 – Classificação da Lesões do grau de lesões por queimaduras

<ul style="list-style-type: none"> • Lesão de 1º Grau Acomete a epiderme que se apresenta hiperemiada, úmida, com edema e muito dolorosa, não provoca alterações hemodinâmicas, sua cura acontece aproximadamente cinco a sete dias • Lesão de 2º Grau superficial • Lesão de 2º Grau profunda Atinge a toda a epiderme e a porção derme e não destrói todos os folículos e glândulas sudoríparas. Caracterizam-se pela formação de flictemas, eritema, umidade e dor acentuada. A restauração total da pele acontece entre 14 e 21 dias, com mínima formação cicatricial • Lesão de 3º Grau Acomete a epiderme e a derme e com frequência destrói o tecido subcutâneo, o músculo e o tecido ósseo. Aparência com aspecto esbranquiçado ou marmóreo, o tecido perde elasticidade e torna-se rígido. Os vasos sanguíneos trombosados podem tornar-se visíveis. • Lesão de 4º grau Acometem todos os tecidos, chamadas áreas carbonizadas
--

Fonte: Adaptado de Bittner et al., 2015, p. 454.

A determinação do percentual total da superfície corporal queimada (% SCTQ) é muito importante para o prognóstico do paciente, para a ressuscitação com fluido, para decisões de

transferência, para o manejo das feridas, para estimar o tempo de duração do tratamento e para a pesquisa.

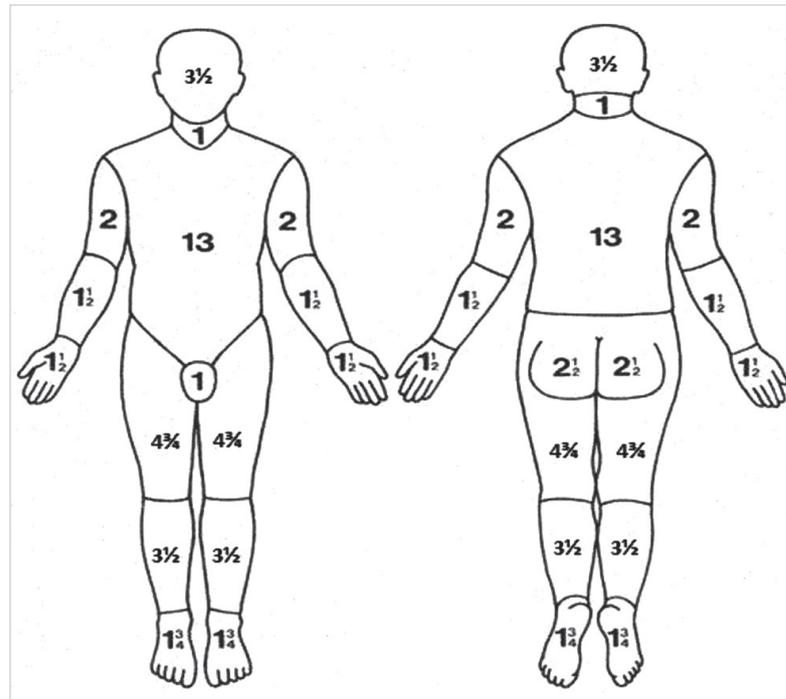
Alguns métodos podem ser aplicados, por exemplo, o método de medida da palma da mão do paciente chamado “regra dos nove”, que consiste em método rápido para avaliação da extensão das queimaduras, utilizado nas salas de emergência hospitalares. Para calcular a superfície corpórea total queimada (% SCTQ) utiliza-se o Diagrama de Lund & Browder considerado um método mais preciso (figura 1). O método de L&B não é fácil de ser aplicado, podendo ocorrer erros de cálculo na aplicação nos serviços de emergências. O quadro abaixo demonstra como estão divididas as áreas e seus respectivos valores:

Quadro 2 – Avaliação segundo o diagrama de Lund & Browder

Extensões Variáveis				Extensão Queimada			
Idade	A	B	C	Cabeça		Genitais	
0	9,5	2,75	2,5	Pescoço		Coxa	
1	8,5	3,25	2,5	Tronco		Perna	
5	6,5	4,0	2,75	Braço		Pé	
10	5,5	4,5	3,0	Antebraço			
15	4,5	4,5	3,25	Mão		Total	
Adulto	3,5	4,75	3,5	Nádega		Peso Corpóreo	
Diagnóstico Inicial				Queimadura em ____% da SC			
Conforme topografia por diagnóstico(s) Secundário(s)							

Fonte: Yasti et al., 2015 p. 81.

Figura 1 – Gráfico “Lund and Browder

Diagnóstico Topográfico

Fonte: Murari et al., 2019, p. 227

1.2 EPIDEMIOLOGIA

As queimaduras são um sério problema de saúde pública, estima-se que ocorram 265.000 mortes anuais em todo mundo em incêndios e que 11 milhões de pessoas necessitem de cuidados especializados em todo mundo. Quase dois terços dos incidentes ocorrem nas regiões da África e Sudeste Asiático, entretanto, existem poucos estudos epidemiológicos sobre queimaduras nesses países. Em países de alta renda, as taxas de morte por queimaduras têm sido reduzidas, através de estratégias de prevenção e melhorias no atendimento a vítimas de queimaduras. O quadro 3 traz fatos importantes na prevenção de queimaduras graves (WHO, 2018).

Quadro 3 – Fatos importantes para prevenção de Queimaduras Graves

Fatos Importantes na Prevenção de Queimaduras Graves

As lesões por queimaduras não fatais são uma das principais causas de morbidade, devido a necessidade de hospitalizações prolongadas, desfiguração e incapacidade, que frequentemente resultam em rejeição e estigma:

- ✓ Queimaduras ocorrem principalmente em casa e no trabalho
- ✓ O índice de mortalidade em crianças é 07 vezes maior em países de média e baixa renda do que em países de alta renda
- ✓ Queimaduras são evitáveis.

Fonte: WHO, 2018.

Em estudo realizado no Brasil por Santos et al. (2017), em base de dados hospitalares, no período de 2000 a 2014, foram analisadas as características demográficas e econômicas dos pacientes hospitalizados por queimaduras. Em um total de 412.541 hospitalizações por queimaduras, foi encontrada a taxa de 14,56 hospitalizações/100.000 habitantes/ano. As crianças menores de cinco anos representaram 24% de todas as internações. A taxa de mortalidade intra-hospitalar foi de 8,1% e a mediana do tempo de permanência foi de 05 dias.

O Brasil é o único país latino-americano que dispõe de serviço de saúde especializado no tratamento de queimados, inserido no sistema de saúde universal (SUS), porém em estudo realizado por Citron et al. (2018), verificou-se que estes centros de tratamento estão distribuídos pelo território brasileiro de maneira irregular, portanto existem regiões do país, por exemplo, a região Norte, onde o serviço para tratamento de queimados não existe, assim o acesso aos cuidados é desigual e limitado à população desta região. Os estudos epidemiológicos, em geral, têm sido realizados em uni-centros e as publicações nacionais concentram-se na descrição de casos de queimaduras que chegam aos hospitais. Quase não existem estudos com base nas mortes por queimaduras que ocorreram fora do hospital (OOH-*out of hospital*). A taxa OOH é considerada uma medida crítica de acesso, pois demonstra que os indivíduos queimados morrem antes de chegarem a receber os cuidados clínicos, comprovando a falta de acesso ao atendimento. Conseqüentemente os índices de mortalidade intra-hospitalar diminuem (CITRON et al., 2018).

Tabela 1 – Base demográfica, características clínicas e econômicas de hospitalizações devido a queimaduras no Brasil entre 2000 e 2014, comparado por sexo

Indicadores	Total	Homens	Mulheres
No. de hospitalizações	412.541	256.149	156.391
Hospitalizações	14.6	18.2	10.9
Média (dias internação)	5	5	5
Média idade (SD)	24.8 (21.2)	24.5 (20.4)	25.1 (22.5)
Custo médio (R\$)	1448.4	1471.1	1411.2
Óbitos em hospitais (2009-2014)	12.235 (8,1%)	7603 (8.0%)	462 (8.3%)

Fonte: Santos et al., 2017, p. 2008.

Para descrever a epidemiologia nacional de queimaduras Citron et al. (2018), avaliaram o acesso regional ao cuidado, observando a contribuição da mortalidade extra-hospitalar para o total de mortes por queimaduras. Os registros encontrados no DATASUS, no período de 2008 a 2014, foram analisados destacando os seguintes dados: o número de admissões, a mortalidade hospitalar, o reembolso do hospital e o número total de mortes. Neste período estudado o total de mortes por queimadura foi 17.254, média anual de 2.466 (DP 202). De todas as mortes por queimaduras, 79,1% ocorreram fora do hospital. O número médio anual de internações após 24 horas de a queimadura ter ocorrido foi de 18.551(DP 1.504), com maior prevalência de queimaduras por chama em geral (43,98%) e predominando em menores de 5 anos (57,8%). Uma média de U\$ 1.022 (DP U\$ 94) foi reembolsada por admissão de queimadas. Por fim, o estudo mostrou que 80% das mortes por queimadura ocorreram fora dos hospitais (OOH).

O planejamento de saúde pública sobre lesões por queimadura necessita promover a distribuição de unidades de tratamento de queimados por todo país, de modo que a população tenha acesso aos cuidados necessários em caso de acidentes. É urgente conscientizar a sociedade sobre o problema, desenvolver e aplicar políticas eficazes, identificar os fatores de risco, definir prioridades de pesquisa e promoção de intervenções promissoras, dimensionar quantos leitos hospitalares serão necessários para atender as vítimas de queimaduras em todo o território nacional, desenvolver programas de prevenção de queimaduras, capacitar profissionais de saúde, bombeiros e equipes socorristas a realizarem o atendimento pré-hospitalar, direcionar esforços para regiões mais pobres, onde as crianças são mais expostas a riscos (WHO, 2018).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA QUEIMADURA

O conhecimento atual sobre o tratamento de feridas descreve a lesão em três zonas: zona de coagulação, zona de estase e zona de hiperemia. A zona de coagulação representa o tempo da lesão e o tecido que foi destruído, esta área está cercada por uma zona de estase, com inflamação e baixos níveis de perfusão, frequentemente esta área progride para necrose nas primeiras 48 horas após o ferimento. A área externa é denominada zona de hiperemia, onde a perfusão microvascular não está prejudicada. Após a queima inicial a lesão expande e aprofunda-se. A lesão térmica causa imunossupressão, este fato predispõe o paciente a sepse e falência múltipla de órgãos (NIELSON et al., 2017).

As disfunções microvasculares causam trombose de vasos, aumento de mediadores inflamatórios e de fatores pro-apoptóticos. Os danos microvasculares são provocados pelos leucócitos, que são mediadores pro-inflamatórios e resultam em resposta bifásica. A primeira fase é pro-inflamatória denominada SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) nesta fase estão envolvidos os macrófagos e a citocina interleucina-6 (IL-6) e o fator necrose tumoral (TNF- α). Durante a fase inicial da queimadura o processo inflamatório pode levar a falência de órgãos. A segunda fase da queimadura é anti-inflamatória nesta fase ocorre a participação dos linfócitos-T, IL-2/IL-10, que atuam como mediadores anti-inflamatórios (NIELSON et al., 2017). Todos os mediadores com o aumento da hidrostática vascular, pressão causada pela dilatação do vaso, são as principais razões para vazamento microvascular sistêmico observado em queimaduras. Em resposta à inflamação, as junções das células endoteliais aumentam e formam-se lacunas, causando comprometimento das funções da barreira. As alterações que acometem o indivíduo gravemente queimado distribuem-se por todos os principais órgãos, causam alterações no sistema musculoesquelético, cardiovascular, renal, pulmonar, hepático, neurológico e gastrointestinal (NIELSON et al., 2017).

Além disso, as cininas, especificamente a bradicinina que atua como mediador vasoativo, são produzidas no local da queimadura e causam dilatação venular, aumento da permeabilidade microvascular, contração do músculo liso e dor. Queimaduras graves induzem a reações em quase todos os órgãos, a inflamação, o hipermetabolismo, o desgaste muscular e a resistência insulínica presentes no organismo do indivíduo gravemente queimado, são características das respostas fisiopatológicas que permanecem por vários anos após a lesão (NIELSON et al., 2017).

1.4 DEFINIÇÕES PARA SEPSE E CHOQUE SÉPTICO-TERCEIRO CONSENSO INTERNACIONAL (2016)

Na última conferência promovida pela Sociedade de Medicina Crítica (*Society Critical Care Medicine — SCCM*) e a Sociedade Européia de Atendimento Médico Crítico (*European Society of Critical Care Medicine — EISCM*), foi revista e publicada nova definição de sepse e de choque séptico. Pela nova publicação, sepse é definida pela “presença de disfunção orgânica ameaçadora a vida por resposta desregulada do hospedeiro a infecção”. Em pacientes com sepse que apresentarem anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas profundas, suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade, denomina-se choque séptico (GREENHALGH, 2017).

1.4.1 Critérios clínicos para identificação de sepse:

- Sepse — infecção suspeita ou documentada associada ao aumento agudo de > 2 pontos de avaliação de falha (SOFA — *Sequential Organ Failure Assessment*);
- Choque séptico — aumento do nível sérico de lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL), necessidade de terapia com vasopressores para elevar a PAM > 65 mmHg apesar de adequada ressuscitação com fluidos.

No início de 2017 a nova versão do *Surviving Sepsis Campaign* foi publicada por especialistas que elaboraram um guia de prática clínica para identificação precoce de sepse e estratégias de tratamento padrão para todos os aspectos da sepse e do choque séptico (GREENHALGH, 2017).

Na fase precoce do choque séptico os pacientes sépticos graves, apresentam hipotensão refratária a volume e/ou lactato sérico elevado (≥ 4 mmol/l). É importante que o quadro clínico seja revertido num prazo de 6 horas, para isso, é necessário atingir as seguintes metas: pressão venosa central (PVC) entre 8 – 12 mmHg, pressão arterial média (PAM) ≥ 65 mmHg, débito urinário $\geq 0,5$ ml/kg/hora e saturação venosa central de oxigênio (Svc O₂) $\geq 70\%$ (WESTPHAL et al., 2010).

1.4.1.1 Epidemiologia da sepse

Apesar de todo esforço, a sepse continua sendo a principal causa de morte mundial. Em recente publicação científica, estimou-se que em 2017 a sepse afetou cerca de 48,9 milhões de pessoas e causou 11 milhões de mortes no mundo todo a cada ano, representando 20% do total de mortes. Dentre estes casos, 20 milhões de casos acometeram crianças e provocou a morte de 2,9 milhões de crianças menores de 5 anos de vida (WHO, 2018).

A sepse surge a partir da deterioração clínica de infecções comuns e evitáveis e também de infecções adquiridas em ambientes hospitalares. A sepse em mulheres grávidas é chamada de sepse materna e quando ocorre em bebês recém-nascidos é chamada de sepse neonatal. Esta patologia apesar de ser evitável, continua sendo uma das principais causas de morte para mulheres e bebês recém-nascidos. As disparidades regionais justificam a concentração de 85% dos casos em países de baixa e média renda (WHO, 2018).

Entretanto, alguns grupos populacionais são mais suscetíveis, tais como idosos, gestantes, bebês recém-nascidos, pacientes hospitalizados, pacientes internados em unidade de tratamento intensivo (UTI), portadores de HIV/AIDS, indivíduos com câncer, com doenças auto-imune, com doença hepática, com doença renal, sem baço (WHO, 2018).

As doenças mais comuns que contribuem para os casos de sepse e mortalidade, relacionada a sepse em todas as idades, foram as doenças diarreicas (9,2 a 15 milhões de casos anuais) e as infecções respiratórias inferiores (1,8 a 2,8 milhões de casos anuais). As doenças não-transmissíveis corresponderam a 1/3 dos casos de sepse e quase a metade de todas as mortes relacionadas à sepse foram devido a uma lesão subjacente ou doença crônica (WHO, 2018). Todo indivíduo que desenvolva um quadro infeccioso bacteriano ou viral, transmissível ou não, está predisposto a desenvolver sepse, por exemplo, a síndrome aguda respiratória (SARS) causada por coronavírus (MERS ou COVID-19). O indivíduo acometido por uma grave lesão, por exemplo, queimadura grave ou indivíduo portador de doença crônica não-transmissível.

1.4.2 Sepse em pacientes queimados

O aprimoramento dos cuidados dos pacientes queimados nos modernos centros de tratamento intensivo de queimaduras, eleva as taxas de sobrevivência para pacientes queimados cujas lesões foram consideradas fatais a algumas décadas. As infecções são as complicações mais frequentes após as queimaduras. Além das pneumonias, das infecções de trato urinário,

em feridas e ossos, na corrente sanguínea muito frequente em pacientes queimados hospitalizados. Devido a estas infecções, a sepse é a principal causa de mortalidade em adultos e pacientes pediátricos queimados. Apesar de os tratamentos serem efetivos, as taxas de mortalidade são altas, entre 50% e 84% em pacientes adultos queimados e cerca de 55% em pacientes pediátricos queimados (GREENHALGH, 2017).

A principal causa da alta taxa de mortalidade é a ruptura da pele, que é a mais importante barreira de proteção contra os micro-organismos presentes no ambiente. O diagnóstico de sepse em pacientes com queimadura grave (>20% do total da superfície corpórea acometida-SCTQ) é particularmente complicado, devido à sobreposição de sinais clínicos da resposta hipermetabólica pós-queimadura, com os sinais de sepse (GREENHALGH, 2017).

Todo indivíduo em que a superfície queimada total do corpo (SCQT %) seja acima de 20% desenvolve a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Estes indivíduos apresentam taquicardia, taquipneia, leucocitose e temperatura corporal em torno de 38 °C. Para identificar a sepse faz-se necessário combinara avaliação clínica e critérios laboratoriais., sendo necessária a presença de três dentre os critérios a seguir:

- Temperatura >39 °C ou <36,5 °C
- Progressiva taquicardia >110 batimentos por minuto
- Progressiva taquipneia >25 respirações/ minuto ou ventilação/ minuto >12L/min
- Trombocitopenia <100.000/mcl (não se aplica antes 3 dias após a queima)
- Hiperglicemia (na ausência de diabetes pré-existente)
(Glicose plasmática não tratada >200 mg/dl ou insulina I.V. >7UI/ hr IV, resistência insulínica [>25% de aumento da necessidade de insulina ao longo de 24 h])

1.4.3 Biomarcadores

Para identificar a presença precoce de sepse, vários estudos têm sido realizados em busca de biomarcadores que pudessem indicar a presença de sepse, através de exame laboratorial. Entre os biomarcadores mais estudados em infecções bacterianas e sepse, está a procalcitonina (PCT). Em condições orgânicas normais a procalcitonina é produzida por células neuroendócrinas, principalmente pela tireóide (células-C) e em menor quantidade por células hepáticas e intestinais (NUNEZ LOPEZ et al., 2017).

Sabemos que após três horas do início do quadro de infecção o nível sérico de PCT apresenta-se aumentado, atingindo o pico por volta de 20 horas. E após a resolução do processo infeccioso o nível de PCT diminui cerca de 50% a cada dia. A função da PCT ainda não está esclarecida, contudo, o aumento considerável de PCT em relação a outros indicadores impulsiona o uso de PCT como um biomarcador de infecção e sepse, desde 1990. A elevação de PCT está associada com infecção bacteriana, mas não à infecção viral. A PCT tem sido estudada como uma ferramenta para prognóstico e diagnóstico de sepse em pacientes queimados. Estudos demonstram que os níveis séricos de PCT podem ser utilizados como guia para de-escalamento e duração da exposição (NUNEZ LOPEZ et al., 2017).

O fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por várias categorias de células em resposta a diferentes estressores incluindo as endotoxinas, produtos bacterianos, ativação do sistema complemento e outras citocinas, hipoxemia, isquemia e reperfusão. O TNF- α possui várias funções fisiológicas, tais como, ativação de monócitos/macrófagos e células *natural killer* (NK) e está envolvido na indução de apoptose e sobrevivência celular, causa vasodilatação por indução da produção de óxido nítrico, promove quimiotaxia dos neutrófilos, e ativa os fatores pro-trombóticos e vias fibrinolíticas. O nível sérico de TNF- α apresenta-se elevado após a queimadura e quando os níveis de TNF- α encontra-se muito aumentado, observa-se o desenvolvimento de sepse (NUNEZ LOPEZ et al., 2017).

As interleucinas (IL-6, IL-8, IL-10) são citocinas pró-inflamatórias produzidas por leucócitos, fígado, rim, baço e podem ser produzidas na maioria das células, por macrófagos, monócitos e células endoteliais. Após a queimaduras interleucinas atingem níveis séricos elevados. As interleucinas apresentam amplas funções imunológicas, tais como a modulação da fase inflamatória, a indução do aumento da temperatura corporal, estimulam a produção do hormônio do stress, ativam hematopoese, ativação e maturação de células imunológicas. Em pacientes sépticos a concentração sérica de interleucina 10(IL-10) apresenta elevação e promove hiperativação da resposta anti-inflamatória (NUNEZ LOPEZ et al., 2017).

1.4.4 Choque hipovolêmico

Após o diagnóstico de sepse ter sido confirmado, seguindo as recomendações de tratamento de sepse contida no Guia de Práticas Clínicas (*Surviving Sepsis Campaign*, 2017), devem ser coletadas amostras biológicas para investigação microbiológica e iniciada

imediatamente a reposição de fluidos. Após uma hora da estabilização do paciente, é necessário iniciara terapia antimicrobiana.

Os pacientes queimados recebem abundante quantidade de fluidos após queimaduras. Após a ressuscitação e estabilização, deve-se realizar avaliação clínica e monitorar as variáveis fisiológicas regularmente para se necessário realizar ajuste terapêutico e manter o paciente euvolêmico.

O volume e a categoria de fluido administrado em pacientes queimados sépticos, serão determinados por vários fatores, inclui-se idade do paciente, função cardíaca, renal e a variação do volume de extravasamento de água através das queimaduras descobertas. O objetivo da reposição de fluidos é manter a pressão arterial média maior ou igual a 65 mmHg e normalizar o nível de lactato para menor que 2 mmol/L (18 mg/dL). Sabemos que hipotensão arterial e hiperlactemia são indicadores de hipoperfusão tecidual (NUNEZ LOPEZ et al., 2017).

Para calcular o volume de fluido para ressuscitação volêmica em pacientes adultos queimados não-superficial, utiliza-se a Fórmula de *Parkland* para obter-se uma estimativa do volume de cristalóides que necessitam ser infundido no paciente.

Quadro 4 – Fórmula de *Parkland*

<p>Fórmula de <i>Parkland</i></p> <p>Cristalóide total pelas primeiras 24 horas = 4 x Peso (kg) x</p> <p>SCTQ (%)</p> <p>SCTQ = superfície corpórea total queimada</p>

1.4.5 Infecções bacterianas - pacientes grandes queimados

Os estudos realizados na última década demonstraram que 42% a 65% das mortes em pacientes queimados são provocadas por infecções. A alta prevalência de bactérias multirresistentes (MDR) em centros de tratamento de queimados pode ser promovida pela seleção empírica de antibióticos, as quais desencadeiam um círculo vicioso de maior resistência microbiana. O microrganismo MDR é definido como não-suscetível à pelo menos um agente em três ou mais classes de agentes antimicrobianos (VICKERS et al., 2018).

A resistência microbiana é definida como mudança fenotípica de suscetível (S) ou intermediário(I), para resistente (R) a determinado antimicrobiano, em culturas de acompanhamento. As culturas devem ter sido feitas pelo menos 2 dias, após a cultura inicial. O

tempo de isolamento do microrganismo MDR é calculado a partir da data de admissão na UTI até a data da coleta das primeiras bactérias Gram-negativas MDR identificadas na cultura. A partir das culturas interpreta-se a suscetibilidade antimicrobiana com base nas Diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos Laboratoriais (CLSI- *Clinical Laboratory Standards Institute*) como suscetível(S), intermediário (I) ou resistente (R) (DHAESE et al., 2018).

Dados apresentados no relatório nacional de queimados nos Estados Unidos, em 2016, mostram que 07 entre 10 das mais frequentes complicações que acometem pacientes queimados são de etiologia infecciosa.

Em casos de lesão por inalação, a necessidade de utilização prolongada de ventilação mecânica, aumenta o risco para o surgimento de pneumonias. As infecções hospitalares (HAIs- *hospital associated infection*) surgem mais cedo durante a hospitalização, geralmente durante a primeira semana. Os estudos microbiológicos realizados indicam que os microrganismos Gram-positivos ocorrem mais cedo durante a hospitalização e os Gram-negativos acometem os pacientes mais tardiamente (LACHIEWICZ et al., 2017).

Alguns patógenos necessitam de atenção especial nos centros de tratamento de queimados, pois tem sido registrados surtos por cepas *Multi-Drug-Resistants* (MDR): *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophiliae Methicilin Resistant*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*.

A tabela 2 apresenta os microrganismos prevalentes nas infecções hospitalares.

Tabela 2 – Infecções mais comuns relacionadas ao tempo de internação após queimadura

0 a 15 dias	Infecção de pele e Tecidos moles	<i>Staphylococcus aureus</i>
15 a 30 dias	Pneumonia	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
30 a 60 dias	Resistência Bacteriana, Infecção na corrente sanguínea. Infecção no Trato Urinário	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
60 ≥ 90 dias	Todas as infecções	Todos m.o.acima citados

Fonte: Adaptado da obra Lachiewicz et al., 2017, p. 2131.

Para os pacientes queimados o tempo de internação prolongado é o principal fator de risco para desenvolverem infecções por bactérias MDR, devido à complexidade do tratamento e as características clínicas do paciente, tais como a extensão da lesão e a presença de lesão inalatória.

A alta prevalência de bactéria MDR, em centros de tratamento de queimados é consequência de vários fatores, a alta pressão antibiótica, a alta pressão de colonização, a necessidade de tratamento médico intensivo, as terapias cirúrgicas e a vulnerabilidade dos pacientes devido a estarem imunocomprometidos.

Os procedimentos para o controle de infecção hospitalar nos centros de tratamento intensivo, devem adotar estratégias, tais como a higiene das mãos dos profissionais de saúde antes e depois do contato com o paciente, isolar o paciente infectado, realizar limpeza e desinfecção antibacteriana dos ambientes, aperfeiçoar as intervenções cirúrgicas, utilizar de forma consciente os dispositivos médicos e fazer o controle ambiental. Inúmeros estudos mostram o benefício de estratégias de controle do risco de infecção hospitalar na propagação de microrganismos MDR em pacientes queimados.

As diretrizes da Sociedade Internacional de Queimaduras recomendam que os centros de tratamento de queimados desenvolvam, apliquem e monitorem um programa de administração de antimicrobianos, o qual permita identificar os pacientes infectados por bactérias multirresistentes (LACHIEWICZ et al., 2017; VICKERS et al., 2018).

1.5 ANTIMICROBIANOS

A atividade antimicrobiana do fármaco é avaliada por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) em condições específicas *in vitro*.

As características farmacodinâmicas do antimicrobiano são a inibição do crescimento do microrganismo, o intervalo e a extensão da ação bactericida e os efeitos pós-antibióticos (PAE). Estas características levam a definição do regime de dose, a dosagem usual e o intervalo de dose. Os índices farmacodinâmicos descrevem a atividade ótima do antimicrobiano:

- $fT >$ (quantidade de tempo em que a concentração de fármaco livre permanece acima do CIM do organismo infectante);
- C_{max} / CIM (relação entre a concentração máxima do fármaco e o CIM do organismo infectante);
- $AUC_{(0-24)} / CIM$ (razão entre a área total sob a curva de concentração –tempo (AUC) ao longo de 24 horas e o CIM do organismo infectante);

A eficácia do tratamento antimicrobiano depende da interação de vários fatores: bacteriano (tamanho da população bacteriana inicial), potência (CIM e CBM), características

farmacocinéticas do agente antimicrobiano em uso, taxa de recrescimento de organismos persistentes, capacidade de defesa hospedeiro (VEIGA; PAIVA, 2018).

O produto MERREL® aprovado na década de 90, foi desenvolvido por AstraZeneca, indústria suíça fundada em 1938. Inicialmente teve a dose diária de 2 g, prevista em bula, no regime de dose de 0,5g q6h, para administração sistêmica, por infusão intermitente, de 0,5 h aos pacientes adultos de UTI. Recentemente o produto, passou a ser comercializado, pela AstraZeneca LP no Brasil, sob denominação de MERONEM®.

Nesse período, o alvo terapêutico a ser atingido foi baseado no valor recomendado de $40\% f\Delta T > CIM$, considerado adequado para índice de efetividade (IKAWA et al., 2008). Subsequentemente utilizou-se o índice de $60\% f\Delta T > CIM$ com o objetivo de garantir a cobertura contra patógenos Gram-negativos $CIM > 2 \text{ mg/L}$. Destaca-se ainda que inúmeros estudos clínicos controlados, em pacientes sépticos queimados e não queimados, foram conduzidos pela infusão estendida de diversos agentes beta-lactâmicos, incluindo-se Ampicilina, Piperacilina-Tazobactam e o Meropenem (LANGAN et al., 2014; DE WAELE et al., 2014; SILVA JR et al., 2017).

Após o último Consenso de Terapia Intensiva e Medicina de Emergência, realizado recentemente em Bruxelas, inúmeros autores reportaram que o novo índice de $100\% f\Delta T > CIM$ para a predição de efetividade do Meropenem, portanto ficou definido que o índice precisa ser atingido para garantir a cobertura antimicrobiana do Meropenem contra patógenos Gram-negativos $CIM 4 \text{ mg/L}$ (ABDUL-AZIZ et al., 2016; KUPA, 2019; SILVA JR et al., 2017; RHODES et al., 2017).

1.5.1 Meropenem tri-hidratado (MERONEM®) Antimicrobiano Carbapenêmico

É um antibiótico carbapenêmico prescrito para o tratamento de pacientes graves, para uso parenteral em terapia intensiva. Devido às alterações fisiopatológicas presentes nos pacientes, podem ocorrer modificações na depuração renal que interferirá no volume de distribuição e na eliminação do fármaco, causando variações na concentração plasmática, reduzindo a eficácia do tratamento da infecção. O Meropenem possui caráter hidrofílico, portanto apresentam maior risco de variações e necessita ser monitorado quanto a dosagem e concentração plasmática, de modo a evitar sub-dose ou acúmulo de dose.

Os antimicrobianos carbapenêmicos foram desenvolvidos para serem usados no tratamento empírico de infecções causadas por bactérias resistentes à penicilina. Possuem

amplo espectro de atividade bactericida contra cepas Gram-positivas (*Pseudomonas ssp*, *Streptococcus ssp* *Enterococcus ssp*) e Gram-negativas (*Enterobacteriaceae* e não-*Enterobacteriaceae*), aeróbias e anaeróbias.

O Meropenem é um agente antibacteriano que afeta a viabilidade dos microrganismos, pois impede o crescimento e a reprodução do microrganismo, atua por inibição da síntese da parede celular bacteriana, penetra na parede celular e liga-se a alvos proteicos de ligação à penicilina e possui estabilidade à maioria das serinas betalactamases. Possui reduzida suscetibilidade para hidrólise, pela enzima dehydropeptidase I humana (DPH-I), presente no túbulo proximal, portanto não é requerida a coadministração de inibidor de DPH-I. É primeiramente excretado pelos rins, (50 a 70%) da dose é excretada inalterada em 12 horas. Ocorre depuração renal por filtração e secreção tubular.

1.6 ESTRUTURA QUÍMICA

O MERREM® I.V. (Meropenem injetável) é um antibiótico carbapenêmico estéril, isento de pirogênicos, com largo espectro, para administração intravenosa.

1.6.1 Nome Químico Meropenem - 96036-03-2

(4*R*,5*S*,6*S*) -3-[(3*S*,5*S*) -5-(dimethylcarbamoyl) pyrrolidin-3-yl] sulfanyl-6-[(1*R*) -1-hydroxyethyl] -4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo [3.2.0] hept-2-ene-2-carboxylic acid;trihydrate.

1.6.1.1 Fórmula Molecular – C₁₇H₃₁N₃O₈S

1.6.1.2 Peso Molecular: 437.5 g/mol

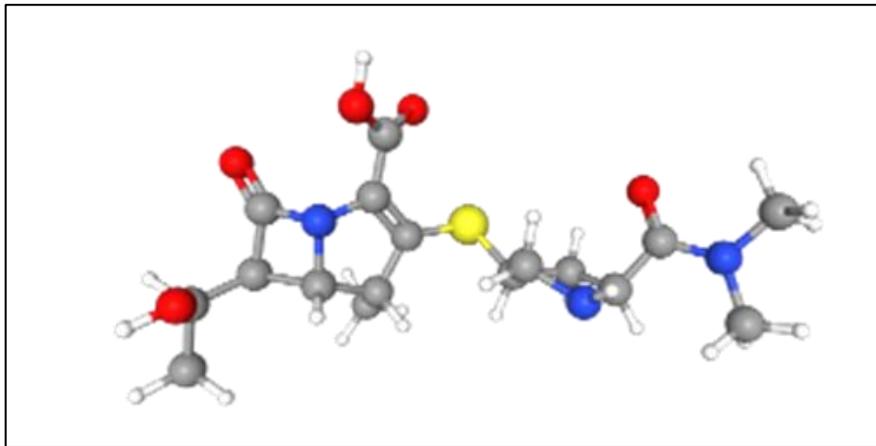
1.6.1.3 Nome Comercial- Merrem® - Meropenem tri-hidratado

O MERREM ® I.V. é um pó cristalino branco a amarelo pálido, sua solução tem variação de incolor a amarelo dependendo da sua concentração.

O seu Ph está entre 7,3 e 8,3, é solúvel em solução monobásica a 5 % de solução de fosfato de potássio, pouco solúvel em água, e muito solúvel em etanol hidratado, praticamente insolúvel em acetona ou éter.

1.6.1.4 Estrutura Química 3 D (Tridimensional) - Meropenem Tri-Hidratado

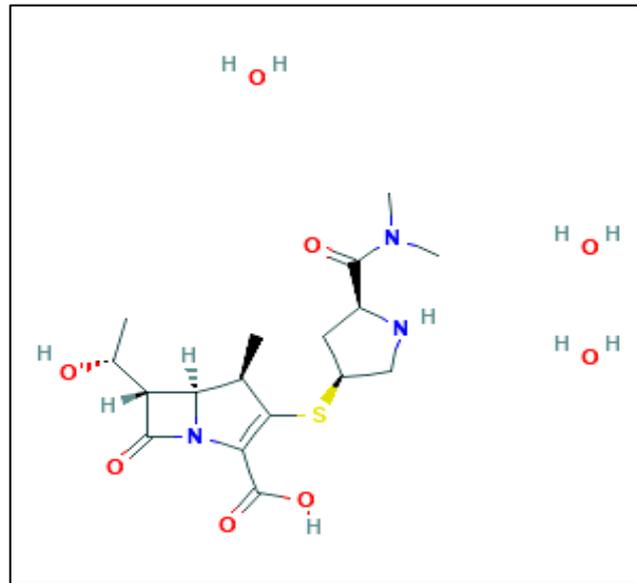
Figura 2 – Estrutura Química 3D Tridimensional - Merrem ® - Meropenem tri-hidratado CID=64778



Fonte: Pubchem, s/d.

1.6.1.5 Estrutura Química 2 D (Bidimensional) - Meropenen Tri- Hidratado

Figura 3 – Estrutura Química 2D Bidimensional - Merrem ®
Meropenem tri-hidratado CID=64778



Fonte: Pubchem, s/d.

1.6.2 Indicações de uso - posologia

Recomendado para o tratamento de infecção grave da pele e dos tecidos, infecção urogenital e intra-abdominal, pneumonia adquirida (hospitalar) e em caso de sepse. Administrado por via intravenosa em pacientes hospitalizados submetidos à tratamento intensivo. O Meropenem está disponível em frascos de 500 mg ou 1 grama de pó liofilizado para injeção Pubchem Database (2020).

Em Adultos a faixa de dosagem é de 1,5 g a 6 g diários, divididos em 3 administrações. A dose usual é de 500 mg a 1 g no regime de dose de 8 horas, por administração intravenosa.

1.6.3 Toxicidade

O Meropenem é considerado seguro e apresenta poucos efeitos adversos, mesmo quando utilizado em altas doses. Os efeitos adversos mais comuns são diarreias, náuseas e vômitos, *rash* cutâneo e prurido. Em altas doses apresenta neurotoxicidade. Outros efeitos

adversos observados com menor frequência são insuficiência renal aguda, distúrbios eletrolíticos, hemólise intravascular grave, trombocitose, trombopenia grave, leucopenia, hipersensibilidade do tipo retardo, choque anafilático e reações cutâneas severas (VEIGA; PAIVA, 2018).

1.6.4 Características farmacocinéticas do Meropenem

- Concentração plasmática máxima (C max), aproximadamente 30mg/L (após administração de 1 g por via intravenosa)
- Área sob a Curva (AUC) - aumenta linearmente com a dose (dose dependente)
- Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) - aproximadamente 1 hora.
- Volume de distribuição = 21L (distribuição extracelular)
- Eliminação via metabolismo e excreção. Em voluntários sadios, até 70% é recuperado na urina e o restante é responsável por uma forma de anel aberto de beta-lactama do composto, ICI 213689

Em pacientes com insuficiência renal o $t_{1/2}$ do Meropenem é prolongado bem como a depuração de creatinina, portanto os ajustes posológicos podem ser feitos com base na depuração da creatinina (MOUTON; VAN DEN ANKER, 1995).

1.6.5 Características farmacodinâmicas do Meropenem

- Atividade bactericida é dependente do tempo
- Atividade antibacteriana é a porcentagem do intervalo de dosagem em que os níveis do medicamento livre excedem o MIC, ou % $T > fMIC$.
- A magnitude que melhor se correlaciona com a eficácia in vitro, in vivo e em humanos é de 100% $T > fMIC$

1.6.6 Interações medicamentosas do Meropenem

- Ácido Valpróico – o uso de Meropenem concomitante ao Ácido Valpróico ocorre a diminuição do efeito antiepilético, resultando em níveis sub-terapêuticos de Ácido Valpróico podendo ocorrer convulsões.
- Probenecida- prolonga o tempo de meia-vida do Meropenem, aumenta os níveis séricos, provavelmente por bloqueio da excreção tubular (BOLHUIS et al., 2011).

1.7 ABORDAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA (PK/PD)

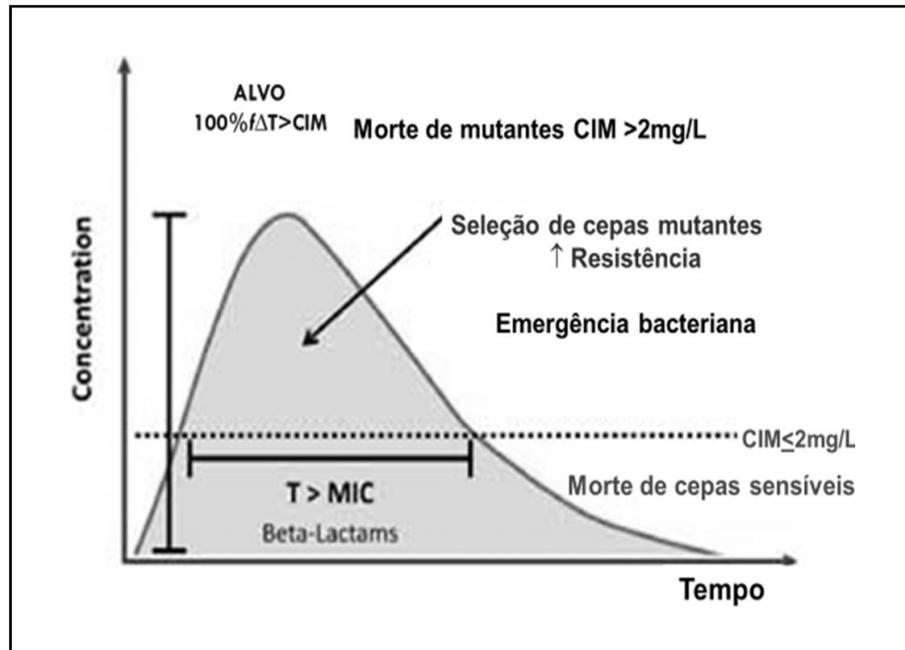
Por meio da análise PK/PD pode-se calcular o índice para a predição da efetividade do fármaco a partir da correlação entre um ou mais parâmetros farmacocinéticos (medida *in vivo*) com um parâmetro farmacodinâmico (medida *in vitro*).

O índice de predição de efetividade para o Meropenem está baseado $100\%f\Delta T > CIM$, percentual do intervalo de dose em que a concentração da fração livre permanece acima da concentração inibitória mínima do patógeno. Considerou-se a sensibilidade das cepas susceptíveis ao Meropenem na faixa de CIM: 0,25-4 mg/L constante no *Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI database*.¹

O valor para o índice de predição de efetividade para os agentes carbapenêmicos de $40\%f\Delta T > CIM$ inicialmente recomendado na década de 90, foi substituído pelo valor de $60\%f\Delta T > CIM$ em 2017, e mais recentemente foi definido após o último consenso em $100\%f\Delta T > CIM$, que se refere ao índice recomendado atualmente para a garantia da erradicação dos patógenos susceptíveis para a cura da infecção nos pacientes sépticos. A utilização desse novo índice permitiu eliminar a seleção de mutantes e a redução de óbitos pela emergência bacteriana.

¹ INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. ICH E6(R2) Good Clinical Practice: Integrated Addendum to ICH E6(R1). Março de 2018. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/e6r2-good-clinical-practice-integrated-addendum-ich-e6r1>.

Figura 4 – Abordagem PK-PD



Fonte: Abdul-Aziz, 2015, p. 3

1.7.1 Cálculo do Índice de efetividade do Meropenem $100\% f \Delta T > CIM$ equação:

$$f \Delta T > CIM = \left(\frac{\ln(MIC) - \ln(\text{vale sérico})}{K_{el}} - \tau \right) \times 100 / \tau$$

1.8 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS (TDM)

O TDM é uma estratégia utilizada para aperfeiçoar a exposição ao fármaco, especialmente em pacientes gravemente enfermos, com hipoalbuminemia, função renal alterada e infecções por cepas bacterianas resistentes. O TDM deveria ser realizado como rotina para o ajuste de dose de antimicrobianos, porém nem sempre é realizado devido à falta de recursos técnicos e financeiro nos laboratórios dos hospitais.

Muitos fatores presentes em pacientes graves queimados podem afetar a farmacocinética dos fármacos, tais como a superfície corpórea total queimada (% SCTQ), a profundidade da lesão, a idade, o *clearance* de creatinina e o tempo após a lesão. Em função de causarem alterações na concentração plasmática do antimicrobiano, faz-se necessário ajustar a

dose durante o tratamento para evitar a redução da atividade e falha terapêutica (MACHADO et al., 2017).

O TDM também está indicado para ser realizado em pacientes obesos e imunossuprimidos, indivíduos infectados por cepas bacterianas resistentes, pacientes com função renal alterada e submetidos às técnicas de suporte extracorporais.

Vários estudos relatam a alta variabilidade farmacocinética dos beta-lactâmicos, em pacientes sépticos ou em choque séptico, tanto em pacientes diferentes quanto em um mesmo paciente temporalmente (VEIGA; PAIVA, 2018).

Alguns métodos podem ser aplicados para aprimorar os resultados no tratamento de infecções em pacientes queimados graves internados em UTI:

- Implantar um programa de administração de antimicrobianos pode reduzir a pressão seletiva por uso indevido dos antibióticos.
- Realizar a rápida identificação de infecções bacterianas.
- De-escalar e encurtar a duração do tratamento com antibióticos

2 OBJETIVO

Avaliar a efetividade do Meropenem em pacientes sépticos grandes queimados, na fase precoce e tardia do choque séptico, submetidos a tratamento, com a dose diária recomendada, através de infusão estendida (3 horas) com base no monitoramento sérico. Estudo das alterações da farmacocinética na fase precoce e tardia do choque séptico e avaliação da cobertura do antimicrobiano pela estimativa do índice de predição de efetividade baseado na abordagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD).

3 CASUÍSTICA

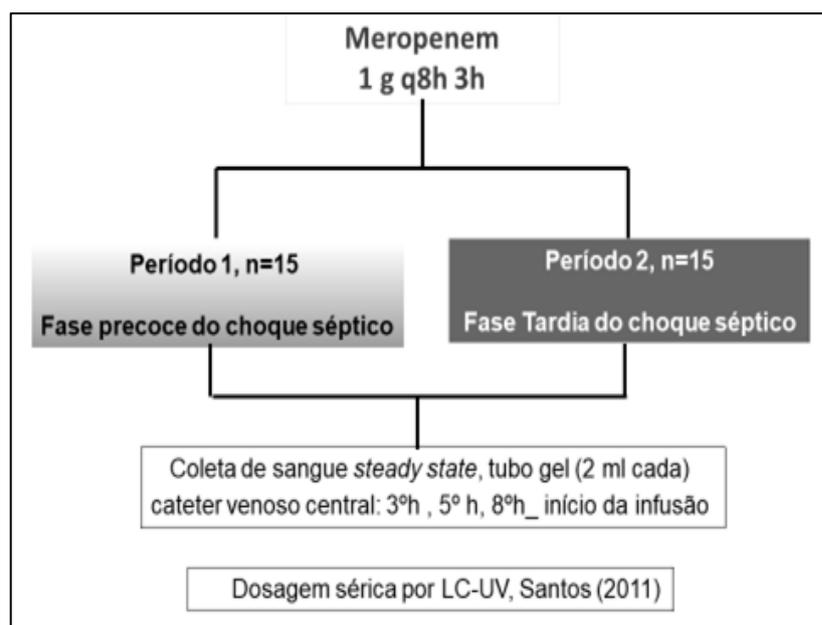
O protocolo foi registrado na Plataforma Brasil, sob nº CAAE 07525118.3.0000.0068.

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), detalhado no Anexo I.

3.1.2 Desenho do estudo

Figura 5 – Desenho do Estudo



3.2 MÉTODO

O protocolo foi desenhado para avaliação da efetividade da terapia antimicrobiana com o Meropenem no regime de dose de 1g q8h no período precoce do choque séptico, pela infusão estendida de 3 horas em população de adultos.

O tamanho amostral de 15 pacientes foi determinado através do software *Power & Sample Size Calculation* (versão 3.0.43 38-42), utilizando como parâmetros para o cálculo: alfa

de 0,05; poder do teste de 80%, a partir da média da área sob a curva e o desvio padrão da média, significância estatística $P < 0,05$ conforme recomendado para agentes carbapenêmicos em grandes queimados (GOMEZ et al., 2015).

Desta forma, para se atingir o objetivo proposto, incluíram-se no protocolo de estudo, 15 pacientes em choque séptico, grandes queimados, adultos entre 18 e 49 anos, de ambos os sexos e função renal preservada, na vigência de SIRS, no período entre abril de 2016 e janeiro de 2019.

Os pacientes sépticos queimados do protocolo tiveram indicação de Meropenem sistêmico. A dose recomendada no hospital de 3g diários, no regime de dose de 1 g q h8 de acordo com o tempo de infusão, foi realizada através de bomba durante 3 horas. Adicionalmente, ressalta-se que todos os pacientes incluídos no protocolo foram avaliados semanalmente, durante a terapia antimicrobiana relativamente aos níveis séricos e abordagem PK/PD, até o desfecho clínico, quanto à necessidade ou não de ajuste do regime de dose, ou então pela indicação do de-escalonamento do Meropenem. Todos os pacientes incluídos no grupo finalizaram o estudo.

3.2.1 Critérios de inclusão de pacientes para o estudo

Quadro 5 – Critérios de Inclusão de Pacientes no Estudo²

<p>Terapia antimicrobiana na suspeita de sepse após 48 horas sem melhora do quadro Choque séptico confirmado e infecção documentada por patógeno hospitalar</p> <p>Sinais e sintomas clínicos compatíveis com infecção, com necessidade de introdução de pelo menos um antimicrobiano sistêmico após 72 horas da admissão, ou após prescrição inicial de antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por patógenos da comunidade, sem melhora após 48 horas da terapia</p> <p>Indicação de terapia sistêmica para um agente carbapenêmico</p> <p>Presença de 2 ou mais sinais e sintomas indicação para o uso empírico de antimicrobianos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Leucopenia ou leucocitose 2. Aumento de Proteína C reativa (PCR) 3. Aprofundamento do grau da queimadura decorrente da lesão térmica 4. Hipotermia ($>38,5^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$) 5. Instabilidade hemodinâmica, necessidade de fármaco vasoativo após correção hidroeletrólítica

Fonte: CCIH-HCFMUSP, 2018-20.

² Plataforma Brasil, sob nº CAAE 07525118.3.0000.0068

3.2.2 Critérios de exclusão de pacientes para o estudo

Quadro 6 – Critérios de Exclusão de Pacientes no Estudo³

<p>Paciente gravemente neutropênico (contagem absoluta de neutrófilos inferior à 500 células/mm³) no período de estudo devido à quimioterapia prévia ou planejada ou ainda, no paciente com HIV apresentando contagem de CD4 inferior a 200 nos últimos seis meses.</p> <p>Mulheres grávidas ou nutrizes</p> <p>Hipersensibilidade conhecida ou intolerância aos medicamentos em estudo ou aos excipientes da formulação.</p> <p>Pacientes com disfunção renal ($Cl_{Cr} < 50$ ml/min) ou terapia de reposição.</p>
--

Fonte: CCIH-HCFMUSP, 2018-20.

3.2.3 Local do estudo

A etapa clínica foi realizada na Unidade de Terapia Intensiva de Grandes Queimados, Divisão de Cirurgias Plásticas e Queimaduras HCFMUSP, 8º andar do Instituto Central, *situ* à Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 225. A etapa analítica e estatística ocorreu no Centro de Farmacocinética Clínica, Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Bloco 13B 1º piso, Av. Prof. Lineu Prestes, 580.

3.2.4 Coleta de dados demográficos, clínico e laboratorial dos pacientes

Idade	Peso ideal	Peso real
Altura	Índice de Massa Corpórea	Superfície corporal

3.2.5 Cálculo da creatinina sérica e *Clearance* da Creatinina

Equação de Cockcroft-Gault- <i>Clearance</i> da Creatinina
<p>$Cl_{Cr} = \{[(140 - \text{idade}) \times [\text{Peso}]] / (72 \times \text{Scr})\} \times F \text{ ml/min}$</p> <p>Scr: creatinina sérica mg/dl</p> <p>F: fator de multiplicação relacionado ao gênero (M:1; F:0,85)</p>

³ Plataforma Brasil, sob nº CAAE 07525118.3.0000.0068

3.3 MEDICAÇÕES, REGIME DE DOSE E ADMINISTRAÇÃO

Quadro 7 – Prescrição de Meropenem aos pacientes críticos de UTI.
Pacientes com função renal preservada

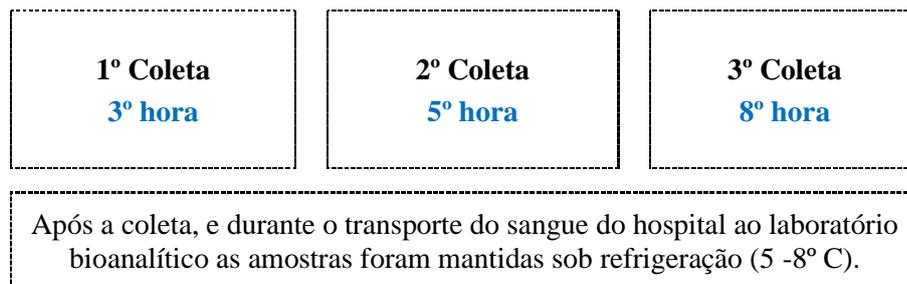
Prescrição de Meropenem aos pacientes críticos de UTI		
Pacientes com função renal preservada		
Dose diária	Regime de Dose	Infusão em bomba
3 g	1 g 3x dia	Estendida (3h)

Fonte: CCIH-HCFMUSP, 2018-20.

3.4 COLETAS SERIADAS DE AMOSTRAS DE SANGUE E ENCAMINHAMENTO AO LABORATÓRIO BIOANALÍTICO

3.4.1 Modelo farmacocinético: coleta seriada

Foram coletadas três amostras sanguíneas de 2 ml/tubo gel, após o término da infusão do Meropenem.



3.5 ETAPA ANALÍTICA

A Etapa Analítica e o Método Bioanalítico estão descritos detalhadamente no Apêndice I.

3.6 ETAPA ESTATÍSTICA

3.6.1 Modelagem farmacocinética

O modelo de quantificação dos níveis séricos de meropenem utilizado para a realização da modelagem farmacocinética, foi o modelo de um compartimento. Os parâmetros farmacocinéticos determinados no estudo foram a taxa de eliminação, o tempo de meia vida biológica, a depuração total corporal do meropenem, o volume aparente de distribuição e a área sob a curva. No quadro 8 estão as equações para calcular cada parâmetro farmacocinético e suas respectivas unidades.

Quadro 8 – Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos após Infusões Múltiplas

Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos após Infusões Múltiplas		
Parâmetro	Unidade	Equação
Taxa de infusão	k_0 (mg/h)	Dose/Tinfusão
Taxa de eliminação	kel (h ⁻¹)	$(\ln C_1 - \ln C_2) / (T_1 - T_2)$
Meia-vida biológica	$t(1/2)\beta$ (h)	0,693/ kel
Área sob a curva	ASC_{τ}^{ss} (mg.h/L)	Trapezóides (integração ponto-ponto)
Depuração total corporal	CL_T (L/h)	Dose tid/ ASC_{τ}^{ss}
Volume aparente de distribuição	V_d^{ss} (L)	Dose/($kel \cdot ASC_{\tau}^{ss}$)
Abreviaturas: $t(1/2)\beta$: meia vida biológica; CL_T : depuração total corporal; V_d^{ss} : volume aparente de distribuição.		

Fonte: PK Solutions v. 2.0 *Noncompartmental Data Analysis* (Summit, USA)

3.6.2 Estudo populacional e análise estatística

Os programas *Excel_2007* (Microsoft Corporation, USA) e *GraphPad Prisma v.5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foram utilizados nos cálculos, organização dos dados individuais obtidos e populacionais, bem como na representação gráfica e tratamento estatístico, para efeito de comparação entre grupos e no estudo de correlação. Aplicou-se estatística não paramétrica e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados relacionados às características demográficas da população de pacientes e os dados da farmacocinética e os que dizem respeito à abordagem PK/PD foram expressos como medianas e interquartis.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Foram incluídos no estudo 15 pacientes adultos, grandes queimados, admitidos na UTI-Q. Os pacientes receberam Meropenem na dose recomendada de 1 g a cada 8 horas através de bomba por infusão estendida de 3 horas. A informação relativa à característica demográfica como gênero, idade, peso e altura foi capturada do prontuário de cada paciente; adicionalmente, o índice de massa corpórea foi calculado com base nesses parâmetros. Os dados individuais estão reunidos na tabela 3, os dados populacionais foram expressos através de mediana e interquartil.

Tabela 3 – Características demográficas dos pacientes investigados

Alocação n=15	Gênero (M/F)	Idade (anos)	Peso real (kg)	Peso ideal (kg)	^aSC (m²)	^aIMC (kg/m²)
#1	M	34	70	80	1,88	21,6
#2	F	29	47	50	1,42	19,5
#3	M	35	80	80	2,01	24,7
#4	M	38	80	75	2,01	24,7
#5	M	37	70	77	1,82	24,2
#6	M	32	85	72	2,10	24,8
#7	M	49	80	70	2,01	24,7
#8	F	47	64	77	1,77	20,8
#9	F	43	51	105	1,51	19,9
#10	M	39	65	75	1,73	23,9
#11	M	34	75	67	1,92	24,5
#12	F	18	51	65	1,51	19,9
#13	F	44	55	51	1,60	20,3
#14	M	20	71	70	1,84	24,3
#15	M	39	72	68	1,86	24,3
Proporção	5F /10M	-	-	-	-	-
Mediana (IQ)	-	37 (33 - 41)	71,0 (59,5 - 80,0)	72,0 (67,5 - 77,0)	1,84 (1,66 - 2,01)	24,3 (20,6 - 24,7)

Abreviaturas: M: masculino; F: feminino; SC: superfície corpórea; IMC: índice de massa corpórea; IQ: intervalo interquartil. **Nota:** ^asuperfície corpórea e índice de massa corpórea: estimadas a partir de equação recomendada, tomando-se por base o peso real do paciente. **Estatística:** Prism v.5,0; medianas (interquartil).

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Na oportunidade da admissão dos pacientes na UTI registrou-se a causa, o tipo de trauma, térmico ou elétrico e a superfície corpórea queimada total. O escore de gravidade SAPS 3 (*Simplified Acute Physiology Score*) foi atribuído a cada paciente com base nas características clínicas e no perfil laboratorial de admissão. A presença de lesão inalatória foi avaliada, bem como a necessidade de intubação orotraqueal na UTI-Q e a necessidade de uso de fármacos vasopressores, os dados estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes queimados na admissão da UTI

Alocação n=15	SCTQ (%)	Trauma 1:T/ E:0	LI-DVA 1 (+) 0)	IOT-VM 1 (+) 0(-)	SAPS-3
#1	36,5	1	1	1	54
#2	34,0	1	1	1	59
#3	18,0	1	1	1	45
#4	18,5	0	1	1	53
#5	34,0	1	0	1	43
#6	38,0	1	1	0	37
#7	37,0	1	1	1	54
#8	25,0	1	1	1	56
#9	34,0	1	1	1	59
#10	16,0	0	1	1	48
#11	12,0	0	0	1	58
#12	33,0	0	0	0	24
#13	15,5	1	1	1	59
#14	34,8	0	1	1	58
#15	30,0	1	1	1	60
Proporção	-	10/15	12/15	13/15	-
Mediana	33,0	-	-	-	54,0
IQ	(18,3 – 34,4)	-	-		(46,5-58,5)

Abreviaturas: SCTQ: superfície corpórea total queimada; LI: lesão inalatória; DVA: vasopressores; IOT: intubação orotraqueal; VM: ventilação mecânica; SAPS-3: *Simplified Acute Physiology Score*; IQ: intervalo interquartil; E:queimadura elétrica; T: queimadura térmica. **Estatística:** Prism v.5,0; medianas (interquartil).

4.3 BIOMARCADORES - RENAL E INFLAMATÓRIO

Os resultados da dosagem sérica dos biomarcadores inflamatórios, proteína C-Reativa, leucócitos e neutrófilos, bem como o *Clearance* da Creatinina estimado a partir da creatinina sérica considerado marcador endógeno da filtração glomerular, estão descritos na Tabela 5. O *Clearance* da Creatinina foi estimado a partir da creatinina sérica, utilizando as equações de Cockroft – Gault, indivíduos adultos.

Tabela 5 – Dosagem Sérica dos Biomarcadores Inflamatórios

Alocação n=15	S_{Cr} (mg/dL)	CL_{Cr}^a (ml/min)	PCR (mg/L)	Leucócitos (mil cel /mm³)	Neutrófilos (mil cel/mm³)
#1	1,31	79	73	14,76	12,79
#2	0,84	73	26	28,17	24,79
#3	0,64	182	199	11,11	8,37
#4	1,29	88	14	22,34	19,21
#5	1,01	99	20	15,88	14,45
#6	1,14	112	281	15,99	15,03
#7	0,51	198	309	18,93	14,16
#8	0,70	100	208	13,27	11,26
#9	0,51	115	223	9,02	5,38
#10	1,43	64	2,7	12,18	9,73
#11	0,95	116	0,4	21,82	18,5
#12	0,64	115	98	14,78	13,01
#13	0,63	99	237	22,42	18,83
#14	0,73	162	20	26,59	23,54
#15	1,34	75	85	21,17	18,38
Mediana (IQ)	0,84 (0,64 - 1,22)	100 (89 - 116)	85 (20 - 216)	15,99 (14,02 - 22,08)	14,45 (12,03 - 18,67)

Abreviaturas: S_{Cr}: creatinina sérica; CL_{Cr}: *clearance* de creatinina; PCR: proteína C- reativa; IQ: intervalo interquartil. **Nota:** ^a*Clearance* de creatinina calculado a partir da fórmula de Cockcroft e Gault.

4.4 HISTÓRICO CLÍNICO DE INTERNAÇÃO

Os dados clínicos de internação dos pacientes estão apresentados na tabela 6, tais como o agente causador da queimadura, a presença de politrauma, o número de dias de internação na UTI, o número de dias de internação total e o desfecho de cura e alta.

Tabela 6 – Dados clínicos de internação dos pacientes investigados

Alocação n=15	Agente	Acidente	Crime	Poli Trauma	UTI (dias)
#1	álcool		1		76
#2	álcool	1			31
#3	álcool		1		11
#4	eletricidade	1		1	75
#5	gás cozinha	1		1	40
#6	gasolina	1		1	45
#7	gasolina		1		81
#8	gás cozinha	1		1	41
#9	gasolina		1		23
#10	eletricidade	1		1	45
#11	eletricidade	1		1	28
#12	óleo escaldo	1			89
#13	chama-fogo	1			16
#14	eletricidade	1			140
#15	chama-fogo		1		43
Proporção	-	10/15	5/15	6/15	-
Mediana (IQ)	-	-	-	-	43 (30-76)

Abreviaturas: IQ: intervalo interquartil; UTI: unidade de terapia intensiva
Estatística: Prisma v.5,0; medianas (interquartil)

4.5 PERFIL FARMACOCINÉTICO NO CHOQUE SÉPTICO

A tabela 7 demonstra os parâmetros farmacocinéticos calculado para fase precoce (TDM₁) e na fase tardia (TDM₂) do choque séptico dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 7 – Análise Estatística do Perfil Farmacocinético

Parâmetros	n=15	TDM ₁ Fase precoce	TDM ₂ Fase tardia	Estatística
^a Dose diária	mg/kg dia	42,9 (40,8 - 50,6)	42,9 (40,8 - 50,6)	p>0,05
ASC ^{ss} ₀₋₂₄	mg*h/L	476 (394 - 550)	430 (415 - 457)	p>0,05
^a Dose tid	mg/kg dose	14,3 (13,6 - 16,9)	14,3 (13,6 - 16,9)	p>0,05
ASC ^{ss} ₀₋₈	mg*h/L	136 (122 - 181)	143 (138 - 152)	p>0,05
Pico	mg/L	26,0 (24,0 - 30,1)	34,0 (32,0 - 35,5)	p>0,05
Vale	mg/L	8,3 (7,0 - 12,7)	2,4 (2,3 - 3,2)	p>0,05

Abreviaturas: tid *time inter doses*; ASC^{ss}: área sob a curva. ^a**Nota:** Dose normalizada/peso ideal.
Estatística: Prism v.5,0; medianas (interquartil); Wilcoxon, dados pareados significância p<0,05.

4.6 ÍNDICE DE EFETIVIDADE DA TERAPIA COM MEROPENEM

Tabela 8 demonstra a concentração inibitória mínima (CIM) atingida na fase precoce e na fase tardia do choque séptico. Ao observar a média obtida na fase precoce do choque séptico, constata-se que a efetividade da terapia foi alcançada para CIM de até 4 mg/L. Para a fase tardia do choque séptico, verifica-se que a efetividade da terapia foi alcançada para CIM igual 2 mg/L e que a média obtida para concentração inibitória mínima (CIM) igual 4 mg/L foi limítrofe e não alcançou 100% da fração livre do fármaco durante o intervalo de dose, portanto, a cobertura antimicrobiana não foi atingida. Portanto, este resultado indica a necessidade de ajustar a dose do Meropenem a ser administrada a estes pacientes na fase tardia do choque séptico.

4.8 PERFIL FARMACOCINÉTICO

A tabela 10 nos mostra o perfil farmacocinético do Meropenem nos pacientes incluídos no estudo na fase precoce e tardia do choque séptico e evidência a importância de realizar o ajuste de dose do antimicrobiano. Verifica-se no TDM₁, dose empírica, o prolongamento do tempo de meia-vida em 6 vezes, a redução da depuração total corporal e o aumento do volume de distribuição aparente encontra-se triplicado. E após o ajuste da dose, verifica-se no TDM₂ (dose ajustada) houve a redução aproximada de 50% do tempo de meia-vida biológica e a redução do volume de distribuição ficando próximo do normal quando comparado a voluntários sadios.

Tabela 10 – Farmacocinética do Meropenem pacientes queimados sob dose empírica 1g q8h infusão estendida por 3 horas

Parâmetro	^a Voluntários Sadios	Fase Precoce TDM ₁ Dose Empírica	Fase Tardia TDM₂ Dose Ajustada	Estatística	Parâmetro	^a Voluntários Sadios
t_{1/2}(h)	0,62 - 0,66 h	3,0 (2,7 - 3,8)	1,4 (1,3 - 1,5)	p<0,0001	t_{1/2}(h)	0,62 - 0,66 h
CL_T (L/h)	12,8 - 13,2 L/h	7,4 (5,5 - 8,2)	7,0 (6,6 - 7,2)	p=0,3591	CL_T (L/h)	12,8 - 13,2 L/h
Vd^{ss}(L)	11,6 - 12,2 L	32,0 (26,9 - 35,9)	12,7 (12,5 - 14,1)	p<0,0001	Vd^{ss}(L)	11,6 - 12,2 L

Abreviaturas: t_{(1/2)β}- meia vida biológica; CL_T: depuração total corporal; Vd^{ss}: volume de distribuição.
Estatística: Wilcoxon Prism v.5.0. mediana (interquartil), significância estatística p<0,05. Correlação Linear Prism v.5.0, média (IC95).

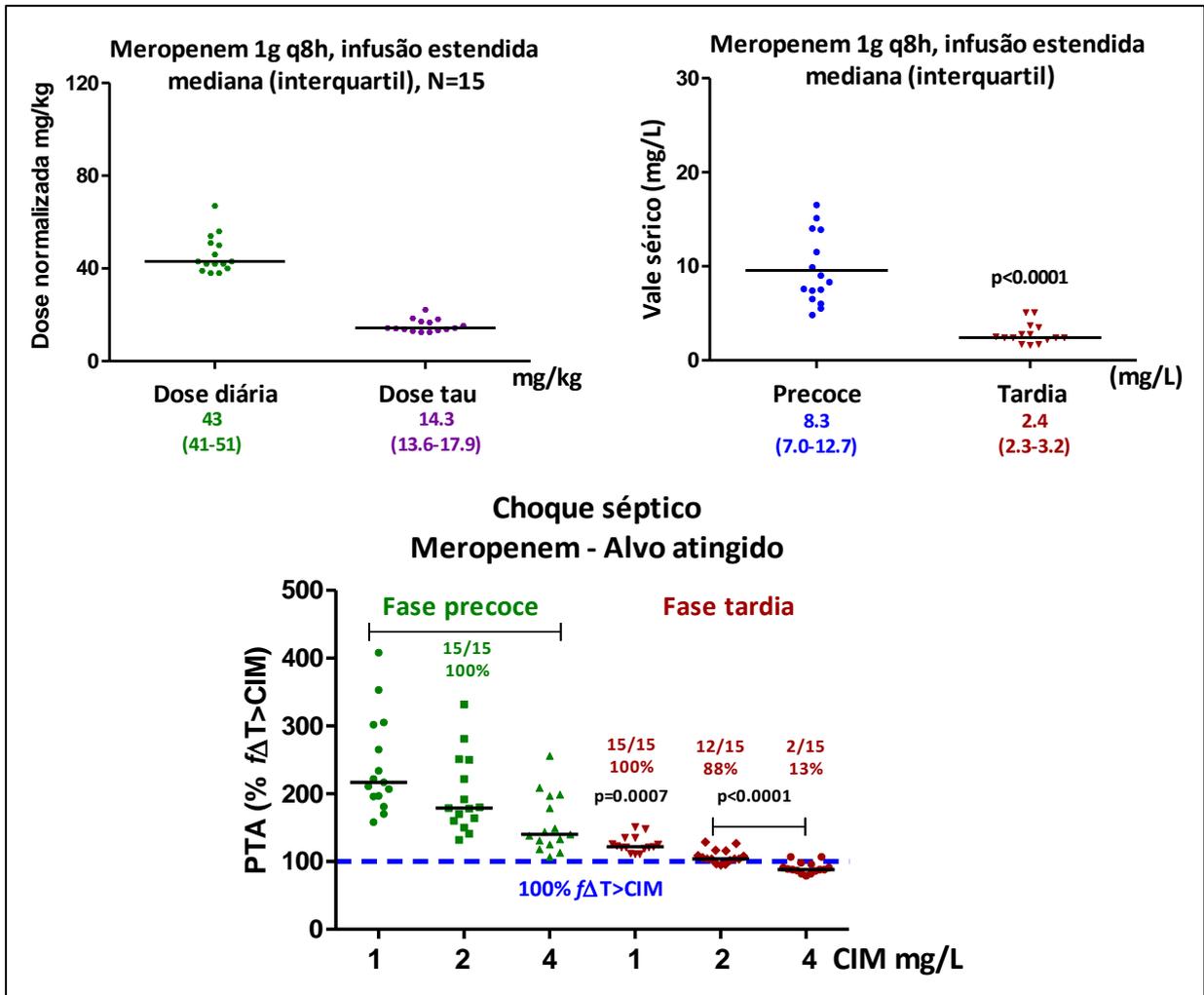
4.9 EFETIVIDADE DO MEROPENEM

A figura 6 apresenta a efetividade do Meropenem, investigada após a infusão estendida em 3 h, para os dois grupos de pacientes estudados e os resultados foram descritos em PTA (porcentagem do alvo atingido) com base no novo índice de efetividade (100% f Δ T > CIM).

Os resultados são ilustrados na faixa de CIM 1 a 4 mg/L. A cobertura do Meropenem foi garantida até CIM 4 mg/L para os pacientes investigados, após regime de dose de 1g q 8h, por infusão estendida na fase precoce, em 15/15 pacientes e na fase tardia a cobertura até CIM 1mg/L foi atingida para 15/15 pacientes, a cobertura até CIM 2mg/L foi alcançada por 12/15 pacientes e para cobertura até 4 mg/L foi garantida para 2/15 pacientes.

Figura 6 – Cobertura do Meropenem em pacientes queimados após 1g q8h, infusão de 3 horas, pela comparação da fase precoce com a fase tardia do choque séptico.

Alvo atingido na terapia antimicrobiana de pacientes grandes queimados recebendo o Meropenem nas fases precoce *versus* tardia do choque séptico.



Abreviaturas CIM: concentração inibitória mínima; PTA: porcentagem de pacientes que atingiram o alvo terapêutico 100% fΔT>CIM (KUPA, 2019).

Estatística: Prism v.5.0 medianas; Wilcoxon: dados pareados; significância p<0,05.

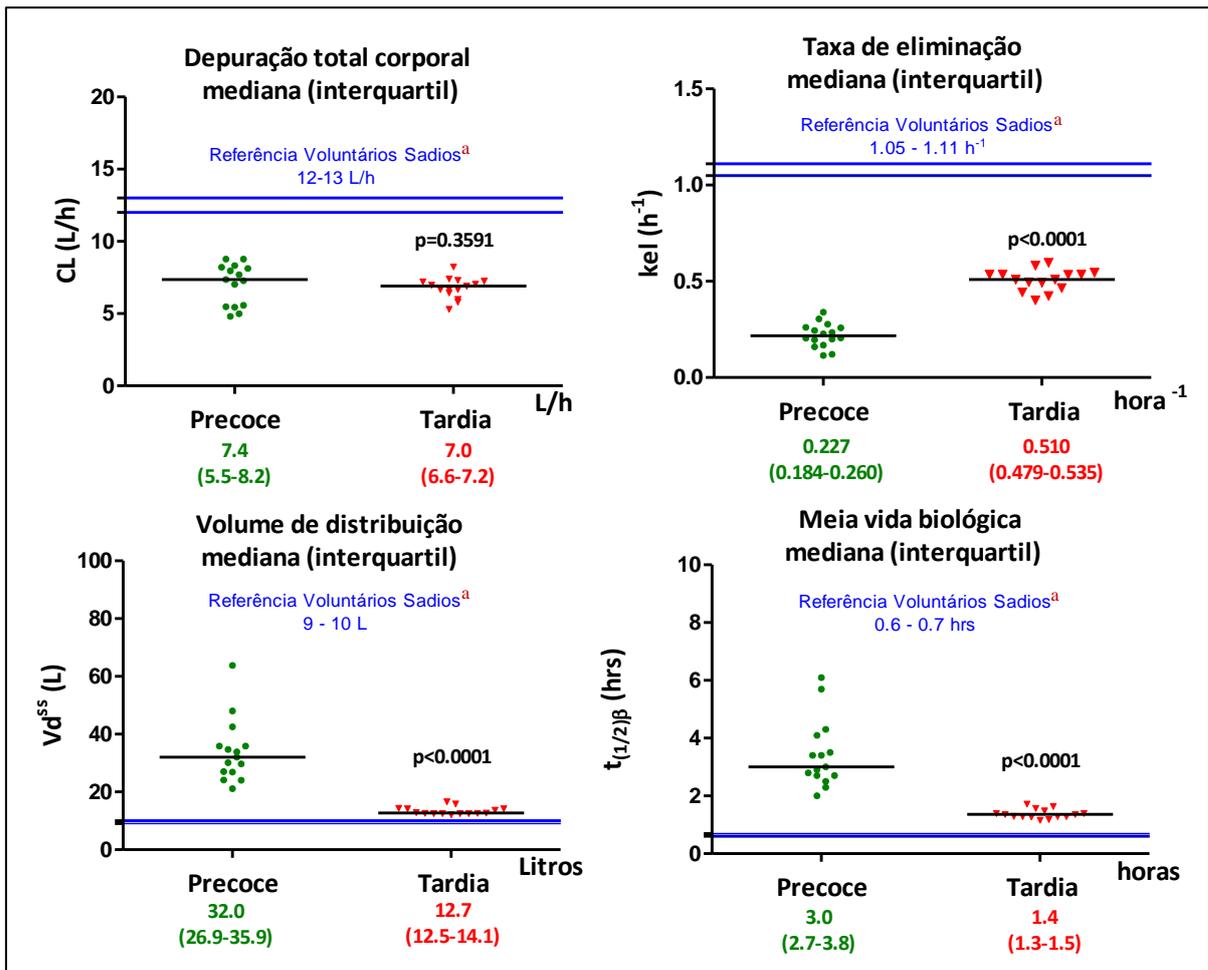
4.10 ALTERAÇÕES DA FARMACOCINÉTICA DO MEROPENEM COMPARADA AOS VALORES DE REFERÊNCIA REPORTADOS EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

A farmacocinética do Meropenem mostrou-se alterada nos pacientes estudados, durante o choque séptico, frente aos dados reportados em voluntários sadios, por redução da taxa de eliminação, por redução da depuração total corporal e por prolongamento da meia vida

biológica. Adicionalmente, os valores de referência descritos em voluntários sadios por Jaruratanasirikul e Sriwiriyan (2003) foram incluídos e os resultados são ilustrados na Figura 7.

Figura 7 – Farmacocinética do Meropenem em pacientes sépticos grandes queimados, comparados a farmacocinética reportada em voluntários sadios

Alterações na Farmacocinética do Meropenem durante a terapia do choque séptico frente os valores de referência reportados em voluntários sadios



Abreviaturas: $t_{(1/2)\beta}$ meia vida biológica; CL_T : depuração total corporal; Vd^{ss} volume de distribuição.

Estatística: Prism v.5.0 medianas; Wilcoxon: dados pareados; significância $p<0,05$.

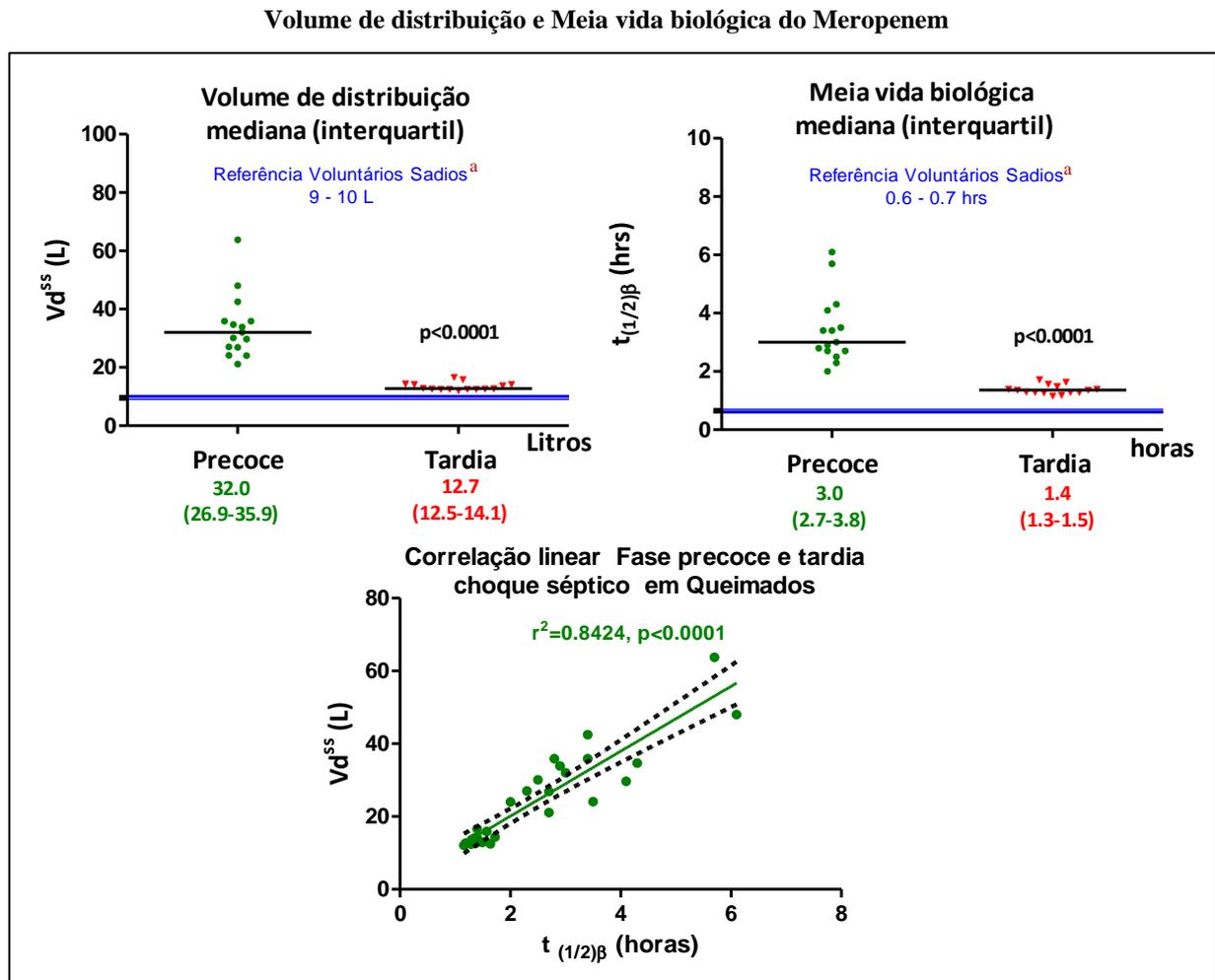
Fonte: Jaruratanasirikul e Sriwiriyan, 2003^a

4.11 IMPACTOS DO VOLUME DE DISTRIBUIÇÃO DO MEROPENEM

Na figura 8 observamos a alteração do volume de distribuição do meropenem e o prolongamento do tempo de meia vida biológica, que garantiram a cobertura antimicrobiana

durante a fase precoce para patógenos com CIM 4 mg/L e na fase tardia do choque séptico contra os patógenos susceptíveis com CIM 1 mg/L.

Figura 8 – Proporcionalidade das alterações entre o volume aparente e a meia-vida biológica do meropenem em pacientes grandes queimados mostrou correlação linear durante o choque séptico, fase precoce e tardia.



Abreviaturas: $t_{(1/2)\beta}$: meia vida biológica; Vd^{ss} : volume de distribuição.

Estatística: Wilcoxon Prism v.5.0; mediana (interquartil), significância estatística $p < 0,05$. Teste de correlação linear, Prism v.5.0, média (IC95).

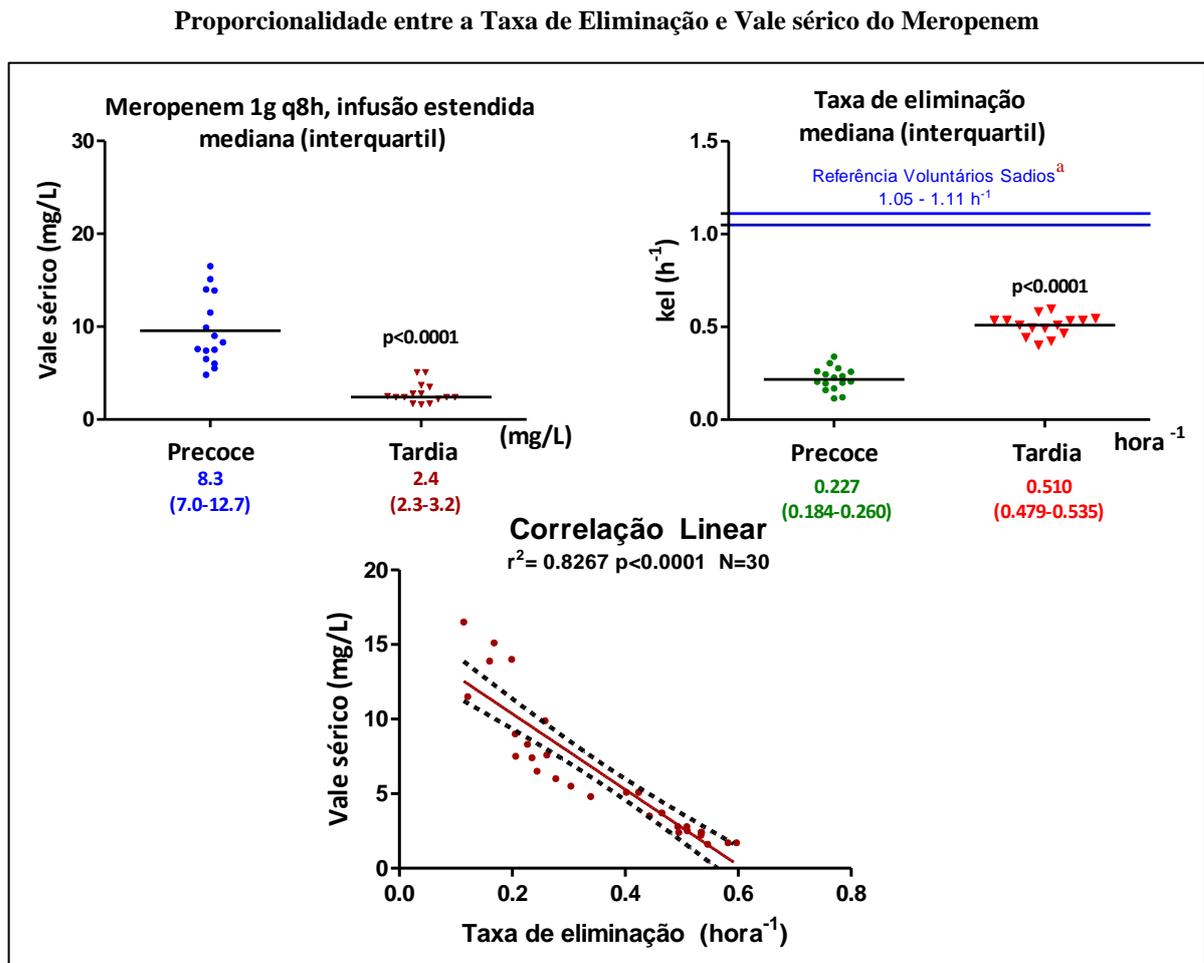
Fonte: Jaruratanasirikul e Sriwiryajan, 2003^a

Registrou-se estreita relação entre a meia vida biológica prolongada em decorrência do aumento do volume de distribuição, em ambas as fases do choque séptico.

4.12 NÍVEIS SÉRICOS E TAXA DE ELIMINAÇÃO DO MEROPENEM

Na figura 9 observa-se a redução do vale sérico em consequência do aumento da taxa de eliminação na fase tardia do choque séptico.

Figura 9 – Proporcionalidade entre a taxa de eliminação e o vale sérico do meropenem em pacientes grandes queimados mostrou correlação linear durante o choque séptico, fase precoce e tardia.



Abreviaturas kel: depuração total corporal.

Estatística: Wilcoxon Prism v.5.0, mediana (interquartil), significância estatística $p < 0,05$. Teste de correlação linear, Prism v.5.0, média (IC95).

Fonte: Jaruratanasirikul e Sriwiriyan, 2003^a

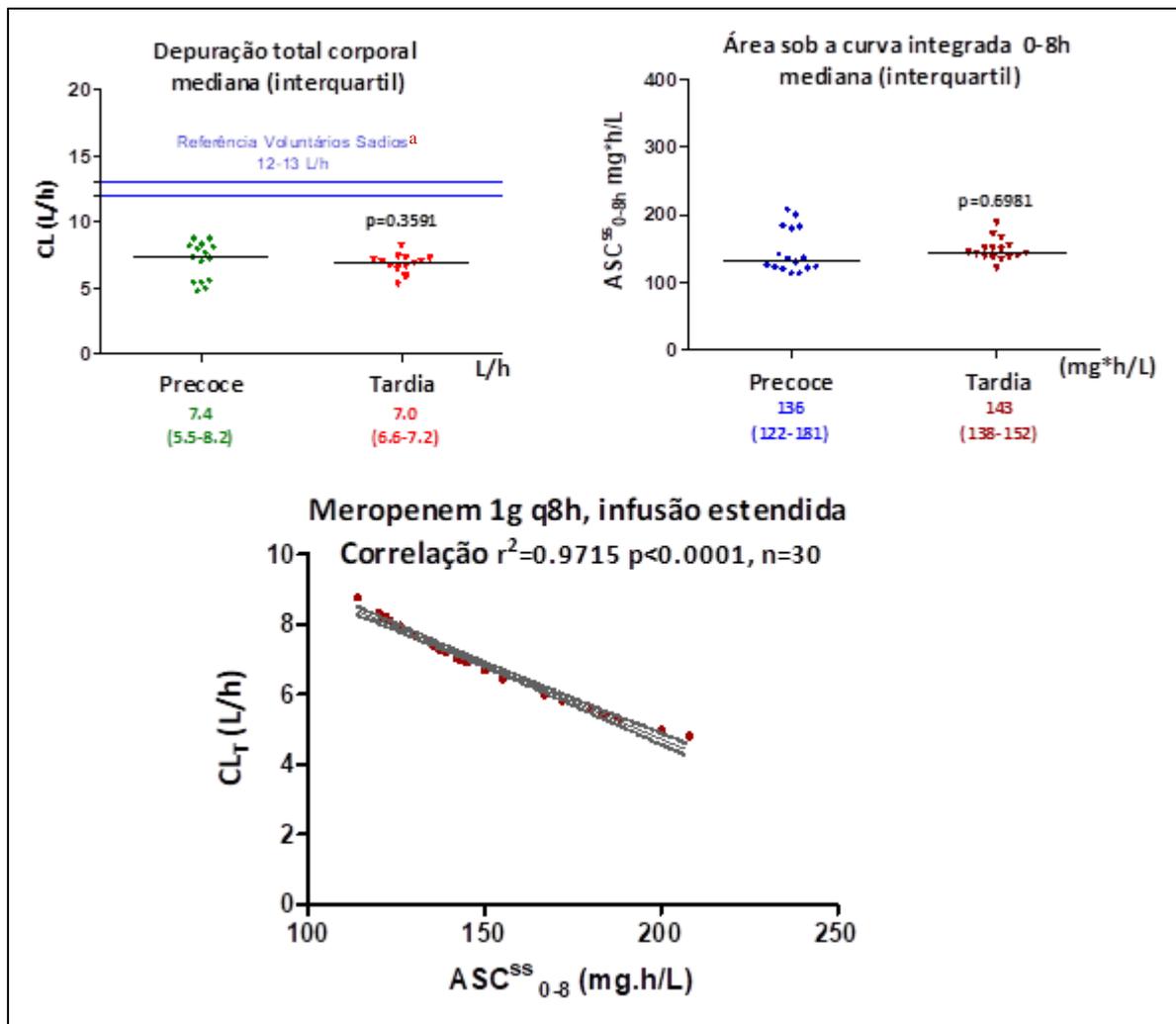
Registrou-se aumento do vale sérico em função da redução da taxa de eliminação na fase precoce do choque séptico em devido a acentuada resposta sistêmica inflamatória (SIRS).

4.13 DEPURAÇÃO TOTAL CORPORAL *versus* SIRS

A figura 10 nos mostra a depuração total corporal durante a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e a concentração plasmática (ASC^{SS}_{0-8h}) de fármaco livre. Esta figura evidencia que a depuração corporal total está reduzida em aproximadamente 50%, apesar da secreção tubular ativa e da filtração glomerular estarem preservada e demonstra que a concentração do fármaco (ASC^{SS}) na fase precoce e tardia permanece estável.

Figura 10 – Proporcionalidade entre a depuração total corporal e a disponibilidade sistêmica do meropenem infundido (ASC^{SS}_{0-8}) em pacientes grandes queimados

Depuração total corporal em pacientes grandes queimados em SRIS comparada a referência em Voluntários saudios



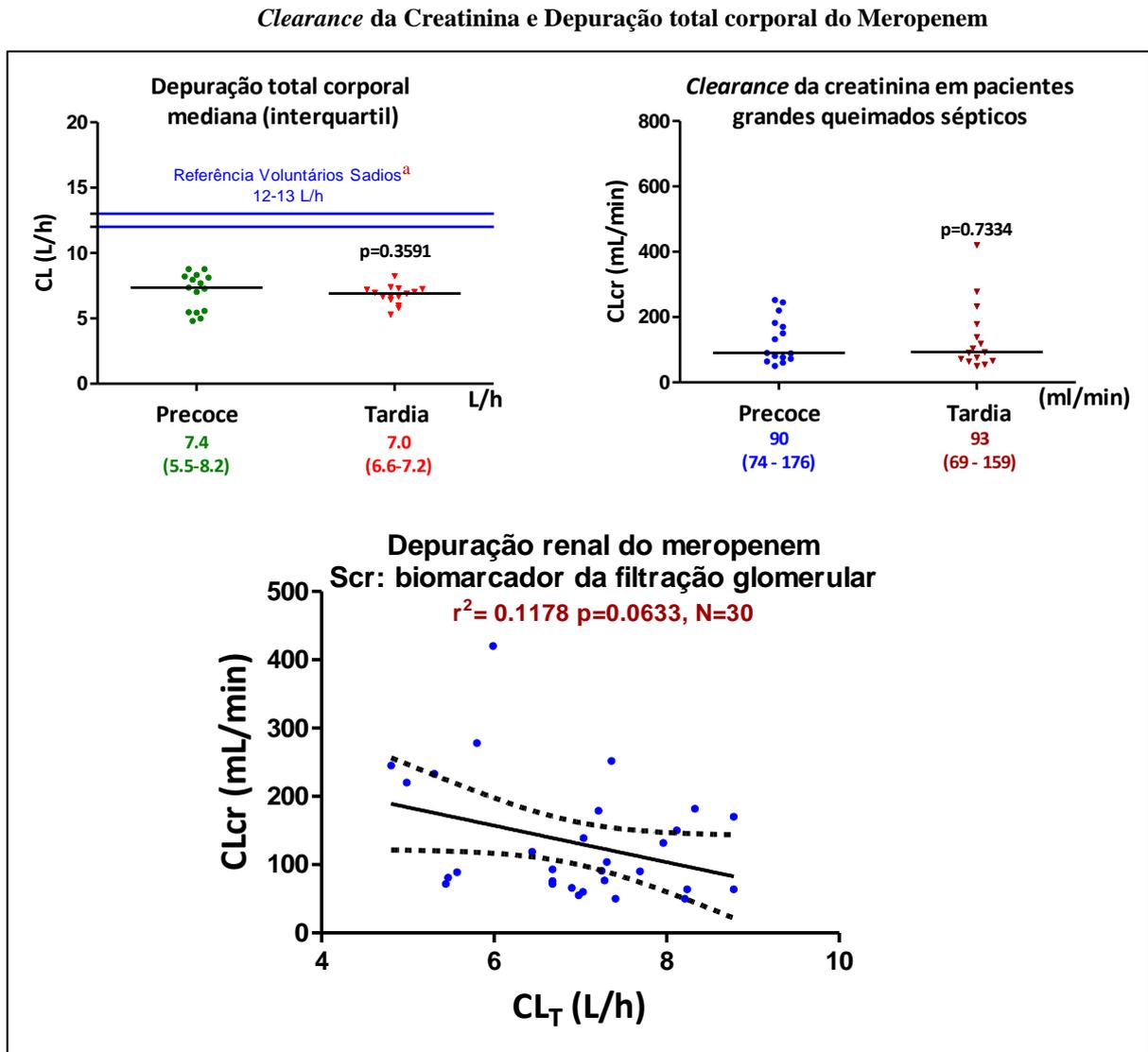
Abreviaturas: CL_T – depuração total corporal; ASC^{SS}_{0-8} : área sob a curva no intervalo de dose.

Teste de Estatística: Wilcoxon Prism v.5.0. mediana (interquartil), significância estatística $p<0,05$. correlação linear Prism v.5.0, média (IC95)

Fonte: Jaruratanasirikul e Sriwiriyan, 2003^a

4.14 DEPURAÇÃO TOTAL CORPORAL *versus* CLEARANCE DA CREATININA

Figura 11 – Depuração total corporal do meropenem reduzida nos pacientes grandes queimados durante o choque séptico, apesar da filtração glomerular preservada nas fases precoce e tardia do choque séptico.



Abreviaturas: CL_T: depuração total corporal; Clcr: Clearance da creatinina; r²: correlação linear

Estatística: Wilcoxon Prism v.5.0. mediana (interquartil), significância estatística p<0,05. Teste de correlação linear r²: 0.1178 p=0,0633. Prism v.5.0, média (IC95).

Fonte: Jaruratanasirikul e Sriwiriyan, 2003^a

Não existe correlação linear entre o *Clearance* da Creatinina e a depuração total corporal durante o choque séptico nos pacientes investigados.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se a alteração da farmacocinética e seu impacto na cobertura do Meropenem nos pacientes críticos grandes queimados com função renal preservada, após regime de dose de 1 g q8h com infusão estendida, período precoce e período tardio do choque séptico. A quantificação no soro de beta-lactâmicos não é realizada pelo laboratório central dos hospitais rotineiramente, tal fato se deve fundamentalmente, a falta de instrumentação analítica adequada e de alto custo para os hospitais, visto que tais dosagens são realizadas na Central Analítica de Institutos de Desenvolvimento e Pesquisa através da cromatografia líquida UV-VIS ou LC MS/MS. Na falta desses equipamentos não é possível efetuar esse monitoramento de suporte laboratorial especializado de apoio à prescrição médica. Assim, o desfecho desejado não é atingido apenas com base na evolução clínica do paciente. Então, a intervenção precoce do médico intensivista fica prejudicada relativa à alteração da prescrição médica para otimizar a terapia pelo ajuste de dose em tempo real (CARLIER et al., 2015).

O uso frequente de vasopressores nestes pacientes resultará na redução de níveis séricos de beta-lactâmicos, que atingem níveis séricos inferiores aos níveis séricos requeridos, para eliminação total dos patógenos hospitalares, provocando o surgimento de patógenos multirresistentes e aumento de óbitos na UTI. Inúmeros estudos prospectivos controlados evidenciam alterações farmacocinéticas de antimicrobianos hidrofílicos nos pacientes críticos queimados e não queimados durante o choque séptico. Nestes casos o antimicrobiano não atingirá níveis efetivos nos tecidos moles e no osso, independentemente do tipo de infusão e dose 1 g q8h, portanto ocorrerá o desenvolvimento de resistência bacteriana nesses pacientes (ABDUL-AZIZ et al., 2015). Analisou-se a efetividade do meropenem, indicado por (ABDUL-AZIZ et al., 2016) para verificar-se a cobertura do carbapenêmico na fase precoce do choque séptico, após o regime de 1g q 8h. Os pesquisadores relataram qualidade superior nos resultados obtidos, na comparação da infusão estendida à intermitente naquele regime de dose a partir do novo índice de efetividade de 100% $f\Delta T > MIC$ testado, visto que a cobertura foi garantida até CIM 8 mg/L, considerando-se o novo índice (KUPA, 2019).

Em revisão realizada sobre a farmacocinética e a cobertura do Meropenem após infusão estendida de 3 horas, na qual foram realizados estudos prospectivos controlados em pacientes adultos críticos queimados e não queimados, apresentamos os resultados obtidos na tabela 7.

Destaca-se que os resultados da farmacocinética foram incluídos a partir de estudo conduzido em voluntários saudáveis, recebendo o mesmo regime de dose e tipo de infusão, para se investigar as alterações que ocorrem nos pacientes críticos durante o choque séptico.

A alteração na farmacocinética que ocorreram nesses pacientes queimados e não queimados foi registrada pela comparação aos resultados reportados por Jaruratanasirikul e Sriwiriyan (2003) em voluntários saudáveis, refletiram-se fundamentalmente no prolongamento da meia-vida biológica em decorrência do aumento do volume de distribuição nos pacientes críticos adultos (JARURATANASIRIKUL; SRIOWIRIYAJAN; PUNYO, 2005; DE WAELE et al., 2014; MATTIOLI et al., 2016; SILVA JR. et al. (2017); KUPA, 2019).

Por outro lado, apesar do alvo terapêutico de $100\% f \Delta T > MIC$ considerado por Mattioli (2016), os resultados reportados por esses autores para pacientes sépticos não queimados que receberam a mesma dose e tipo de infusão, o PTA (porcentagem de pacientes que atingiram o alvo terapêutico) foi baseada na fração de resposta cumulativa (*cumulative fraction of response: CFR*).

As alterações farmacocinéticas dos beta-lactâmicos são amplamente reportadas, entre os pacientes de UTI, como sendo a principal justificativa para a exposição a antibióticos abaixo da dose efetiva, quando a dose empírica é prescrita para o tratamento de infecções severas. Neste estudo, realizado por Abdul-Aziz et al. (2015), 115 pacientes receberam antibiótico beta-lactâmico por Infusão *Bolus* (IB) e 67 pacientes receberam antibiótico beta-lactâmico por infusão prolongada. Observou-se que 89% dos pacientes não atingiram o alvo PK/PD e permaneceram abaixo de $50\% f T > MIC$ e 27,5% atingiram o alvo acima de $100\% f T > MIC$. Observou-se ao realizar a administração do beta-lactâmico por infusão prolongada, que os pacientes foram 3 vezes mais propensos em atingir o alvo acima de $100\% f T > MIC$. Além da forma de administração, é importante considerar que os beta-lactâmicos são eliminados pelos rins, portanto se houver aumento da função renal haverá aumento do *clearance* Renal do Meropenem podendo reduzir a concentração do fármaco e o índice de efetividade. Para atingir a cura clínica deve-se considerar a gravidade da doença, sabemos que a administração do fármaco por infusão prolongada poderá promover maior concentração do fármaco no fluido intersticial dos tecidos pulmonares infectados, onde ocorre a interação antibiótico-bactéria. Por fim, o estudo demonstrou que a administração de meropenem por infusão prolongada otimiza os resultados clínicos em pacientes graves e particularmente em pacientes com infecções respiratórias (ABDUL-AZIZ et al., 2015).

É fato que pacientes críticos queimados apresentam alta taxa de mortalidade por infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes. Em estudo realizado para

identificar os fatores de risco, foram incluídos 21 pacientes, com características demográficas semelhantes, admitidos em unidade de tratamento intensivo de queimados (UTI-Q), os pacientes foram avaliados individualmente com aplicação do índice *Acute Burn Severity Index* (ABSI- Índice de Gravidade Aguda da Queimadura), para o qual determinou-se o critério de $p\text{-valor} < 0,25$, que foi considerado fator de risco potencial. A alta mortalidade entre os pacientes queimados graves está relacionada com as lesões na pele, que provocam a perda da barreira de proteção por ruptura e destruição. A presença de imunossupressão, de comprometimento vascular tecidual, além da necessidade de longos períodos de hospitalização, de diagnósticos invasivos e de inúmeras intervenções cirúrgicas terapêuticas predispõe os pacientes queimados graves à desenvolverem sepse, (com taxas acima de 75%). Os patógenos Gram-negativos multirresistentes têm uma incidência entre 42% e 86% dentre os casos de sepse.

Os patógenos Gram-negativos isolados em UTI-Q com maior frequência (70%) são *Pseudomonas aeruginosas*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sp.*

As cepas produtoras de beta-lactamase são cada vez mais comuns nas comunidades e em estabelecimentos de saúde, portanto são uma preocupação de saúde pública. Estima-se que as cepas produtoras de beta-lactamase são a causa de 26.000 infecções e 1.700 mortes por ano. O aumento do uso de carbapenêmicos pode selecionar micro-organismos resistentes. Uma estratégia para reduzir o uso global de carbapenêmicos é reavaliar agentes alternativos em combinação com inibidores de beta-lactamase, tais como a Piperacilina-Tazobactam, considerada uma opção poupadora de carbapenem para tratamento de infecções por cepas Gram-negativas beta-lactamase. Constatou-se que a exposição prévia ao Meropenem, a presença de colônias de cepas Gram-negativas na admissão do paciente, a necessidade de escarotomia, a espessura parcial superficial, o tamanho da superfície corporal queimada são fatores potencialmente importantes para aumentar o risco de infecção por patógeno Gram-negativos MDR nestes pacientes (VICKERS et al., 2018).

Em estudo realizado por Harris et al. (2018) para testar a hipótese de utilizar Piperacilina-Tazobactam no tratamento de infecções na corrente sanguínea (BSI), foram incluídos 378 pacientes. O tratamento com Meropenem na dose empírica foi administrado para 191 pacientes, que receberam 1g q 8h, por administração intravenosa (I.V.), por infusão de 30 minutos; 187 pacientes receberam Piperacilina-Tazobactam na dose empírica de 4,5g q 6h, I.V., por infusão de 30 minutos. O tempo de tratamento variou de 4 dias até no máximo 14 dias, todos os pacientes foram acompanhados por 30 dias. Os dados clínicos foram registrados diariamente, a partir do dia de hemocultura positiva inicial até o dia 5 após a randomização (sendo o dia 1, o dia da randomização, que teve que ocorrer dentro de 72 h da coleta inicial da

hemocultura). No dia da randomização 40,7% dos pacientes tiveram os marcadores resolvidos objetivos de infecção, considerado como resolução clínica e microbiológica. Para o desfecho primário foi estabelecido mortalidade por todas as causas após 30 dias, posterior à randomização. O desfecho secundário adotado foi tempo de resolução clínica e microbiológica da infecção, definido como o número de dias desde a randomização até a resolução, febre > 38 °C e leucocitose (contagem células sanguíneas brancas > 12000 / μ L). Constatou-se semelhança entre os grupos, a taxa de mortalidade, observada no grupo tratado com Piperacilina-Tazobactam obtida, permaneceu alterada e a taxa de mortalidade no grupo tratado com Meropenem foi de 40,3%. Concluiu-se que em pacientes com infecção sanguínea por *E. coli* ou *Klebsiella pneumoniae* resistentes à Ceftriaxona, o tratamento definitivo com Piperacilina-Tazobactam em comparação com Meropenem não resulta em mortalidade menor que 30 dias, portanto, esses resultados não apoiam o uso de Piperacilina- Tazobactam nesse cenário (HARRIS et al., 2018).

Em estudo epidemiológico retrospectivo realizado para avaliar a influência de infecção da corrente sanguínea e a mortalidade, identificou-se que este sítio infeccioso está associado a um aumento significativo da morbidade e utilização de recursos, além de estar relacionado com necessidade de ventilação mecânica e internação por períodos mais longos.

Em agosto de 2014, houve uma explosão maciça de poeira de alumínio em uma fábrica na China, onde 185 pessoas foram gravemente feridas, entre as quais a mediana da área de superfície corporal queimada foi de 95%. Este grande número de pacientes permitiu avaliação confiável da relação entre resultados e infecção na corrente sanguínea.

O estudo foi realizado em 20 UTI-Q por 90 dias e o desfecho médio medido foi mortalidade no intervalo de 90 dias. Na admissão, os pacientes foram avaliados usando índice *Acute Physiology and Chronic Health Evolution II* (APACHE II), escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) e *Abbreviated Burn Severity Index* (ABSI). Segundo o critério da *American Burn Association* (ABA) para *Blood Stream Infection* (BSI), que define o episódio de BSI como um período distinto de doença clínica associada a hemoculturas positivas, as infecções polimicrobianas da corrente sanguínea são aquela que tem dois ou mais organismos isolados de uma, ou mais hemocultura durante o mesmo episódio de infecção (BSI). Dentre 185 pacientes incluídos no estudo, três não apresentaram resultados microbiológicos e cinco foram a óbito em menos de 72 horas e 177 pacientes foram analisados. A idade média de 38 anos (IQR 30-43), 54,8% pacientes era do sexo masculino. A superfície corpórea total queimada (SCTQ) média de 95% (IQR 85% e 98%). Lesão por inalação ocorreu em 97,2%. O desfecho mensurado foi mortalidade geral em 90 dias de 35% (62/177). Em comparação dentre pacientes que não

apresentaram BSI e os pacientes que apresentaram BSI, observou-se que a presença de BSI foi relacionada com a presença de maiores % SCTQ, maior profundidade das lesões, índice SOFA mais alto, internação em UTI mais prolongada, necessidade de uso de ventilação mecânica por período mais longo e maior mortalidade bruta de 60 dias e mortalidade de 90 dias e por fim o grupo de pacientes com BSI teve seis vezes maior chance de mortalidade. Presume-se que a fonte primária de BSI seja a translocação através de uma ferida por queimadura por um cateter e outras fontes, tais como respiratória ou translocação intestinal, ou outra fonte que poderia ter coexistido. Este fato destaca a importância de cuidados preventivos com os cateteres (CVC), em pacientes gravemente queimados (TANG et al., 2017).

Em busca de alcançar os resultados clínicos desejados e suprimir o surgimento de patógenos multirresistentes (MDR), devem ser aplicados os princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos na forma de estratégia para otimização de doses em terapias antimicrobianas, em busca de maximizar a probabilidade de atingir a concentração (PTA) desejada do beta-lactâmico (DHAESE et al., 2018).

É comum o uso de beta-lactâmicos em UTIs para tratamento de infecções severas, devido ao seu amplo espectro de ação e a capacidade de eliminar as bactérias, quando a concentração de fármaco livre permanece acima da concentração mínima inibitória (CIM) de crescimento do patógeno.

Para aprimorar os resultados dos tratamentos com antibióticos e conseqüentemente reduzir o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana é recomendado aplicar *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) que consiste em aumentar a eficácia e limitar a toxicidade dos antibióticos, que possuem janela terapêutica estreita, por exemplo, a vancomicina e os aminoglicosídeos. A crescente disponibilidade de técnicas de dosagem rápida de medicamentos no plasma, viabiliza monitorar as concentrações sanguíneas de antibióticos em tempo real, para melhor eficácia, para evitar a sub-dosagem, que podem favorecer o crescimento bacteriano e o surgimento de microorganismos resistentes e para evitar a super dosagem que pode acentuar a toxicidade. Os pacientes queimados graves apresentam o metabolismo alterado com a presença de flutuações drásticas na eliminação de fármacos, modificações rápidas no volume de distribuição, alterações da função renal, alterações no tempo de meia vida biológica do fármaco, portanto necessitam de modificações das doses padronizadas de antibióticos.

Em estudo prospectivo, monocêntrico, com seguimento por 3 anos com o objetivo de determinar a extensão da sub e super dosagem de antibióticos e avaliar o impacto da aplicação do TDM sistemático com dose em tempo real no mesmo dia, foram realizadas intervenções para atingir e manter as concentrações de antibióticos no intervalo de dose terapêutica. Foi

realizado ensaio clínico controlado, randomizado. Foram selecionados 38 pacientes, sendo 19 pacientes, grupo controle, os quais receberam tratamento com a dose empírica de antibiótico padronizado em bula e 19 pacientes, grupo intervenção, foram submetidos a monitoramento terapêutico em tempo real, com ajuste de dose no mesmo dia. Os resultados do estudo demonstraram impacto significativo do TDM, em tempo real, com a adaptação da dose padrão de antibióticos. Portanto, o estudo demonstrou que o TDM sistemático é uma intervenção viável, útil e indicada para superar a variação farmacocinética e evitar a sub e a super dosagem do antibiótico e ainda que o TDM contribui especialmente no tratamento de pacientes com depuração renal aumentada (FOURNIER et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

Registraram-se alterações na farmacocinética do Meropenem nos pacientes sépticos investigados no protocolo, pela comparação aos dados reportados para voluntários saudáveis. Registrou-se ainda significativa alteração da farmacocinética pela comparação dos dados obtidos na fase precoce com os da fase tardia relativamente à taxa de eliminação, meia vida biológica e o volume de distribuição. Estas alterações registradas na farmacocinética nas duas fases do estudo impactaram de forma diferente a cobertura do Meropenem nas duas fases do estudo contra patógenos de susceptíveis, uma vez que se registrou a cobertura contra patógenos de susceptibilidade intermediária (CIM 4 mg/L) apenas na fase precoce do choque séptico. O desfecho clínico esperado foi atingido pela cura clínica e microbiológica obtida para todos os pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-AZIZ, M. H.; LIPMAN, J.; AKOVA, M.; BASSETTI, M.; et al. Is prolonged infusion of piperacillin/tazobactam and meropenem in critically ill patients associated with improved pharmacokinetic/ pharmacodynamic and patient outcomes? An observation from the Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit patients (DALI) cohort. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. n. 71, p. 196-207, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv288>. Acesso em: 13 jan. 2020
- ABDUL-AZIZ, M. H.; LIPMAN, J.; MOUTON, J. W.; HOPE, W. W.; et al. Applying pharmacokinetic/pharmacodynamic principles in critically ill patients: optimizing efficacy and reducing resistance development. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 136-153, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398490>. Acesso em: 24 out. 2020.
- ASTRAZENECA. Label: MERREM I.V. (meropenem for injection), for intravenous use Initial U.S. Approval: 1996. **MERREM I.V.** is a registered trademark of the AstraZeneca group of companies. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/050706s037lbl.pdf. Acesso em: 14 out. 2020.
- ASTRAZENECA. MERONEM I.V.: Meropeném. Identificação do Medicamento. Embalado por: AstraZeneca do Brasil Ltda. Disponível em: https://www.astrazeneca.com.br/content/dam/az-br/Medicine/medicine/pdf/Meronem_Paciente.pdf. Acesso em: 14 out. 2020.
- BITTNER, E. A.; SHANK, E.; WOODSON, L.; MARTYN, J. A. J. et al. Acute and perioperative care of the burn injured patients. *Anesthesiology*, v. 122, n. 2, p. 448-464, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000559>. Acesso em: 15 abr. 2020
- BOLHUIS, M. S.; PANDAY, P. N.; PRANGER, A.D.; KOSTERINK, J. G.; et al., Pharmacokinetic drug interactions of antimicrobial drugs: a systematic review on oxazolidinones, rifamycines, macrolides, fluoroquinolones, and Beta-lactams. **Pharmaceutics**, v.18, n. 4, p. 865-913, 2011. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040865>. Acesso em: 08 ago. 2020
- BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **DOU**, Publicado: 25/07/2017, Edição: 141, Seção: 1, p. 87. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017. Acesso em: 25 mar. 2021.
- CARRIER, M.; STOVE, V.; WALLIS, S. C.; DE WAELE, J.; et al. Assays for therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics: a structured review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 4, p. 367-75, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.016>. Acesso em: 05 mar. 2019

CITRON, I.; AMUNDSON, J.; SALUJA, S.; GUILLOUX, A.; et al. Assessing burn care in Brazil: An epidemiologic, cross-sectional, nationwide study. **Surgery**, v. 163, n. 5, p. 1165-1172, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.11.023>. Acesso em: 14 jun. 2019

COCKCROFT, D. W.; GAULT, M. H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron**, v.16, n.1, p. 31-41, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000180580>. Acesso em: 12 out 2018

COMISSÃO DE CONTROLE DE INFECÇÕES HOSPITALARES DO HOSPITAL DAS CLINICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (CCIH-HCFMUSP). **Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares**. 5 ed. São Paulo: Hospital das Clínicas, 2018-20. Acesso em: 18 set 2019

DE WAELE, J.; CARLIER, M.; HOSTE, E.; DEPUYDT, P.; et al. Extended versus bolus infusion of meropenem and piperacillin: Pharmacokinetic analysis. **Minerva Anesthesiol**, v. 80, n. 12, p. 1302-1309, 2014. Acesso em: 08 abr. 2019

DHAESE, S. A. M.; DEKEZEL, M; CALLANT, M.; BOELENS, J. et al. Emergence of antimicrobial resistance to piperacillin –tazobactam or meropenem in the ICU: intermittent versus continuous infusion. A retrospective cohort study. **Journal of Critical Care**, v. 47, p. 164-168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2018.07.003>. Acesso em: 02 abr. 2020

FOURNIER, A.; EGGIMANN, P.; PANTET, O.; PAGANI, J. L.; et al. Impact of real-time therapeutic drug monitoring on the prescription of antibiotics in burn patients requiring admission to the Intensive Care Unit. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. e01818-17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01818-17>. Acesso em: 05 abr. 2020

GOMEZ, D. de S.; GIRAUD, C. S.; SILVA JUNIOR, C. V. da.; OLIVEIRA, A. M. R. R. de; et al. Imipenem in burn patients: pharmacokinetic profile and PK/PD target attainment. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 68, p. 143-147, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ja.2014.121>. Acesso em: 26 out. 2018

GREENHALGH, D. G. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. **Burns & trauma**, v. 5, n. 23, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s41038-017-0089-5>. Acesso em: 29 abr. 2019

HARRIS, P. N. A.; TAMBYAH, P. A.; LYE, D. C.; MO, Y.; et al. Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients With E coli or Klebsiella pneumoniae Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 320, n. 10, p. 984-994, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.12163>. Acesso em: 05 abr. 2020

IKAWA, K.; MORIKAWA, N.; IKEDA, K. J.; OHGE, H.; et al. Development of breakpoints of carbapenems for intra-abdominal infectious based on pharmacokinetics and pharmacodynamics in peritoneal fluid. **J Infect Chemother**, v.14, n. 4, p. 330-332, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10156-008-0624-1>. Acesso em: 5 nov. 2018

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. ICH E6(R2). Good Clinical Practice: Integrated Addendum to ICH E6 (R1)2018. <http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-document/e6r2-good-clinical-practice-integrated-addendum-ich-e6r1>. Acesso em: 19 out 2018

JARURATANASIRIKUL S.; SRIOWIRIJAJAN, S.; PUNYO J. Comparison of pharmacodynamics of meropenem in patients with ventilator-associated pneumonia following administration by 3-hour infusion or bolus injection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1337-1339, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1337-1339.2005>. Acesso em: 15 jun. 2019

JARURATANASIRIKUL S; SRIWIRIJAJAN S, Stability of meropenem in normal saline solution after storage at room temperature. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 34, n. 3, p. 627-9, 2003. Acesso em: 7 maio 2019

KUPA, L. de V. K. **Modelagem PK/PD na terapia antimicrobiana com carbapenêmico em pacientes sépticos críticos grandes queimados? Estudo da efetividade do meropenem administrado através de infusão intermitente versus estendida?** 2019. 70 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, 2019. Acesso em: 23 out. 2019

LACHIEWICZ, A. M.; HAUCK, C. G.; WEBER, D. J.; CAIRNS, B. A.; et al. Bacterial Infections After Burn Injuries: Impact of Multidrug Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 12, p. 2130-2136, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cix682>. Acesso em: 26 maio 2019

LANGAN, K. M.; JACOB, J.; LI, J.; NATION, R. L.; et al. Pharmacokinetics of short versus extended infusion meropenem dosing in critically ill patients: A pilot study. **Crit Care Resusc.**, v. 16, n. 3, p. 190-6, 2014. Acesso em: 13 set 2018

MACHADO, A. S.; OLIVEIRA, M. S.; SANCHES, C.; SILVA JR, C. V.; et al. Clinical Outcome and Antimicrobial Therapeutic Drug Monitoring for the Treatment of Infections in Acute Burn Patients. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 8, p. 1649-1657e3. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.06.008>. Acesso em: 14 maio 2019

MATTIOLI, F.; FUCILE, C.; BONO, V. D.; MARINI, V.; et al. Population pharmacokinetics and probability of target attainment of meropenem in critically ill patients. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 72, n. 7, p. 839-848. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00228-016-2053-x>. Acesso em: 14 jun. 2019

MOUTON, J. W.; VAN DEN ANKER, J. N. Meropenem Clinical Pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet**, v. 28, p. 275-286, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00003088-199528040-00002>. Acesso em: 10 maio 2019

MURARI., A.; SINGH, K. N. Lund and Browder chart-modified versus original: a comparative study. **Acute and Critical Care**, v. 34, n. 4, p. 276-281, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4266/acc.2019.00647>. Acesso em: 10 nov. 2020

NIELSON, C. B.; DUETHMAN, N. C.; HOWARD, J. M.; MONCURE, M.; et al. Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. **Journal of Burn Care & Research**, v. 38, n. 1, p. e469-e48. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/BCR.0000000000000355>. Acesso em: 13 maio 2019

NUNEZ, L. O.; CAMBIASO-DANIEL, J.; BRANSKI, L. K.; NORBURY, W. B.; et al. Predicting and managing sepsis in burn patients: current perspectives. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.13, p. 1107-1117, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/TCRM.S119938>. Acesso em: 13 maio 2019

PUBCHEM. **National Institutes of Health (NIH)**. Disponível em: 10 jan <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 22 out. 2020.

RHODES, A.; EVANS, L. E.; ALHAZZANI, W.; LEVY, M. M.; et. al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Med.**, v. 43, n. 3, p. 304-77. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>. Acesso em: 18 jan. 2019

SANTOS, J. V.; SOUZA, J.; AMARANTE, J.; FREITAS, A. Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014: A Nationwide Hospital-Based Study. **World J Surg**, v. 41, p. 2006-2012, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00268-017-3988-5>. Acesso em: 14 jun 2019

SANTOS, S.; SANCHES-GIRAUD, C. F.; DE SOUZA, F.; GÓMEZ, D.; et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Correlation for Meropenem Applied To A Burn Child Using A Bioanalytical Liquid Chromatographic Method. **Revista Portuguesa De Farmacoterapia**, v. 3, n. 4, p. 4-12, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.25756/rpf.v3i4.79>. Acesso em: 8 out 2018

SILVA JR., J. M.; KUPA, L. D. K.; OLIVEIRA, A. M. R. R.; SILVA JR., C. V.; SANTOS, S. R. C. J.; GOMEZ, D. S. Meropenem effectiveness in septic burn patients by comparison of extended infusion versus fast infusion against susceptible strains based on drug plasma measurements done in a real time. **BCM Critical Care**, v. 21(supl. 2), p. 31-31, 2017. Acesso em: 23 maio 2019

TANG, C. Q.; LI, J. Q.; SHOU, B. M.; PAN, B. H.; et al. Epidemiology and outcomes of bloodstream infections in 177 severe burn patients from an industrial disaster: a multicenter retrospective study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, p. 199.e1-199.e7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.009>. Acesso em: 10 abril 2020

VEIGA, R. P.; PAIVA, J. A. Pharmacokinetics–pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta lactam antibiotics in critically ill patients. **Critical Care**, v. 22, p. 233, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2155-1>. Acesso em: 14 jun. 2019

VICKERS, M. L.; DULHUNTY, J. M.; BALLARD, E.; CHAPMAN, P.; et al. Risk factors for multidrug resistant Gram-negative Infection in burn patients. **Plastic and Reconstructive Surgery**. **ANZ Journal of Surgery**, v. 88, n. 5, p. 480- 485, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ans.14144>. Acesso em: 13 maio 2019

WESTPHAL, G. A.; SILVA, E.; SALOMÃO, R.; BERNARDO, W. M.; et al. Diretrizes para o tratamento da sepse grave/ choque séptico – ressuscitação hemodinâmica. **Rev. Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 1, p. 13-23, 2011.

Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbti/v23n1/a04v23n1>. Acesso em: 20 mar 2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for trauma quality improvement programmes**, 2018. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 24 out. 2020.

YASTI Ç. A.; ŞENEL, E.; SAYDAM, M.; ÖZOK, G.; et al. Guideline and Treatment Algorithm for Burn Injuries. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.**, v. 21, n. 2, p. 79-89, 2015.

<https://doi.org/10.5505/tjtes.2015.88261>. Acesso em: 30 maio 2019

APÊNDICE I
ETAPA ANALÍTICA

ETAPA ANALÍTICA

1) ETAPA ANALÍTICA

QUANTIFICAÇÃO DE MEROPENEM NO SORO

Sistema analítico

A quantificação do antimicrobiano na matriz biológica (soro) foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se método bioanalítico desenvolvido e validado anteriormente segundo as recomendações da Agência Regulatória (RDC 27/2012, ANVISA) para o meropenem no Laboratório Bioanalítico, Centro de Farmacocinética Clínica Bloco 13B 1º andar, Depto Farmácia (FCF-USP). Realizou-se para a consecução da Etapa Analítica do protocolo o estudo de validação parcial do método bioanalítico desenvolvido e validado anteriormente (SANTOS et al., 2011).

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência consistiu de cromatógrafo modelo LC-10A Shimadzu (Kyoto, Japão) microprocessado pelo software CLASS VP, equipado com bomba LC-10AVP; controladora SCL-10AVP, auto-injetor SIL- 10ADVP e detector UV-VIS modelo SPD-10AVP operando no ultravioleta em 306 para quantificação do analito.

Empregou-se coluna analítica de fase reversa octadecil e fase móvel binária no sistema cromatográfico. Os picos foram eluídos de coluna em sistema isocrático de eluição (0,7 mL/min) à temperatura ambiente. O sistema cromatográfico constou de coluna Shimpak ODS (Shimadzu, Kyoto, Japão) 150x6mm, 5 µm e a fase móvel consistiu na mistura de tampão acetato 0,01M, pH 5,0 e acetonitrila (9:1, v/v). A fase móvel foi preparada diariamente; todas as soluções tampão foram diluídas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q-Milli-DI, Millipore, São Paulo. O pH da fase móvel foi monitorado através de medidor de pH com eletrodo seletivo para mistura aquosa-solvente orgânico (Digimed®, São Paulo, Brasil), previamente à análise cromatográfica. A fase móvel foi de gaseificada com hélio ultrapuro imediatamente antes da estabilização do sistema cromatográfico. Toda a vidraria, e demais materiais não descartáveis utilizados na análise foram lavados com Extran, MERCK (São Paulo, Brasil) enxaguados com água corrente, água purificada e secos à temperatura ambiente em sala climatizada 22° C.

Os extratos purificados de soro dos pacientes foram inseridos na bandeja do sistema de injeção automática juntamente com os calibradores e controles internos de qualidade. A corrida analítica constou da injeção de extratos de calibradores C0, C1- C6 (C1 e C6, duplicatas), extratos purificados obtidos a partir das coletas de sangue dos pacientes intercalados com solução de lavagem e os controles internos de qualidade (CQA, CQM1, CQM2 e CQB).

A curva de calibração diária foi construída plotando-se a razão de área do analito e seu respectivo padrão interno versus a concentração do analito nos calibradores em soro fetal bovino (SFB). A curva do dia foi aceita através da estimativa do erro sistemático inferior a 15% recomendado pela Agência Regulatória para os controles internos de qualidade avaliados paralelamente na corrida analítica. O analito (meropenem) contido nos extratos de soro dos pacientes queimados foram quantificados com base no método do padrão interno a partir da curva de calibração diária.

Reagentes e soluções

Foram utilizados solventes, grau cromatográfico (metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano), e grau analítico (ácido acético glacial e propileno glicol) Merck (Darmstadt, Alemanha). A acetonitrila foi empregada na purificação da matriz/soro, na preparação da fase móvel, e na regeneração dos sistemas analíticos de automação. O tetrahidrofurano e o metanol foram requeridos na limpeza do sistema de cromatografia e da coluna analítica. A água ultrapura (UP) foi obtida a partir da filtração em membrana HA 5 micra, Millipore (São Paulo, SP, Brasil) a partir da água procedente do sistema Milli-Di/cartucho de purificação conectado a água da rede pré- filtrada, Millipore (São Paulo, SP, Brasil). A água UP foi utilizada na preparação da solução tampão da fase móvel de cromatografia, na limpeza diária da tubulação, da coluna analítica e na regeneração do sistema cromatográfico após a finalização da corrida analítica.

Padrões de referência

Utilizaram-se padrões primários (United States Pharmacopeia – Padrão USP) dos analitos e dos padrões internos. Foi utilizado cefepime como padrão interno na análise de meropenem. Os padrões foram armazenados de acordo com a recomendação do fabricante, e mantidos nas embalagens de origem em dessecador mantido ao abrigo da luz em geladeira à

5°C, Metalfrio. O soro fetal bovino estéril, inativado e isento de mycoplasma Vitrocell (Campinas/SP, Brasil) foi utilizado como matriz na preparação da curva de calibração e controles de qualidade.

Preparação da curva de calibração - Revalidação do método

Foram preparadas soluções-padrão estoque (1mg/mL) a partir dos padrões rastreáveis (Padrão USP), as quais foram armazenadas nas mesmas condições dos padrões primários como mencionado anteriormente. A diluição adequada da solução estoque do meropenem foi utilizada na construção da curva de calibração para revalidação da linearidade, precisão e exatidão. Alíquotas de solução padrão do analito foram adicionadas a balões volumétricos (10 mL) contendo soro fetal bovino (SFB) estéril, inativado isento de mycoplasma, Vitrocell (Campinas-SP, Brasil), e o volume foi completado com SFB. As diluições foram realizadas de forma a obter as concentrações de 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,50; 0,25 mg/L fornecendo dez calibradores (C1-C10) incluindo-se ainda o branco (C0) para possibilitar a quantificação do antimicrobiano na faixa de concentração requeridas para o analito. A seguir, foram preparados os controles internos de qualidade para estudo da precisão e exatidão para avaliação da variação intra- e inter-ensaios. Esses controles internos foram preparados em quatro diferentes concentrações: alta (CQA: 80-90% do limite superior de quantificação), média nível 1 e 2 (CQM1 50% CQA, CQM2 25% CQA) e baixa (CQB: 4 vezes o LIQ). A precisão e exatidão intra e inter- dias também foram realizadas, estando os resultados obtidos de acordo com o método bioanalítico reportado anteriormente (SANTOS et al., 2011).

A corrida analítica na revalidação constou dos extratos purificados dos calibradores (C0-C10) da curva de calibração, controles internos de qualidade (CQA, CQM1-2 e CQB, triplicata). A linearidade do método foi $r^2=0,999$ (0,25 – 100 mg/L), com LID e LIQ de 0,1 mg/L e 0,2 mg/L, respectivamente. A exatidão do método foi de 98,9 % e a precisão inter-dia/intra-dia de 2,3/2,0%.

Conforme reportado anteriormente AstraZeneca (1996), considerou-se que a concentração do analito quantificado foi equivalente à concentração da fração livre do fármaco no soro uma vez que a extensão da ligação do meropenem às proteínas plasmáticas é muito reduzida no sangue circulante (KRUEGER et al., 2005).

Preparação das matrizes

A purificação do analito da matriz biológica foi realizada pela precipitação de proteínas com acetonitrila, proporção de 1:3 (v/v). O soro em volumes de 200 µl foi adicionado de 25 µl da solução de padrão interno (Cefepime, solução de adição eq. 50 µg/mL) e 100 µl de tampão MOPS 10% massa/volume [3-(N-morpholino) Propanesulfonicacid]). A precipitação das proteínas do soro ocorreu pela adição de 600 µl de acetonitrila sob agitação em vortex de plataforma. A mistura foi centrifugada a 8000 rpm, 5°C por 30 minutos. O volume de 800 µl do sobrenadante foi transferido para tubo de vidro cônico para concentração dos extratos até à secura sob corrente de nitrogênio purificado. O resíduo foi dissolvido em vortex pela adição de 600 µl de solução de lavagem preparada a partir de água UP e acetonitrila (9:1 v/v) e transferido para o vial no rack para injeção de 5 µl no cromatógrafo.

Estudo populacional e análise estatística

Os programas Excel_2007 (Microsoft Corporation, USA) e GraphPad Prisma v.5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foram utilizados nos cálculos, organização dos dados individuais obtidos e populacionais, bem como na representação gráfica e tratamento estatístico, para efeito de comparação entre grupos e no estudo de correlação. Aplicou-se estatística não paramétrica e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados relacionados às características demográficas da população de pacientes e os dados da farmacocinética e os que dizem respeito à abordagem PK/PD foram expressos como medianas, interquartis.

Gerenciamento dos dados e arquivos

Os prontuários médicos dos pacientes, resultados de exames de qualquer natureza, e TCLE foram considerados “documentos-fonte”, de onde foram retirados os dados para o estudo. Todos os documentos-fonte são de posse do paciente e ficaram disponíveis no prontuário na UTI-Q durante a permanência do paciente. Após alta ou óbito, os prontuários ficaram retidos e arquivados no arquivo médico do HC-FMUSP, sob responsabilidade do mesmo de acordo com a legislação médica vigente. O documento-fonte serve para comprovar a existência dos sujeitos da pesquisa. O banco de dados gerado no estudo incluiu documentos, relatórios, e qualquer outro documento criado para o protocolo ou alimentado com dados do estudo como tabelas,

figuras e arquivos gráficos arquivados (via original ou cópia, conforme aplicável), em local seguro no Centro de Farmacocinética Clínica, Depto Farmácia, FCF-USP, por tempo indeterminado, de forma a garantir a rastreabilidade dos dados

Confidencialidade dos dados coletados

Através da assinatura do TCLE, o paciente, ou responsável legal, atesta que tem ciência de que os dados coletados a partir de sua participação poderão ser tornados públicos. Porém, como preconiza a legislação inicial de pesquisa clínica no país (Resolução CNS 196/96) alinhada à última harmonização “ICH E7- Good Clinical Practice Integrated Addendum to ICH E6 (R1) n.1, março 2018” os pacientes envolvidos o protocolo de estudo, foram identificados através de suas iniciais e por seu código numérico de alocação no protocolo. Em caso de publicação, a identidade de todo e qualquer paciente envolvido no estudo foi mantida sob si.

Limites de confiança do método bioanalítico para quantificação do meropenem em plasma com base na RE 899, 2003 e RDC 27, 2012		
Parâmetro	Unidade	Limites de confiança
Linearidade (n=30)	µg/mL	0,2-100
Regressão linear (n=3 curvas)	r ²	0,998
LID: 0,1 µg/mL (n=10)	CV%	6,9
LIQ: 0,2 µg/mL (n=10)	CV%	4,5
Recuperação		
Absoluta (n=10) analito e PI Relativa (n=10) analito/PI	%	99,3/98,8
	%	101,0
Precisão /dentro do dia (n=12) 80 µg/mL	CV% (média: 2,0)	
40 µg/mL		1,9
10 µg/mL		2,5
0,8 µg/mL		2,2
		1,0
Precisão /entre dias (n=36) 80 µg/mL	CV% (média: 2,3)	
40 µg/mL		3,9
10 µg/mL		3,8
0,8 µg/mL		3,7
		5,5
Exatidão /dentro do dia (n=36) 80 µg/mL	CV% (média: 0,1)	
40 µg/mL		3,8
10 µg/mL		4,5
0,8 µg/mL		3,8
		4,6
Exatidão /entre dias (n=27) 80 µg/mL	CV% (média: 1,2)	
40 µg/mL		5,9
10 µg/mL		7,2
0,8 µg/mL		6,6
		5,8
Estabilidade /Cícl0s de congelamento/descongelamento	Erro sistemático ES%	
Cícl0 1 (n=12)		7,8
Cícl0 2 (n=12)		4,4
Cícl0 3 (n=12)		10,9
Estabilidade bancada /Curto prazo até 6 horas, replicatas n=3	ES%	
40 µg/mL		1,7
20 µg/mL		2,1
0,8 µg/mL		3,0
Estabilidade /auto-injetor 24horas	ES%	
40 µg/mL		3,5
20 µg/mL		3,8
0,8 µg/mL		4,70
Abreviaturas: Coeficiente de variação (CV%); Desvio padrão da média (DP); Erro sistemático (ES%); Padrão interno (PI); Limite de detecção (LID); Limite de quantificação (LIQ); r ² : Coeficiente de correlação.		

ANEXO I

TCLE

TCLE

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

- 1. NOME:**
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** **Monitoramento Plasmático de Antimicrobianos em Pacientes Queimados.**
- PESQUISADOR : Dr. David de Souza Gomes
- CARGO/FUNÇÃO: Diretor de Serviço INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº35316
- UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Cirurgia Plástica e Queimaduras
- 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
- RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO RISCO MAIOR
- 4. DURACÃO DA PESQUISA :** 12 meses a partir da aprovação

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

O pesquisador responsável por este protocolo é o Prof. Dr David de Souza Gomes , também participarão deste estudo o Dr. Edvaldo Vieira, Dra. Cristina Sanches Giraud e Profa Dra Silvia Regina Cavani Jorge Santos.

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Se o(a) senhor(a) ou pessoa por quem o Sr.(a) é responsável apresentar sinais de infecção serão empregados antibióticos para o tratamento, isto é, medicações que visam tratar a infecção, conseqüente da lesão pela queimadura. Os antibióticos atualmente utilizados para esta finalidade são anfotericina B, caspofungina, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, fluconazol, imipenem ou meropenem, linezolida, oxacilina, piperacilina/tazobactam, polimixina B ou E e vancomicina. O objetivo do presente estudo é avaliar se um destes antibióticos, na dose e forma utilizadas, atinge quantidades satisfatórias no sangue.
2. **Procedimentos que serão utilizados:** o senhor ou pessoa por quem o Sr.(a) é responsável receberá o antibiótico nas doses e nos momentos normalmente utilizados pelos pacientes com infecção devido a queimaduras. Serão coletadas no máximo seis amostras de sangue (1,5-2,0 mL por coleta) conforme segue: término da infusão, 2ª, 3ª, 4ª, 6ª hora e imediatamente antes da dose subsequente. Será coletado através de cateter venoso (dispositivo que substitui a picada) volume total inferior a 15 mL de seu sangue para a dosagem do medicamento. No sangue será dosada a concentração do antibiótico utilizando método laboratorial específico.
3. **Desconforto e riscos esperados:** o risco a que o senhor ou pessoa por quem o Sr.(a) é responsável será submetido é mínimo pois o procedimento é feito por profissionais altamente treinados, de forma estéril, com todo o material descartável.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:** após os resultados de cada avaliação, caso seja necessário, serão realizados ajustes nas doses e intervalos de doses de antibióticos utilizados no tratamento. Este estudo deverá também futuramente beneficiar muito outros pacientes queimados.
5. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** neste caso, não há procedimentos alternativos, pois se trata de procedimento de escolha e o melhor para pacientes queimados com infecção, estes antibióticos, são os previstos no protocolo de tratamento de infecções com antimicrobianos em grandes queimados.

Além disto, garantimos que:

1. O Sr.(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive esclarecer eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Terá a confidencialidade, sigilo e privacidade garantidos.
4. Disponibilidade de assistência na DIVISÃO DE CIRURGIA PLÁSTICA - HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
6. Não existirão despesas pessoais para o Sr.(a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
7. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Em caso de intercorrências clínicas e reações adversas relacionadas ao estudo atual, entrar em contato com:

Prof. Dr. David de Souza Gomez / Dr Edvaldo Vieira UTI Queimados

CIRURGIA PLÁSTICA – HCFMUSP – Fone (11) 3069-6470

Cristina Sanchez Giraud – Telefone (11) 3091-2189 ou (11) 7684-9233

Silvia Regina Cavani Jorge Santos Telefone (11) 3091-2189 ou (11) 7379-2804

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovidio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel. 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Monitoramento Plasmático de Antimicrobianos em Pacientes Queimados." Eu discuti com o Dr. David de Souza Gomez, sobre a minha decisão em participar nesse estudo e/ou em consentir que a pessoa sob minha tutela participe do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura do testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

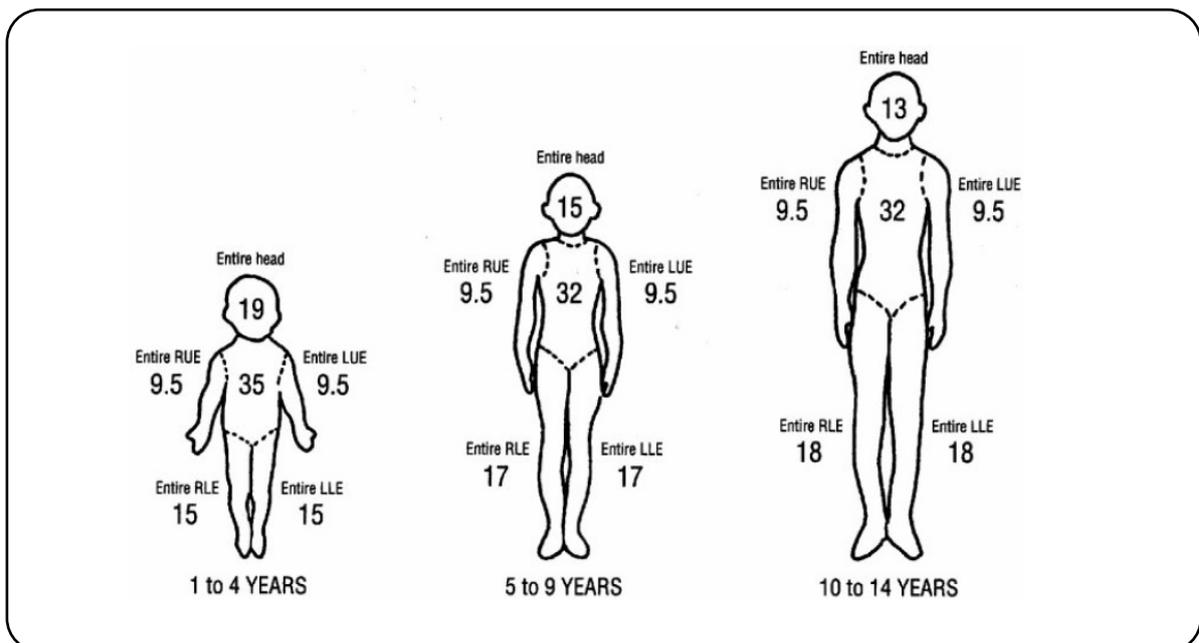
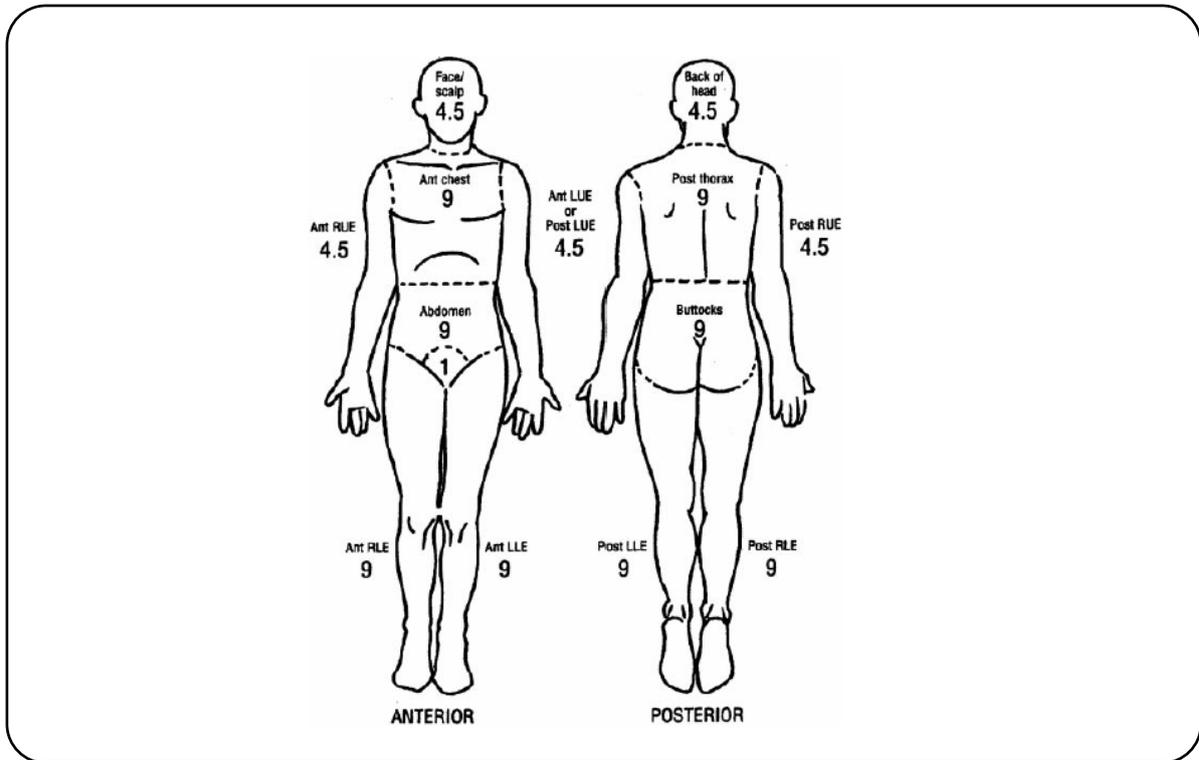
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

ANEXO II
ESTIMATIVA DA SUPERFÍCIE CORPORAL TOTAL QUEIMADA

ESTIMATIVA DA SUPERFÍCIE CORPORAL TOTAL QUEIMADA

Estimativa da superfície corpórea queimada total - SCQT (%)
Diagrama de Lund & Browder



Fonte: Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections.
Clin Microbiol Rev. 2006, v. 19, n. 2, p. 403-434

ANEXO III
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 DOU 22/maio/2012

Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 10 de maio de 2012, adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente Substituto, determino a sua publicação:

CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES INICIAIS Seção I

Objetivo

Art. 1º Esta Resolução possui o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil.

Seção II

Definições

Art. 2º Para efeito desta Resolução são adotadas as seguintes definições:

I- amostra branco: amostra de matriz processada sem adição de analito e padrão interno;

II- amostra de controle de qualidade (amostra de CQ): amostra de matriz adicionada do analito em concentração específica, usada para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico;

III- amostra de controle de qualidade de alta concentração (amostra de CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 85% (oitenta e cinco por cento) da maior concentração da curva de calibração;

IV- amostra de controle de qualidade de baixa concentração (amostra de CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até 3 (três) vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ);

V- amostra de controle de qualidade de diluição (amostra de CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (LSQ), analisada por meio de procedimento e proporção de diluição pré-definidos e especificados pelo laboratório bioanalítico;

VI- amostra de controle de qualidade de média concentração (amostra de CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;

VII- amostra em estudo: amostra biológica que é objeto de análise;

VIII- amostra hemolisada: amostra biológica contendo hemácias lisadas em grau pré-definido e especificado pelo laboratório bioanalítico;

IX- amostra lipêmica: amostra com alto teor de lipídeos, por exemplo, proveniente de coleta pós prandial;

X- amostra processada: amostra pronta para análise instrumental;

XI- amostra zero: amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno (PI);

XII- amostras de fontes distintas: amostras biológicas originadas de diferentes indivíduos ou de diferentes lotes de mistura de amostras;

XIII- analito: composto químico específico a ser mensurado em uma matriz;

XIV- corrida analítica das amostras em estudo: análise de um conjunto de amostras processadas sob as mesmas condições, com quantificação por meio da mesma curva de calibração e validada pelas mesmas amostras de CQs;

XV- curva de calibração: relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito;

XVI- efeito matriz: efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica;

XVII- efeito residual (carryover): efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente;

XVIII- estudo de estabilidade: ensaio que visa determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas;

XIX- exatidão: concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência;

XX- limite inferior de quantificação (LIQ): menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;

XXI- limite superior de quantificação (LSQ): maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;

XXII- matriz: meio no qual os analitos em estudo serão quantificados;

XXIII- matriz biológica: meio de origem biológica no qual os analitos em estudo serão quantificados;

XXIV- matriz substituta: matriz que substitui a matriz biológica das amostras em estudo;

XXV- métodos bioanalíticos: métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas;

XXVI- métodos cromatográficos: métodos que empregam cromatografia para separar o analito de outros componentes da amostra e quantificá-lo;

XXVII- padrão de calibração: matriz à qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito, utilizado para construir a curva de calibração;

XXVIII- padrão interno (PI): substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de CQs e amostras em estudo;

XXIX- precisão: proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz;

XXX- seletividade: capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes da amostra;

XXXI- solução primária: solução preparada a partir de substância química de referência;

XXXII- solução de trabalho: solução preparada a partir da diluição da solução primária;

XXXIII- substância química de referência caracterizada: substância de referência caracterizada por meio de ensaios adequados, devidamente validados e documentados, possuindo alto grau de pureza e uniformidade;

XXXIV- substância química de referência farmacopeica: substância estabelecida e distribuída por farmacopéias ou instituições oficiais autorizadas, possuindo alto grau de pureza e uniformidade;

XXXV- validação: confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos;

XXXVI- validação parcial: realização de parte dos ensaios da validação total em decorrência de modificação no método bioanalítico validado, visando demonstrar a manutenção do desempenho e confiabilidade do método; e

XXXVII- validação total: realização de todos os ensaios de validação de um método bioanalítico.

CAPÍTULO II

DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 3º Para moléculas passíveis de análise por métodos cromatográficos, estes devem ser a primeira escolha.

Parágrafo único. Na hipótese do caput deste artigo, caso não seja utilizado um método cromatográfico, deve ser apresentada justificativa técnica.

Art. 4º Deve ser utilizado PI sempre que aplicável.

§ 1º Para métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, deve ser utilizado, preferencialmente, PI marcado com isótopo estável.

§ 2º O uso de PI pode ser dispensado desde que justificado tecnicamente.

Art. 5º Os ensaios podem ser ajustados ou modificados quando utilizadas técnicas alternativas, devendo-se atender os fundamentos desta Resolução.

Art. 6º Antes da implementação de um método bioanalítico, deve ser realizada validação total.

§ 1º A validação deve conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme as especificações de cada ensaio.

§ 2º O estudo de estabilidade de longa duração pode ser concluído após a análise das amostras em estudo, desde que iniciado antes da análise da primeira amostra.

Art. 7º A interferência de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra, nicotina, cafeína e outros possíveis interferentes deve ser avaliada sempre que necessário.

Art. 8º A possibilidade de conversão de um metabólito no composto original durante os procedimentos da análise deve ser avaliada e controlada sempre que necessário.

Art. 9º Sempre que ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado, deve ser realizada validação parcial ou total, de acordo com a relevância da modificação.

Parágrafo único. Quando o impacto da modificação for desconhecido, deve ser realizada a validação total.

Art. 10. Devem ser utilizadas, preferencialmente, substâncias químicas de referência farmacopeica.

Parágrafo único. Substâncias químicas de referência caracterizadas podem ser admitidas, desde que haja:

I - documentação emitida pelo fabricante contendo as seguintes informações:

- a) nomenclatura (denominação comum brasileira ou denominação comum internacional);
- b) nº CAS;
- c) nome químico;
- d) sinonímia;
- e) fórmula molecular e estrutural;
- f) peso molecular;
- g) forma física;
- h) propriedades físico-químicas;
- i) perfil de impurezas; e
- j) cuidados de manipulação e conservação; e

II- laudo analítico emitido pelo fabricante comprovando:

- a) identidade;
- b) teor; e
- c) validade ou data de reteste.

CAPÍTULO III

DOS ENSAIOS DE VALIDAÇÃO

Seção I

Seletividade

Art. 11. Devem ser analisadas amostras da matriz biológica obtidas de, no mínimo, 6 (seis) fontes distintas.

§ 1º Quando a matriz biológica for plasma, devem ser empregadas 4 (quatro) amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

§ 2º Quando a matriz biológica for sangue total, devem ser empregadas 5 (cinco) amostras normais e uma lipêmica.

§ 3º Quando forem utilizadas outras matrizes biológicas, suas características devem ser avaliadas e testadas.

Art. 12. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do LIQ.

§ 1º As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras do LIQ.

§ 2º As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI.

Art. 13. Caso uma ou mais amostras analisadas apresentem interferência acima dos limites estabelecidos no art. 12, novas amostras de, no mínimo, outras seis fontes distintas devem ser testadas.

Parágrafo único. Caso uma ou mais amostras do segundo grupo apresentem interferência acima dos limites estabelecidos no art. 12, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

Seção II

Efeito residual

Art. 14. Devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ. § 1º Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ.

§ 2º As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ.

§ 3º As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI.

Art. 15. Se o efeito residual for inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas.

Seção III

Efeito matriz

Art. 16. Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

§ 1º Quando a matriz biológica for plasma, devem ser analisadas 8 (oito) amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas.

§ 2º Quando a matriz biológica for sangue total, devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas, sendo 4 (quatro) normais e 2 (duas) lipêmicas.

§ 3º Quando outras matrizes biológicas forem utilizadas, devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas.

§ 4º Em estudos conduzidos em pacientes, que apresentem alguma alteração nas características da matriz biológica, deve-se empregar esta matriz específica neste ensaio.

Art. 17. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

Art. 18. O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (quinze por cento).

Parágrafo único. Caso o CV dos FMNs relativos a todas as amostras de plasma seja superior a 15% (quinze por cento) devido ao resultado discrepante das amostras hemolisadas, novo CV dos FMNs sem estas amostras pode ser calculado e as amostras em estudo hemolisadas não poderão ser analisadas.

Art. 19. Amostras em estudo com grau de hemólise superior ao grau de hemólise aprovado neste teste não poderão ser analisadas.

Art. 20. Caso a metodologia bioanalítica não permita a avaliação do efeito matriz conforme descrito acima, deve ser aplicado procedimento alternativo.

Seção IV

Curva de calibração

Art. 21. Devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, 6 (seis) amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI.

Parágrafo único. As amostras da curva de calibração devem ser inicialmente adicionadas do padrão do analito e do PI e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação a que serão submetidas as amostras em estudo.

Art. 22. A curva de calibração deve ser construída utilizando-se a mesma matriz proposta para o estudo.

Art. 23. Deve ser apresentada justificativa científica para a faixa de concentração contemplada pela curva de calibração.

Art. 24. Deve ser apresentada a equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito.

§ 1º As respostas das amostras branco e zero não devem ser utilizadas na construção da equação.

§ 2º Deve ser adotado preferencialmente o modelo matemático mais simples, geralmente o linear.

§ 3º Caso seja proposto um modelo não linear, deve ser demonstrado matematicamente que o modelo linear não é adequado.

§ 4º Para modelos não lineares devem ser incluídas no mínimo 8 (oito) amostras de diferentes concentrações na curva de calibração.

§ 5º Caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva.

§ 6º A equação da curva não deve incluir padrões de calibração que não atendam aos critérios de aprovação.

§ 7º Quando um padrão de calibração não for aprovado, a curva de calibração deve ser recalculada sem este padrão.

§ 8º Quando um padrão de calibração atender aos critérios de aprovação, este não deve ser excluído da equação da curva.

Art. 25. Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios:

I - desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ; e

II - desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

Art. 26. A curva de calibração deve atender aos seguintes critérios para ser aprovada:

I - no mínimo 75% (setenta e cinco por cento) dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores; e

II - no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.

Seção V

Precisão

Art. 27. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (precisão intercorridas).

§ 1º Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) replicatas em, pelo menos, 5 (cinco) concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

§ 2º O ensaio de precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

Art. 28. A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento), segundo a fórmula a seguir:

§ 1º O CV da precisão intracorrída e intercorridas deve ser calculado com base em todos os valores obtidos.

§ 2º Caso o CV não atenda aos limites dispostos no caput, o ensaio deverá ser repetido.

Seção VI

Exatidão

Art. 29. A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (exatidão intercorridas).

§ 1º Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) replicatas em, pelo menos, 5 (cinco) concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

§ 2º O ensaio de exatidão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

Art. 30. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

§ 1º A exatidão intracorrída e intercorridas deve ser calculada com base em todos os valores obtidos.

§ 2º Caso o CV não atenda aos limites dispostos no caput, o ensaio deverá ser repetido.

Seção VII

Estabilidade do analito em matriz biológica

Art. 31. Deve ser demonstrada a estabilidade do analito na matriz biológica por meio dos seguintes estudos:

I - estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento;

II - estabilidade de curta duração;

III- estabilidade de longa duração; e

IV- estabilidade pós-processamento.

Art. 32. As condições de realização dos estudos de estabilidade devem reproduzir as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo.

Art. 33. Os estudos de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras de matriz biológica adicionadas de soluções do analito, PI e o mesmo anticoagulante a ser usado nas amostras em estudo.

Art. 34. Devem ser empregadas no mínimo 3 (três) amostras de CQB e CQA, as quais devem ser analisadas imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaio aplicáveis.

Parágrafo único. Devem ser empregadas apenas amostras cujo resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal.

Art. 35. A concentração das amostras deve ser determinada por meio de uma curva de calibração recém preparada.

Art. 36. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Parágrafo único. Todas as concentrações obtidas devem ser incluídas no cálculo da média.

Subseção I

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Art. 37. As amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por no mínimo 12 (doze) horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente.

§ 1º Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por, no mínimo, 12 (doze) horas, e assim sucessivamente, quantificando-se o analito nas amostras após o último ciclo.

§ 2º O número de ciclos de congelamento e descongelamento deve ser igual ou maior ao número de ciclos a que serão submetidas as amostras em estudo.

Subseção II

Estabilidade de curta duração

Art. 38. As amostras do estudo de estabilidade de curta duração devem ser processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente, ou na temperatura de processamento estabelecida para o método bioanalítico, por tempo superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nas mesmas condições durante o estudo.

Subseção III

Estabilidade de longa duração

Art. 39. As amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por período que exceda o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última.

Parágrafo único. A temperatura utilizada no estudo de estabilidade deve reproduzir a temperatura a que forem armazenadas as amostras em estudo.

Subseção IV

Estabilidade pós-processamento

Art. 40. As amostras devem ser processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo.

§ 1º O período deve ser superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa.

§ 2º Caso seja realizado algum armazenamento além do auto-injetor, deve ser comprovada a estabilidade nessas condições.

Seção VIII

Estabilidade do analito e PI em solução

Art. 41. Deve ser demonstrada a estabilidade do analito e do PI em, no mínimo, 3 (três) amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas.

§ 1º As soluções devem ser analisadas após serem mantidas sob as mesmas condições a que serão submetidas as soluções durante seu uso e armazenamento.

§ 2º A estabilidade das soluções primária e de trabalho deve ser analisada por meio de uma diluição apropriada levando-se em consideração a faixa de medição do detector.

§ 3º A média das respostas instrumentais provenientes das soluções em estudo deve ser comparada com a média daquelas obtidas utilizando-se soluções recém preparadas do analito e do PI.

§ 4º Caso seja empregado um isótopo estável como PI, não é necessária a realização do estudo de estabilidade em solução do mesmo, desde que comprovada a ausência de reações de troca de isótopos nas condições do estudo de estabilidade.

Art. 42. As soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas.

Parágrafo único. Todas as respostas instrumentais obtidas devem ser incluídas no cálculo da média.

Seção IX

Métodos em que a matriz biológica isenta de analito não está disponível

Art. 43. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada pela comparação das inclinações de, no mínimo, 6 (seis) curvas de adição padrão em 6 (seis) amostras de fontes distintas de matriz biológica (contendo um nível basal do analito) e da curva padrão em solução ou matriz substituta.

§ 1º O método é considerado seletivo se as inclinações das curvas não forem significativamente diferentes.

§ 2º Deve ser definido previamente um modelo estatístico para comparação das inclinações.

Art. 44. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, os ensaios de validação da curva de calibração, exatidão e efeito residual podem ser realizados utilizando padrões de calibração e CQs em solução ou matriz substituta, desde que atendido ao disposto no art. 43.

Art. 45. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, os ensaios de validação de precisão e estudos de estabilidade devem ser realizados na mesma matriz biológica das amostras em estudo.

Parágrafo único. Os estudos de estabilidade devem ser realizados de acordo com um dos procedimentos a seguir:

I - comparação das concentrações obtidas das amostras recém- preparadas com as obtidas das mesmas amostras após o período de estabilidade em estudo; ou

II - comparação com os valores nominais, desde que a matriz seja previamente analisada e o nível basal do analito completado a fim de atingir as concentrações do CQB e CQA.

CAPÍTULO IV

CRITÉRIOS DE APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO

Art. 46. O método aplicado à análise das amostras em estudo deve ser o mesmo método validado, incluindo a utilização do mesmo anticoagulante, técnica de extração e condições analíticas.

Art. 47. Cada corrida analítica das amostras em estudo deve conter:

I - curva de calibração;

II - amostras de CQB, CQM e CQA; e

III - amostras em estudo de um ou mais voluntários do estudo.

§ 1º Todas as amostras devem ser processadas como um único lote.

§ 2º Em estudos de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa, todas as amostras de um mesmo voluntário devem ser analisadas numa mesma corrida, com exceção das amostras de reanálise.

§ 3º O número de amostras de CQB, CQM e CQA a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras em estudo e não deve ser inferior a 6 (seis) CQs, sendo uma duplicata de cada concentração.

§ 4º No caso de corridas de reanálise com amostras diluídas, devem ser incluídas amostras de CQD.

§ 5º As amostras de CQB, CQM, CQA e CQD devem ser distribuídas entre as amostras em estudo de forma balanceada na corrida analítica, sempre em igual número de replicatas de cada concentração.

§ 6º Caso a curva de calibração contemple uma faixa de concentração muito ampla em comparação com a concentração de todas as amostras dos voluntários, um controle de qualidade adicional deve ser incluído na corrida analítica dos voluntários, para que pelo menos dois CQs estejam dentro da faixa de concentrações medidas.

Art. 48. Devem ser consideradas apenas as concentrações quantificadas entre o LIQ e o LSQ.

§ 1º Se os padrões de calibração relativos ao LIQ ou LSQ forem reprovados, o LIQ ou LSQ para esta corrida analítica podem ser considerados os próximos padrões de calibração aprovados.

§ 2º Amostras de concentrações superiores ao LSQ devem ser diluídas e reanalisadas.

§ 3º Concentrações abaixo do LIQ devem ser reportadas como <LIQ.

Art. 49. Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% (sessenta e sete por cento) do total de CQs e no mínimo 50% (cinquenta por cento) dos CQs de cada concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação aos seus respectivos valores nominais.

Art. 50. A exatidão média e a precisão dos CQs de todas as corridas aprovadas (exatidão e precisão intercorridas) devem ser calculadas para cada nível de concentração.

Parágrafo único. Caso a exatidão média ou a precisão intercorridas extrapole 15% (quinze por cento), as causas devem ser investigadas e justificadas, podendo acarretar rejeição dos dados.

Art. 51. Para aprovação da corrida analítica, sua curva de calibração deve atender aos critérios definidos nos arts. 24, 25 e 26, I.

Parágrafo único. Devem ser aprovados, no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, conforme os critérios estabelecidos no art. 25.

Art. 52. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, para a corrida analítica das amostras em estudo, devem ser utilizados padrões de calibração e CQs na mesma matriz empregada na validação.

CAPÍTULO V

REANÁLISE

Art. 53. As amostras em estudo devem ser reanalisadas quando:

I - apresentarem concentração acima do LSQ;

II - apresentarem concentração entre o LIQ e o padrão de calibração adjacente, considerando a situação prevista no art. 48, § 1º;

III - apresentarem problemas analíticos que impossibilitem ou invalidem a quantificação; ou

IV - apresentarem resposta do analito acima do LIQ em amostras do tempo pré-dose, amostras de grupo placebo e amostras de grupo controle.

Art. 54. Em estudos de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa, não devem ser realizadas reanálises por motivos farmacocinéticos.

Art. 55. Não devem ser realizadas reanálises de padrões de calibração e CQs.

Art. 56. Os procedimentos relativos à reanálise devem estar pré-estabelecidos em procedimento operacional padrão.

CAPÍTULO VI

DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 57. Esta resolução revogará a Seção Métodos Bioanalíticos do Anexo da Resolução - RE 899, de 29 de maio de 2003 e alínea "d" do Item 2 do Anexo da Resolução - RE 1170, de 19 de abril de 2006 em de 1º de dezembro de 2012.

§ 1º As empresas já podem adequar seus procedimentos de acordo com esta Resolução sem prejuízo da necessidade de observância da data referida no caput deste artigo.

§ 2º Até a data de 1º de dezembro de 2012 as empresas poderão protocolar a documentação ainda de acordo com a RE 899/2003 ou poderão optar por apresentar a documentação conforme previsto nesta Resolução.

§ 3º Na hipótese de optar por apresentar a documentação de acordo com esta Resolução, antes do prazo obrigatório, a aprovação do estudo dependerá da adequação integral na forma desta Resolução.

Art. 58. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

JAIME CESAR DE MOURA OLIVEIRA

ANEXO IV

RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003

RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003

O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria n.º 238, de 31 de março de 2003,

considerando o disposto no art.111, inciso II, alínea "a" § 3º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000,

considerando que a matéria foi submetida à apreciação da Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 6 de março de 2003, resolve:

Art. 1º Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" anexo Art.

2º Fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DAVI RUMEL

ANEXO

GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Considerações gerais

1.1. As informações contidas nesse Anexo apresentam as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

1.2. Essas informações aplicam-se a:

1.2.1. técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

1.2.2. métodos não-cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (por ex. titulometria, espectrofotometria UV-VIS);

1.2.3. testes imunológicos ou microbiológicos, desde que observado o grau de variabilidade usualmente associado a estas técnicas.

1.3. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise.

1.4. Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.

1.5. Para efeito desse guia, considera-se corrida analítica as medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas nas mesmas condições: método, analista, instrumentação, local, condições de utilização e em intervalo de tempo curto entre as medições.

1.6. No caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada.

1.7. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado nas Tabelas 1 e 2.

1.7.1. Especificidade e Seletividade

1.7.2. Linearidade

1.7.3. Intervalo

1.7.4. Precisão

1.7.5. Limite de detecção (sensibilidade)

1.7.6. Limite de quantificação

1.7.7. Exatidão

1.7.8. Robustez

1.8. No caso da transferência de metodologias da matriz para suas subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centro de estudos de equivalência farmacêutica, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada e deverá conter, no mínimo, todos os parâmetros relacionados no item 1.7.

1.9. Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

1.10. Os testes são classificados em 4 categorias, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade:

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

1.11. Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade:

P a r â m e t r o		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

1.12. metodologia analítica deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias:

1.12.1. mudanças na síntese da substância ativa;

1.12.2. mudanças na composição do produto acabado;

1.12.3. mudanças no procedimento analítico.

Determinadas outras mudanças podem requerer validação também, dependendo da natureza das mudanças.

2. Metodologia

2.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

2.1.1. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.

2.1.2. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

2.1.3. Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

2.2.1. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 3.

2.2.2. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática.

2.2.3. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

2.2.4. Deve-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

2.3. Intervalo O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Tabela 3. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

2.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

2.4.1. Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

2.4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

2.4.3. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula, em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

2.5. Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

2.5.1. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável;

2.5.2. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

2.5.3. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

2.5. Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

2.5.1. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável;

2.5.2. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

2.5.3. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6. Limite de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

2.6.1. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

Pode ser expresso pela equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6.2. Também pode ser determinado por meio do ruído.

Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

2.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

2.7.1. Fármaco

2.7.1.1. aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência);

2.7.1.2. comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

2.7.2. Forma Farmacêutica

2.7.2.1. na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

2.7.2.2. nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

2.7.3. Impurezas

2.7.3.1. análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco;

2.7.3.2. no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

2.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 4. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> •Estabilidade das soluções analíticas •Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> •Variação do pH da solução •Temperatura •Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> •Variação do pH da fase móvel •Variação na composição da fase móvel •Diferentes lotes ou fabricantes de colunas •Temperatura •Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> •Diferentes lotes ou fabricantes de colunas •Temperatura •Velocidade do gás de arraste

MÉTODOS BIOANALÍTICOS

1. Definições

Amostra - termo geral que abrange: controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas.

Amostra branco - amostra de uma matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado, utilizada para avaliar a especificidade do método bioanalítico.

Amostra de Controle de Qualidade (CQ) - amostra de matriz biológica adicionada do analito, usada para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual.

Amostra processada - extrato final (anterior à análise instrumental) de uma amostra que foi submetida a várias manipulações (ex.: diluição, extração, concentração).

Amostra desconhecida - amostra biológica que é objeto de análise.

Analito - composto químico específico a ser mensurado, podendo ser o fármaco não-transformado, biomolécula ou seu derivado, metabólito ou produto de degradação em uma matriz biológica.

Corrida analítica (ou lote) - conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e CQs para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições.

Especificidade - habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz.

Estabilidade - parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

Exatidão - representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

Faixa de quantificação - corresponde a uma faixa de concentração, incluindo o LSQ e o LIQ, que pode ser confiável e reprodutivelmente quantificada com exatidão e precisão, por meio da relação concentração-resposta.

Limite de Detecção (LD) - menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo.

Limite Inferior de Quantificação (LIQ) - menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.

Limite Superior de Quantificação (LSQ) - maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão.

Linearidade - corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (analito).

Matriz biológica - material distinto de origem biológica, que pode ser amostrado e processado de modo reprodutível.

Método - descrição compreensível de todos os procedimentos usados em análises de amostras.

Padrão de calibração - matriz biológica a qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito. Os padrões de calibração são usados para construir a curva de calibração, com a qual são determinadas as concentrações do analito nos CQs e nas amostras desconhecidas em estudo.

Padrão Interno (PI) - composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito.

Precisão - representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio.

Recuperação - eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Reprodutibilidade - precisão entre dois laboratórios. Também representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo.

Validação parcial - modificação no método bioanalítico validado que não requer a necessidade de uma revalidação total.

Validação total - estabelecimento de todos os parâmetros de validação de um método bioanalítico, aplicáveis à análise das amostras.

2. Considerações gerais

2.1. As informações contidas neste guia aplicam-se a métodos bioanalíticos, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e estas combinadas com espectrometria de massa (MS) tais como LC-MS, LC-MS-MS, CGMS, CG-MS-MS, utilizados na determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina. Também se aplica a outras técnicas analíticas, tais como métodos

microbiológicos e imunológicos, ou para outras matrizes biológicas, embora, nestes casos, pode-se observar um alto grau de variabilidade.

2.2. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

2.3. Deve-se utilizar substâncias químicas de referência e /ou padrões biológicos oficializados pela Farmacopéia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente. Serão admitidos estudos utilizando padrões secundários desde que seja comprovada sua certificação, na ausência de substâncias químicas de referência e/ou padrões biológicos farmacopéicos.

2.4. Para os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deve-se utilizar padrão interno, sempre que métodos cromatográficos forem utilizados. Deve-se justificar a impossibilidade de sua utilização.

2.5. Deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos.

2.6. Devem ser realizadas validações parciais quando ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado. Os ensaios de validação parcial podem ser desde uma pequena determinação, como a determinação da exatidão e precisão intra-ensaio, até próximo de uma validação total. As mudanças típicas que podem requerer uma validação parcial incluem, entre outras:

2.6.1. transferências de métodos entre laboratórios e analistas;

2.6.2. mudanças na metodologia analítica, por exemplo, substituição do sistema de detecção;

2.6.3. mudança de anticoagulante na coleta das amostras;

2.6.4. mudança de matriz, por exemplo, de plasma para urina;

2.6.5. mudança no procedimento de preparação da amostra;

2.6.6. mudanças relevantes na faixa de concentração;

2.6.7. mudanças de instrumentos e/ou "softwares";

2.6.8. demonstração de seletividade do analito na presença de medicações concomitantes;

2.6.9. demonstração de seletividade do analito na presença de metabólitos específicos.

2.7. A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções deverão ser incluídas no procedimento. Exemplos de variações:

2.7.1. estabilidade das soluções analíticas.

2.7.2. tempo de extração. Variações típicas em cromatografia líquida:

2.7.3. influência da variação de pH da fase móvel.

2.7.4. influência da variação da composição da fase móvel.

2.7.5. diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes).

2.7.6. temperatura.

2.7.7. velocidade de fluxo. Variações típicas em cromatografia gasosa:

2.7.8. diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes);

2.7.9. temperatura;

2.7.10. velocidade de fluxo.

3. Validação pré - estudo

3.1. Especificidade

3.1.1. Deve-se analisar amostras da matriz biológica (sangue, plasma, soro, urina, ou outra) obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco deve ser testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LIQ.

3.1.2. Qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, deve ser rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Caso uma ou mais das amostras deste grupo apresentarem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

3.1.3. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. A interferência da nicotina, cafeína, produtos de venda isenta de prescrição e metabólitos deve ser considerada sempre que necessário.

3.1.4. Caso o método seja destinado à quantificação de mais de um fármaco, cada um deve ser injetado separadamente para determinar os tempos de retenção individuais e assegurar que impurezas de um fármaco não interfiram na análise do outro.

3.1.5. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.

3.2. Curva de calibração/linearidade

3.2.1. A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva de calibração deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 6 (seis) amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, contemplando o limite de variação esperado, do LIQ até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar.

3.2.2. Para a determinação da curva de calibração, deve-se analisar amostras extraídas da matriz apropriada, no mínimo 6 (seis) concentrações diferentes. Procedimentos alternativos devem ser

justificados, como na obtenção de uma correlação não-linear, em que um maior número de concentrações de padrões serão necessários.

3.2.3. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Deve-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático), o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta.

3.2.4. Critérios de aceitação da curva de calibração:

3.2.4.1. desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação a concentração nominal para o LIQ;

3.2.4.2. desvio menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;

3.2.4.3. no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;

3.2.4.4. o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

3.3. Precisão

3.3.1. A repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração.

3.3.2. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intra-corrída) e em corridas diferentes (precisão intercorridas).

3.3.3. Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

onde, D P é o desvio padrão e C M D, a concentração média determinada.

3.4. Exatidão

3.4.1. A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração.

3.4.2. A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas).

3.4.3. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

3.4.4. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.5. Limite inferior de quantificação (LIQ)

3.5.1. Estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

3.5.2. Pode-se, também, utilizar a razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base, devendo-se especificar o método utilizado para determinação do LIQ.

3.5.3. O LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.

3.5.4. O pico de resposta do fármaco no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% (vinte por cento) e exatidão de 80 - 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de padrões.

3.6. Limite de detecção (LD) Estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

3.7. Recuperação A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

3.7.1. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

3.7.2. O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

3.8. Controle de qualidade (CQ)

3.8.1. CQ do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ): mesma concentração de LIQ.

3.8.2. CQ de baixa concentração (CQB): menor ou igual 3 x LIQ.

3.8.3. CQ de média concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA

3.8.4. CQ de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

3.9. Estudo de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos:

3.9.1. Considerações específicas relevantes

Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez, previamente validados.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros.

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas.

As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência.

3.9.2. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Deve-se testar a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.3. Estabilidade de curta duração Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas (baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente) e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.4. Estabilidade de longa duração

3.9.4.1. O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

3.9.4.2. A temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para armazenamento das amostras, normalmente igual a -20 °C.

3.9.4.3. Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. As concentrações de todas as amostras de estabilidade devem ser comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste.

3.9.5. Estabilidade pós-processamento

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do fármaco, na amostra processada para análise, incluindo o adrião interno, na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de

tempo superior à duração da corrida analítica. Utiliza-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.6. Estabilidade das soluções-padrão

3.9.6.1. Deve ser avaliada a estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno, mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas após preparação.

3.9.6.2. Em caso de tais soluções serem armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas.

3.9.6.3. Os resultados desse teste devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do fármaco e do padrão interno.

3.9.7. Análise dos resultados

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%. Qualquer que seja o método estatístico utilizado para avaliar os resultados dos estudos de estabilidade, este deverá estar descrito claramente no procedimento operacional padrão (POP). 4. Critérios de aplicação do método bioanalítico validado

4.1. A análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica deve ser concluída dentro do período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada.

4.2. Uma corrida analítica deve conter: amostras de CQ, padrões de calibração e amostras desconhecidas de um ou mais voluntários do estudo. É preferível que todas as amostras de um mesmo voluntário sejam analisadas numa única corrida.

4.3. Não é permitido estimar a concentração das amostras através de extrapolação da curva de calibração abaixo do LIQ ou acima do maior padrão. Em vez disso, a curva deve ser redefinida ou as amostras de concentrações superiores devem ser diluídas e reanalisadas.

4.4. No uso rotineiro do método analítico validado, sua precisão e exatidão devem ser monitoradas regularmente para assegurar a continuidade do desempenho satisfatório. Para atingir este objetivo, amostras de CQ devem ser analisadas juntamente com as demais amostras, em cada corrida analítica.

4.5. As amostras de CQ devem ser incorporadas em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras da corrida, sempre em igual número de replicatas de cada concentração (CQB, CQM e CQA).

4.6. O número de amostras de CQ (em múltiplos de três) a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras desconhecidas. Para corridas analíticas constituídas de até 120 amostras, pelo menos 6 (seis) CQs (uma duplicata de cada concentração) devem estar presentes.

4.7. Os resultados das amostras de CQ servirão de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica. No mínimo, 67% (quatro de seis) das amostras de CQ devem estar dentro de mais ou menos 15% dos seus respectivos valores nominais, exceto para o LIQ, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%; 33% (duas de seis) amostras de CQ podem estar fora destes limites, mas não para a mesma concentração.