



FACULTAD DE FARMACIA

CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE IMPENEM EN SUERO EN
CONDICIONES HABITUALES DE PRÁCTICA CLÍNICA, MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO

RAUL ALEXIS FIGUEROA TRUJILLO

Director: Jacqueline Concha Olmos

Co-Director: Yanneth Moya Olave

Valparaíso, 2014

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCION	1
1.1	Antibióticos en la salud humana	1
1.2	Antibióticos Carbapenémicos	2
1.3	Imipenem, propiedades químicas y mecanismo de acción	6
1.4	Administración, farmacocinética y farmacodinamia	11
1.5	Estabilidad del fármaco	15
1.6	Validación y verificación de un método analítico	18
1.6.1	Linealidad	20
2	HIPOTESIS	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo general	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1	Reactivos	25
4.2	Materiales de laboratorio	26
4.3	Instrumentos y equipos	26
4.4	Metodología	27
4.4.1	Determinación de la idoneidad del sistema	27
4.4.2	Verificación del método HPLC	29
4.4.3	Solución estándar curva de calibrado HPLC	29
4.4.4	Condiciones cromatográficas	30
4.4.5	Cinética de degradación	32
5	RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
5.1	Determinación de la idoneidad del sistema	34
5.2	Verificación del método	34
5.2.1	Parámetro de Linealidad	35
5.2.2	Influencia de la matriz	41

5.2.3	Influencia del laboratorio proveedor -----	44
5.3	Curva de calibrado -----	47
5.4	Cinética de degradación en condiciones clínicas de administración -----	48
6	CONCLUSIÓN -----	55
7	BIBLIOGRAFIA -----	56
8	ANEXOS -----	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Clasificación para carbapenemicos	5
Tabla 1-2. Las concentraciones de imipenem y bencilpenicilina requeridas para la inhibición del 50 % de la actividad de entrecruzamiento de peptidoglicano y la actividad D-alanina carboxipeptidasa en PBS de <i>E. coli</i>	8
Tabla 1-3. Organismos frente a los que imipenem es normalmente activo in vitro.....	9
Tabla 1-4. Concentraciones de Imipenem en tejidos y líquidos corporales después de una dosis de 1g	13
Tabla 1-5. Dosificación de Imipenem i.v. en adultos con función renal normal y peso corporal 70 kg.....	14
Tabla 1-6. Estabilidad de imipenem reconstituido.....	16
Tabla 1-7. Datos requeridos para la validación según ISP (Merino et al, 2010).....	20
Tabla 4-1. Parámetros de idoneidad obtenidos y valores límites establecidos.	28
Tabla 4-2. Condiciones cromatografías para la determinación de imipenem por cromatografía líquida (HPLC).....	30
Tabla 4-3. Condiciones en las que se realizó el ensayo de cinética de degradación para imipenem.....	32
Tabla 5-1. Prueba de linealidad para Imipenem _{LAB-1}	36
Tabla 5-2. Prueba de linealidad para Imipenem _{LAB-2}	38
Tabla 5-3. Prueba de linealidad para Imipenem _{LAB-3}	40
Tabla 5-4. Variación de pendientes de acuerdo al rango de concentraciones incluidas en la regresión lineal.....	42
Tabla 5-5. Variación de pendientes de la regresión lineal en buffer fosfato 0,1 N pH 7 de acuerdo al laboratorio proveedor.	44
Tabla 5-6. Variación de pendientes de la regresión lineal en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado, según laboratorio proveedor.	46
Tabla 5-7. Cinética de degradación de imipenem bajo 8 condiciones de estudio.	49
Tabla 8-01. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-1} .en buffer fosfato 0,1 N pH 7.....	60
Tabla 8-02. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-1} .en suero fisiológico.....	60
Tabla 8-03. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-1} .en suero glucosado.	61
Tabla 8-04. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-2} .en buffer fosfato 0,1 N pH 7.....	61
Tabla 8-05. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-2} .en suero fisiológico.....	62

Tabla 8-06. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-2} en suero glucosado al 9%.....	62
Tabla 8-07. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-3} en buffer fosfato 0,1 N pH 7.....	63
Tabla 8-08. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-3} en suero fisiológico.....	63
Tabla 8-09. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem _{LAB-3} en suero glucosado al 5%.....	64
Tabla 8-10. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a Imipenem _{LAB-1} en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.....	65
Tabla 8-11. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a Imipenem _{LAB-2} en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.....	66
Tabla 8-12. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a Imipenem _{LAB-3} en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.....	67
Tabla 8-13. Curva de calibrado de Imipenem _{LAB-4}	68
Tabla 8-14. Curva de calibrado de Imipenem _{LAB-4}	68
Tabla 8-15. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 1.....	69
Tabla 8-16. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 2.....	69
Tabla 8-17. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 3.....	69
Tabla 8-18. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 4.....	70
Tabla 8-19. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 5.....	70
Tabla 8-20. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 6.....	70
Tabla 8-21. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 7.....	71
Tabla 8-22. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 8.....	71
Tabla 8-23. Ejemplos de cromatogramas de la cinética de degradación correspondientes a las condiciones 1, 5, 4 y 8 a T0 y a T60.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Proporción del consumo de antibióticos en Chile entre los años 2000-2003... 2	2
Figura 1-2. Estructura química de tienamicina (Krisztina et al, 2011). 3	3
Figura 1-3. Estructuras químicas de algunos carbapenem (Krisztina <i>et al</i> , 2011). 4	4
Figura 5-1. Efecto de la matriz en Imipenem _{LAB-1} , Imipenem _{LAB-2} e Imipenem _{LAB-3} .en un rango de concentraciones de 20 a 600 ppm. 41	41
Figura 5-2. Efecto de la matriz en Imipenem _{LAB-1} , Imipenem _{LAB-2} e Imipenem _{LAB-3} para un rango de concentraciones de 20 a 200 ppm. 43	43
Figura 5-3. Comparación entre las curvas de calibrado de imipenem de distintos laboratorios en buffer fosfato 0,1 N pH 7. 45	45
Figura 5-4. Comparación entre las curvas de calibrado de imipenem de distintos laboratorios en suero fisiológico y suero glucosado al 5%. 46	46
Figura 5-5. Regresión lineal de curva de calibrado Imipenem _{LAB-4} en suero fisiológico.... 47	47
Figura 5-6. Regresión lineal de curva de calibrado Imipenem _{LAB-4} en suero glucosado.... 48	48
Figura 5-7. Efecto de la temperatura (A: 35°C, B: 25°C) sobre imipenem en suero fisiológico y suero glucosado al 5%. 50	50
Figura 5-8. Efecto exposición a la luz y protección de la luz en imipenem en suero fisiológico y suero glucosado al 5%. 51	51
Figura 5-9. Esquema de la principal vía de degradación de los carbapenémicos..... 53	53

Dedicatoria

A mis padres por todo su amor y cariño con el cual me han forjado como persona y por el inmenso apoyo que me han brindado en todos estos años de estudio.

... todo lo que soy y lo que tengo se los debo a ellos.

Agradecimientos

Al concluir este trabajo, culmina también una linda etapa en mi vida en donde conté con el respaldo incondicional de mis seres queridos, y en donde también conocí a personas que de una forma u otra hicieron que este camino fuera más comfortable.

Es por eso que debo agradecer en primer lugar a la profesora Jacqueline Concha, por aceptar trabajar conmigo y confiar en mí para realizar esta tesis bajo su dirección. Sus ideas, orientación y dedicación fueron fundamentales, tanto en lo académico como en lo personal, le estoy muy agradecido por estar siempre presente cuando la necesité. A la profesora Yanneth Moya por su importante aporte como co-directora, y por facilitarme los medios para realizar las diferentes actividades a lo largo de este trabajo.

A mis amigos y compañeros con los que compartí, los cuales hicieron de cada clase un momento más grato.

También agradecer a aquellas personas que en este momento ya no forman parte de mi vida, pero que sin embargo me acompañaron a lo largo de estos años, y que con un mensaje de aliento o a través de un consejo, me dieron la seguridad necesaria para superar cada desafío que se presentó.

Finalmente agradecer muy especialmente a mis viejitos lindos, a Raúl Figueroa Farfán y a Claudia Trujillo Cárdenas, ya que todo esto es posible gracias a ellos, les estoy eternamente agradecido de lo que han hecho por mí, su apoyo a lo largo de estos años ha sido invaluable, desde aquel día en que me llevaron a la escuela de la mano por primera vez, hasta el día de hoy.

A todos ellos y a los que injustamente he olvidado... muchas gracias.

RESUMEN

Imipenem es un antibiótico carbapenémico perteneciente al grupo de los antibióticos β -lactámicos, que tiene un rol importante en la clínica actual en el tratamiento de infecciones severas o de difícil manejo.

Existen evidencias de inestabilidad química de imipenem, que conllevarían alteraciones en la efectividad y seguridad de la terapia antimicrobiana. En este trabajo se evaluó la estabilidad de imipenem simulando las condiciones habituales de administración del fármaco en la práctica clínica, a través de un modelo de cinética de degradación. La determinación de imipenem fue realizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), previa verificación de la metodología analítica. Las concentraciones de imipenem se calcularon por interpolación de las áreas de los picos cromatográficos en una curva de calibrado. Los resultados obtenidos establecieron que la estabilidad de imipenem durante su administración se ve afectada por los factores de luminosidad y temperatura, pero no así del medio de disolución. Además se evaluaron probables estrategias que permitieron corroborar como el factor de luminosidad y temperatura afecta cuando el fármaco es administrado en un intervalo de 60 minutos.

ABSTRACT

Imipenem is a carbapenem antibiotic belonging to the group of the β -Lactam antibiotics, which have an important role in the current clinic in severe infections treatments or difficult managing.

Evidences of chemical instability of imipenem exist, that would entail alterations in the effectiveness and security of the antimicrobial therapy. It is that in this study the stability of imipenem was evaluated simulating the habitual conditions of administration in the clinical practice, across a model of kinetic of degradation. The determination of imipenem was realized by liquid chromatography of high resolution (HPLC), previous verification of the analytical methodology. The concentrations of imipenem were calculated by interpolation of the areas of the chromatographic peaks in a curve of calibrated. The obtained results established that the stability of imipenem during his administration sees affected by the factors of luminosity and temperature under habitual conditions in the clinical practice but not that dissolution means. In addition probable strategies were evaluated that allowed to corroborate as the factor of luminosity and temperature affects when the drug is administered in an interval of 60 minutes.

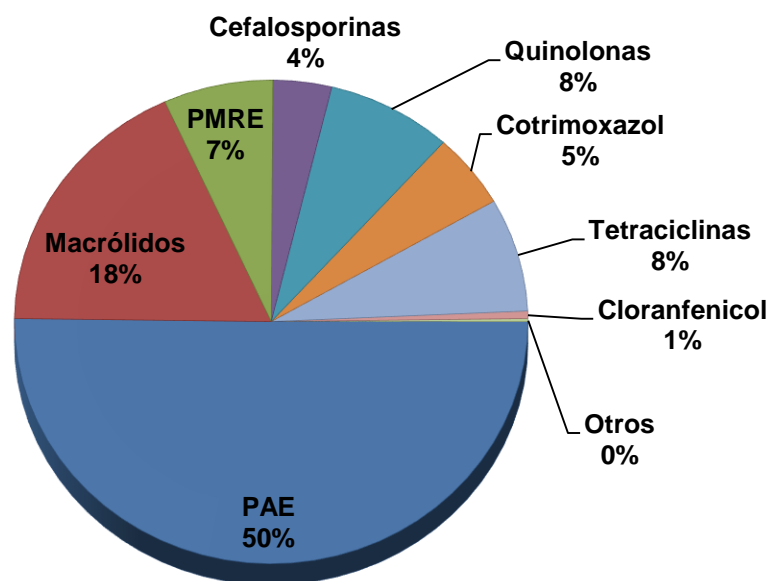
1 INTRODUCCION

1.1 Antibióticos en la salud humana

Desde la introducción de la penicilina sódica en los tratamientos infecciosos (en la década de los 40), los antibióticos han constituido uno de los puntos de inflexión en la historia de la humanidad al reducir las cifras de mortalidad existente. (Sánchez, 2006).

Los antibióticos se han ido desarrollando mediante modificaciones moleculares a partir de las estructuras de los antibióticos más antiguos, con el fin de mejorar su efectividad y su selectividad. Actualmente existen diversas familias de antibióticos, las que se clasifican de acuerdo a su estructura química, y en donde encontramos los β -lactámicos, aminoglucósidos, glucopéptidos, macrólidos, tetraciclinas, fenicoles, quinolonas, entre otros (Flores *et al*, 1998).

En la actualidad los β -lactámicos son los antimicrobianos más prescritos en Chile (**Figura 1-1**) (Vidal S., 2007). Sin embargo debido a la masificación de su uso, surgen problemas tales como el desarrollo de resistencia y la selección de organismos resistentes. De esta manera, y ante la necesidad de disponer de antibióticos de amplio espectro, rápida acción bactericida, y propiedades que limiten el desarrollo de resistencia y tolerabilidad, se han desarrollado una sub-familia de antimicrobianos denominados compuestos carbapenémicos.



PAE: Penicilinas de amplio espectro; PMRE: Penicilinas de mediano y reducido espectro.

Figura 1-1. Proporción del consumo de antibióticos en Chile entre los años 2000-2003.

1.2 Antibióticos Carbapenémicos

Los antibióticos carbapenémicos pertenecen a la clase de antibióticos β -lactámicos y presentan el mayor espectro de actividad bactericida dentro de este grupo, destacando por su gran resistencia a betalactamasas. El primer representante carbapenémico fue tienamicina, descubierta a partir del microorganismo *Streptomyces cattleya*, y cuya estructura molecular se convirtió en el modelo base de los carbapenémicos (Figura 1-2) (Krisztina *et al*, 2011).

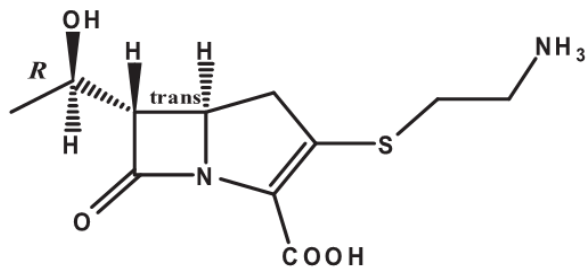


Figura 1-2. Estructura química de tienamicina (Krisztina et al, 2011).

Sin embargo, debido a la inestabilidad química presentada por tienamicina se motivó el desarrollo de derivados análogos con mayor estabilidad. Es así como nace imipenem, quien se convierte en el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. Posteriormente le siguen un gran número de compuestos, en donde destacan meropenem ertapenem y doripenem entre los compuestos carbapenémicos más utilizados (Rivero *et al*, 1998). Algunos representantes carbapenémicos con sus respectivas estructuras se exponen en la **Figura 1-3** (Seija y Vignoli, 2006).

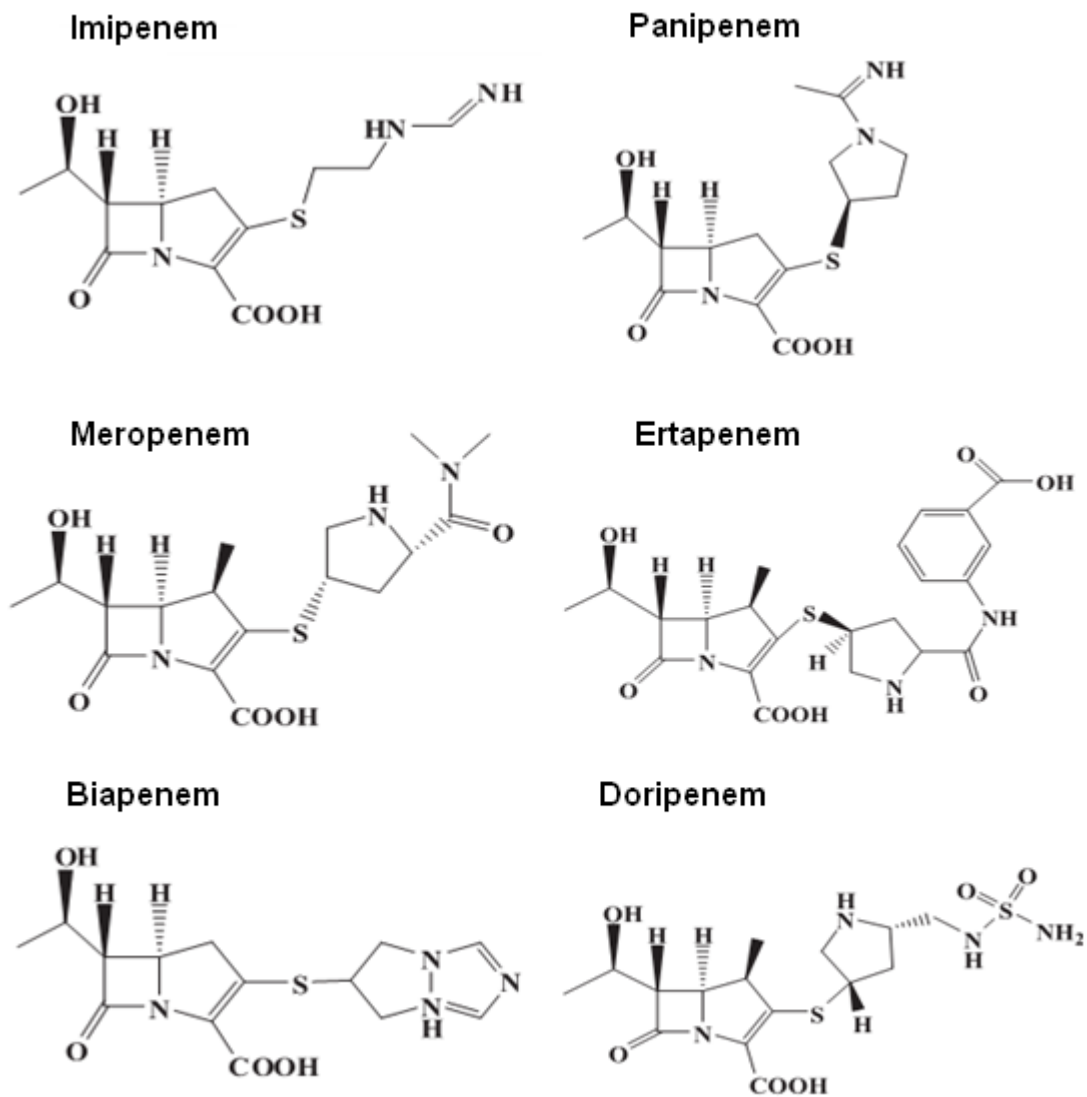


Figura 1-3. Estructuras químicas de algunos carbapenem (Krisztina *et al*, 2011).

Los carbapenémicos no son compuestos homogéneos, ya que sus espectros antimicrobianos y características farmacocinéticas son diferentes, por lo que se creó una propuesta para una nueva clasificación para los compuestos carbapenémicos, la cual se expone en la **Tabla 1-1** (Shah y Isaacs, 2003).

Tabla 1-1. Clasificación para carbapenémicos (Shah y Isaacs, 2003).

Grupo 1	Carbapenémicos de amplio espectro, con limitada actividad contra bacilos Gram negativos no fermentadores, que están indicados principalmente en infecciones adquiridas en la comunidad. Ejemplo: ertapenem.
Grupo 2	Carbapenémicos de amplio espectro, activos contra bacilos Gram negativos no fermentadores (<i>Acinetobacter</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp), indicados principalmente en infecciones nosocomiales. Ejemplo: imipenem/cilastatina y meropenem.
Grupo 3	Carbapenémicos con actividad contra <i>Staphylococcus</i> spp meticilina resistente (aún no licenciados).

Los carbapenémicos poseen la capacidad de evadir la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana, siendo la clase de mayor actividad entre los antibióticos β -lactámicos, por lo que habitualmente se reservan para el tratamiento de infecciones graves o para aquéllas producidas por organismos resistentes a los otros antibióticos (Livermore, 2011).

Imipenem posee gran potencia, un amplio espectro de acción antimicrobiano y un buen perfil de seguridad (Birnbaum *et al*, 1985; Kropp *et al*, 1985). A la fecha más de 26 millones de pacientes han sido tratados con imipenem, y en donde este sigue jugando un papel importante en los tratamientos empíricos y en los apuntados a infecciones severas de difícil manejo (Rodloff *et al*, 2006).

1.3 Imipenem, propiedades químicas y mecanismo de acción

Imipenem denominado también como N-Formimidooiltienamicina (**Figura 1-3**) es un derivado semisintético de tienamicina *Streptomyces cattleya* (Alvin G y Nord CE., 1995). Desde el punto de vista estructural, este antibiótico posee una sustitución del átomo de azufre del anillo central de la mayor parte de los antibióticos β -lactámicos por un grupo metileno (-CH₂). Esta sustitución aumenta la reactividad del imipenem con las proteínas de la pared celular de las bacterias y, por lo tanto, le confiere un efecto bactericida más potente. Otra diferencia con las penicilinas y cefalosporinas es que la cadena lateral hidroxietílica del imipenem está unida al anillo betalactámico en posición trans, y esta singular configuración lo hace excepcionalmente estable ante las betalactamasas bacterianas¹.

Imipenem es rápidamente degradado por la dehidropeptidasa-1 del riñón, por lo que está combinado en proporción 1:1 con cilastatina, un inhibidor de esta enzima. Cilastatina no sólo previene la degradación de imipenem, sino que también protege los riñones contra efectos potenciales tóxicos ejercidos por las dosis más altas de imipenem (Rodloff *et al*, 2006).

El mecanismo de acción de imipenem es como el de los otros β -lactámicos, inhibe la reacción de entrecruzamiento entre los polímeros de peptidoglicanos, (etapa final de la síntesis de la pared celular bacteriana) por inactivación de importantes

¹ <http://www.mufel.net/plm/prods/36371.htm>

enzimas, la carboxipeptidasa y la transpeptidasa. Este tipo de enzimas están ancladas a la membrana plasmática de la bacteria y se les denomina PBP (proteínas ligadoras de penicilinas), ya que es aquí, donde se unen los β -lactámicos, inhibiéndolas en forma no competitiva e irreversible. Todas las bacterias constan de este tipo de proteínas, variando en su número y afinidad de unión por diferentes antibióticos β -lactámicos de acuerdo a cuál sea la bacteria.

La afinidad de imipenem y bencilpenicilina a las diferentes enzimas se muestra en la **Tabla 1-2**. De esta forma imipenem induce la formación de formas alargadas o esferoplastos con la subsecuente ruptura celular, pero no el crecimiento de filamentos de bacteria que se observa por los otros β -lactámicos. Por lo tanto, el tratamiento de imipenem reduce la cantidad de lipopolisacárido liberado durante la bacteriólisis (Jackson y Kropp, 1992).

Tabla 1-2. Las concentraciones de imipenem y bencilpenicilina requeridas para la inhibición del 50 % de la actividad de entrecruzamiento de peptidoglicano y la actividad D-alanina carboxipeptidasa en PBS de *E. coli* (Hashizume *et al*, 1984).

PBP responsable de actividad enzimática	Actividad enzimática	50% de la concentración inhibitoria (µg/mL)	
		Imipenem	Bencilpenicilina
1A	Transpeptidasa	0.5	<0.1
1B	Transpeptidasa	0.8	1
2	Transpeptidasa	1	1.6
3	D-Alanina carboxipeptidasa	>3	0.1 - 0.3
4	D-Alanina carboxipeptidasa	0.03	0.04
5	D-Alanina carboxipeptidasa	0.034	5.5

El mecanismo de acción de imipenem le otorga actividad contra agentes Gram-positivos y Gram-negativos, cocos y bacilos, aerobios y anaerobios. Imipenem puede tener actividad contra *Micobacteria spp.*, sin embargo *Micoplasma*, *Clámida*, *Legionella*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium difficile* y *Staphylococcus aureus meticillina*-resistente (MRSA) no están dentro de su espectro antimicrobiano (Rodloff *et al*, 2006). En la **Tabla 1-3** se detalla el espectro de acción para imipenem²

² Prospecto TIENAM®, 2013

Tabla 1-3. Organismos frente a los que imipenem es normalmente activo in vitro (prospecto TIENAM®).

Aerobios Gramnegativos	
<i>Achromobacter spp.</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Acinetobacter spp.</i> (antes <i>Mima-Herellea</i>)	(anteriormente <i>Proteus morganii</i>)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (incluyendo cepas productoras de penicilinas)
<i>Alcaligenes spp.</i>	
<i>Bordetella bronchicanis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Pasteurella spp.</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Brucella melitensis</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>
<i>Capnocytophaga spp.</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Providencia spp.</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Enterobacter spp.</i>	(anteriormente <i>Proteus rettgeri</i>)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Pseudomonas spp.**</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Haemophilus influenzae</i> (incluyendo cepas productoras de beta-lactamasas)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Salmonellaspp.</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella typhi</i>
(anteriormente <i>Serratia liquefaciens</i>)	<i>Serratia spp.</i>
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	(anteriormente <i>Serratia liquefaciens</i>)
	<i>Serratia marcescens</i>

<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Shigella spp.</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Yersinia spp.</i> (anteriormente <i>Pasteurella</i>)
<i>Legionella spp.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Moraxella spp.</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

***Xanthomonas maltophilia* (anteriormente *Pseudomonas maltophilia*) y algunas cepas de *Pseudomonas cepacia* no son generalmente sensibles a imipenem.

Aerobios Grampositivos

<i>Bacillus spp.</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Streptococcus</i> Grupo C
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus</i> Grupo G
<i>Nocardia spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Pediococcus spp.</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (incluyendo cepas productoras de penicilinas)	<i>Streptococcus grupo viridans</i> (incluyendo cepas alfa y gamma hemolíticas)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (incluyendo cepas productoras de penicilinas)	

Enterococcus faecium y algunos estafilococos resistentes a meticilina no son sensibles a imipenem.

Anaerobios Gramnegativos

<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bacteroides distasonis</i>	(anteriormente <i>Bacteroides accharolyticus</i>)
<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Prevotella bivia</i> (antes <i>Bacteroides bivius</i>)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Prevotelladisiens</i> (antes
<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>Bacteroidesdisiens</i>)

<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Prevotellaintermedia</i>
<i>Bilophila wadsworthia</i>	(antes <i>Bacteroides intermedius</i>)
<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	(antes <i>Bacteroides melaninogenicus</i>)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Veillonella</i> spp.

Anaerobios Grampositivos

<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Mobiluncus</i> spp.
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Microaerophilic streptococcus</i>
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Peptococcus</i> spp.
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
<i>Eubacterium</i> spp.	<i>Propionibacterium</i> spp.
<i>Lactobacillus</i> spp.	(incluyendo <i>P. acnes</i>)

Otras

Mycobacterium fortuitum
Mycobacterium smegmatis

Las pruebas in vitro muestran una actividad sinérgica de imipenem y aminoglucósidos frente a algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Administración, farmacocinética y farmacodinamia

La forma farmacéutica de imipenem corresponde a un polvo estéril para reconstitución y administración por vía intravenosa, y su presentación está compuesta por 500 mg de imipenem y 500 mg de cilastatina sódica contenidos en un vial, además contiene bicarbonato de sodio como amortiguador para proporcionar soluciones con pH de 6,5 a 8,5. La semivida plasmática de imipenem

es de una hora y su grado de unión del imipenem con las proteínas plasmáticas humanas es de 20% aproximadamente (Rodloff *et al*, 2006)

Imipenem pertenece al tipo de antibióticos tiempo-dependiente, es decir el éxito terapéutico viene dado por mantener concentraciones plasmáticas del antibiótico (en el sitio de infección) por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) determinada para el microorganismo infectante, durante el mayor tiempo posible inter-dosis (Calvo *et al*, 2004; Flores *et al*, 1998).

En la **Tabla 1-4** se detallan concentraciones de imipenem en tejidos y líquidos corporales después de una dosis de 1g.

La administración intravenosa de imipenem de 250 mg, 500 mg y 1000 mg produce, en el transcurso de 20 minutos, concentraciones plasmáticas máximas de imipenem de 12 a 20 µg/mL, de 21 a 58 µg/mL, y de 41 a 83 µg/mL respectivamente. Además, con dichas dosis, las concentraciones plasmáticas de imipenem disminuyen hasta menos de 1 µg/mL en cuatro a seis horas. Las concentraciones urinarias de imipenem fueron mayores de 10 µg/mL hasta ocho horas después de administrar una dosis de 500 mg de imipenem (Rodloff *et al*, 2006).

Tabla 1-4. Concentraciones de Imipenem en tejidos y líquidos corporales después de una dosis de 1g (TIENAM® prospecto)

Tejido o líquido	µg/mL o µg/g	Tiempo transcurrido (horas)
Cuerpo vítreo	3.4	3.5
Humor acuoso	2.99	2.0
Tejido pulmonar	5.6	1.0
Espujo	2.1	1.0
Pleural	22.0	1.0
Peritoneal	23.9	2.0
Bilis	5.3	2.25
Líquido cefalorraquídeo:		
Sin meningitis	1.0	4.0
Con meningitis	2.6	2.0
Secreción prostática	0.2	1.0 - 1.5
Tejido prostático	5.3	1.0 - 2.75
Trompas de Falopio	13.6	1.0
Endometrio	11.1	1.0
Miometrio	5.0	1.0
Hueso	2.6	1.0
Líquido intersticial	16.4	1.0
Piel	4.4	1.0
Fascia	4.4	1.0

Cuando se administra sólo, imipenem es metabolizado en los riñones por la dehidropeptidasa I. Los porcentajes individuales de recuperación de la orina en varios estudios variaran entre 5 y 40% con un promedio de 15 a 20% (Rodloff *et al*, 2006). Las dosis de Imipenem varían desde 1 a 4 g/d, sin sobrepasar 50 mg/Kg/día, repartidos en 3 o 4 dosis, dependiendo de la susceptibilidad del

germen, la gravedad del caso y la penetración del antibiótico en la región. En caso de insuficiencia renal hay que adaptar la posología según la depuración de creatinina del paciente; y en caso de diálisis se sugiere dar una dosis suplementaria posterior al procedimiento. Su administración es mediante infusión endovenosa lenta en el transcurso de 20 a 30 minutos, para cada dosis mayor de 500 mg, la administración se realiza en el transcurso de 40 a 60 minutos².

En la **Tabla 1-5** se presenta las dosificaciones de imipenem basadas en un paciente con función renal normal (aclaramiento de creatinina mayor a 70 mL/min/1,73 m²) y peso corporal mayor a 70 kg.

Tabla 1-5. Dosificación de Imipenem i.v. en adultos con función renal normal y peso corporal 70 kg².

Gravedad de la infección	Dosis (mg de imipenem)	Intervalo entre dosis	Dosis total diaria
Leve	250 mg	6 horas	1 g
Moderada	500 mg	8 horas	1.5 g
	100 mg	12 horas	2 g
Severa, por gérmenes muy sensibles	500 mg	6 horas	2 g
Severa y/o que pone en peligro la vida, causada por gérmenes menos sensibles (principalmente algunas cepas de <i>Ps. aeruginosa</i>)	1000 mg	8 horas	3 g
	1000 mg	6 horas	4 g

² Prospecto TIENAM®, 2013

1.5 Estabilidad del fármaco

La estabilidad del fármaco se define como la capacidad de un producto farmacéutico, para conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, a lo largo de su tiempo de conservación (OMS, 2000). Existen múltiples factores que afectan la estabilidad de un producto farmacéutico; la interacción potencial entre el principio activo y excipientes, el proceso de elaboración, la forma de dosificación, sistema de envases, las condiciones ambientales durante el transporte, almacenamiento y manipulación.

Las propiedades que pueden alterarse en un fármaco al verse afectada su estabilidad y sus potenciales consecuencias son del tipo (Debesa *et al*, 2004):

- Químicas: cada ingrediente activo puede variar su integridad química y la potencia declarada.
- Físicas: pueden alterarse algunas propiedades físicas originales tales como la apariencia, uniformidad, disolución, color, etc.
- Microbiológicas: puede afectarse la esterilidad o la resistencia al crecimiento bacteriano.
- Terapéuticas: pueden modificarse los efectos terapéuticos esperados.
- Toxicológicas: pueden ocurrir formación de productos tóxicos.

Cuando la estabilidad de un fármaco se altera, este puede sufrir cambios tanto en su efectividad (debido a que una alteración podría disminuir la concentración sanguínea del principio activo, disminuyendo así su potencia farmacológica), como en la seguridad que entrega al paciente (debido a que la modificación en su estructura podría generar productos de degradación tóxicos para el paciente) (Cuervas-Mons *et al*, 2004; Debesa *et al*, 2004). Por lo tanto la estabilidad de un fármaco es un factor que determina la efectividad y seguridad de un tratamiento.

La **Tabla 1-6** muestra el período de estabilidad de imipenem cuando se reconstituye con determinadas soluciones para infusión y se almacena a temperatura ambiente o bajo refrigeración de acuerdo a la información entregada por el proveedor².

Tabla 1-6. Estabilidad de imipenem reconstituido.

Diluyente	Período de estabilidad	
	Temperatura ambiente (25°C)	Refrigeración (4°C)
Cloruro sódico isotónico	4 horas	24 horas
Dextrosa en agua 5%	4 horas	24 horas
Dextrosa en agua 10%	4 horas	24 horas
Dextrosa 5% y ClNa 0,9%	4 horas	24 horas
Dextrosa 5% y ClNa 0,45%	4 horas	24 horas
Dextrosa 5% y ClNa 0,225%	4 horas	24 horas
Dextrosa 5% y ClK 0,15%	4 horas	24 horas
Manitol 5% y 10%	4 horas	24 horas

² Prospecto TIENAM®, 2013

Sin embargo, estudios recientes han evidenciado atisbos de inestabilidad química de imipenem en determinadas condiciones. Olivares (2013) validando un método de monitorización farmacocinética de ceftazidima e imipenem encontró mediante la evaluación de la especificidad que imipenem es termolábil, muy sensible a hidrólisis acida, hidrólisis alcalina, sensible a la oxidación e inestable a la luz. En otro estudio de estabilidad de imipenem en mezclas intravenosas (Yoshida *et al*, 2012) se halló que la hidrólisis de imipenem en solución acuosa se encuentra acelerada por el pH, y por concentraciones crecientes de bisulfito de sodio (SBS) y L-cisteína. También existen antecedentes (Swanson *et al*, 1986) que estudiaron el efecto de la temperatura sobre la cinética de degradación de imipenem en suero fisiológico, evidenciando que existen variaciones de la vida media a 37°C.

Dado al importante rol que cumple imipenem frente a las infecciones de difícil manejo en la clínica actual, y las evidencias anteriormente expuestas, que sugieren la existencia de ciertos problemas con respecto a la estabilidad química de imipenem; y frente a las consecuencias de que esto conllevaría en la administración del fármaco, en la efectividad y seguridad de la terapia antimicrobiana, es que en el presente trabajo se evaluó la estabilidad de imipenem bajo condiciones clínicas de administración, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.6 Validación y verificación de un método analítico

Para asegurar que los resultados entregados por un método son confiables, la validación de dicho método analítico es un paso fundamental de acuerdo a lo señalado por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

La validación de un método analítico busca establecer con fundamento estadístico, que el método es apropiado para los fines previstos (Merino *et al*, 2010). En términos generales se establece que el laboratorio debe validar un método cuando corresponden a:

- Métodos no normalizados: corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- Método normalizado con una modificación significativa.

En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como validación menor o verificación cuando se trate de:

1. Métodos normalizados.
2. Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.
3. Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.

4. Cuando se trate de métodos previamente validados, que haya sufrido alguna alteración significativa por lo cual deber volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser: cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado.

En caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta al ensayo. Como el ensayo realizado corresponde a un método previamente validado con una modificación en la matriz que contiene el analito se debe evaluar los parámetros de acuerdo a lo recomendado por el ISP (**Tabla 1-7**) (Merino et al, 2010).

Tabla 1-7. Datos requeridos para la validación según ISP (Merino et al, 2010).

---Método Cuantitativo---				
	Cualitativo	Normalizado	Modificado	Nuevo
Especificidad	Si	No	Si	Si
Linealidad	No	Si	Si	Si
Sensibilidad	No	Si o No	Si	Si
Limites	Si	Si o No	Si	Si
Precisión	No	Si	Si	Si
Exactitud	No	Si o No	Si o No	Si
Robustez	No	No	Si o No	Si
Aplicabilidad	Si	Si	Si	Si

De este modo el parámetro que se evaluó en esta tesis corresponde a la verificación de la linealidad.

1.6.1 Linealidad

La linealidad de un método analítico es la capacidad de producir una respuesta que sea directamente proporcional a la concentración de analito dentro de un determinado intervalo (Quattrochi *et al*, 1992).

Mediante la realización de un gráfico de concentración versus respuesta se puede determinar el rango lineal, normalmente llamada recta de calibrado. Ésta se establece con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de

trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al Límite Máximo Permitido (LMP) o al valor de interés. El número de puntos a analizar es establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores) (Merino et al, 2010).

Los datos obtenidos a partir de la mejor recta son útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Debe informarse los estimadores de regresión lineal: la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r) y el punto de corte (intercepto) con el eje de las Y (a) (Domínguez-Gil y Martín., 1997).

$$Y = m \times x + a$$

El criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad por lo general es el coeficiente de correlación (r), si r tiene un valor cercano a uno 1, significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0,999. Aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99 (Merino et al, 2010).

Otro criterio de aceptación es la prueba t-Student. En donde se desea probar si existe una correlación significativa. La hipótesis nula H_0 es que no existe correlación entre X e Y. Si el valor observado de $t_{calculado}$ es mayor que t_{crit} , se

rechaza la hipótesis nula H_0 , siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Donde:

$t_{\text{calculado}}$ = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación

$n - 2$ = Número de grados de libertad

r^2 = Valor del coeficiente de determinación

2 HIPOTESIS

El manejo adecuado de las condiciones ambientales (temperatura y luminosidad), habituales en la práctica clínica durante la administración de imipenem, mejoran la estabilidad del fármaco e incidirían positivamente en la efectividad y seguridad de la terapia antimicrobiana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la estabilidad de imipenem en condiciones ambientales (temperatura y luminosidad), habituales de administración utilizadas en la práctica clínica, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar la metodología analítica para medir imipenem, a partir de un método ya validado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.
2. Establecer las variables que determinan las condiciones clínicas en las que se administra y afecta el imipenem como temperatura, exposición a la luz y tipo de disolución.
3. Evaluar estrategias de acción que incidan positivamente en la estabilidad de imipenem en condiciones habituales en la práctica clínica.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

- Imipenem
 - Lab-1: Inem® Laboratorio Chile 1 g (500 mg imipenem, 500 mg cilastatina).
 - Lab-2: Ethanem® Laboratorio Ethon Pharmaceuticals 1 g (500 mg imipenem, 500mg cilastatina).
 - Lab-3: Imipenem + Cilastatina Laboratorio Kabi 1 g (500 mg imipenem, 500 mg cilastatina).
 - Lab 4: Tienam® Laboratorio Merck Sharp & Dohme 1g (500 mg imipenem, 500 mg cilastatina).

- Agua Ultra pura calidad HPLC.
- Metanol calidad HPLC (Merck, USA).
- Suero Fisiológico (cloruro sódico al 0.9%) Fresenius Kabi 100 mL solución para perfusión.
- Suero glucosado (dextrosa al 5%) Fresenius Kabi 100 mL solución para perfusión.

4.2 Materiales de laboratorio

- Vasos precipitados 100, 250, 500 mL (Material de vidrio clase A).
- Filtros de membrana de acetato de celulosa, tamaño de poro 0,2 μm .
- Jeringas de plástico desechables de 10 mL.
- Probeta graduada de 200, 500 y 1000 mL.
- Tubos Eppendorf 1,5 mL.
- Jeringa HPLC 50 μL Hamilton 80565.
- Micropipeta 100, 1000 μL .
- Guantes desechables de látex.

4.3 Instrumentos y equipos

- Equipo HPLC Jasco PU 2087 Plus.
- Detector UV-Visible Jasco con lámpara de deuterio modelo UV- 2075 plus.
- Bomba cuaternaria Jasco modelo PU-2089 plus.
- Columna HPLC KYA TECH HiQ sil C18HS tamaño de particular 5 μm y tamaño de poro de 100 Å.
- Balanza analítica digital Denver Instrument Company® modelo AA200. 120 ± 0.0001 g.
- Medidor de pH Hanna Instrument® modelo HI9321.
- Agitador magnético
- Baño de ultrasonido.

- Manta calefactora Thermo electron modelo Hot pocket.
- Shaking Incubator modelo Labtech LSI-3016A
- Refrigerador.

4.4 Metodología

La metodología para la realización del presente trabajo se efectuó de acuerdo a las siguientes etapas:

4.4.1 Determinación de la idoneidad del sistema

La determinación de la idoneidad del sistema es un conjunto de ensayos que se efectúan para demostrar que un sistema es adecuado para una metodología analítica determinada (ICH, 2005). Se considera como parte integral del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización del ensayo analítico. Los parámetros de idoneidad no son parte integral de la validación o verificación, sin embargo, son considerados dentro de las buenas prácticas de laboratorio (USP 35, 2012).

Los parámetros cuantitativos que indican la eficiencia e idoneidad de una columna cromatográficas son:

- **Números de platos teóricos (N):** cortes o rodajas imaginarias en que se divide una columna cromatográfica, donde se consigue un equilibrio transitorio antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente plato, equivalente a un corte (Quattrochi *et al*, 1992). La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos. También es una medida de la definición de los picos, que es importante para detectar trazas de componentes (USP 35, 2012).
- **Factor de asimetría (As):** medida de la asimetría de un pico cromatográfico. Los valores cercanos a 1 indican picos simétricos y, el valor aumenta cuando la asimetría es más pronunciada. Cuando esto ocurre, la integración y la precisión se vuelven menos confiables (Quattrochi *et al*, 1992).

Los valores límites propuestos aparecen en la **Tabla 4-1** (USP 35, 2012).

Tabla 4-1. Valores límites establecidos de los parámetros de idoneidad del sistema.

Parámetro	Valor límite
Números de platos teóricos (NTP)	$N \geq 2000$
Factor de asimetría As	$As \leq 2$

4.4.2 Verificación del método HPLC

Para realizar el estudio de la cinética de degradación de imipenem en condiciones clínicas de administración mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fue necesario verificar el método validado por Olivares (2013). Esto debido al cambio de matriz en las muestras del método (suero fisiológico y suero glucosado 5%) para el presente ensayo con respecto al método validado (buffer fosfato pH 7), y con el fin de demostrar que la alteración realizada no afecta al ensayo. Para verificar el método se evaluó el parámetro de linealidad.

4.4.3 Solución estándar curva de calibrado HPLC

Se preparó una solución de imipenem de 1000 ppm en un volumen de 25 mL en buffer fosfato 0.1N pH 7, suero fisiológico (cloruro sódico 0.9%) y suero glucosado (dextrosa al 5%). Los estándares de trabajo fueron preparados diariamente por dilución de la solución estándar en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado 5% según corresponda. Este rango de concentraciones se determina según las concentraciones esperadas luego de dosis terapéuticas obtenidas en la literatura (Flores *et al*, 1998)

4.4.4 Condiciones cromatográficas

El estudio de la estabilidad de imipenem se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), bajo las condiciones presentadas en la **Tabla 4-2**.

Tabla 4-2. Condiciones cromatografías para la determinación de imipenem por cromatografía líquida (HPLC).

Imipenem	
Fase Móvil	Buffer fosfato 0,1 N/Metanol (60/40)
Temperatura	35° C
Flujo	0,8 mL/min
pH fase móvil	7,00 ± 0,05
Tipo de Columna	C18
Longitud de onda de trabajo	313 nm

Previo a la inyección de las muestras, la columna se equilibra durante 30-45 min con la fase móvil.

4.4.4.1 Linealidad

La linealidad de un método analítico describe la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Para la determinación de esta, se preparó una serie de 8 concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 y 600 ppm de Imipenem_{LAB-1}, Imipenem_{LAB-2} e Imipenem_{LAB-3} en buffer fosfato 0,1N pH 7, suero fisiológico (cloruro sódico al 0.9%) y suero glucosado (dextrosa al 5%) a partir de una solución estándar.

Cada concentración se inyectó por triplicado obteniéndose un total de 24 inyecciones para cada curva. La determinación se realizó en condiciones de repetibilidad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis. Se determinaron los coeficientes de correlación y el grado de significación con una tabla de prueba de coeficiente de correlación (Quattrochi *et al*, 1992).

4.4.5 Cinética de degradación

Consiste en la determinación de las variables ambientales clínicas de administración de imipenem, las cuales fueron: temperatura, exposición a la luz y tipo de solución inyectable. El ensayo se realizó combinando las variables expuestas en la **Tabla 4-3**

Tabla 4-3. Condiciones en las que se realizó el ensayo de cinética de degradación para imipenem.

		Suero fisiológico		Suero glucosado	
		P	E	P	E
Temperatura	25°C	Condición 1	Condición 2	Condición 5	Condición 6
	35°C	Condición 3	Condición 4	Condición 7	Condición 8

P: Protegido de la luz; E: Expuesto a la luz

Para cada condición se preparó una solución de Imipenem_{LAB-4} de 4 mg/mL en 100 mL de acuerdo a la concentración de imipenem una vez reconstituido (para una dosis de 1 g en 250 mL de solución) la cual se dividió en 5 frascos de 20 mL cada uno, en donde se determinó la concentración de imipenem, retirando un frasco a tiempo 0, 15, 30, 45 y 60 min. La determinación de imipenem se realizó previa

dilución de las muestras (factor de dilución= 80). Las inyecciones a cada tiempo fueron realizadas en triplicado, de manera inmediata una de la otra.

5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Determinación de la idoneidad del sistema

Los resultados obtenidos para los parámetros de idoneidad (**Tabla 5-1**), cumplen con los valores límites establecidos, por lo que se demuestra que el sistema es adecuado para la metodología analítica a utilizar.

Tabla 5-1. Parámetros de idoneidad obtenidos y valores límites establecidos.

Parámetro	Resultados	Valor límite	Cumple
Números de platos teóricos (NTP)	NTP_{buffer} : 2437,13	$N \geq 2000$	Si
	NTP_{SF} : 2149,86		
	NTP_{SG} : 2128,44		
Factor de asimetría As	As_{buffer} ; 1,84	$As \leq 2$	Si
	As_{SF} : 1,93		
	As_{SG} : 1,76		

5.2 Verificación del método

En el presente trabajo se efectuó una modificación del método validado por Olivares (2013) para la determinación de imipenem, que consistió en cambiar matriz buffer fosfato 0.1 N pH 7 por suero fisiológico y suero glucosado al 5%. Esto considerando que ambos sueros son recomendados en la práctica clínica para reconstituir y administrar imipenem por infusión endovenosa.

Para todas las matrices se realizaron las siguientes pruebas con el fin de demostrar que la modificación del solvente no afecta al ensayo.

5.2.1 Parámetro de Linealidad

Para evaluar este parámetro se analizaron las áreas cromatográficas de las curvas de calibrado estándar de imipenem y como estas se ven influenciada por los cambios en la matriz de la muestra y en los cambios de reactivos (distinto laboratorio proveedor).

A partir de una solución de Imipenem de 1000 ppm, se prepararon 8 diluciones del fármaco a concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 y 600 ppm, en donde cada concentración se leyó por triplicado (**Anexo 8A**). El análisis fue realizado con imipenem de 3 laboratorios distintos en las distintas matrices.

Los resultados de la regresión lineal para imipenem de Imipenem_{LAB-1} (**Tabla 5-2**) se ajustan a un modelo lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 20 y 600 ppm tanto en buffer fosfato 0.1 N, suero fisiológico y suero glucosado, ya que la linealidad se ve comprobada al analizar los valores de coeficiente de correlación múltiple. Se plantea que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,99 cuando se trata de trazas (Merino et al, 2010). Ya que el sistema cumple los requisitos de linealidad para cada condición evaluada, se dice que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

Tabla 5-2. Prueba de linealidad para Imipenem_{LAB-1}.

Resultados	Imipenem _{LAB-1} .		
	Buffer fosfato 0.1N	Suero fisiológico	Suero glucosado 5%
Ecuación de la recta	$Y = 0,7436 * X + 11,94$	$Y = 1,028 * X + 1,210$	$Y = 0,9266 * X + 18,57$
Coefficiente de correlación múltiple	0,9945	0,9978	0,9999
Pendiente (p-value)	$0,7436 \pm 0,04444$ ($< 0,0001$)	$1,028 \pm 0,04267$ ($< 0,0001$)	$0,9266 \pm 0,02417$ ($< 0,0001$)
Intercepción (p-value)	11,94 (0,1561)	1,210 (0,8570)	18,57 (0,0241)
p-value entre pendientes	$< 0,0001$		

Para determinar si la correlación lineal es significativa, se realizó un test t de Student siendo la hipótesis nula que no existe correlación lineal. En este caso el t_{tabulado} resulto ser de 2,447 establecido para n-2 grados de libertad y un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia estadística, $\alpha = 0,05$, y $t_{\text{calculado}}$ para Inem® en buffer fosfato, suero fisiológico y suero glucosado resulto ser de 23,23, 37,27 y 173,9 respectivamente; lo que se interpreta de la siguiente manera: al ser $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$ en las 3 condiciones, entonces se rechaza la hipótesis nula de no linealidad, y esto indicaría que existe una correlación lineal para Imipenem_{LAB-1} tanto en buffer fosfato 0,1 N, como en suero fisiológico y suero glucosado al 5%, esto se ve reflejado en el p-value que fue $p < 0,0001$ en cada caso, lo que indica que es extremadamente significativo.

Por lo tanto la respuesta del equipo fue significativamente lineal, es decir, directamente proporcional en el rango de concentraciones desde 20 ppm hasta 600 ppm para Imipenem_{LAB-1} en buffer fosfato 0,1 N, suero fisiológico y suero glucosado al 5%. Sin embargo al comparar las 3 pendientes entre sí (p-value entre pendientes) se obtiene que las diferencias son extremadamente significativas, por lo tanto las rectas son distintas entre sí.

Los resultados de la regresión lineal para Imipenem_{LAB-2} (**Tabla 5-3**) se ajustan a un modelo lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 20 y 600 ppm tanto en buffer fosfato 0,1 N, suero fisiológico y suero glucosado al 5%, ya que la linealidad se ve comprobada al analizar los valores de coeficiente de correlación múltiple que son 0,9968, 0,9969 y 0,9982 respectivamente. Se plantea que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,99 cuando se trata de trazas (Merino et al, 2010). Ya que el sistema cumple los requisitos de linealidad para cada condición evaluada, se dice que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

Tabla 5-3. Prueba de linealidad para Imipenem_{LAB-2}

Resultados	Imipenem _{LAB-2}		
	Buffer fosfato 0.1N	Suero fisiológico	Suero glucosado 5%
Ecuación de la recta	$Y = 0,6974 * X + 12,87$	$Y = 0,8283 * X + 14,97$	$Y = 0,8384 * X + 22,92$
Coefficiente de correlación múltiple	0,9968	0,9969	0,9982
Pendiente (p-value)	$0,6974 \pm 0,02108$ ($< 0,0001$)	$0,8283 \pm 0,02916$ ($< 0,0001$)	$0,8384 \pm 0,01867$ ($< 0,0001$)
Intercepción (p-value)	12,87 (0,04735)	14,97 (0,1316)	22,92 (0,0019)
p-value entre pendientes	$< 0,0001$		

Para determinar si la correlación lineal es significativa, se realizó un test t de Student siendo la hipótesis nula que no existe correlación lineal. En este caso el t_{tabulado} resulto ser de 2,447 establecido para n-2 grados de libertad y un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia estadística, $\alpha=0,05$, y $t_{\text{calculado}}$ para Imipenem_{LAB-2} en buffer fosfato, suero fisiológico y suero glucosado resulto ser de 14,5, 13,4 y 14,7 respectivamente. Al ser $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$ en las 3 condiciones, entonces se rechaza la hipótesis nula de no linealidad y esto indicaría que existe una correlación lineal para Imipenem_{LAB-2} tanto en buffer fosfato 0,1 N, como en suero fisiológico y suero glucosado al 5%, esto se ve reflejado en el p-value que fue $< 0,0001$ en cada caso, lo que indica que es extremadamente significativo.

Por lo tanto la respuesta del equipo fue significativamente lineal, es decir, directamente proporcional en el rango de concentraciones entre 20 ppm y 600

ppm para Imipenem_{LAB-2} en Buffer fosfato 0,1 N, suero fisiológico y suero glucosado al 5%. Sin embargo al comparar las 3 pendientes entre sí (p-value entre pendientes) se obtiene que las diferencias son extremadamente significativas, por lo tanto las rectas son distintas entre sí.

Los resultados de la regresión lineal para Imipenem_{LAB-3} (**Tabla 5-4**) se ajustan a un modelo lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 20 y 600 ppm tanto en buffer fosfato 0,1 N, suero fisiológico y suero glucosado, ya que la linealidad se ve comprobada al analizar los valores de coeficiente de relación r que son 0,9994, 0,9992 y 0,9995 respectivamente. Se plantea que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,99 cuando se trata de trazas (Merino et al, 2010). Ya que el sistema cumple los requisitos de linealidad para cada condición evaluada, se dice que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.

Para determinar si la correlación lineal es significativa, se realizó un test t de Student siendo la hipótesis nula que no existe correlación lineal. En este caso el t_{tabulado} resultó ser de 2,447 establecido para $n-2$ grados de libertad y un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia estadística, $\alpha=0,05$, y $t_{\text{calculado}}$ para Imipenem_{LAB-3} en buffer fosfato, suero fisiológico y suero glucosado resulto ser de 70,7, 55,8 y 40,3 respectivamente. Al ser $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$ en las 3 condiciones, entonces se rechaza la hipótesis nula de no linealidad y esto indicaría que existe una correlación lineal Imipenem_{LAB-3} tanto en buffer fosfato 0,1 N, como en suero

fisiológico y suero glucosado al 5%, esto se ve reflejado en el p-value que fue < 0,0001 en cada caso, lo que indica que es significativo. Al comparar las 3 pendientes entre sí (p-value entre pendientes) se obtiene que las diferencias no son significativas, por lo tanto se puede decir que las pendientes no son significativamente diferentes, sin embargo sus interceptos poseen diferencias significativas (p-value = 0,3723).

Tabla 5-4. Prueba de linealidad para Imipenem_{LAB-3}

Resultados	Imipenem _{LAB-3}		
	Buffer fosfato 0.1N	Suero fisiológico	Suero glucosado 5%
Ecuación de la recta	$Y = 1,035 \cdot X - 0,8011$	$Y = 1,120 \cdot X + 2,580$	$Y = 1,068 \cdot X + 13,01$
Coefficiente de correlación múltiple	0,9994	0,9992	0,9995
Pendiente (p-value)	$1,035 \pm 0,01128$ ($< 0,0001$)	$1,120 \pm 0,03797$ ($< 0,0001$)	$1,068 \pm 0,02447$ ($< 0,0001$)
Intercepción (p-value)	0,811 (0,8194)	2,580 (0,4300)	13,01 (0,0749)
p-value entre pendientes	0,282		

En resumen, se puede concluir mediante los datos obtenidos que la respuesta del equipo fue significativamente lineal, es decir, directamente proporcional en el rango de concentraciones entre 20 ppm y 600 ppm para imipenem de laboratorio Imipenem_{LAB-3} fosfato 0.1 N, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

5.2.2 Influencia de la matriz

Como se evidenció anteriormente cada curva presentó una respuesta lineal para el método analítico, no obstante en la **Figura 5-1**, que expone las gráficas correspondientes a la regresión lineal de imipenem de cada laboratorio bajo el efecto matriz, se observa un efecto del tipo multiplicativo (Quattrochi *et al*, 1992), esto significa que el efecto matriz afecta a las pendientes obtenidas de las rectas.

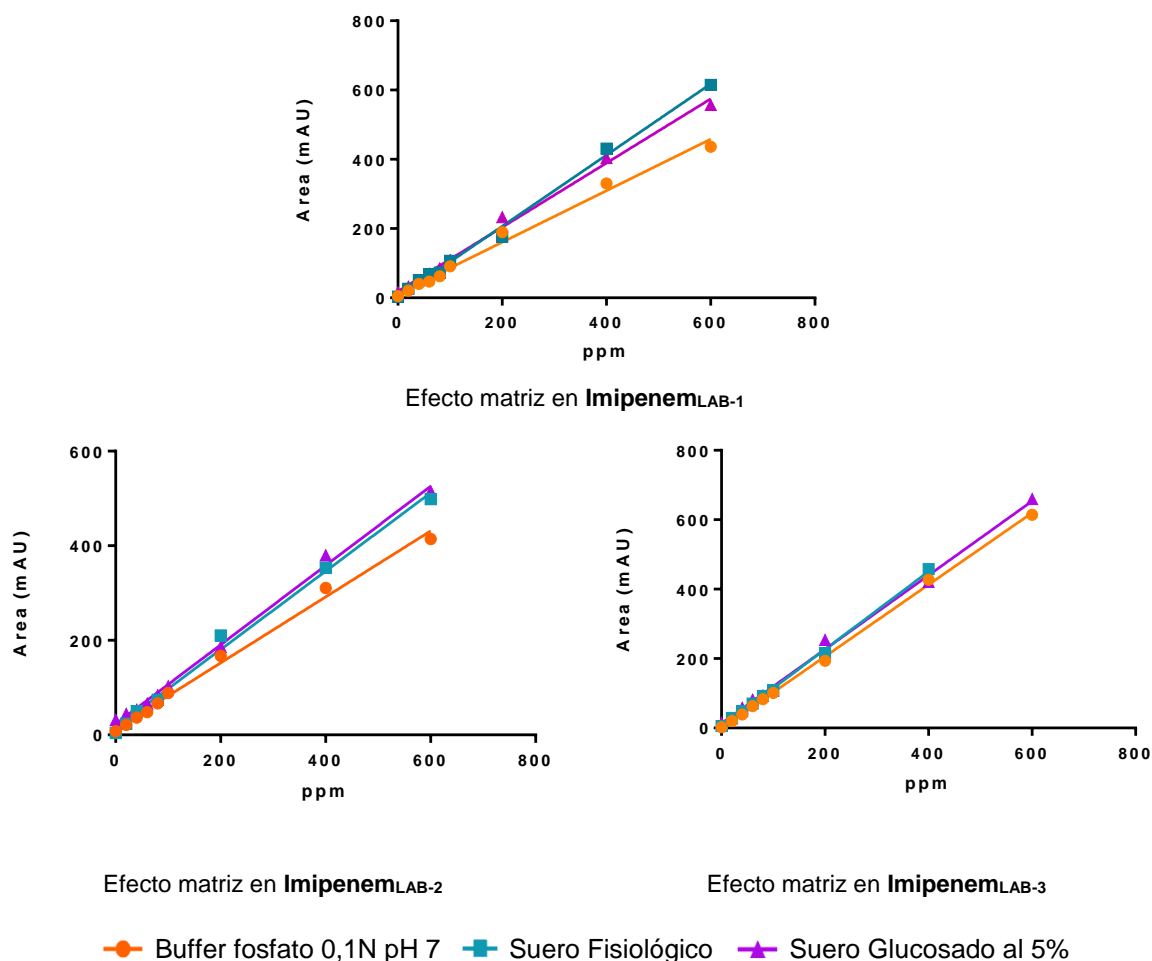


Figura 5-1. Efecto de la matriz en Imipenem_{LAB-1}, Imipenem_{LAB-2} e Imipenem_{LAB-3}. en un rango de concentraciones de 20 a 600 ppm.

Se puede observar que existen diferencias extremadamente significativas al comparar las pendientes de cada matriz (para un mismo laboratorio). Sin embargo lado se obtienen diferencias no significativas en las pendientes de cada matriz, si la regresión lineal para imipenem en buffer se realiza para las concentraciones de 20 hasta 200 ppm. (**Tabla 5-5**).

Tabla 5-5. Variación de pendientes de acuerdo al rango de concentraciones incluidas en la regresión lineal.

		Imipenem _{LAB-1}	Imipenem _{LAB-2}	Imipenem _{LAB-3}
	Rango (ppm)		Pendiente (m)	
Buffer	20-200	0,9213	0,8090	0,963
fosfato	20-600	0,7436	0,6974	1,0345
Suero fisiológico	20-600	1,028	0,8283	1,12
Suero glucosado	20-600	0,9226	0,8384	1,068
p-value	20-200	0,0680	0,9799	0,3377
p-value	20-600	< 0,0001	< 0,0001	0,282

De acuerdo a lo anterior, se puede decir que el efecto de la matriz es menor a un rango de concentración comprendido entre 20 a 200 ppm, lo que se ilustra en la **Figura 5-2**.

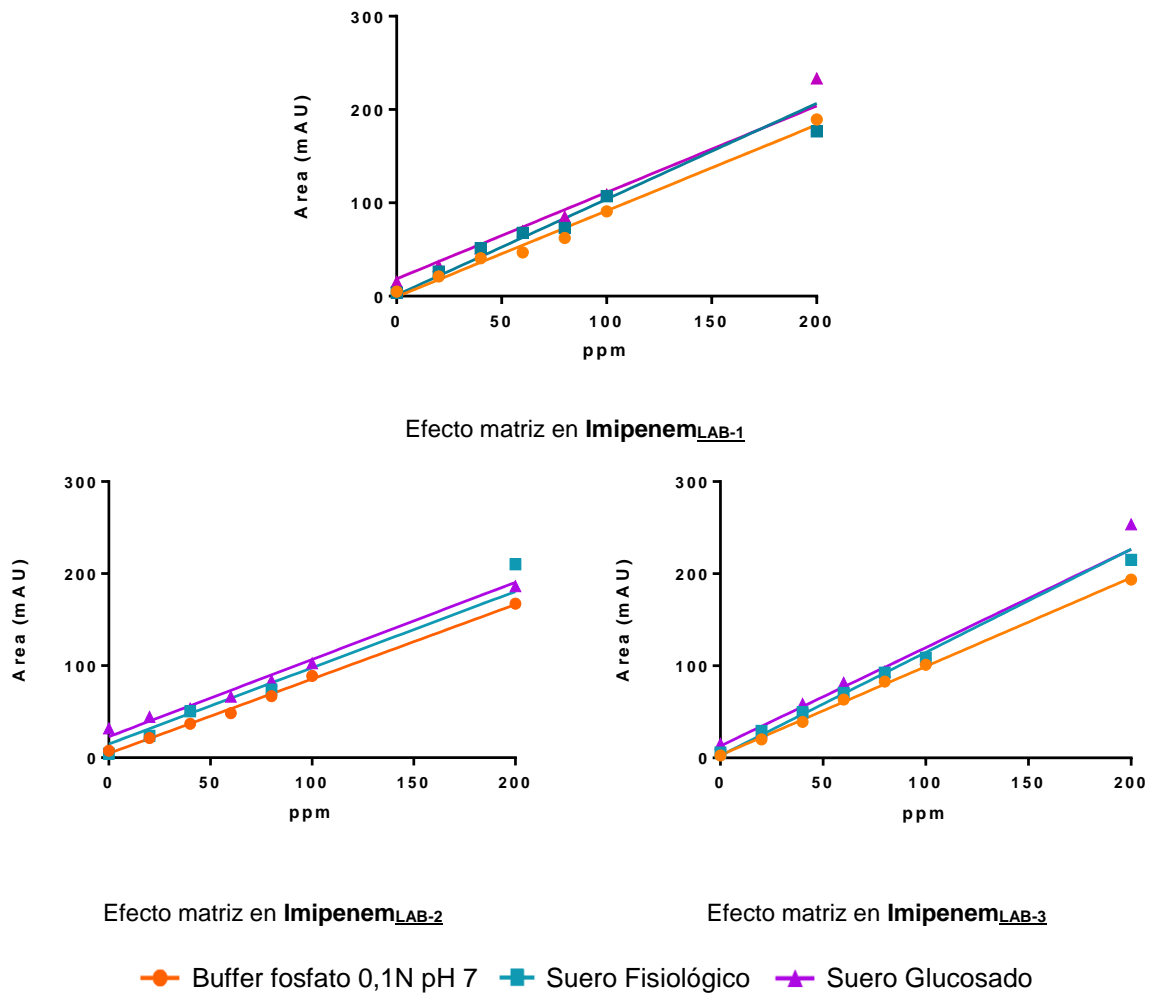


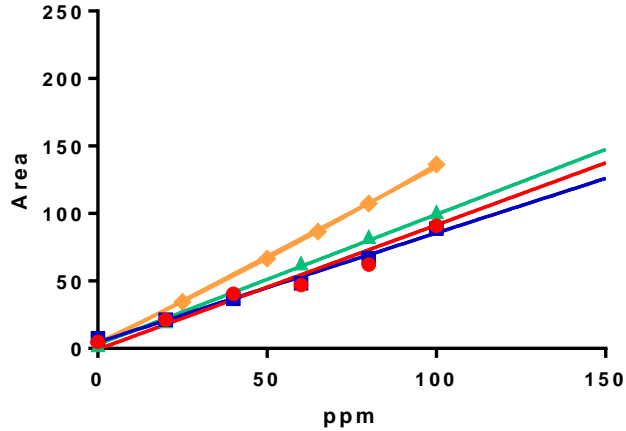
Figura 5-2. Efecto de la matriz en Imipenem_{LAB-1}, Imipenem_{LAB-2} e Imipenem_{LAB-3} para un rango de concentraciones de 20 a 200 ppm.

5.2.3 Influencia del laboratorio proveedor

Como se demostró anteriormente el método analítico presenta una respuesta lineal independientemente si el analito se encuentra en una solución buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico o suero glucosado al 5%. No obstante en la **Figura 5-3**, se expone la gráfica de la regresión lineal de imipenem de 3 laboratorios farmacéuticos con la regresión lineal de los datos de imipenem ($\text{Imipenem}_{\text{LAB-L}}$) obtenidos de la tesis de Olivares (2013), en la cual se observa una mayor pendiente de $\text{Imipenem}_{\text{LAB-L}}$ con respecto a las otras y un p-value que permite corroborar que al comparar estas 4 pendientes se obtienen que los datos poseen diferencias extremadamente significativas, en contraste al comparar solo los 3 laboratorios utilizados en el presente estudio se observa un p-value que indica que las pendientes no son significativamente distintas (**Tabla 5-6**). Esto se puede considerar un efecto de tipo multiplicativo, en donde la influencia del laboratorio genera un efecto matriz que afecta a las pendientes obtenidas de las rectas.

Tabla 5-6. Variación de pendientes de la regresión lineal en buffer fosfato 0,1 N pH 7 de acuerdo al laboratorio proveedor.

	Imipenem			Imipenem				
	LAB-1	LAB-2	LAB-3	Promedio	CV (%)	p-value	LAB-R	p-value
	Pendiente (m)							
Buffer fosfato	0,9213	0.8090	0,963	0,94215	3%	0,0614	1,3169	<0,0001



Influencia de laboratorio proveedor en buffer fosfato 0,1 N pH 7

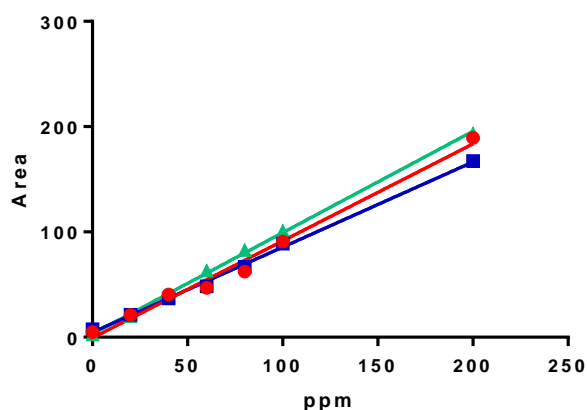
—●— Imipenem_{LAB-1} —■— Imipenem_{LAB-2} —▲— Imipenem_{LAB-3} —◆— Imipenem_{LAB-L}

Figura 5-3. Comparación entre las curvas de calibrado de imipenem de distintos laboratorios en buffer fosfato 0,1 N pH 7.

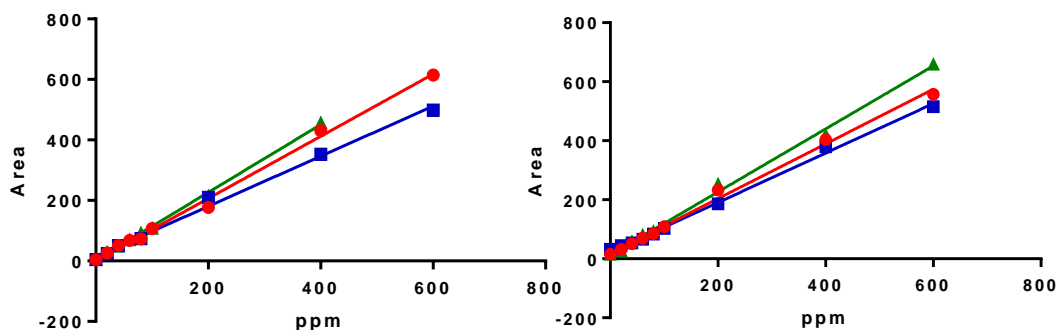
En la **Figura 5-4** se expone las gráficas de la regresión lineal de Imipenem_{LAB-1}, Imipenem_{LAB-2} e Imipenem_{LAB-3}, en las cuales se observa la variación de las pendientes entre laboratorio en solución buffer fosfato 0,1 N pH7, suero fisiológico y en suero glucosado al 5%. De acuerdo a las pendientes obtenidos de la regresión lineal (**Tabla 5-7**), se puede decir que existen variaciones, en donde la mayor variabilidad se observa entre laboratorios en suero fisiológico y en suero glucosado al 5%. Por otra parte se puede apreciar que Imipenem_{LAB-2} es el que obtiene las rectas con menor valor de pendientes.

Tabla 5-7. Variación de pendientes de la regresión lineal en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado, según laboratorio proveedor.

	Imipenem			Promedio	CV (%)	p-value
	LAB-1	LAB-2	LAB-3			
	Pendiente (m)					
Buffer fosfato	0,9213	0,8090	0,9630	0,9422	3%	0,614
Suero fisiológico	1,028	0,8283	1,120	0,9921	15%	0,0019
Suero glucosado	0,9226	0,8384	1,068	0,9430	12%	0,0003



Influencia de laboratorio proveedor en buffer fosfato 0,1 N pH 7



Influencia de laboratorio proveedor en suero fisiológico

Influencia de laboratorio proveedor en suero glucosado

● Imipenem_{LAB-1} ■ Imipenem_{LAB-2} ▲ Imipenem_{LAB-3}

Figura 5-4. Comparación entre las curvas de calibrado de imipenem de distintos laboratorios en suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

De acuerdo a lo anterior es posible afirmar que existe un efecto entre las pendientes de las curvas de calibrado por influencia del laboratorio proveedor.

5.3 Curva de calibrado

Para la determinación de imipenem se preparó una solución de Imipenem_{LAB-4} de 1000 ppm en un volumen de 25 mL en buffer fosfato 0.1N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%, de donde se prepararon estándares de trabajo a 20, 40, 60, 80, 100 y 200 ppm.

Se realizó la regresión lineal con los promedios de las áreas obtenidas a cada concentración (**Anexo 8-B**). En la **Figura 5-5** y **Figura 5-6** se muestran las curvas de calibrado de Imipenem_{LAB-4} en suero fisiológico y en suero glucosado respectivamente.

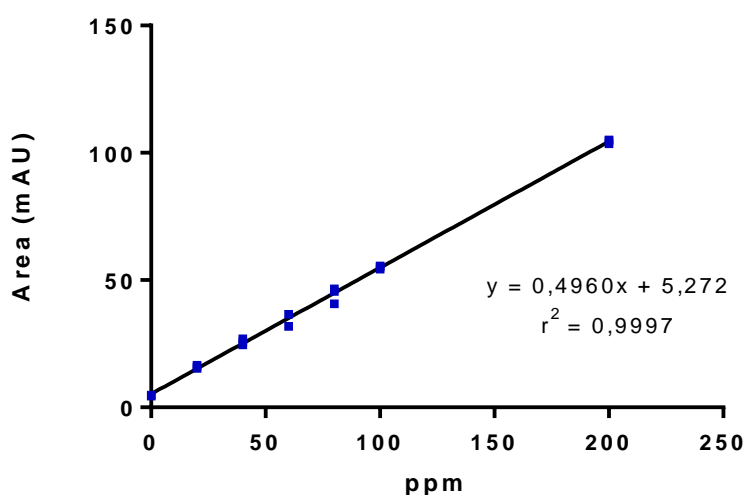


Figura 5-5. Regresión lineal de curva de calibrado Imipenem_{LAB-4} en suero fisiológico.

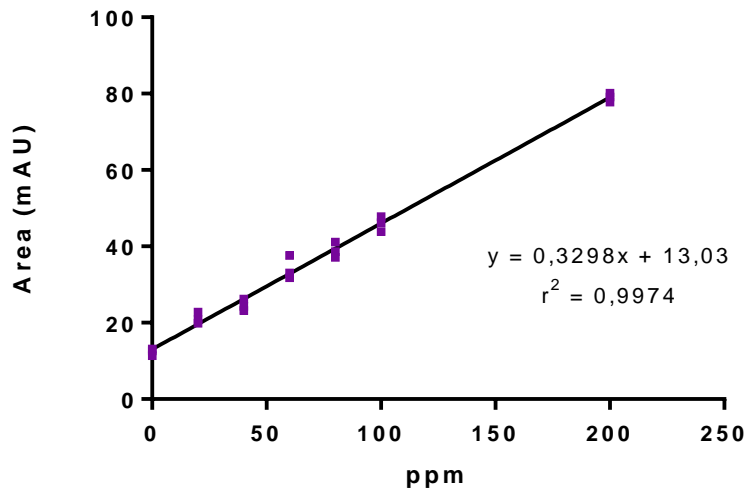


Figura 5-6. Regresión lineal de curva de calibrado Imipenem_{LAB-4} en suero glucosado.

5.4 Cinética de degradación en condiciones clínicas de administración

Se realizó un estudio de la estabilidad de imipenem en condiciones ambientales frecuentes en la práctica clínica de administración del medicamento. Considerando los factores de temperatura, exposición a la luz y solución de reconstitución.

Los resultados se obtuvieron mediante interpolación de la curva de calibrado (**Anexo 8-C**), los cuales se exponen con fin de facilitar su análisis, como porcentajes de la concentración de imipenem a tiempo cero para cada condición (**Tabla 5-8**).

Tabla 5-8. Cinética de degradación de imipenem bajo 8 condiciones de estudio.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Imipenem en SF	25°C - P	25°C - E	35°C - P	35°C - E
Tiempo (min)	Porcentaje de concentración respecto concentración a T0			
0	100%	100%	100%	100%
15	100%	100%	102%	93%
30	98%	102%	101%	95%
45	99%	98%	100%	95%
60	98%	94%	97%	87%

	Condición 5	Condición 6	Condición 7	Condición 8
Imipenem en SG (5%)	25°C - P	25°C - E	35°C - P	35°C - E
Tiempo (min)	Porcentaje de concentración respecto concentración a T0			
0	100%	100%	100%	100%
15	98%	101%	97%	99%
30	97%	99%	102%	93%
45	96%	101%	101%	97%
60	98%	99%	95%	86%

(**SF**): suero fisiológico, (**SG**): suero glucosado, (**P**): protegido de la luz, (**E**): expuesto a la luz, (**T0**): tiempo cero.

Se puede apreciar en la **Tabla 5-7** que para todas las condiciones de estudio una vez transcurrido 60 minutos, imipenem no logra conservarse al 100% de su concentración inicial (C_0), sin embargo, destaca la condición 4 y la condición 8, en donde la concentración de imipenem a 60 minutos (C_{60}) no alcanza a mantener el 90% de C_0 .

Al comparar la gráfica **A** (condiciones 3, 4, 7 y 8) con respecto a la gráfica **B** (condiciones 1, 2, 5 y 6) de la **Figura 5-7** se observa el efecto de la temperatura sobre imipenem en suero fisiológico y suero glucosado al 5%, en donde se

observa una menor concentración del fármaco al cabo de 60 minutos cuando este fue sometido a 35°C.

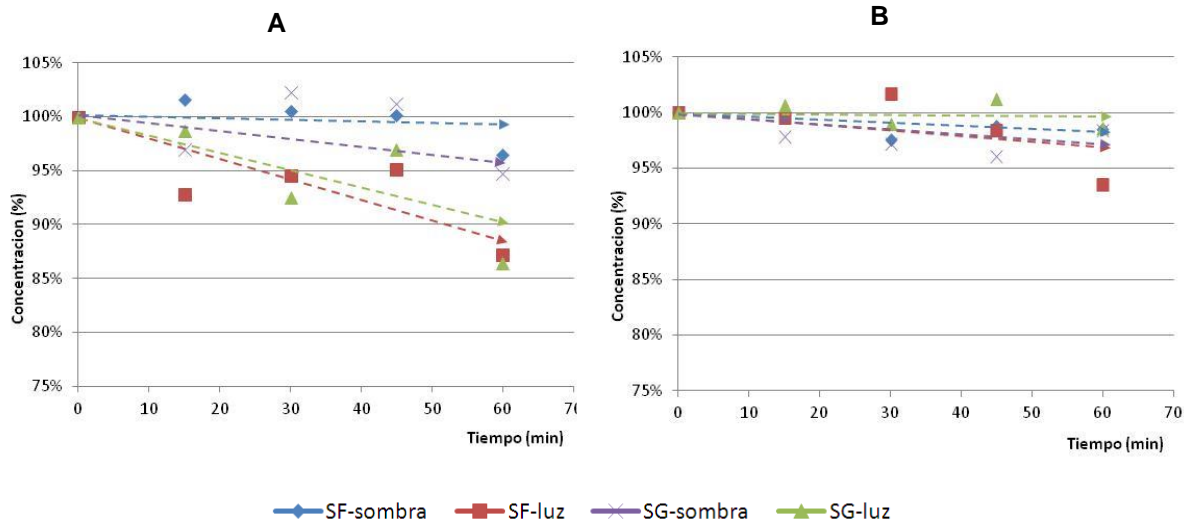


Figura 5-7. Efecto de la temperatura (**A:** 35°C, **B:** 25°C) sobre imipenem en suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

Al comparar la gráfica **A** (condiciones 2, 4, 6 y 8) con respecto a la gráfica **B** (condiciones 1, 3, 5 y 7) de la **Figura 5-8** se observa el efecto de la luz sobre imipenem en suero fisiológico y suero glucosado al 5%, y se destaca una menor concentración del fármaco al cabo de 60 minutos cuando este fue expuesto a la luz.

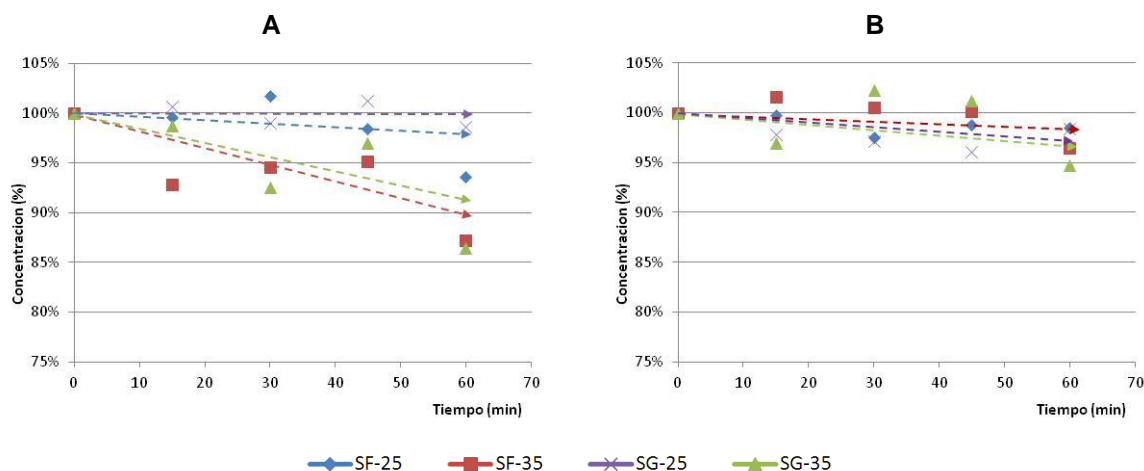


Figura 5-8. Efecto exposición a la luz y protección de la luz en imipenem en suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

Al analizar el efecto de la temperatura y la exposición a la luz sobre imipenem, se puede observar como estos factores repercuten negativamente sobre la estabilidad del fármaco, como lo evidencian las condiciones 4 y 8, en donde se conjugaron una alta temperatura junto a la exposición a la luz, siendo evidentemente estas condiciones en donde se ve mayormente afectada la estabilidad de imipenem, sin embargo destaca particularmente lo observado al proteger el fármaco de la luz, en donde pese a estar sometido a 35°C durante una hora, este posee una C_{60} por sobre el 95% de C_0 . Por otro lado al evaluar el efecto de la solución en la cual se reconstituye el fármaco, no se logra observar una clara tendencia con respecto al medio en cual imipenem vea favorecida su estabilidad. Se controló el pH de imipenem reconstituido (pH promedio $\approx 5,5$ en suero fisiológico y pH promedio $\approx 4,6$) no registrándose variaciones a T60 respecto a T0. Lo anteriormente expuesto se ve respaldado al someter los datos a un análisis

factorial 2k, en donde se obtiene que los factores que influyen los resultados son temperatura, exposición a la luz y temperatura con exposición a la luz a la vez, y no así los factores que involucran el tipo de solución.

De cualquier modo el hecho que imipenem no logre mantener su concentración inicial bajo las condiciones de estudio dentro de un lapso de tiempo de 60 minutos, (tiempo en el cual se administra la dosis correspondiente a 1 g del fármaco), es de gran importancia, ya que imipenem pertenece al tipo de antibióticos cuyo mecanismo de acción es tiempo-dependiente. Es decir, su éxito terapéutico está condicionado a mantener concentraciones plasmáticas del antibiótico por encima de la CIM determinada para el microorganismo infectante, durante el mayor tiempo posible inter-dosis; por lo tanto, una menor dosis a la estimada podría tener como consecuencia concentraciones plasmáticas del fármaco por debajo de la CIM o por menos tiempo del estimado. Este hecho eventualmente podría no tan solo tener consecuencias negativas para el paciente (fracaso terapéutico), sino que también a la comunidad, ya que al someter al microorganismo al antibiótico en concentraciones bajo la CIM podría eventualmente desarrollar resistencia al antibiótico, generando un problema del tipo epidemiológico.

En el presente estudio no se detectaron productos de degradación de imipenem en ninguna de las condiciones estudiadas mediante el método utilizado, sin embargo aquello no significa que estos no se encuentren. De acuerdo a la literatura (Mendez R. *et al*, 1991; Smith G.B. *et al*, 1990) el producto de

degradación principal de los carbapenémicos corresponde a la estructura con la apertura del anillo β lactámico (**Figura 5-9**) (Ratcliffe R.W. *et al*, 1989).

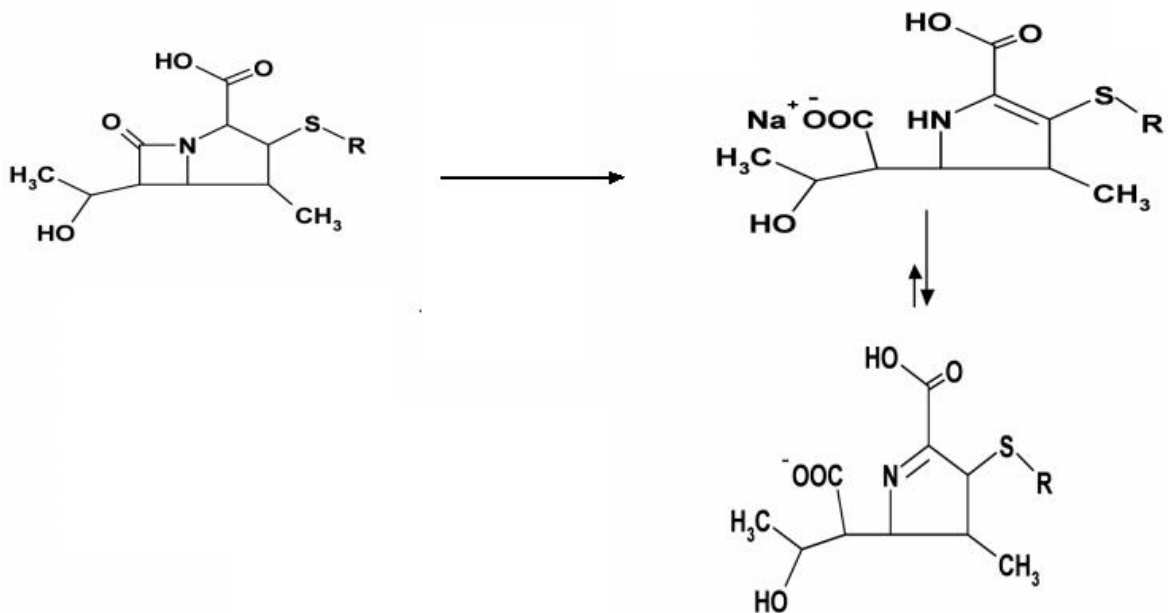


Figura 5-9. Esquema de la principal vía de degradación de los carbapenémicos.

Es probable que este y otros productos de degradación se encuentren presente durante la administración de imipenem por vía endovenosa, por lo que resulta importante la evaluación de posibles efectos tóxicos que alguna de estas estructuras pudiese presentar. En relación a lo anterior y tomando en cuenta que la dosificación utilizada en el presente trabajo es la indicada a pacientes que poseen una infección severa, y que sea causada por organismos menos sensibles a otros antibióticos, es que resulta fundamental estudiar y analizar a futuro cómo una administración sobreestimada de imipenem afecta la efectividad del tratamiento, y las medidas a tomar al respecto para lograr una administración de

imipenem en condiciones en donde se vea favorecida su estabilidad y como la posible administración de productos de degradación de imipenem, pueden repercutir en la seguridad de la terapia antimicrobiana.

Finalmente y de acuerdo a la evidencia del efecto de los factores evaluados y presentes en las condiciones habituales de práctica clínica, es que se recomienda tomar algunas medidas para mejorar las condiciones de administración de imipenem como por ejemplo proteger de la luz durante la administración, y en lo posible, manejar temperaturas ambientales menor a los 35°C. De esta manera podemos aumentar su estabilidad, y por ende mejorar la efectividad y seguridad de la terapia antimicrobiana.

6 CONCLUSIÓN

Se logró la verificación de la metodología analítica para la determinación de imipenem en suero fisiológico y en suero glucosado al 5% mediante HPLC.

Los factores de luminosidad y temperatura en condiciones habituales en la práctica clínica afectan la estabilidad de imipenem durante su administración. Sin embargo el tipo de solución (suero fisiológico o suero glucosado al 5%) no se distingue claramente como un factor determinante en la estabilidad de imipenem.

Las medidas de protección de imipenem a los factores de luz temperatura, favorecen su estabilidad mientras este se administra, incidirían positivamente en la efectividad y seguridad de la terapia antimicrobiana.

La realización de este tipo de estudios por parte del profesional químico farmacéutico permite la compatibilización de dos grandes áreas de su quehacer; ya que otorga una respuesta de tipo analítica a los problemas de prácticas clínicas habituales de administración de antimicrobiano en nuestros hospitales.

7 BIBLIOGRAFIA

- Alvin G, Nord CE. 1995. Adverse effects of monobactams and carbapenems. *Drug Saf*; 12(5): 305-13.
- Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. 1985. Carbapenems, a new class of b-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* 787: 3–21.
- Cuervas-Mons Vendrell M, Fernández Prieto M, Sánchez Sánchez MT, Maestre Fullana MA, Abad Lecha E, Salvador Palacios A, de Frutos Soto A. 2004 Posible validez de los medicamentos termolábiles fuera de las condiciones recomendadas por el fabricante. *Farm Hosp.*; 28(6): 440—4.
- Debesa, Fernández, Pérez. 2004 La caducidad de los medicamentos: justificación de una duda. *Revista Cubana*; 38(3).
- Domínguez-Gil A, Hurle y Suarez M. 1997. Universidad de Salamanca. Curso de determinación de fármacos por HPLC en fluidos biológicos. Salamanca. Pág.: 107.
- Flores J. Farmacología humana. 1998. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. 1061-1083pp.
- Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsushashi M. 1984. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins

(PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot*; 37: 394–400.

- ICH, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference On Harmonization Of Technical Requirements.
- Jackson JJ, Kropp H. 1992. β -Lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. *J Infect Dis* (165): 1033–41.
- Kropp H, Gerckens L, Sundelof JG, Kahan FM. 1985. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. *Rev Infect Dis* (Suppl 3): S389–410
- Livermore D.M. 2002 The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*; 3: 218-24.
- Manual de Procedimiento. Comisión del Codex Alimentarius. 19^o Edición-OMS/FAO
- Mendez R., Alemany T., Martín-Villacorta J. 1991. Catalytic effect of buffers on degradation of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in aqueous solutions. *Chem. Pharm. Bull.*39: 831.
- Merino L., Daffou B., Rojas F., Guerrero I., Roa L., Rodríguez L., Soto M., Aguilera M., Sandoval S. 2010. Guía técnica de los "Aspectos generales sobre la validación de métodos".

- Olivares R. 2013. Desarrollo de métodos cromatográficos para la monitorización farmacocinética de ceftazidima e imipenem en plasma sanguíneo. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso.
- OMS. 2000. Directrices para las pruebas de estabilidad de productos farmacéuticos que contienen sustancias medicamentosas bien establecidas en formas farmacéuticas corrientes. En: Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas: 34° Informe. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; p.71-85. (Serie de Informes Técnicos; No. 863).
- Papp-Wallace KM , Endimiani A , Taracila MA , Bonomo RA . 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrob Agentes Chemother.; 55: 4943-60.
- Quattrochi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S.I., Laba, R. F. 1992. Introducción a HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina. Pag: 301-381.
- Ratcliffe R.W., Wildonger K.J., Michele L.D., Douglas A.W., R. Hajdu, Goegelman R.T., Springer J.P., and J. Hirshfield. 1989. Studies on the structure of imipenem, dehydropeptidase I hydrolyzed imipenem and related analogues. J. Org. Chem.54:653.
- Rodloff A. C., Goldstein E. J., Torres A. 2006. Two decades of imipenem therapy. J. Antimicrob. Chemother. 58: 916–929.

- Sanchez C. 2006. Antibióticos, ayer, hoy y mañana. Revista Química Viva número 2, año 5.
- Seija V, Vignoli R. 2008. Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica.: 631-647.
- Shah PM, Isaacs RD. 2003. Ertapenem, the first of a new carbapenem. J Antimicrob Chemother 2 52: 538-42.
- Smith G.B., Dezeny G.C., Douglas A.W. 1990. Stability and kinetics of degradation of imipenem in aqueous solution. J. Pharm. Sci.79:732.
- Swanson DJ, DeAngelis C, Smith IL, Schentag JJ. 1986. Degradation kinetics of imipenem in normal saline and in human serum. Antimicrob Agents Chemother; 29: 936–937.
- Tune BM. 1994. Renal tubular transport and nephrotoxicity of beta-lactam antibiotics: structure -activity relationships. Miner Electrolyte Metabol; 20(4): 221-31.
- United States Pharmacopeia convention. USP XXXV. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. USP 35/FN30. Estados Unidos. 856-861, 3183-3189.
- United States Pharmacopeia convention. USP XXIX. Validation of compendial methods. 29 ed. Rockville Mag Printing, 2006:1982-4.
- Vidal S. 2007. Evolución del consumo de antibióticos en Chile 2000-2003. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A: linealidad

Tabla 8-1. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-1} en buffer fosfato 0,1 N pH 7.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
0	4,9	4,8	5,2	4,97	0,21	4%
20	24	19,4	20,3	21,23	2,44	11%
40	40,6	41,3	39,9	40,60	0,70	2%
60	48,4	43,5	48,9	46,93	2,98	6%
80	66	56,1	64,7	62,27	5,38	9%
100	110	48,3	114,3	90,87	36,93	41%
200	206	208,5	153,6	189,37	31,00	16%
400	289,6	365,3	336,5	330,47	38,21	12%
600	300,3	441,9	566,3	436,17	133,09	31%

Tabla 8-2. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-1} en suero fisiológico.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
0	3,60	4,30	3,90	3,93	0,35	9%
20	27,30	27,50	24,40	26,40	1,73	7%
40	51,20	50,70	52,10	51,33	0,71	1%
60	74,40	72,10	57,30	67,93	9,28	14%
80	49,20	64,40	105,40	73,00	29,07	40%
100	117,70	102,40	101,40	107,17	9,14	9%
200	172,20	136,06	221,80	176,69	43,05	24%
400	423,20	426,10	442,90	430,73	10,64	2%
600	552,40	766,60	525,90	614,97	131,99	21%

Tabla 8-3. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-1} en suero glucosado.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
0	16,5	15,1	14,6	15,40	0,98	6%
20	33,4	31,5	32,2	32,37	0,96	3%
40	48,8	54,8	50,2	51,27	3,14	6%
60	68,8	63,1	76,7	69,53	6,83	10%
80	88	80,6	86,9	85,17	3,99	5%
100	105,4	103,4	118	108,93	7,92	7%
200	233	228,7	238,2	197,62	49,03	25%
400	392,7	441	377,8	370,38	72,15	19%

Tabla 8-4. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-2} en buffer fosfato 0,1 N pH 7.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
0	7	9,5	6,4	7,63	1,64	22%
20	19,6	24,6	20,1	21,43	2,75	13%
40	36,4	37,2	36,8	36,80	0,40	1%
60	48,4	55,1	41,3	48,27	6,90	14%
80	63,3	67,6	70	66,97	3,39	5%
100	87,4	100,1	79	88,83	10,62	12%
200	182	199,5	120,4	167,30	41,55	25%
400	261,2	332,9	338	310,70	42,94	14%
600	368,9	430,2	443,1	414,07	39,64	10%

Tabla 8-5. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-2} en suero fisiológico.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
0,00	4,30	4,70	4,30	4,43	0,23	5%
20,00	15,30	24,40	32,00	23,90	8,36	35%
40,00	69,00	43,30	38,80	50,37	16,29	32%
80,00	74,30	96,80	51,10	74,07	22,85	31%
100,00	52,90	82,80	58,60	64,77	15,88	25%
200,00	217,90	194,40	218,20	210,17	13,66	6%
400,00	361,80	296,40	401,40	353,20	53,03	15%
600,00	696,70	490,60	308,30	498,53	194,32	39%

Tabla 8-6. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-2} en suero glucosado al 9%.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
0,00	31,30	36,90	27,60	31,93	4,68	15%
20,00	41,90	41,90	49,60	44,47	4,45	10%
40,00	51,20	52,20	56,70	53,37	2,93	5%
60,00	63,30	61,20	74,40	66,30	7,09	11%
80,00	91,40	108,60	51,60	83,87	29,24	35%
100,00	104,10	105,70	97,70	102,50	4,23	4%
200,00	208,40	204,50	146,30	186,40	34,78	19%
400,00	413,10	343,20	383,00	379,77	35,06	9%
600,00	463,70	395,50	686,70	515,30	152,30	30%

Tabla 8-7. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-3} en buffer fosfato 0,1 N pH 7.

Concentración (ppm)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	2,20	2,70	2,90	2,60	0,36	14%
20	17,40	22,40	20,90	20,23	2,57	13%
40	36,70	39,50	40,90	39,03	2,14	5%
60	64,40	60,00	65,40	63,27	2,87	5%
80	81,30	85,00	82,40	82,90	1,90	2%
100	96,70	105,80	100,70	101,07	4,56	5%
200	192,50	196,80	191,50	193,60	2,82	1%
400	439,80	435,60	406,50	427,30	18,14	4%
600	626,90	586,70	630,20	614,60	24,22	4%

Tabla 8-8. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-3} en suero fisiológico

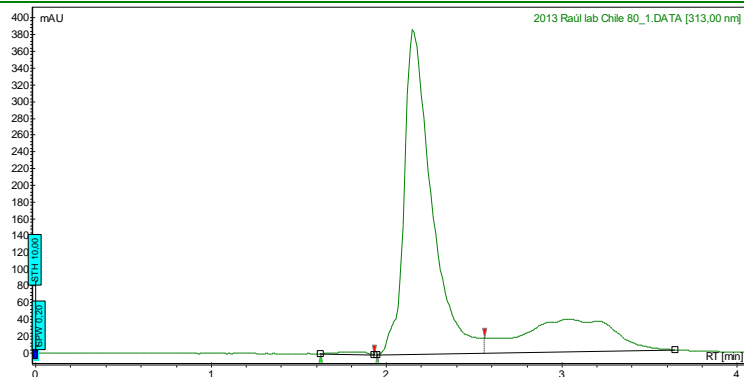
Concentración (ppm)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	7,60	5,30	5,00	5,97	1,42	24%
20	29,00	29,80	29,10	29,30	0,44	1%
40	49,90	49,40	48,60	49,30	0,66	1%
60	77,40	67,70	66,60	70,57	5,94	8%
80	92,60	92,70	92,30	92,53	0,21	0%
100	112,40	104,10	109,80	108,77	4,25	4%
200	277,00	201,50	167,20	215,23	56,17	26%
400	422,40	510,20	439,40	457,33	46,57	10%

Tabla 8-9. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para concentraciones seleccionadas de Imipenem_{LAB-3} en suero glucosado al 5%

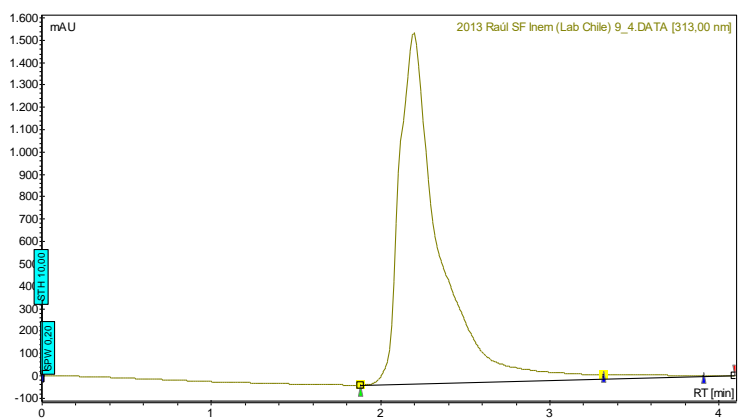
Concentración (ppm)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0,00	18,50	11,70	15,80	13,75	2,90	21%
20,00	33,60	26,10	23,90	25,00	1,56	6%
40,00	30,50	64,70	46,30	55,50	13,01	23%
60,00	79,90	34,40	80,40	57,40	32,53	57%
80,00	96,00	92,40	92,80	92,60	0,28	0%
100,00	103,90	111,10	107,50	109,30	2,55	2%
200,00	231,90	287,20	241,80	264,50	32,10	12%
400,00	482,90	299,90	479,60	389,75	127,07	33%
600,00	734,20	571,20	550,70	560,95	14,50	3%

Tabla 8-10. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a Imipenem_{LAB-1} en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

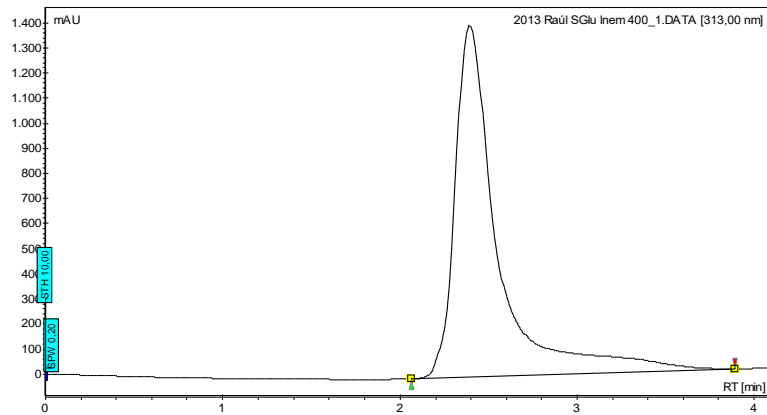
Imipenem_{LAB-1}



Buffer fosfato 0,1 N pH 7



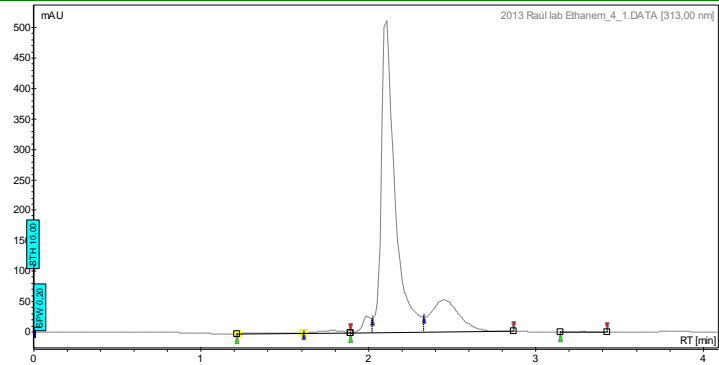
Suero fisiológico



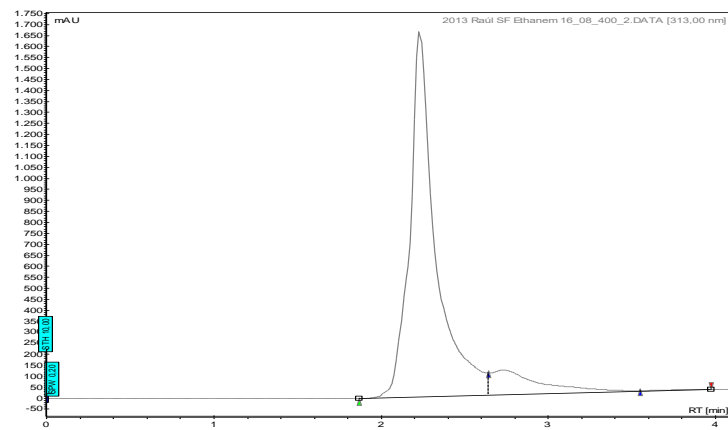
Suero glucosado al 5%

Tabla 8-11. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a Imipenem_{LAB-2} en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

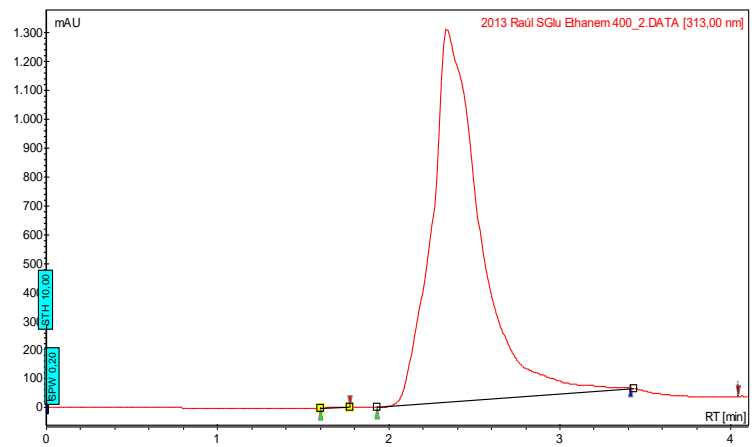
Imipenem_{LAB-2}



Buffer fosfato 0,1 N pH 7



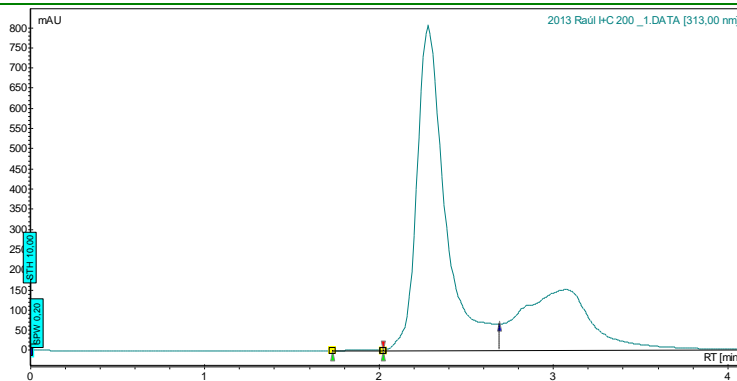
Suero fisiológico



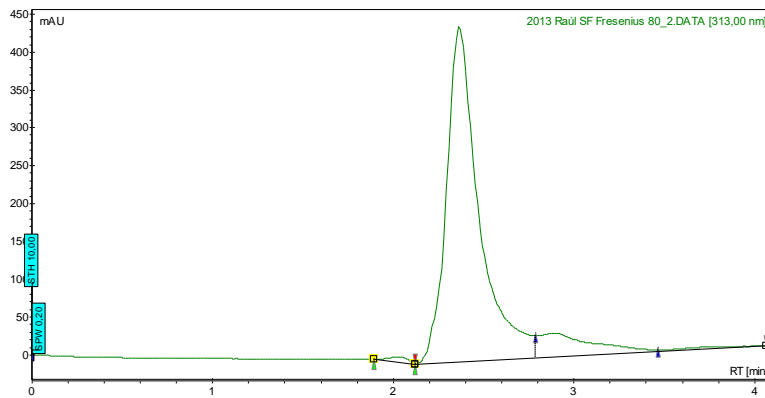
Suero glucosado al 5%

Tabla 8-12. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a Imipenem_{LAB-3} en buffer fosfato 0,1 N pH 7, suero fisiológico y suero glucosado al 5%.

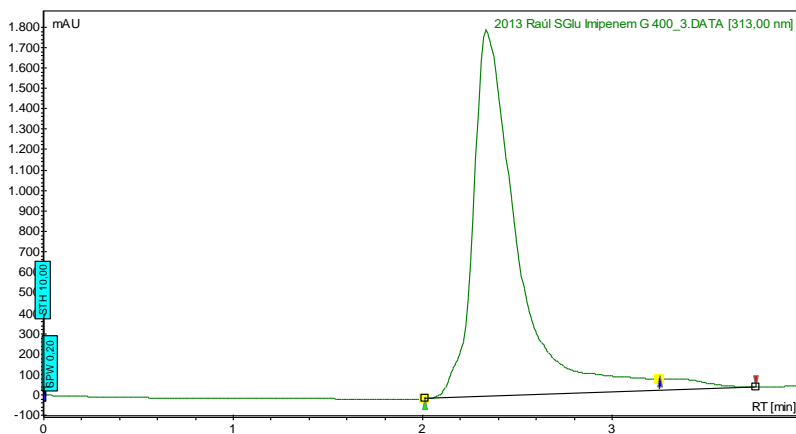
Imipenem_{LAB-3}



Buffer fosfato 0,1 N pH 7



Suero fisiológico



Suero glucosado al 5%

8.2 Anexo B: curva de calibrado Imipenem_{LAB-4}

Tabla 8-13. Curva de calibrado de Imipenem_{LAB-4}

ppm	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0,0	4,8	4,4	4,2	4,5	0,31	7%
20,0	15,9	16,5	15,3	15,9	0,60	4%
40,0	26,9	24,6	25,7	25,7	1,15	4%
60,0	36,6	31,8	36,7	35,0	2,80	8%
80,0	45,5	46,6	40,7	44,3	3,14	7%
100,0	55,6	55,2	54,3	55,0	0,67	1%
200	103,6	104,7	105,1	104,5	0,7767	1%
Pendiente	0,504	0,502	0,482	0,496	0,0118	2%
Intercepto	5,705	4,743	5,362	5,270	0,4875	9%

Tabla 8-14. Curva de calibrado de Imipenem_{LAB-4}

ppm	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0,0	12,6	13,1	11,4	12,4	0,87	7%
20,0	19,9	20,8	22,8	21,2	1,48	7%
40,0	26,2	24,3	23,2	24,6	1,52	6%
60,0	31,8	37,6	33,0	34,1	3,06	9%
80,0	41,1	38,6	37,1	38,9	2,02	5%
100,0	43,9	47,8	46,2	46,0	1,96	4%
200,0	79,100	77,800	80,100	79,0	1,15	1%
Pendiente	0,330	0,323	0,336	0,330	0,0065	2%
Intercepto	12,822	14,043	12,226	13,030	0,9265	7%

8.3 Anexo C: cinética de degradación

Tabla 8-15. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 1.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	61,8	62,6	55,5	59,97	3,89	6%
15	60,5	62,5	56,6	59,87	3,00	5%
30	60,3	56,6	59	58,63	1,88	3%
45	58,9	56,9	62,1	59,30	2,62	4%
60	56,4	60,6	60,4	59,13	2,37	4%

Tabla 8-16. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 2.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	42,5	42,1	39,6	41,40	1,57	4%
15	40,1	40,9	42,7	41,2	1,33	3%
30	43,4	40,6	42	42,0	1,40	3%
45	36,2	42,4	43,9	40,8	4,08	10%
60	40,2	35,4	41,6	39,1	3,25	8%

Tabla 8-17. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 3.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	50,30	51,90	54,5	52,23	2,12	4%
15	53,10	54,40	51,50	53,00	1,45	3%
30	55,10	48,60	53,80	52,50	3,44	7%
45	50,30	56,80	49,80	52,30	3,91	7%
60	50,7	51,20	49,90	50,60	0,66	1%

Tabla 8-18. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 4.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	32,7	32,5	28,2	31,13	2,54	8%
15	29,5	28,6	29,7	29,3	0,59	2%
30	29,8	31,2	28,2	29,7	1,50	5%
45	30,8	28,8	30	29,9	1,01	3%
60	26,9	28,6	28	27,8	0,86	3%

Tabla 8-19. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 5.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	74,9	71,3	67,1	71,10	3,90	5%
15	65	78,4	66,1	69,83	7,44	11%
30	74,1	67,5	66,8	69,47	4,03	6%
45	69,8	67,1	69,6	68,83	1,50	2%
60	66,2	70,4	73,9	70,17	3,86	5%

Tabla 8-20. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 6.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	67,8	66	66,2	66,67	0,99	1%
15	66,1	71,3	63,6	67,00	3,93	6%
30	60,8	69,8	67,8	66,13	4,73	7%
45	67,4	65,8	68,8	67,33	1,50	2%
60	59,2	67,1	71,4	65,90	6,19	9%

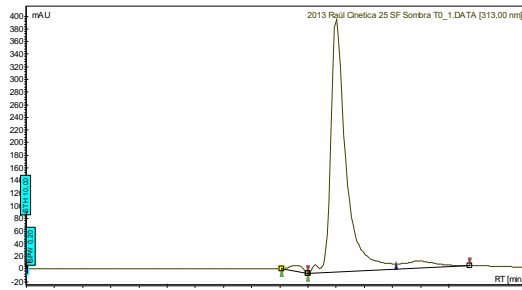
Tabla 8-21. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 7.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	63,6	63,3	64,3	63,73	0,51	1%
15	57,3	61,7	67,6	62,20	5,17	8%
30	61,4	64,5	68,7	64,87	3,66	6%
45	67,8	62,5	62,8	64,37	2,98	5%
60	57,3	61,1	64,8	61,07	3,75	6%

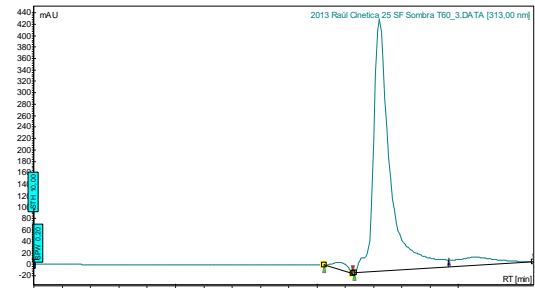
Tabla 8-22. Área bajo la curva promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para condición 8.

Tiempo (min)	area1	area2	area3	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
0	32,9	36,5	31,5	33,63	2,58	8%
15	33,8	35,5	30,8	33,37	2,38	7%
30	29,6	33,4	33,3	32,1	2,17	7%
45	29,7	33,4	35,6	32,9	2,98	9%
60	31,3	29	32,2	30,8	1,65	5%

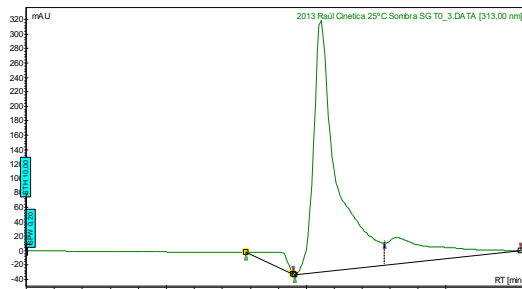
Tabla 8-23. Ejemplos de cromatogramas de la cinética de degradación correspondientes a las condiciones 1, 5, 4 y 8 a T0 y a T60.



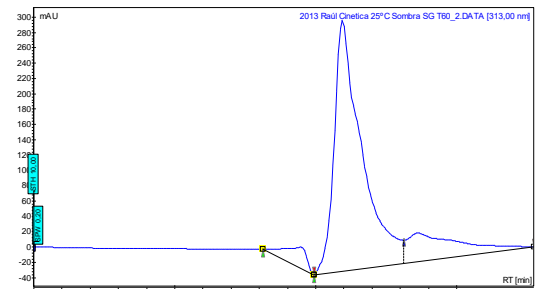
Condición 1 a T0



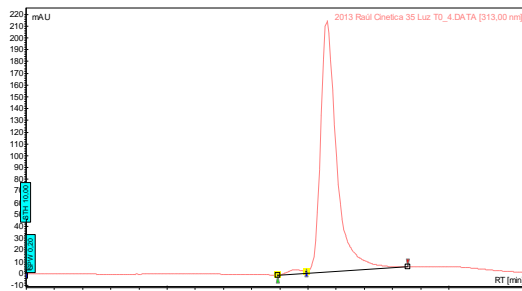
Condición 1 a T60



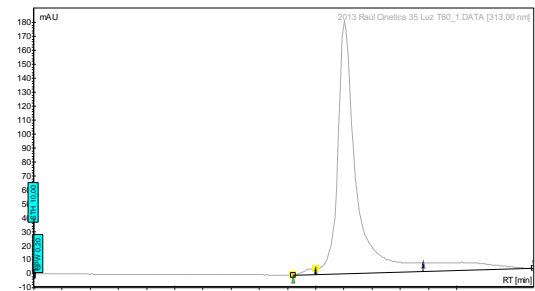
Condición 5 a T0



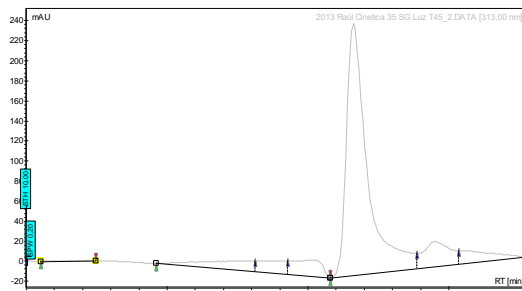
Condición 5 a T60



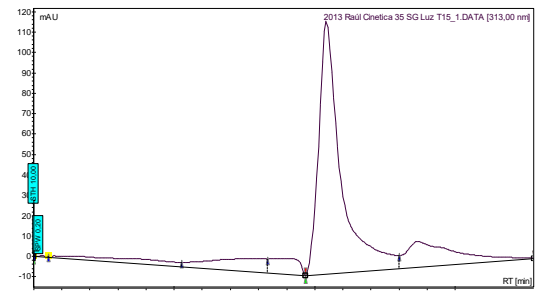
Condición 4 a T0



Condición 4 a T60



Condición 8 a T0



Condición 8 a T60